

2024

ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ

Иллюстрации к статье «Принцип эколого-молекулярного консенсуса в реконструкции филогении микроба чумы *Yersinia pestis*» (автор: В.В. Сунцов) (с. 645–654)

Illustrations for the article “The principle of ecological and molecular consensus in reconstructed plague microbe *Yersinia pestis* phylogeny” (author: Suntsov V.V.) (pp. 645–654)

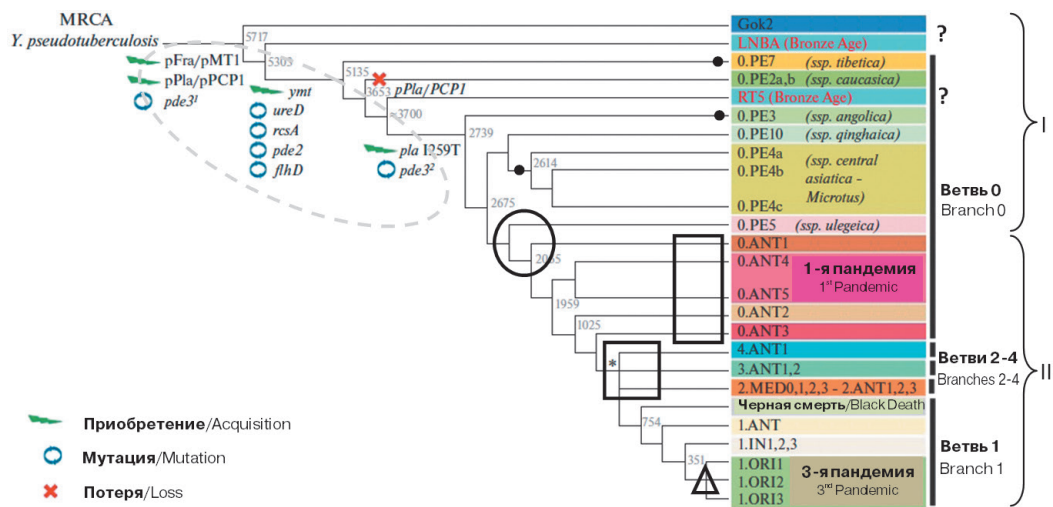


Рисунок 1. Молекулярно-генетическая кладограмма *Yersinia pestis* [21]

Figure 1. *Yersinia pestis* molecular genetic cladogram [21]

Примечание. Экологические несоответствия обозначены значками (объяснения в тексте). ● — сомнительные подвиды. ○ — преобразование «полевкового» подвида в «сурочий» подвид накануне 1-й пандемии. □ — политомия («Big Bang») в популяциях монгольского сурка накануне 2-й пандемии. □□ — геноварианты ветви 0.ANT по МГ данным других авторов [36] входят в узел политомии «Big Bang». △ — формирование «крысиных» геновариантов из «сурочьих» геновариантов в Юньнани. ? — вымирание «археологических» «подвидов» (экологически не обосновано [31]). I — первая волна экспансии «полевковой» чумы. II — вторая волна экспансии «сурочьей» чумы. Пунктирным овалом очерчены генетические «видообразующие» изменения генома псевдотуберкулезного предка микроба чумы.

Note. Environmental discrepancies are indicated by icons (explanations in the text). ● — dubious subspecies; ○ — transformation of the “vole” subspecies (0. PE) into the “marmot” subspecies (0. ANT) on the eve of the 1st pandemic; □ — polytoimy in Mongolian marmot (*Marmota sibirica*) populations on the eve of the 2nd pandemic; □□ — genovariants of the 0. ANT branch according to the MG data of other authors [36] are included in the “Big Bang” polytoimy node. △ — development of “rat” genovariants (1. ORI) from “marmot” genovariants (1. IN) in Yunnan; ? — extinction of “archaeological subspecies” (not justified ecologically [31]). I — the first wave of the expansion of the “vole” plague. II — the second wave of the expansion of the “marmot” plague. The dotted oval outlines genetic “speciation” changes in the genome of the pseudotuberculous ancestor of the plague microbe.

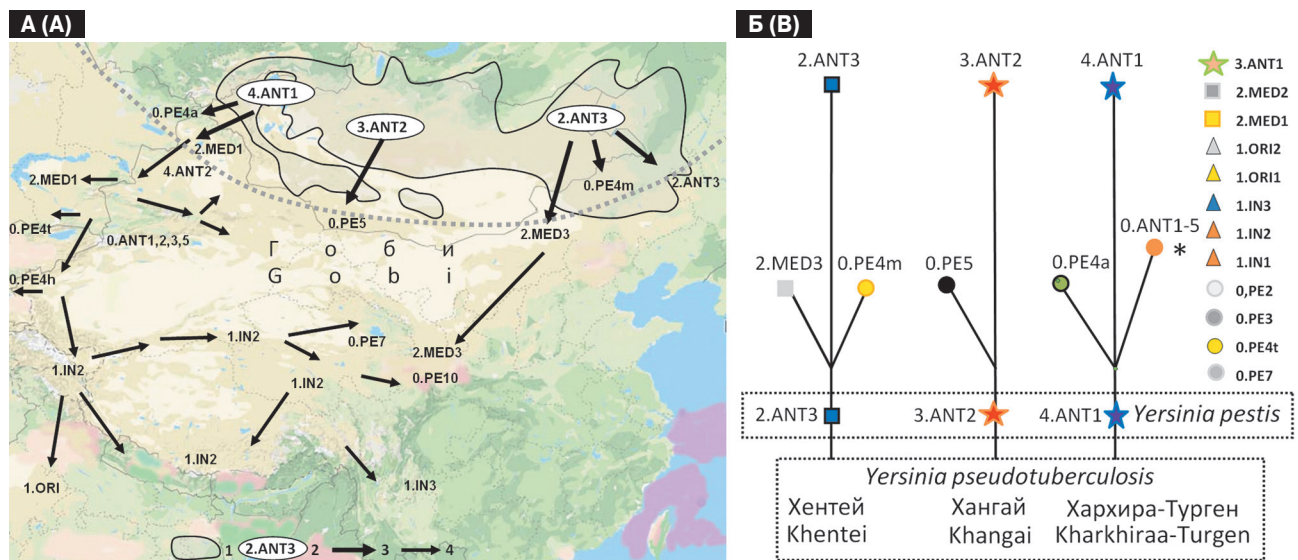


Рисунок 2. Экологический сценарий видообразования и азиатской экспансии возбудителя чумы — микроба *Yersinia pestis*

Figure 2. Ecological scenario of speciation and Asian expansion of the plague causative agent — the microbe *Yersinia pestis*

Примечание. А — маршруты экспансии из районов видообразования [11]. 1 — ареал монгольского сурка. 2 — три исходных геноварианта/подвида возбудителя чумы в трех географических популяциях монгольского сурка. 3 — маршруты распространения сурочьих геновариантов/подвидов в популяции симпатричных с монгольским сурком норových грызунов/пищух. 4 — азиатская экспансия возбудителя чумы с формированием новых геновариантов/подвидов. Точечной линией обозначена южная граница «вечной» мерзлоты. Б — трехкорневое «экологическое» филогенетическое древо (или филогенетическая роща) [14]. * — диверсификация и азиатская экспансия геновариантов.

Note. A — expansion routes from areas of speciation [11]. 1 — the range of the Mongolian marmot. 2 — three primary genovariants/subspecies of plague pathogen in three geographical populations of the Mongolian marmot. 3 — distribution routes of marmot genovariants/subspecies in the population of burrow rodents/pikas sympatric to the Mongolian marmot. 4 — Asian expansion of the causative agent of the plague with the formation of new genovariants/subspecies. The dotted line shows the southern boundary of the “permafrost”. B — three-rooted “ecological” phylogenetic tree (or phylogenetic grove) [14]. * — diversification and Asian expansion of genovariants.

ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ

июль–август

2024, том 14

№ 4

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

Редакционный совет

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

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

Учредители

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Издательство НИИЭМ имени Пастера
197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14.
Тел./факс: (812) 644-63-11.
E-mail: izdatelstvo@pasteurorg.ru

Типография ООО «Аллегро»
196084, Санкт-Петербург,
наб. Обводного канала, 88, литера С,
помещ. 7-Н, оф. 1, 2.
Тел./факс: (812) 388-90-00.

Подписано в печать 28.08.2024 г. Формат 60 x 90 1/8.
Печать офсетная. Усл.-печ. л. 25.
Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.).
Заказ № 1172

© 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)

July–August

2024, volume 14

No. 4

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. Gintzburg** 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 28.08.2024. 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

Сунцов В.В.

**ПРИНЦИП ЭКОЛОГО-МОЛЕКУЛЯРНОГО КОНСЕНСУСА В РЕКОНСТРУКЦИИ ФИЛОГЕНИИ
МИКРОБА ЧУМЫ *YERSINIA PESTIS* 645**

Раевская Н.М., Никитина Т.Н., Симбирцев А.С., Соловьева И.Л., Волгин А.Р., Коровкин А.С.

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ВАКЦИН ПРОТИВ ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ 655

Лелехова С.А., Григорьев Г.Е., Курганский И.С.

**НОВЫЕ ПЕРСПЕКТИВНЫЕ АНТИСЕПТИКИ ДЛЯ ИНДИВИДУАЛЬНОЙ АНТИВИРУСНОЙ ЗАЩИТЫ
ПРИ СЕЗОННЫХ ИНФЕКЦИЯХ, ВКЛЮЧАЯ COVID-19 672**

Оригинальные статьи

Алексеева А.Е., Бруснигина Н.Ф., Махова М.А.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ КАРБАПЕНЕМ-УСТОЙЧИВЫХ ШТАММОВ *ACINETOBACTER BAUMANNII* 681

Ильинских Е.Н., Воронкова О.В., Решетова А.В., Хасанова Р.Р., Есимова И.Е., Чернышов Н.А., Ямпольская О.В., Ямпольская А.В., Поломошнова Е.М., Минакова Е.В.

**ОЦЕНКА СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА ЛИМФОЦИТОВ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ
И ИНДУЦИРОВАННОЙ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОМ ЦИТОКИНСЕКРЕТОРНОЙ АКТИВНОСТИ
В КУЛЬТУРАХ МОНОНУКЛЕАРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ БОЛЬНЫХ С ЛИХОРАДОЧНОЙ
И МЕНИНГЕАЛЬНОЙ ФОРМАМИ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА 690**

Побежимова О.О., Жестков А.В., Лямин А.В., Решетникова В.П., Ерещенко А.А., Алексеев Д.В.

**ОЦЕНКА КОРРЕЛЯЦИИ БИОЛОГИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ МИКРОБИОТЫ РОТОГЛОТКИ
СО СТЕПЕНЬЮ ТЯЖЕСТИ И ЧАСТОТОЙ ОБОСТРЕНИЙ У ПАЦИЕНТОВ С АТОПИЧЕСКИМ ДЕРМАТИТОМ 701**

Харченко Е.П.

ОСОБЕННОСТИ ГЕНОВ ГЕМАГГЛЮТИНИНА ВИРУСОВ ГРИППА И ВОЗМОЖНОСТИ ИХ РЕКОДИРОВАНИЯ 709

Даренская М.А., Казанцева Е.Д., Петрова А.Г., Рычкова Л.В., Колесников С.И., Семенова Н.В., Курашова Н.А., Лесная А.С., Шолохов Л.Ф., Колесникова Л.И.

**ГРИПП И НЕГРИППОЗНЫЕ ОРВИ У ДЕТЕЙ. ВЗАИМОСВЯЗЬ ПРОФИЛЯ ЦИТОКИНОВ,
ПАРАМЕТРОВ СИСТЕМЫ «ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ – АНТИОКСИДАНТНАЯ ЗАЩИТА»
С КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫМИ ПОКАЗАТЕЛЯМИ 719**

Костарев С.Н., Серета Т.Г.

ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ ЛЕЙКОЦИТАРНОЙ ФОРМУЛЫ КРОВИ В ПЕРИОД ПАНДЕМИИ 731

Агарков Н.М., Якунченко Т.И., Охотников О.И., Макконен К.Ф., Алымова М.В.

**ВЛИЯНИЕ НОВОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ НА ПОКАЗАТЕЛИ ГЕМОГРАММЫ В РАННЕМ ПЕРИОДЕ
ВЫЗДОРОВЛЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА 740**

Жданова Е.В., Рубцова Е.В., Костоломова Е.Г.

ДИНАМИКА РЕЗИСТЕНТНОСТИ ОРГАНИЗМА В ПОСТКОВИДНОМ ПЕРИОДЕ 747

Зурочка А.В., Добрынина М.А., Сафронова Э.А., Зурочка В.А., Зуйкова А.А., Сарапульцев Г.П.,
Забков О.И., Мосунов А.А., Верховская М.Д., Дукардт В.В., Фомина Л.О., Костоломова Е.Г.,
Останкова Ю.В., Кудрявцев И.В., Тотолян А.А.

**НАРУШЕНИЯ Т-КЛЕТОЧНОГО ЗВЕНА ИММУНИТЕТА ЧЕРЕЗ 6–12 МЕСЯЦЕВ ПОСЛЕ ОСТРОЙ ФАЗЫ
КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ: СКРИНИНГОВОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ 756**

Костинов М.П., Настаева Н.Ю., Никитюк Н.Ф., Машилов К.В., Хасанова А.А., Соловьева И.Л., Андреева Н.П.,
Ли Ю.А., Полищук В.Б., Линок А.В., Локтионова М.Н., Костинова А.М., Храпунова И.А.

**ПОСТВАКЦИНАЛЬНЫЙ ИММУНИТЕТ И ЧАСТОТА ПНЕВМОНИЙ У МЕДИЦИНСКИХ РАБОТНИКОВ
ПОСЛЕ ПРИМЕНЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ СХЕМ ВАКЦИНАЦИИ ПРОТИВ ГРИППА МЕЖДУ 1 И 2 ПИКАМИ
ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ COVID-19 769**

Масуми-Асл Х., Натегян А., Барадаран Х.Р., Джафари Э., Азизян Р., Фарамарзи М.

ИММУНОГЕННОСТЬ И БЕЗОПАСНОСТЬ ВАКЦИНЫ DTPW-НЕР В-Н1В (PRP-T) (ПЕНТАВАК) У МЛАДЕНЦЕВ В ВОЗРАСТЕ 2–7 МЕСЯЦЕВ: КЛИНИЧЕСКОЕ ИСПЫТАТЕЛЬНОЕ ПОСТМАРКЕТИНГОВОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ 4 ФАЗЫ	781
--	------------

Парьяти С.П.Ю., Рамадханти Ш., Хасан Х.

ОЦЕНКА ТИТРА АНТИТЕЛ ПОСЛЕ АНТИИДИОТИПНОЙ ВАКЦИНАЦИИ ПРОТИВ БЕШЕНСТВА С АДЪЮВАНТОМ НАНОХИТОЗАНОМ	788
---	------------

Давыденко В.С., Останкова Ю.В., Щемелев А.Н., Серикова Е.Н., Тотолян А.А.

ХАРАКТЕРИСТИКА БЕЛКОВОГО ПРОФИЛЯ ВИЧ У ПАЦИЕНТОВ С ВПЕРВЫЕ ВЫЯВЛЕННОЙ ИНФЕКЦИЕЙ	795
--	------------

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

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ ТЕРМОТОЛЕРАНТНЫХ <i>SAMPYLOBACTER</i> spp., ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ЛЮДЕЙ И ПТИЦ В РЕСПУБЛИКЕ ГВИНЕЯ	809
--	------------

Краткие сообщения

Рябенко Ю.Н., Рябенко Э.Б.

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ОПИСТОРХОЗА	816
---	------------

Скупневский С.В., Савельев Р.В.

СЕРОТОНИН И АДРЕНАЛИН КАК ИНГИБИТОРЫ ОБРАЗОВАНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛОВУШЕК НЕЙТРОФИЛОВ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ	823
---	------------

Видманова М.В.

ЛАБОРАТОРНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ СЕРОМОНИТОРИНГА ПОСТВАКЦИНАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА ПРОТИВ КОКЛЮША	827
---	------------

Правила для авторов	833
----------------------------------	------------

Авторский указатель	836
----------------------------------	------------

Предметный указатель	836
-----------------------------------	------------

CONTENTS

Reviews

Suntsov V.V.

**THE PRINCIPLE OF ECOLOGICAL AND MOLECULAR CONSENSUS IN RECONSTRUCTED PLAGUE MICROBE
YERSINIA PESTIS PHYLOGENY** 645

Raevskaya N.M., Nikitina T.N., Simbirtsev A.S., Soloveva I.L., Volgin A.R., Korovkin A.S.

PROSPECTIVES OF DEVELOPING THERAPEUTIC HPV VACCINES 655

Lepekhova S.A., Grigor'ev G.E., Kurganskiy I.S.

**NEW PROMISING ANTISEPTICS FOR INDIVIDUAL ANTIVIRAL PROTECTION AGAINST SEASONAL
INFECTIONS INCLUDING COVID-19** 672

Original articles

Alekseeva A.E., Brusnigina N.F., Makhova M.A.

GENETIC PROFILE OF CARBAPENEM-RESISTANT ACINETOBACTER BAUMANNII STRAINS 681

*Ilyinskikh E.N., Voronkova O.V., Reshetova A.V., Hasanova R.R., Esimova I.E., Chernyshov N.A., Yampolskaya O.V.,
Yampolskaya A.V., Polomoshnova E.M., Minakova E.V.*

**EVALUATING PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTE SUBSET COMPOSITION AND LIPOPOLYSACCHARIDE-
INDUCED CYTOKINE SECRETORY ACTIVITY IN MONONUCLEAR LEUKOCYTE CULTURES FROM PATIENTS
WITH FEBRILE AND MENINGEAL FORMS OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS** 690

Pobezhimova O.O., Zhestkov A.V., Lyamin A.V., Reshetnikova V.P., Ereshchenko A.A., Alekseev D.V.

**ASSESSED CORRELATION BETWEEN BIOLOGICAL DIVERSITY OF OROPHARYNGEAL MICROBIOTA
AND ATOPIC DERMATITIS SEVERITY AND EXACERBATIONS** 701

Kharchenko E.P.

FEATURES OF INFLUENZA VIRUS HEMAGGLUTININ GENES AND THEIR RECODING POSSIBILITIES 709

*Darenskaya M.A., Kazantseva E.D., Petrova A.G., Rychkova L.V., Kolesnikov S.I., Semenova N.V., Kurashova N.A.,
Lesnaya A.S., Sholokhov L.F., Kolesnikova L.I.*

**INFLUENZA AND NON-INFLUENZA ARVI IN CHILDREN. A RELATIONSHIP BETWEEN CYTOKINE PROFILE,
PARAMETERS OF THE "LIPID PEROXIDATION – ANTIOXIDANT DEFENSE SYSTEM" AS WELL AS CLINICAL
AND LABORATORY INDICATORS** 719

Kostarev S.N., Sereda T.G.

ALTERED LEUKOCYTE BLOOD COUNT IN COVID-19 PANDEMIC PERIOD 731

Agarkov N.M., Yakunchenko T.I., Okhotnikov O.I., Makkonen K.F., Alymova M.V.

**THE EFFECT OF A NEW CORONAVIRUS INFECTION ON HEMOGRAM PARAMETERS IN THE EARLY
CONVALESCENCE PERIOD OF PATIENTS WITH CORONARY HEART DISEASE** 740

Zhdanova E.V., Rubtsova E.V., Kostolomova E.G.

HUMAN BODY RESISTANCE DYNAMICS IN THE POST-COVID PERIOD 747

*Zurochka A.V., Dobrynina M.A., Safronova E.A., Zurochka V.A., Zuikova A.A., Sarapultsev G.P., Zabkov O.I.,
Mosunov A.A., Verkhovskaya M.D., Ducardt V.V., Fomina L.O., Kostolomova E.G., Ostankova Yu.V.,
Kudryavtsev I.V., Totolian A.A.*

**ALTERATIONS IN T CELL IMMUNITY OVER 6–12 MONTHS POST-COVID-19 INFECTION IN CONVALESCENT
INDIVIDUALS: A SCREENING STUDY** 756

*Kostinov M.P., Nastaeva N.Yu., Nikityuk N.F., Mashilov K.V., Khasanova A.A., Soloveva I.L., Andreeva N.P., Li Yu.A.,
Polishchuk V.B., Linok A.V., Loktionova M.N., Kostinova A.M., Khrapunova I.A.*

**POST-VACCINATION IMMUNITY AND PNEUMONIA INCIDENCE IN MEDICAL WORKERS IN RESPONSE
TO VARIOUS FLU VACCINATION REGIMENS BETWEEN THE 1st AND 2nd PEAKS OF COVID-19 MORBIDITY** 769

Masoumi-Asl H., Nateghian A., Baradaran H.R., Jafari E., Azizian R., Faramarzi M.

IMMUNOGENICITY AND SAFETY OF DTPW-HEPB-HIB (PRP-T) VACCINE (PENTAVAC) IN INFANTS AGED 2–7 MONTHS: A POST MARKETING PHASE 4 CLINICAL TRIAL STUDY	781
--	------------

Paryati S.P.Y., Ramadhanti S., Hasan K.

ANTIBODY TITER AFTER ANTI-IDIOTYPE RABIES VACCINATION WITH NANO-CHITOSAN ADJUVANT	788
--	------------

Davydenko V.S., Ostankova Yu.V., Shchemelev A.N., Serikova E.N., Totolian A.A.

HIV PROTEIN PROFILE CHARACTERISTICS IN PATIENTS WITH FIRST-TIME DETECTED INFECTION	795
---	------------

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

PREVALENCE AND ANTIBIOTICS SUSCEPTIBILITY OF THERMOTOLERANT <i>CAMPYLOBACTER</i> spp. ISOLATED FROM HUMANS AND CHICKENS IN THE REPUBLIC OF GUINEA	809
--	------------

Short communications

Ryabenko Yu.N., Ryabenko E.B.

OPISTHORCHIASIS-RELATED TOPICAL ISSUES	816
---	------------

Skupnevskii S.V., Saveljev R.V.

SEROTONIN AND ADRENALINE AS INHIBITORS OF NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS FORMATION (EXPERIMENTAL STUDY)	823
--	------------

Vidmanova M.V.

LABORATORY SUPPORT FOR SEROMONITORING OF ANTI-PERTUSSIS POST-VACCINATION IMMUNITY	827
--	------------

Instructions to Authors	833
--------------------------------------	------------

Author index	836
---------------------------	------------

Subject index	836
----------------------------	------------

ПРИНЦИП ЭКОЛОГО-МОЛЕКУЛЯРНОГО КОНСЕНСУСА В РЕКОНСТРУКЦИИ ФИЛОГЕНИИ МИКРОБА ЧУМЫ *YERSINIA PESTIS*

В.В. Сунцов

Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва, Россия

Резюме. Во второй половине XX века усилиями ученых многих стран была сформулирована стройная теория природной очаговости чумы (ТПОЧ, sylvatic plague), в которой предпринималась попытка описать историю происхождения и эволюции возбудителя этой инфекции — микроба *Yersinia pestis*. Но накопленные знания в этом отношении оставались крайне ограниченными. Методы филогенетических построений в догеномное время с точки зрения современной филогенетики были достаточно примитивными, «ручными», свойственными ранней эмпирико-интуитивной геккелевской филогенетике. Внедрение с началом XXI века геномных методологий в изучение возбудителя чумы позволило детально описать внутривидовое разнообразие (подвидов, геновариантов) этого особо опасного патогена на уровне географических и местных популяций (отдельных природных очагов) по всему миру и довести диагностику и описание внутривидового разнообразия до высокой степени совершенства. Были сделаны два важных открытия. Во-первых, был надежно установлен прямой предок чумного микроба, им оказался возбудитель кишечной инфекции — дальневосточной скарлатиноподобной лихорадки (*Y. pseudotuberculosis* O:1b). Во-вторых, была показана эволюционная молодость возбудителя чумы, «молекулярные часы» показали время его дивергенции от предковой популяции не ранее 30 тыс. лет назад. Таким образом, был полноценно охарактеризован корень филогенетического древа *Y. pestis*. Тем не менее молекулярно-генетические (МГ) достижения пока не позволяют раскрыть секреты его филогенеза — происхождения и последовательности мировой экспансии. В качестве важнейшей причины видится высокая зависимость МГ реконструкций филогенеза от выбора модели эволюции анализируемых признаков: традиционно принимают модель нейтральной эволюции, но ее адекватность в отношении филогении *Y. pestis* ставится под сомнение многими известными экологическими (в широком понимании) фактами. В то же время МГ достижения способствовали созданию экологического (ЭКО) подхода, опирающегося на положения теории природной очаговости чумы в обновленной версии, в соответствии с которой возбудитель чумы является эволюционно молодым патогенном, произошедшим от психрофильного псевдотуберкулезного предка. Презумптивный ЭКО сценарий не имеет очевидных естественно-научных и исторических противоречий и может служить нуль-гипотезой для совершенствования МГ методологии филогенетических построений чумного микроба и других подобных микроорганизмов. Высказывается мнение, что создание реальной филогении чумного микроба возможно только на основе интеграции МГ и ЭКО подходов.

Ключевые слова: *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia pestis*, филогения, молекулярные маркеры, экологические признаки, внутривидовая диверсификация.

Адрес для переписки:

Сунцов Виктор Васильевич
119071, Россия, Москва, Ленинский пр., 33,
Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН.
Тел.: 8 (985) 171-89-04.
E-mail: vvsuntsov@rambler.ru

Contacts:

Viktor V. Suntsov
119071, Russia, Moscow, Leninsky pr., 33, A.N. Severtsov Institute
of Problems of Ecology and Evolution of RAS.
Phone: +7 (985) 171-89-04.
E-mail: vvsuntsov@rambler.ru

Для цитирования:

Сунцов В.В. Принцип эколого-молекулярного консенсуса в реконструкции филогении микроба чумы *Yersinia pestis* // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 4. С. 645–654. doi: 10.15789/2220-7619-TPO-17601

Citation:

Suntsov V.V. The principle of ecological and molecular consensus in reconstructed plague microbe *Yersinia pestis* phylogeny // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 4, pp. 645–654. doi: 10.15789/2220-7619-TPO-17601

© Сунцов В.В., 2024

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-TPO-17601>

THE PRINCIPLE OF ECOLOGICAL AND MOLECULAR CONSENSUS IN RECONSTRUCTED PLAGUE MICROBE *YERSINIA PESTIS* PHYLOGENY

Suntsov V.V.

A.N. Severtsov Institute of Problems of Ecology and Evolution of Russian Academy of Science, Moscow, Russian Federation

Abstract. In the second half of the 20th century, through the efforts of scientists from many countries, a coherent theory of natural plague foci (sylvatic plague) was formulated, attempted to describe the history of the origin and evolution of the causative agent of plague infection, the microbe *Yersinia pestis*. But the accumulated knowledge in this regard remained extremely limited. Envisioned by the modern phylogenetics, the methods of phylogenetic constructions in the pregenomic time were rather primitive, “manual”, characteristic of early empirico-intuitive Haeckel phylogenetics. Since the beginning of the 21st century, the introduction of genomic methodologies in the study of the plague pathogen allowed to detail the intraspecific diversity (subspecies, genovariants) of this particularly dangerous pathogen at the level of geographical and local populations (individual natural foci) around the world and to bring the diagnostics and description of intraspecific diversity to a high degree of perfection. Two important discoveries were made. First, the direct ancestor of the plague microbe was reliably established, it turned out to be the causative agent of intestinal infection — Far Eastern scarlet-like fever (*Y. pseudotuberculosis* 0:1b). Secondly, the evolutionary youth of the plague pathogen was shown, the “molecular clock” showed the time of its divergence from the ancestral population no earlier than 30 thousand years ago. Thus, the root of the phylogenetic tree of *Y. pestis* was fully characterized. Nevertheless, molecular genetic (MG) achievements do not yet allow to reveal the secrets of its phylogeny, i.e. the origin and sequence of world expansion. The most important reason is the high dependence of the MG of phylogeny reconstructions on the choice of evolutionary model for the analyzed characters: the model of neutral evolution is traditionally accepted, but its adequacy in relation to *Y. pestis* phylogeny is questioned by many well-known ecological (in the broad sense) facts. At the same time, MG achievements contributed to the creation of an ecological (ECO) approach based on the provisions of the theory of natural plague foci in an updated version, according to which the plague pathogen is an evolutionarily young pathogen descended from a psychrophilic pseudotuberculous ancestor. The presumptive ECO scenario has no obvious natural-scientific and historical contradictions and can serve as a null hypothesis for improving the MG methodology of phylogenetic constructions for plague and other similar microbes. It is suggested that the creation of a real phylogeny of the plague microbe is possible only based on integration of MG and ECO approaches.

Key words: *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia pestis*, phylogeny, molecular markers, ecological traits, intraspecific diversification.

Введение

Возбудитель чумы — микроб *Yersinia pestis* — был открыт А. Йерсином в Гонконге в начале 3-й пандемии в 1894 г. Это стало началом глубокого всестороннего изучения чумной инфекции и ее возбудителя. Через несколько лет, в 1898 г., российский бактериолог Д.К. Заболотный, изучая вспышку чумы в северо-восточном Китае, пришел к выводу, что чума является болезнью диких норových грызунов. Во второй половине XX века усилиями ученых многих стран была сформулирована стройная теория природной очаговости чумы (ТПОЧ, sylvatic plague), в которой предпринималась попытка описать историю происхождения и эволюции возбудителя этой инфекции. Но накопленные знания в этом отношении оставались крайне ограниченными. Методы филогенетических построений в догеномное время с точки зрения современной филогенетики были достаточно примитивными, «ручными», свойственными ранней эмпирико-интуитивной геккелевской филогенетике. Отсутствовали три основных требования для построения филогений: не были установлены анализируемые признаки, не разработаны модели эволюции этих признаков и методы анализа признаков. Предпринимались лишь редкие

попытки интерпретировать историю возбудителя чумы на основе имеющихся в медицинской и биологической науках общих теоретических и фактологических знаний. Об истории возбудителя судили по таким естественнонаучным фактам, как географическое распространение очагов чумы в мире; ландшафтное распространение очагов в аридных горных районах, степях, полупустынях и пустынях; устойчивость циркуляции микроба в популяциях норových грызунов, на которых паразитируют в обилии блохи; палеогеографическое распространение норových грызунов; чувствительность к возбудителю чумы основных хозяев микроба в природе и т. д. Выявленные факты анализировались, сопоставлялись, состыковывались и складывались в «филогенетические пазлы». Такие филогенетические конструкторы стали основой общепринятой идеи о происхождении чумы в глубокой древности, в олигоцене-плиоцене, 30–3 млн лет назад [5, 7, 22, 35]. Высокое морфологическое и биохимическое сходство с кишечными микробами семейства *Yersiniaceae* (*Enterobacteriaceae*), в частности с возбудителем псевдотуберкулеза (*Y. pseudotuberculosis*), послужило доводом к утверждению о его формировании из какого-то псевдотуберкулезоподобного предка, обитающего в пищеварительном трак-

те грызунов или паразитирующих на них блох. Формирование чумного микроба, согласно положениям классической версии ТПОЧ, произошло в процессе длительной коэволюции с хозяевами-грызунами и переносчиками-блохами или в Новом Свете в популяциях (пра)сурков (*Marmotini*), или в Старом Свете в популяциях песчанок (*Gerbillinae*). Расширение внутривидового разнообразия связывали с распространением возбудителя из центра видообразования грызунами-хозяевами по регулярно возникавшим в геологическое время Берингийскому, Синайскому и Панамскому межконтинентальным сухопутным мостам и с коэволюцией и гостальной специализацией в популяциях новых норových хозяев, встреченных на маршрутах экспансии.

Развитие геномики и молекулярно-генетических (МГ) методов на рубеже XX–XXI веков и их внедрение в инфектологию чумы привели к двум краеугольным открытиям, которые внесли существенные изменения в положения классической ТПОЧ. Во-первых, вопреки представлениям о глубокой древности чумы, молекулярными методами была установлена эволюционная молодость ее возбудителя. «Молекулярные часы» показали время его возникновения не ранее 30 тыс. лет назад, то есть на рубеже плейстоцена и голоцена или в голоцене [18, 28]. Отсюда стало понятным, что видообразовательный процесс прошел в (почти) современной биогеоэкологической обстановке, когда уже существовали современные виды хозяев и переносчиков возбудителя и аридные ландшафты в географических границах современных природных очагов. При этом следует заметить, что любой видообразовательный процесс проходит при изменении среды обитания (популяции) исходного вида или его внедрении в новую среду, то есть в новую экологическую нишу. Поэтому важно было выяснить, какие изменения в абиотической и/или биотической среде обитания популяции (клона) энтеропатогенного предка могли привести к недавнему, (почти) современному возникновению популяции производного «кровавого» обитателя — возбудителя чумы, где и при каких обстоятельствах проходил процесс перехода предковой популяции из пищеварительного тракта в лимфомиелоидный комплекс грызунов? Ответ на эти вопросы является прерогативой экологии (в широком понимании). Высказывались неаргументированные предположения [17, 38], что изменения в поведении грызунов могли привести к регулярному заражению крови возбудителем псевдотуберкулеза и передаче инфекции через укусы блох.

Во-вторых, генетическими методами, изучением O-антигена, был установлен бес-

спорный прямой предок чумного микроба — психрофильный возбудитель дальневосточной скарлатиноподобной лихорадки (ДСЛ), псевдотуберкулезный микроб 1-го серотипа *Y. pseudotuberculosis* 0:1b [23, 30]. Этот кишечный патоген распространен среди широкого круга беспозвоночных и позвоночных животных в холодных районах Азии [8, 25]. Отсюда можно было сделать заключение, что видообразование чумного микроба из клона возбудителя ДСЛ прошло в не столь отдаленном историческом времени в Центральной Азии, где возбудитель ДСЛ обычен и где расположены «замороженные» (по выражению И.Г. Иоффа [8]) природные очаги чумы. Наиболее вероятно микроб чумы появился в Монголии с ее ультраконтинентальным климатом или в ближайшем к ней окружении [11, 13]. Это событие, по нашему мнению, изложенному ниже, было связано с наступившим в Северной и Центральной Азии, Сибири и на Дальнем Востоке максимальным (сартанским) похолоданием на рубеже плейстоцена и голоцена (22–15 тыс. лет назад), которое вызвало изменения в структуре биоценозов, формо- и видообразование, смещение границ ареалов животных и растений.

Два выше названных МГ открытия позволили логически увязать многочисленные факты различных научных направлений: экологии, биогеографии, биогеоэкологии, эпизоотологии, палеобиологии, палеоклиматологии, микробиологии, генетики, молекулярной биологии, информатики и других — и создать параллельный к МГ сценариям экологический (в широком понимании) сценарий возникновения и азиатской экспансии нового микробного высокопатогенного вида *Y. pestis*, радикально отличающийся от МГ сценариев [11, 12]. В настоящей статье высказывается мнение, что для создания достоверной непротиворечивой филогении чумного микроба важны надежные факты, представляемые любыми сценариями, и эти сценарии должны быть приведены к единому консенсусу, за основу которого следует принять менее противоречивый экологический сценарий.

Молекулярно-генетический подход

В настоящее время в филогенетике чумного микроба доминирует МГ подход. Наиболее популярные филогенетические схемы представляют чаще в виде дендрограмм или кладограмм [18, 20, 21, 27, 28, 29]. Методология МГ филогенетических исследований включает различные признаки, модели и методы [1, 33]. Наибольшую популярность приобрела методология, опирающаяся на SNP-признаки, теорию нейтральной эволюции как базовую теорети-

ческую основу филогенетических реконструкций *Y. pestis* и статистические методы анализа признаков — максимального правдоподобия и Байеса. В целом МГ методология реконструкции истории чумного микроба использует приемы, применяемые при реконструкции историй (филогений) высших таксонов ранга вида и выше, когда вид-основатель, а тем более исходный подвид (популяция) основателя, как правило, не выявлен. Но вид-основатель чумного микроба доподлинно известен, и филогения чумного микроба — это история его видообразования и внутривидовой диверсификации, история формирования подвидов — низших таксономических групп. То есть это предмет филогеографических исследований, имеющих несколько отличную от филогенетики методологию. Филогеография оперирует популяционно-экологическими и популяционно-генетическими понятиями, такими как ареал, подвид, географическая популяция, экологическая ниша, непосредственное родство, поток генов и другими. К тому же, в силу своей молодости, компьютерно-стохастические МГ методологии филогенетики пока остаются не вполне совершенными, выводы при использовании различных признаков и методов их анализа заметно различаются, и для оценки реальности предложенных МГ филогений необходима их оценка другими возможными методами. В наиболее ранних филогенетических реконструкциях использовали метод тройного параллелизма Э. Геккеля, включающий морфологический, палеонтологический и эмбриологический подходы. В отношении микроба чумы в МГ подходе для реконструкции филогений использовали разные методы и выбирали разные признаки, например, IS, SNP, VNTR (MLVA), INDELs маркеры [17, 18, 33, 36]. Сопоставление различных приемов исторических реконструкций придает большую убедительность сделанным выводам. В настоящей статье рассмотрим популярную МГ филогенетическую схему, представленную Х. Демером с соавт. [21], и оценим ее параметры в отношении экологической фактологии (рис. 1, II обложка).

Прежде всего следует обратить внимание на внутреннюю противоречивость МГ подхода в построении филогений. Молекулярные и генетические аргументы не имеют логического единства. С точки зрения генетических преобразований видообразование *Y. pestis* рассматривают как сальтационный процесс «горизонтального» внедрения в клетку псевдотуберкулезного предка специфических плазмид вирулентности pFga и pPst из внешней среды или от других микроорганизмов, а также одноактных делеций и инактиваций генов, утерявших функции в новой среде обитания [26, 32].

В таком случае генетические преобразования рассматривают как результат быстрого («in eye blink» [34]) адаптиогенеза. В то же время молекулярные преобразования рассматривают с позиций теории нейтральной эволюции как постепенный стохастический процесс накопления нейтральных мелких мутаций, подверженных случайному дрейфу [18, 28]. При этом, как можно видеть на рис. 1, топологию филогенетического древа выстраивают только на основании статистического анализа нейтральных нуклеотидных изменений. Наличие генетических адаптивных изменений, которые, собственно, привели к возникновению вида *Y. pestis* и всего внутривидового разнообразия, лишь констатируют. Влияние адаптаций на филогению воспринимают как неизбежный «филогенетический шум» (очерчены пунктирным овалом на рис. 1). Игнорирование адаптиогенеза в молекулярных филогенетических реконструкциях чумного микроба стало, по нашему мнению, причиной отсутствия конгруэнтности «молекулярных» и «экологической» филогений.

Двухэтапная азиатская экспансия возбудителя чумы

МГ методами показано, что наиболее древними формами чумного микроба являются «полевковые» подвиды (биовар Pestoides, кластер 0.PE). По нуклеотидной структуре анализируемых маркеров они наиболее близки к псевдотуберкулезному предку. Возбудители «полевковой» чумы проявляют избирательную вирулентность, слабовирулентны по отношению к суркам, сусликам, песчанкам, человеку. Согласно МГ подходу, после возникновения *Y. pestis* (Pestoides) в Азии сначала сформировался ареал «полевковых» очагов 0.PE (рис. 1), и лишь через тысячи лет накануне 1-й пандемии («Чума Юстиниана», 541 г.) возбудитель одного из «полевковых» подвидов в популяциях алтайского сурка (*Marmota baibacina centralis*) на Тянь-Шане приобрел свойство высокой вирулентности и широко распространился в Азии второй волной, сформировав современную зону первичных природных очагов в популяциях многих фоновых норových грызунов. Подобное двухволновое формирование зоны природных очагов чумы в Азии не находит объяснений с экологических, биогеографических и эпизоотологических позиций.

Преобразование «полевкового» подвида в «сурочий» накануне 1-й пандемии

Наиболее молодым среди «полевковых» подвидов называют 0.PE5 (*Y. pestis ulegeica*), характерный для популяций монгольской пещуши (*Ochotona pallasi pricei*) на Монгольском и Гобийском Алтае. Судя по МГ-филогениям,

этот подвид стал предшественником высоко-вирулентных подвидов/геновариантов [20, 21] (рис. 1). Производные от него «сурочки» подвиды, составляющие кластер 0.ANT, встречаются только на Тянь-Шане. Отсюда, согласно «молекулярной» логике, пищуховый подвид 0.PE5 накануне 1-й пандемии проник из Монголии на Тянь-Шань, где закрепился в популяциях алтайского сурка. Позднее из популяций алтайского сурка уже в виде геноварианта 0.ANT1 вновь вернулся в Монголию и освоил три географических популяции монгольского сурка-тарбагана (*M. sibirica sibirica*, *M. sibirica caliginosus* и *M. sibirica* ssp.), преобразовавшись в геноварианты 2.ANT3, 3.ANT2 и 4.ANT1. Подобный реверс возбудителя чумы в монголо-тяньшаньском регионе с экологической и биогеографической точек зрения является совершенным нонсенсом. К тому же появились новые МГ данные [36], что филогенетическую ветвь 0.ANT, как и другие ветви 1.ANT1, 2.ANT3, 3.ANT2 и 4.ANT1, также следует отнести к узлу политомии «Big Bang», а не выделять как более раннюю «сурчиную» ветвь.

Сомнительные подвиды

Методами молекулярной диагностики и систематики конкретизировано внутривидовое разнообразие чумного микроба. Прежде всего, это касается таксономических единиц — подвидов, которые являются эколого-географической категорией: подвид имеет ареал, образованный структурированными популяциями, имеющими определенный эффективный размер. В настоящее время описано более 30 геновариантов (= подвидов) характерных для конкретных природных и антропогенных очагов чумы. Но «молекулярные» «полевковые» подвиды 0.PE7 (*Y. pestis* subsp. *tibetica*), 0.PE3 (*Y. pestis* subsp. *angolica*), 0.PE4 (*Y. pestis* subsp. *central-asiatica*) не соответствуют критериям подвида.

Подвид 0.PE7 считают наиболее древним. Этот подвид представлен лишь двумя штаммами, изолированными в 1960-х гг. на Цинхайском плато в восточном Тибете. Один штамм изолирован в природе от сибирского тушканчика (*Allactaga sibirica*), другой там же от больного человека [20]. При этом природные очаги чумы с основным хозяином сибирским тушканчиком в мире не известны. Заражение человека от тушканчиков или от их блох маловероятно. Источником его заражения, скорее всего, был многочисленный на Цинхайском плато гималайский сурок, являющийся основным хозяином во многих природных очагах Тибета и Гималаев.

Подвид 0.PE3 известен по одному штамму, изолированному от больного человека в Анголе и длительное время хранившемуся в музее

в США [24], поэтому, согласно экологическим оценкам, штамм должен иметь статус лишь индивидуального (не исключено aberrантного) генотипа неизвестного происхождения, но не подвида. Собственно, это замечание касается некоторых других «молекулярных» подвидов/геновариантов.

Подвид 0.PE4 — сборный [27]. Он включает географически разрозненные популяции, характерные для арчевой полевки (*Microtus carruthersi*) на Гиссаре, серебристой полевки (*Alticola argentatus*) на Таласском хребте, монгольской пищухи в Горном Алтае и полевки Брандта (*Lasiopodomys brandti*) в северо-восточном Китае. Объединение географически разрозненных популяций чумного микроба, циркулирующих в очагах с основными хозяевами, принадлежащими к разным родам, семействам и даже отрядам (*Rodentia* и *Lagomorpha*) норových животных, в единый подвид только на основании нуклеотидного сходства выбранных молекулярных маркеров с экологических позиций представляется не корректным: любому подвиду свойственны прямое родство особей, единство ареала и экологических признаков. С экологической точки зрения вполне легитимными следует считать принятые ранее названия четырех отдельных подвидов: 0.PE4h (*Y. pestis hissarica*), 0.PE4t (*Y. pestis talassica*), 0.PE4a (*Y. pestis altaica*) и 0.PE4m (*Y. pestis microtus* = *Y. pestis xilingolensis*). Эти подвиды не имеют прямого родства, формируют парафилетическую (или полифилетическую?) группу подвидов, возникших в разное время в разных географических районах от разных предковых популяций [11, 12, 20]. К тому же, подвид 0.PE4a (*Y. pestis altaica*), характерный для популяций монгольской пищухи в Горном Алтае, на северо-западе Монгольского Алтая (Баян-Ульгейский регион) имеет зону симпатрии с другим пищуховым подвидом 0.PE5 (*Y. pestis ulegeica*) [16]. Возникает вопрос: почему улегейский подвид, обитающий совместно с алтайским в единой популяции хозяина, по МГ признакам не соответствует статусу так называемого «центральноазиатского подвида» *Y. pestis central-asiatica*? Как это могло случиться? Это важный вопрос для сравнительной оценки МГ и ЭКО методов типирования подвидов *Y. pestis*, а также для оценки потока генов в популяциях подвидов 0.PE4a и 0.PE5 и топологии филограмм.

Политомия в популяциях монгольского сурка накануне 2-й пандемии

Все известные МГ филогенетические схемы фиксируют наличие на филогенетическом древе *Y. pestis* политомии (N07, «Big Bang»), имевшей место якобы накануне второй пандемии («Черная смерть», 1346 г.). Политомию образуют

четыре филогенетические ветви (branches 1, 2, 3, 4) (рис. 1), включающие подвиды/геноварианты чумного микроба 1.ANT1, 2.ANT3, 3.ANT2 и 4.ANT1. Два последних геноварианта характерны для очагов чумы в двух географических популяциях монгольского сурка, обитающих на Хангае и на Хархира-Монгун-Тайгинском горном комплексе. Эти географические популяции монгольского сурка семисимпатричны с единой географической популяцией монгольской пищухи (*O. pallasii pricei*). В таком случае с позиций МГ подхода остается необъяснимым, почему из «полевкового» подвида 0.PE5, характерного для пищучьих очагов на Монгольском и/или Гобийском Алтае, сначала образовались сурочьи подвиды/геноварианты в популяциях алтайского сурка на Тянь-Шане (филогенетическая группа 0.ANT) и лишь много позднее они проникли обратно в Монголию, где внедрились в поселения монгольского сурка, образовав три самостоятельных подвида в трех географических популяциях. Возникновение политомии в Средневековье не находит удовлетворительного объяснения в МГ подходе, в то время как экологический сценарий предоставляет вполне достоверное объяснение, по меньшей мере, достойное обсуждения и дальнейшего более глубокого изучения [11, 12]. К тому же новые данные о филогенетической группе 0.ANT свидетельствуют о ее принадлежности, как и геноварианты/подвиды 1.ANT1, 2.ANT3, 3.ANT2 и 4.ANT1, к узлу политомии «Big Bang» [36]. Это снимает необходимость разработки гипотезы о сложном реверсивном транзите чумного микроба в монголо-тяньшанском регионе [11].

Парафилия подвигов «ветви» 0.PE

«Полевковые» подвиды возбудителя чумы, объединенные в кластер 0.PE, считают наиболее древними, и на филогенетическом древе *Y. pestis* их размещают ближе к корню. Некоторые исследователи рассматривают представителей кластера 0.PE как парафилетическую (или даже как полифилетическую) группу, но в то же время включают в единый подвид *Y. pestis microtus (microti)* [4, 6]. Здесь следует заметить, что, согласно определению, представители парафилетических (полифилетических) групп не имеют прямого родства. В то же время подвиды — это монофилетические (голофилетические) группы напрямую родственных форм (популяций, организмов). Таким образом, реального подвида *Y. pestis microtus (sensu [6])*, объединяющего все «полевковые» биовары в единую подвиговую ветвь 0.PE не существует. Из широко известной работы большого авторского коллектива [20] также следует, что все «полевковые» подвиды сформировались в разных географических районах, в популяциях разных основных хозя-

ев, в разное время, поэтому не имеют прямого родства и соответственно не образуют единую древнюю монофилетическую группу 0.PE. Очевиден вывод о гомоплазийном формировании нуклеотидных признаков, указывающих на сходство (но не родство) всех «полевковых» подвигов [16]. Гомоплазийные признаки подлежат специальному рассмотрению в филогенетических построениях.

Формирование «крысиных» геновариантов 1.ORI в Юньнани

Геноварианты филогенетической ветви 1.ORI ответственны за 3-ю пандемию, которая началась в Юго-Восточном Китае во второй половине XIX в. МГ подход предполагает образование этой ветви не ранее 300–400 лет назад от возбудителя ветви 1.IN, циркулирующего в популяциях гималайского сурка (*M. himalayana*) на юго-востоке Тибета (рис. 1) [11, 21, 29, 37]. Основным хозяином геновариантов 1.ORI в очагах Юньнани является желтогрудая крыса (*Rattus flavipectus*). Но в природе на этой крысе, обитающей во влажных субтропических лесах, специфических блох нет (как и на черной крысе *Rattus rattus* на Индостане). В агрозоне и в населенных пунктах на ней паразитирует космополитная блоха Хеопса (*Xenopsylla cheopis*), имеющая африканское происхождение, которая с синантропными крысами проникла на юг Китая (и на Индостан) не ранее середины XIX в. Таким образом, экологические факты свидетельствуют об отсутствии в Юньнани природных крысиных очагов чумы. Анализ экологических данных приводит к вполне обоснованной гипотезе, что ветвь 1.ORI сформировалась не в Юньнани в последние века в популяциях диких или синантропных крыс, а в раннем или среднем голоцене на Индостане в популяциях индийской песчанки (*Tatera indica*) [11].

Вымирание «археологических» «подвигов»

В Европе в останках человеческих жертв предполагаемых древних эпидемий обнаружены фрагменты «археологической» ДНК, по нуклеотидной структуре некоторых маркеров близкие к гомологичным фрагментам псевдотуберкулезного микроба. Поэтому «археологические» таксоны/подвиды Gok2, LNBA и другие, предложенные на основании этих фрагментов, размещают в корне филогенетических деревьев *Y. pestis* (рис. 1). Современных генотипов микроба чумы, имеющих гомологичные «археологическим» молекулярные маркеры, не обнаружено, и «археологические» таксоны/подвиды считают вымершими [2]. Однако известно, что в постледниковой Европе (в голоцене) не было природных условий, удовлетворяющих требованиям для существования природных очагов

чумы, не было аридных ландшафтов с многочисленным населением норových грызунов, на которых в массе паразитировали блохи [19, 31]. Поэтому для обоснования каких-либо вымерших естественных линий в филогенезе чумного микроба, вызванных вымиранием хозяев или переносчиков возбудителя, нет серьезных экологических оснований. Исчезнувшие ныне очаги чумы в Европе, безусловно, были синантропическими, имели антропогенное (завозное) происхождение.

Экологический сценарий

Как сказано выше, МГ методология не позволяет воссоздать непротиворечивый концепт истории (филогенеза) возбудителя чумы. МГ методологии нацелены раскрывать истории высших таксонов в течение длительных временных интервалов. Исходные виды, а тем более исходные популяции изучаемых филогенетических групп, почти всегда неизвестны, и для характеристики корня филогенетического древа используют концепцию субъективно выбираемой внешней группы. Иное дело — экологический подход при изучении истории возбудителя чумы, который нацелен на видообразование и выяснение внутривидовых отношений. Предковая форма чумного микроба — возбудитель ДСЛ — доподлинно известна. В таком случае задача изучения истории чумы являются в большей мере предметом филогеографии (в меньшей мере филогенетики) с присущей ей методологией, оперирующей такими популяционно-экологическими и популяционно-генетическими понятиями как непосредственное родство, внутривидовая диверсификация, местная и географическая популяция, подвид, ареал, экологическое единство, экологическая ниша.

В семействе кишечных микробов *Yersiniaceae* (*Enterobacteriaceae*), включающем до 250 видов и подвидов, возбудитель чумы является единственным, который передается трансмиссивным способом через укусы блох. Это свидетельствует о его уникальном эволюционном пути и, соответственно, необходимости применения для реконструкции его истории *ad hoc* эволюционной модели [14, 15]. Выше названные два открытия МГ, касающиеся эволюции чумного микроба, и огромный багаж знаний, накопленных ТПОЧ, позволили создать правдоподобный экологический нарратив его истории. Уникальность видообразовательного процесса — преобразования популяции (клона) предкового возбудителя ДСЛ в популяцию микроба чумы — состоит в заражении исходного хозяина чумного микроба — монгольского сурка — не традиционным алиментарным способом

на пастбище, а травматическим путем во время зимней спячки. При этом видообразовательный процесс проходил по квантовому принципу, в эволюционном масштабе времени быстро, но постепенно, с участием таких мало изученных пока явлений, как окислительный взрыв макрофагов в организме гетеротермных сурков и стресс-индуцированный мутагенез переходной формы *Y. pseudotuberculosis-pestis* в популяциях гибернарующих животных [9, 10]. При этом видообразование прошло параллельно в трех географических популяциях монгольского сурка. (Почти) одновременно возникли три подвида/геноварианта 2.ANT3 (Хэнтэй, Барга), 3.ANT2 (Хангай) и 4.ANT1 (Хархира, Турген, Монгун-Тайга) (рис. 2, II обложка) [12]. Эти подвиды/геноварианты на МГ филогенетических схемах демонстрируют политомию «Big Bang». Дальнейшая территориальная азиатская экспансия возбудителя проходила из центров видообразования самостоятельными маршрутами с формированием в популяциях норových грызунов и монгольской пищухи природных очагов со свойственными им подвидами/геновариантами. В этом экологическом сценарии происхождения и эволюции возбудителя чумы можно найти объяснения многим противоречиям, присущим МГ подходу.

Заключение

Главными механизмами эволюции микроба чумы при МГ подходе признают, с одной стороны, сальтационные процессы: горизонтальный перенос генетического материала (прежде всего плазмид вирулентности pFga и pPst) извне, а также делеции и инактивации генов, утративших функции в новой среде обитания. С другой стороны, топологию филогенетического дерева выстраивают только на основе модели постепенной нейтральной эволюции, предусматривающей постепенное накопление нейтральных мутаций и случайный дрейф генов. Эти два подхода в проблеме происхождения чумы являются несовместимыми, антагонистическими. Поэтому согласованного непротиворечивого сценария на основе этих двух современных мэйнстримных подходов к эволюции и филогении чумного микроба создать не удастся. Решению проблемы способствует третий — ЭКО подход. Экологические факты свидетельствуют, что видообразование микроба чумы прошло не ранее 30 тыс. лет назад в Центральной Азии в трех географических популяциях монгольского сурка по парapatрическому (перипатрическому?) принципу. (Почти) одновременно сформировались три исходных подвида чумного микроба 2.ANT3, 3.ANT2 и 4.ANT1, дальнейшая экспансия которых прохо-

дила по самостоятельным маршрутам. Такой нарратив истории чумного микроба снимает многие противоречия, свойственные МГ подходу. Историю «молодого» возбудителя чумы лучше отражают адаптивные признаки, в то время как нейтральные нуклеотидные признаки более подходят для изучения истории высших таксонов на более длительных геологических промежутках времени. Модель нейтральной эволюции может отражать только главное «вертикальное» направление эволюции кишечных бактерий, но не радикальные инновационные и частные адаптации, которые характеризуют возбудителя чумы.

Используемые МГ подходом такие понятия, как наиболее современный общий предок (MRCA, most recent common ancestor), филогенетические ветви (branches 0, 1, 2, 3, 4), эволюционные линии 0.PE, 1.ANT, 2.MED и другие являются абстрактными, статистическими, несут мало биологической информации, крайне ценной в случае микроба чумы. В то же время отбор действует на реальные популяции, эво-

люционируют популяции, а не отдельные организмы, филогенетические ветви или эволюционные линии, и поэтому при реконструкции истории «молодого» чумного микроба, уникального для семейства *Yersiniaceae*, резко отклонившегося от главного направления эволюции кишечных обитателей, не следует игнорировать принципы популяционного мышления и адаптациогенеза.

Следует признать, что каждый из рассмотренных нами подходов имеет свои преимущества и недостатки, при этом решение выявленных противоречий — единственный путь к истине. Дальнейшая интеграция молекулярного, генетического и экологического подходов в проблеме происхождения и эволюции возбудителя чумы будет не только способствовать достижению консенсуса в филогенетической реконструкции чумного микроба, но также создаст условия для совершенствования теории молекулярной эволюции не только возбудителя чумы, но и многих других патогенных микроорганизмов.

Список литературы/References

1. Вагайская А.С., Трунякова А.С., Дентовская С.В. Внутривидовая дифференциация *Yersinia pestis*: от фенотипа к полногеномному секвенированию // Бактериология. 2019. Т. 4, № 2. С. 42–54. [Vagayskaya A.S., Truniakova A.S., Dentovskaya S.V. Intraspecific differentiation of *Yersinia pestis*: from the phenotype to the full genome sequencing. *Bakteriologiya = Bakteriologiya*, 2019, vol. 4, no. 2, pp. 42–54. (In Russ.)] doi: 10.20953/2500-1027-2019-2-42-54
2. Ерошенко Г.А., Куклева Л.М., Кутырев В.В. Исторические и современные классификации возбудителя чумы // Проблемы особо опасных инфекций. 2022. № 4. С. 14–22. [Eroshenko G.A., Kukleva L.M., Kutyrev V.V. Historical and modern classifications of the plague agent. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2022, no. 4, pp. 14–22. (In Russ.)] doi: 10.21055/0370-1069-2022-4-14-22
3. Иофф И.Г., Наумов Н.П., Фолитарек С.С., Абрамов Ф.И. Природная очаговость трансмиссивных болезней в Казахстане // Алма-Ата: Изд-во КазССР, 1951. С. 173–324. [Ioff I.G., Naumov N.P., Folitarek S.S., Abramov F.I. High-altitude natural focus of plague in Kyrgyzstan. *Alma-Ata: Publishing house KazSSR*, 1951, pp. 173–324. (In Russ.)]
4. Кисличкина А.А., Платонов М.Е., Вагайская А.С., Богун А.Г., Дентовская С.В., Анисимов А.П. Рациональная таксономия *Yersinia pestis* // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2019. № 2. С. 76–82. [Kislichkina A.A., Platonov M.E., Vagayskaya A.S., Bogun A.G., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P. Rational taxonomy of *Yersinia pestis*. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya = Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 2019, no. 2, pp. 76–82. (In Russ.)] doi: 10.17116/molgen20193702176
5. Кучерук В.В. Вопросы палеогенеза природных очагов чумы в связи с историей фауны грызунов // Фауна и экология грызунов. 1965. № 7. С. 5–86. [Kucheruk V.V. Issues of paleogenesis of natural foci of plague in connection with the history of the rodent fauna. *Fauna i ekologiya gryzunov = Fauna and Ecology of Rodents*, 1965, no. 7, pp. 5–86. (In Russ.)]
6. Платонов М.Е., Евсеева В.В., Дентовская С.В., Анисимов А.П. Молекулярное типирование *Yersinia pestis* // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2013. № 2. С. 3–12. [Platonov M.E., Evseeva V.V., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P. Molecular typing of *Yersinia pestis*. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya = Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 2013, no. 2, pp. 3–12. (In Russ.)]
7. Ралль Ю.М. Природная очаговость и эпизоотология чумы. М.: Медицина, 1965. 363 с. [Rall' Yu.M. Natural facility and epizootologie of plague. *Moscow: Medicina*, 1965. 363 p. (In Russ.)]
8. Сомов Г.П., Покровский В.И., Беседнова Н.Н., Антоненко Ф.Ф. Псевдотуберкулез. М.: Медицина, 2001. 253 с. [Somov G.P., Pokrovski V.I., Besednova N.N., Antonenko F.F. Pseudotuberculosis. *Moscow: Medicina*, 2001. 253 p. (In Russ.)]
9. Сунцов В.В. «Квантовое» видообразование микроба чумы *Yersinia pestis* в гетероиммунной среде — популяциях гибернирующих сурков-тарбаганов (*Marmota sibirica*) // Сибирский экологический журнал. 2018. № 4. С. 379–394. [Suntsov V.V. Quantum speciation of *Yersinia pestis* plague microbe in a heteroimmune environment: in the populations of hibernating tarbagan marmots (*Marmota sibirica*). *Sibirskii ekologicheskii zhurnal*, 2018, vol. 11, no. 4, pp. 379–394. (In Russ.)] doi: 10.15372/sej20180401
10. Сунцов В.В. Происхождение чумы. Перспективы эколого-молекулярно-генетического синтеза // Вестник Российской Академии Наук. 2019. Т. 89, № 3. С. 260–269. [Suntsov V.V. Origin of the plague: prospects of ecological-molecular-genetic synthesis. *Vestnik Rossiiskoi akademii nauk = Herald of the Russian Academy of Sciences*, 2019, vol. 89, no. 3, pp. 260–269. (In Russ.)] doi: 10.31857/S0869-5873893260-269

11. Сунцов В.В. Гостальный аспект территориальной экспансии микроба чумы *Yersinia pestis* из популяций монгольского сурка-тарбагана (*Marmota sibirica*) // Зоологический журнал. 2020. Т. 99, № 11. С. 1307–1320. [Suntsov V.V. Host aspect of territorial expansion of the plague microbe *Yersinia pestis* from the populations of the tarbagan marmot (*Marmota sibirica*). *Zoologicheskii zhurnal*, 2021, vol. 48, no. 8, pp. 211–223. (In Russ.)] doi: 10.31857/S0044513420090160
12. Сунцов В.В. Политопное видообразование микроба чумы *Yersinia pestis* как причина филогенетической трихотомии в географических популяциях монгольского сурка-тарбагана (*Marmota sibirica*) // Журнал общей биологии. 2021. Т. 82, № 6. С. 431–444. [Suntsov V.V. Polytopic speciation of the plague microbe *Yersinia pestis* as a cause of phylogenetic trichotomy in geographical populations of the Mongolian marmot-tarbagan (*Marmota sibirica*). *Zhurnal obshchei biologii = Biology Bulletin Reviews*, 2021, vol. 82, no. 6, pp. 431–444. (In Russ.)] doi: 10.31857/S0044459621060075
13. Сунцов В.В. Климатические изменения в Центральной Азии как предпосылки и триггер видообразования микроба чумы *Yersinia pestis* // Сибирский экологический журнал. 2022. Т. 15, № 4. С. 451–463. [Suntsov V.V. Climate Changes in Central Asia as a Prerequisite and Trigger of Plague Microbe (*Yersinia pestis*). *Sibirskii ekologicheskii zhurnal*, 2022, vol. 15, no. 4, pp. 451–463. (In Russ.)] doi: 10.15372/SEJ20220406
14. Сунцов В.В. Филогенез микроба чумы *Yersinia pestis*: уникальность эволюционной модели // Вестник Российской Академии Наук. 2022. Т. 92, № 9. С. 860–868. [Suntsov V.V. Phylogenesis of the plague microbe *Yersinia pestis*: the uniqueness of the evolutionary model. *Vestnik Rossiiskoi akademii nauk = Herald of the Russian Academy of Sciences*, 2022, vol. 92, no. 9, pp. 860–868. (In Russ.)] doi: 10.1134/S1019331622050057
15. Сунцов В.В. Экологический сценарий видообразования микроба чумы *Yersinia pestis* как основа адекватной молекулярной эволюционной модели // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 5. С. 809–818. [Suntsov V.V. Ecological scenario of the plague microbe *Yersinia pestis* speciation underlying adequate molecular evolutionary model. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2022, vol. 12, no. 5, pp. 809–818. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-ESO-1955
16. Сунцов В.В. Параллелизмы в видообразовании и внутривидовой диверсификации микроба чумы *Yersinia pestis* // Известия РАН. Серия Биологическая. 2023. № 2. С. 115–121. [Suntsov V.V. Parallelism in Speciation and Intraspecific Diversification of the Plague Microbe *Yersinia pestis*. *Izvestiya RAN. Seriya Biologicheskaya*, 2023, no. 2, pp. 115–121. (In Russ.)] doi: 10.31857/S1026347023010122
17. Achtman M., Zurth K., Morelli G., Torrea G., Guiyoule A., Carniel E. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *PNAS*, 1999, vol. 96, no. 24, pp. 14043–14048. doi: 10.1073/pnas.96.24.14043
18. Achtman M., Morelli G., Zhu P., Wirth T., Diehl I., Kusecek B., Vogler A.J., Wagner D.M., Allender C.J., Easterday W.R., Chenal-Francisque V., Worsham P., Thomson N.R., Parkhill J., Lindler L.E., Carniel E., Keim P. Microevolution and history of the plague bacillus, *Yersinia pestis*. *PNAS*, 2004, vol. 101, no. 51, pp. 17837–17842. doi: 10.1073/pnas.0408026101
19. Bramanti B., Wu Y., Yang R., Cui Y., Stenseth N.C. Assessing the origins of the European Plagues following the Black Death: a synthesis of genomic, historical, and ecological information. *PNAS*, 2021, vol. 118, no. 36: e2101940118. doi: 10.1073/pnas.2101940118
20. Cui Y., Yu C., Yan Y., Li D., Li Y., Jombart T., Weinert L.A., Wang Z., Guo Z., Xu L., Zhang Y., Zheng H., Qin N., Xiao X., Wu M., Wang X., Zhou D., Qi Z Du Z., Wu H., Yang X., Cao H., Wang H., Wang J., Yao S., Rakin A., Li Y., Falush D., Balloux F., Achtman M., Song Y., Wang J., Yang R. Historical variations in mutation rate in an epidemic pathogen, *Yersinia pestis*. *PNAS*, 2013, vol. 110, no. 2, pp. 577–582. doi: 10.1073/pnas.1205750110
21. Demeure C.E., Dussurget O., Fiol G.M., Le Guern A.-S., Savin C., Pizarro-Cerdá J. *Yersinia pestis* and plague: An updated view on evolution, virulence determinants, immune subversion, vaccination, and diagnostics. *Genes. Immun.*, 2019, vol. 20, no. 5, pp. 357–370. doi: 10.1038/s41435-019-0065-0
22. Devignat R. The persistence of plague from ancient times. *Trop. Dis. Bull.*, 1965, vol. 62, no. 4, pp. 301–302.
23. Eppinger M., Rosovitz M.J., Fricke W.F., Rasko D.A., Kokorina G., Fayolle C., Lindler L.E., Carniel E., Ravel J. The complete genome sequence of *Yersinia pseudotuberculosis* IP31758, the causative agent of Far East scarlet-like fever. *PLoS Genet.*, 2007, vol. 3, no. 8: e142. doi: 10.1371/journal.pgen.0030142
24. Eppinger M., Worsham P.L., Nikolich M.P., Riley D.R., Sebastian Y., Mou S., Achtman M., Lindler L.E., Ravel J. Genome Sequence of the Deep-Rooted *Yersinia pestis* Strain Angola Reveals New Insights into the Evolution and Pangenome of the Plague Bacterium. *J. Bacteriol.*, 2010, vol. 192, no. 6, pp. 1685–1699. doi: 10.1128/JB.01518-09
25. Fukushima H., Matsuda Y., Seki R., Tsubokura M., Takeda N., Shubin F.N., Paik I.K., Zheng X.B. Geographical heterogeneity between Far Eastern and Western countries in prevalence of the virulence plasmid, the superantigen *Yersinia pseudotuberculosis*-derived mitogen, and the high-pathogenicity island among *Yersinia pseudotuberculosis* strains. *J. Clin. Microbiol.*, 2001, vol. 39, no. 10, pp. 3541–3547. doi: 10.1128/JCM.39.10.3541–3547.2001
26. Hinnebusch B.J., Chouikha I., Sun Y.-C. Ecological opportunity, evolution, and the emergence of flea-borne plague. *Infect. Immun.*, 2016, vol. 84, no. 7, pp. 1932–1940. doi: 10.1128/IAI.00188-16
27. Kutryev V.V., Eroshenko G.A., Motin V.L., Nosov N.Y., Krasnov J.M., Kukleva L.M., Nikiforov K.A., Al'kova Z.V., Oglodin E.G., Guseva N.P. Phylogeny and classification of *Yersinia pestis* through the lens of strains from the plague foci of Commonwealth of Independent States. *Front. Microbiol.*, 2018, vol. 9, art. 1106. doi: 10.3389/fmicb.2018.01106
28. Morelli G., Song Y., Mazzoni C.J., Eppinger M., Roumagnac P., Wagner D.M., Feldkamp M., Kusecek B., Vogler A.J., Li Y., Cui Y., Thomson N.R., Jombart T., Leblois R., Lichtner P., Rahalison L., Petersen J.M., Balloux F., Keim P., Wirth T., Rave J., Yang R., Carniel E., Achtman M. *Yersinia pestis* genome sequencing identifies patterns of global phylogenetic diversity. *Nature Genetics*, 2010, vol. 42, no. 12, pp. 1140–1145. doi: 10.1038/ng.705
29. Pisarenko S.V., Evchenko A.Yu., Kovalev D.A., Evchenko Yu.M., Bobrysheva O.V., Shapakov N.A., Volynkina A.S., Kulichenko A.N. *Yersinia pestis* strains isolated in natural plague foci of Caucasus and Transcaucasia in the context of the global evolution of species. *Genomics*, 2021, vol. 113, no. 4, pp. 1952–1961. doi: 10.1016/j.ygeno.2021.04.021
30. Skurnik M., Peippo A., Ervela E. Characterization of the O-antigen gene cluster of *Yersinia pseudotuberculosis* and the cryptic O-antigen gene cluster of *Yersinia pestis* shows that the plague bacillus is most closely related to and has evolved from *Y. pseudotuberculosis* serotype O:1b. *Mol. Microbiol.*, 2000, vol. 37, no. 2, pp. 316–330. doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.01993.x

31. Stenseth N.C., Taoc Y., Zhang C., Bramanti B., Büntgen U., Cong X., Cui Y., Zhou H., Dawson L.A., Mooney S.J., Li D., Fell H.G., Cohn S., Sebbane F., Slavin P., Liang W., Tong H., Yang R., Xu L. No evidence for persistent natural plague reservoirs in historical and modern Europe. *PNAS*, 2022, vol. 119, no. 51: e2209816119. doi: 10.1073/pnas.2209816119
32. Sun Y.-C., Jarrett C.O., Bosio C.F., Hinnebusch B.J. Retracing the evolutionary path that led to flea-borne transmission of *Yersinia pestis*. *Cell Host & Microbe*, 2014, vol. 15, no. 5, pp. 578–586. doi: 10.1016/j.chom.2014.04.003
33. Vogler A.J., Keim P., Wagner D.M. A review of methods for subtyping *Yersinia pestis*: From phenotypes to whole genome sequencing. *Infect. Genet. Evol.*, 2016, vol. 37, pp. 21–36. doi: 10.1016/j.meegid.2015.10.024
34. Wren B.W. The *Yersinia* — a model genus to study the rapid evolution of bacterial pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2003, vol. 1, pp. 55–64. doi: 10.1038/nrmicro730
35. Wu Lien-teh, Chun J.W.H., Pollitzer R., Wu C.Y. Plague: a manual for medical and public health workers. *Shanghai: Mercury Press*, 1936. 547 p.
36. Wu Y., Hao T., Qian X., Zhang X., Song Y., Yang R., Cui Y. Small Insertions and deletions drive genomic plasticity during adaptive evolution of *Yersinia pestis*. *Microbiology Spectr.*, 2022, vol. 10, no. 3: e0224221. doi: 10.1128/spectrum.02242-21
37. Zhou D., Han Y., Song Y., Huang P., Yang R. Comparative and evolutionary genomics of *Yersinia pestis*. *Microbes and Infection*, 2004, vol. 6, no. 13, pp. 1226–234. doi: 10.1016/j.micinf.2004.08.002
38. Zhou D., Yang R. Molecular darwinian evolution of virulence in *Yersinia pestis*. *Inf. Immun.*, 2009, vol. 77, no. 6, pp. 2242–2250. doi: 10.1128/IAI.01477-08

Автор:

Сунцов В.В., д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории популяционной экологии Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва, Россия.

Author:

Suntsov V.V., DSc (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Population Ecology, A.N. Severtsov Institute of Problems of Ecology and Evolution of Russian Academy of Science, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 14.02.2024
Принята к печати 08.08.2024

Received 14.02.2024
Accepted 08.08.2024

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ВАКЦИН ПРОТИВ ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

Н.М. Раевская¹, Т.Н. Никитина¹, А.С. Симбирцев², И.Л. Соловьева³, А.Р. Волгин¹,
А.С. Коровкин¹

¹ ФГБУ Научный центр экспертизы средств медицинского применения Минздрава России, Москва, Россия

² ФГУП Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов ФМБА,
Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБОУ ВО Ульяновский государственный университет, г. Ульяновск, Россия

Резюме. Вирус папилломы человека (ВПЧ) является одной из серьезных проблем общественного здравоохранения. Длительно существующая ВПЧ-инфекция является главной причиной возникновения злокачественных заболеваний у мужчин и женщин. Рак относится к заболеваниям с высоким уровнем смертности. Установлено, что ВПЧ-инфекция примерно на 70% связана с раком влагалища, на 50% — с раком половых органов у мужчин, на 90% — с раком анального канала и 60% — с раком головы. Ежегодно у большого количества людей развиваются разные виды рака, инициированные ВПЧ, ведущим из которых является рак шейки матки. Рак шейки матки — один из наиболее распространенных и агрессивных видов рака, угрожающих здоровью, является четвертым по распространенности в мире раком у женщин. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), на 2020 г. около 600 случаев заболеваемости раком шейки матки регистрируется ежедневно в различных странах мира. Возникновение рака шейки матки тесно связано с такими факторами, как длительно существующая (персистирующая) инфекция ВПЧ и соматические мутации генома хозяина. Несмотря на то что поражения, вызванные ВПЧ могут быть выявлены и удалены на ранней стадии с помощью высокоэффективных методов скрининга и хирургических процедур, канцерогенный риск, вызванный ВПЧ-инфекцией продолжает увеличиваться, и есть определенные сложности в ее устранении, особенно в странах с низким уровнем развития. Решением данного вопроса является создание терапевтических вакцин как на этапах профилактики, так и лечения. На сегодняшний день существует три лицензированные профилактические вакцины против ВПЧ на основе вирусоподобных частиц типа L1 (L1-VLP): бивалентная (ВПЧ-2), четырехвалентная (ВПЧ-4) и нонавалентная (ВПЧ-9) вакцины. Использование этих вакцин позволило эффективно устранить около 90% случаев инфицирования ВПЧ во всем мире. Однако терапевтического эффекта данных вакцин в отношении персистирующей ВПЧ-инфекции и вызванных ею поражений замечено не было. Особенностью терапевтических вакцин, разрабатываемых для онкобелков Е6/Е7, является активация клеточного иммунитета, что считается идеальным иммунным способом устранения вирусной инфекции. В представленном обзоре приведена информация, касающаяся классификации, механизма действия и клинических эффектов вакцин против ВПЧ, а также разработки и перспективных направлений в отношении терапевтических вакцин, используемых для профилактики и лечения злокачественных заболеваний.

Ключевые слова: вирус папилломы человека, вирусоподобные частицы, рак шейки матки, профилактические вакцины, терапевтические вакцины, иммуногенность вакцин.

Адрес для переписки:

Раевская Наталья Михайловна
127051, Россия, Москва, Петровский б-р, 8, стр. 2,
ФГБУ НЦЭСМП Минздрава России.
Тел.: 8 (499) 241-89-27. E-mail: raevskayanm@expmed.ru

Contacts:

Natalja M. Raevskaya
127051, Russian Federation, Moscow, Petrovsky boulevard, 8, build. 2,
Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products.
Phone: +7 (499) 241-89-27. E-mail: raevskayanm@expmed.ru

Для цитирования:

Раевская Н.М., Никитина Т.Н., Симбирцев А.С., Соловьева И.Л.,
Волгин А.Р., Коровкин А.С. Перспективы разработки терапевтических
вакцин против папилломавирусной инфекции // Инфекция и иммунитет.
2024. Т. 14, № 4. С. 655–671. doi: 10.15789/2220-7619-POD-17636

Citation:

Raevskaya N.M., Nikitina T.N., Simbirtsev A.S., Soloveva I.L., Volgin A.R.,
Korovkin A.S. Prospectives of developing therapeutic HPV vaccines //
Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024,
vol. 14, no. 4, pp. 655–671. doi: 10.15789/2220-7619-POD-17636

*Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00026-24-00
на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 124022200103-5).*

*The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00026-24-00
and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 124022200103-5).*

PROSPECTIVES OF DEVELOPING THERAPEUTIC HPV VACCINES

Raevskaya N.M.^a, Nikitina T.N.^a, Simbirtsev A.S.^b, Soloveva I.L.^c, Volgin A.R.^a, Korovkin A.S.^a

^a Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

^b State Research Institute of Highly Pure Biopreparations FMBA, St. Petersburg, Russian Federation

^c Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russian Federation

Abstract. Human papillomavirus (HPV) represents one of the most serious global public health problems. Malignant female and male diseases mainly result from persistent HPV infection. Cancer belongs to a high mortality rate disease. It has been established that HPV infection causes about 70% vaginal cancer, 50% male genital cancer, 90% anal cancer and 60% head-and-neck cancer. Annually, a large number of people develop various HPV-caused cancer types, dominated by cervical cancer, one of the most common and aggressive types of cancer that threatens health holding the fourth place among most female common cancer worldwide. According to the World Health Organization (WHO), in 2020, about 600 cases of cervical cancer are recorded daily in different countries. Emergence of cervical cancer is closely related to factors such as long-term (persistent) HPV infection and somatic mutations of the host genome. Although HPV infection can be detected and cured early with highly effective screening methods and surgical procedures, the carcinogenic risk of HPV related diseases constantly increases, which elimination faces certain difficulties, especially in low- and mid-developed countries. The most acceptable solution to this is development and implementation of therapeutic vaccines for prevention and treatment of HPV related diseases. Three licensed HPV vaccines based on L1 type virus-like particles (L1-VLPs) technology are available globally: bivalent (HPV-2), quadrivalent (HPV-4) and nonavalent (HPV-9) vaccines. These vaccines demonstrated effectiveness in reducing HPV-related cervical cancer rate by up to 90% worldwide. However, the therapeutic effect of these vaccines on persistent HPV infection and lesions has not been observed. Therapeutic HPV vaccines candidates targeted E6/E7 cancer proteins activate cellular immunity that eliminates existing HPV infection. Here we review types, mechanisms of action and clinical effects of therapeutic HPV vaccines, as well as current and future developments in the field for prevention and treatment of HPV related diseases.

Key words: Human papillomavirus (HPV), virus-like particles (VLP), cervical cancer, preventive vaccines, therapeutic vaccines, immunogenicity of vaccines.

Вирус папилломы человека (ВПЧ) принадлежит к семейству *Papillomaviridae* и представлен вирусом, несущим кольцевую ДНК, содержащую около 8 тысяч пар оснований. В настоящее время обнаружено более 200 типов ВПЧ, среди них около 40 типов связано с половыми инфекциями и относятся к типам высокого и низкого онкогенного риска, 15 типов ВПЧ относятся к категории высокоонкогенного риска и связаны с наиболее агрессивными видами рака (рак шейки матки, рак головы, рак шеи и др.), 12 типов относятся к типам ВПЧ низкоонкогенного риска, которые в основном связаны с доброкачественными поражениями шейки матки и генитальными кондиломами [1, 3, 4, 9]. Наиболее распространенными высокоонкогенными типами ВПЧ являются ВПЧ 16-го типа (вызывают 80% патологий) и ВПЧ 18-го типа (вызывают 3% патологий). В 70% случаев эти типы ВПЧ являются причиной возникновения рака шейки матки, а в 90% случаев — других опухолей, вызванных ВПЧ [1, 2, 9].

Геном вируса папилломы человека включает следующие области: область (E), кодирующую ранние белки (E1, E2, E4, E5, E6, E7), ключевая роль которых заключается в репликации генома вируса, экспрессии генов и уклонении вируса от иммунитета и область (L), кодирующую белки (L1, L2), которые относятся к внутренней оболочке вируса — капсида. Эти

белки участвуют в инфицировании, осуществляют доставку и упаковку вирусных частиц. Жизненный цикл ВПЧ тесно связан с дифференцировкой основных клеток эпидермиса кожи человека (кератиноцитов) [77]. Вирус папилломы человека проникает в эпителий через микротрещины и заражает активно делящиеся стволовые эпителиальные клетки. Затем посредством капсидного белка L1 связывается с рецептором гепарансульфата протеогликана (Heparan Sulfate Proteoglycan — HSPG), расположенным на поверхности базальной мембраны клетки. Когда ВПЧ связывается с рецептором HSPG, N-концевая часть белка L2 претерпевает конформационное изменение, опосредованное циклофилином В. Затем N-концевая часть расщепляется фурином и/или пропротеинконвертазой PC5/6 (Proprotein Convertase — PC), после чего вирус связывается со вторичным рецептором на плазматической мембране клетки-мишени, а затем попадает внутрь клетки посредством эндоцитоза [37]. Спустя 24 часа после прикрепления к клеткам вирус попадает в ядро клетки-хозяина, где происходит запуск цикла вирусной репликации с участием белков E1 и E2. Число первоначально реплицированных копий в ядре клетки-хозяина невелико и составляет примерно 50–100 копий на ядро [9, 104]. Белок E2 относится к вирусным факторам транскрипции и регулирует

работу ранних вирусных промоторов (Р97 ВПЧ 16 и Р105 ВПЧ 18), расположенных выше открытых рамок считывания, кодирующих гены регуляторных белков Е6 и Е7. Экспрессия белков Е6 и Е7 позволяет поддержать жизнедеятельность клеток, зараженных ВПЧ [44]. По мере того как инфицированные клетки дифференцируются и вступают в более позднюю стадию цикла репликации, происходит инициация экспрессии ранних и поздних белков — Е4 и Е5, а также белков L1 и L2 соответственно. Экспрессия белков Е4 и Е5 усиливает механизм репликации, способствуя увеличению вирусного генома до нескольких тысяч копий на клетку. На поздней стадии цикла репликации белок Е4 играет роль в реорганизации филаментов кератиноцитов — клетки становятся хрупкими, облегчая высвобождение потомства вирусных частиц [44]. Белок L2 транспортируется в ядро, в то время как в цитоплазме клеток-хозяина происходит самосборка белка L1 с образованием пентамерных белков оболочки, которые также транспортируются в ядро [19]. В ядре белки L1 и L2 собираются в вирусные частицы, которые освобождаются из клетки при помощи белка Е4 [23]. Для поддержания активного механизма репликации в клетках присутствует экспрессия онкобелков Е6 и Е7 [35]. Белок Е7 активирует клеточный цикл инфицированных клеток, связываясь с белком ретинобластомы (retinoblastoma protein — pRb), с последующей деградацией транскрипционного репрессорного комплекса, содержащего транскрипционный фактор E2F. Фактор E2F освобождается для активации комплексов клеточной циклин-зависимой киназы 2 (cyclin-dependent kinase 2 — Cdk2) с циклином А (Cdk2/циклин А) и Cdk2 с циклином Е (Cdk2/циклин Е), препятствуя остановке клеточного цикла и стимулируя пролиферацию клеток [52]. Белок Е6 повышает устойчивость к апоптозу и запускает репликацию вирусной ДНК, разрушая белок p53 [74]. Хотя данные белки являются онкопротеинами, их экспрессия необходима для нормальной репликации генома ВПЧ.

На сегодняшний день наиболее эффективной мерой профилактики заражения ВПЧ (в том числе и с экономической точки зрения) является вакцинация. Гетерологичные антигены в составе вакцины попадают в организм, захватываются АПК и вводятся в Т-лимфоциты, стимулируя выработку В-лимфоцитами антител, что является основой профилактического эффекта вакцины [3, 79]. Антитела проникают через стенку кровеносного сосуда для доставки к месту заражения, где объединяются с вирусом, снижая его способность к заражению [79]. Иммунный ответ, вызванный естественной ВПЧ-инфекцией, является слабым, а концен-

трация вырабатываемых в ответ на инфекцию антител — очень низкая, в том числе из-за отсутствия фазы виремии, характерной при попадании ВПЧ в организм.

В настоящее время разработаны и лицензированы вакцины против ВПЧ на основе вирусоподобных частиц (virus-like particles — VLP) основного капсидного белка L1 вируса папилломы, которые представляют собой пустые вирусные оболочки, состоящие из одного или нескольких типов полимерных капсидных белков [4, 24]. Вирусоподобные частицы не содержат вирусного генома и не являются инфекционными или канцерогенными. Они индуцируют сильный гуморальный иммунный ответ, что подтверждено наличием высокого титра длительно функционирующих нейтрализующих антител [4, 24, 28].

Из наиболее значимых профилактических вакцин против ВПЧ на сегодняшний день доступны три: четырехвалентная вакцина (ВПЧ-4), двухвалентная вакцина (ВПЧ-2) и нонавалентная вакцина (ВПЧ-9) [48]. Эти вакцины против ВПЧ были разработаны на основе VLP типа L1. По результатам клинических испытаний было установлено, что вакцины дают хороший профилактический эффект в отношении ВПЧ-инфицирования людей из разных регионов, разных рас и возрастных групп [8].

ВПЧ-4 — первая в мире четырехвалентная вакцина, которую выпустила в 2006 г. компания Merck (США) для профилактики ВПЧ-инфекции. Вакцина представляет собой суспензию белка для инъекций, полученную с помощью технологии рекомбинантной ДНК с последующей экспрессией в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. В ее состав входят самособирающиеся вирусоподобные частицы (VLP), состоящие из очищенного вирусного капсидного белка L1, дополненного аморфным сульфатом гидроксифосфата алюминия (amorphous aluminium hydroxophosphate sulfate — ААHS), который используется в качестве адъюванта [76]. Показано, что в 90% случаев вакцина предотвращает генитальные кондиломы, вызванные ВПЧ 6/11 типов, а в 70% случаев — рак шейки матки и рак анального канала, вызванные ВПЧ 16/18 типов [39]. Вакцина прошла клинические испытания до выхода на рынок, показав высокий уровень (около 98%) профилактики поражений шейки матки; она обеспечивает высокий уровень защиты женщин в возрасте от 15 до 45 лет и мужчин в возрасте от 16 до 26 лет. Также вакцина обладает 100% профилактической эффективностью в отношении заболеваний вульвы и влагалища, связанных с ВПЧ-инфекцией. В США, при наблюдении женщин в возрасте 14–19 и 20–24 лет в течение шести лет после вакцинации, распространен-

ность типов ВПЧ 6/11 и 16/18 снизилась на 64% и 34% соответственно [72]. Хотя большинство испытаний эффективности вакцины проведено у молодых женщин в возрасте 15–26 лет по результатам иммунобриджингового исследования по снижению прививочной дозы, эти вакцины были одобрены для первичной иммунизации как мужчин, так и женщин в возрасте от 9 до 25 лет. Эти исследования показали наличие средних титров антител к ВПЧ 16 у девочек и мальчиков в возрасте 10–15 лет, через месяц после третьей вакцинации, что в 2 раза превышало титры у женщин в возрасте 16–23 лет [12, 49]. Результаты испытаний показали, что вакцина ВПЧ-4 обладает хорошим популяционным профилактическим эффектом.

Вакцина ВПЧ-2, выпущенная компанией GlaxoSmithKline (Бельгия), была одобрена в сентябре 2007 г. Европейским агентством по лекарственным средствам (European Medicines Agency — ЕМА) и в октябре 2009 г. Американским управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (Food and Drug Administration — FDA). Вакцина ВПЧ-2 является эффективной в отношении наиболее распространенных онкогенных генотипов: ВПЧ 16 и ВПЧ 18. В качестве вирусоподобных частиц (VLP) ВПЧ-2 содержит ВПЧ 16 и ВПЧ 18, а в качестве адьюванта — AS04, включающего монофосфориллипид А (Monophosphoryl Lipid A — MPL) и гидроксид алюминия. Монофосфориллипид А представляет собой детоксицирующий бактериальный липополисахарид, является агонистом Толл-подобного рецептора 4 (Toll-like receptor — TLR) и используется для активации врожденных и адаптивных иммунных реакций. По результатам клинических испытаний вакцина ВПЧ-2 продемонстрировала 98,1% защиты от дисплазии шейки матки CIN16+ и CIN18+ (Cervical intraepithelial neoplasia — CIN), ассоциированных с ВПЧ-2. Данные по вакцинации женщин старше 25 лет, находившихся под наблюдением в течение 7 лет, показали, что вакцина ВПЧ-2 предотвращает инфекцию, цитологические аномалии и поражения, связанные с ВПЧ16/18. При проведении долгосрочного исследования вакцины против ВПЧ16/18 у женщин в возрасте 18–25 лет на 11-м году исследования установлено, что ВПЧ-2 эффективна против спонтанного развития CIN16+ и CIN18+, а кумулятивная эффективность вакцины составляла 97,4% и 94,9% соответственно [83]. Наряду с введением вакцины ВПЧ-4, которую использовали в широком возрастном диапазоне, ВПЧ-2 также вызывала сильный иммунный ответ у женщин в возрасте до 55 лет. Несмотря на то, что титр антител у женщин в возрасте 26–55 лет был ниже, чем у более молодых женщин, в возрасте 15–25 лет,

спустя 4 года титр антител к ВПЧ 16/18 все еще был в несколько раз выше, чем при естественной ВПЧ-инфекции [93, 96]. В исследованиях вакцины ВПЧ-2 с участием около 1000 женщин степень поражения вульвы, вызванный ВПЧ-16/18, был снижен на 50% у привитых по сравнению с непривитыми [61]. Несмотря на то что вакцина ВПЧ-2 потенциально обеспечивает меньшую защиту от двух типов ВПЧ, чем вакцина ВПЧ-4, она оказывает лучшее профилактическое действие на прогрессирующие поражения.

В декабре 2014 г. компания Merck (США) выпустила нонавалентную вакцину — ВПЧ-9, а Консультативный комитет по практике иммунизации (Advisory Committee on Immunization Practices — ACIP) рекомендовал ВПЧ-9 в качестве одной из трех разрешенных вакцин против ВПЧ и назначил плановую вакцинацию на февраль 2015 г. Производство вакцины ВПЧ-9 выполнялось аналогично способу производства вакцины ВПЧ-4, но дополнительно включала еще пять типов ВПЧ, обеспечивая, таким образом, защиту от ВПЧ генотипов 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 53 и 58. По результатам клинических исследований вакцина ВПЧ-9 может предотвращать до 90% случаев рака шейки матки [29].

Был проведен анализ эффективности и иммуногенности вакцины ВПЧ-9 у более чем 14 000 женщин в возрасте от 16 до 26 лет. Эффективность вакцины против CIN2+, поражений вульвы VIN2+ (Vulvar intraepithelial neoplasia — VIN) и влагиалища, вызванных ВПЧ 31, 33, 45, 52 и 58, составила 96,7%. Клинические исследования показали, что вакцина ВПЧ-9 в 97,4% случаев защищает от поражений шейки матки, вульвы и влагиалища высокой степени злокачественности у женщин в возрасте от 16 до 26 лет [53].

Несмотря на столь обнадеживающие результаты из-за различий в распространенности конкретных типов ВПЧ, а также для людей разных рас и людей, проживающих в разных регионах, защита обеспечиваемая вакциной, существенно отличается. Результаты уровня защиты, полученные после вакцинации, при различных пострегистрационных исследованиях составили около 87,7% в Азии, 91,7% в Африке, 92% в Северной Америке, 90,9% в Европе и 86,5% в Австралии [110].

Исследования вакцин ВПЧ-2 и ВПЧ-4 показали, что иммуногенность двухдозовых ВПЧ-2 и ВПЧ-4 вакцин была не хуже у девочек в возрасте 9–14 лет при сравнении с женщинами в возрасте 15–26 лет, получивших три дозы вакцины [61, 62]. Было проведено введение трех дополнительных доз вакцины ВПЧ-9 у пациентов, ранее вакцинированных ВПЧ-4, однако клиническая значимость дополнительно зафиксированных пяти титров антител, которые

оказались ниже, пока неизвестна. В настоящее время Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) утвердила вариант двухдозовой вакцинации для мальчиков и девочек в возрасте 9–14 лет, а также трехдозовой вакцинации для людей в возрасте от 15 лет и старше. При этом решение об использовании определенного типа вакцины принимается в индивидуальном порядке [34, 96].

Ключевой особенностью современных профилактических вакцин с использованием вирусоподобных частиц (L1 VLP) является их способность спонтанно образовывать вирусоподобные частицы VLP, обладающие высокой иммуногенностью [53]. Было установлено, что вакцины на основе белка L1 обеспечивают профилактическую защиту от ВПЧ. В настоящий момент большой интерес вызывает изучение вакцин на основе белка L2, обладающих более широким спектром защиты. Белок L2 является высококонсервативным и не образует спонтанных вирусных частиц, что также приводит к образованию титров нейтрализующих антител, но их уровень гораздо ниже по сравнению с титрами, индуцированными гомологичными вирусными частицами L1 [107]. Результаты проведенных исследований показали, что рекомбинантно-экспрессируемый тип белка L2 может действовать против папилломавирусной инфекции как иммуноген, но его способность индуцировать выработку нейтрализующих антител является низкой. Поэтому при разработке ВПЧ вакцины на основе белка L2 основной задачей является повышение ее иммуногенности. Одним из вариантов решения данного вопроса является слияние вирусных частиц типа L2 с иммуностимулирующими молекулами. В частности, описано использование бактериального флагеллина (FLA), являющегося лигандом TLR5, слитого с белком L2, с добавлением алюминия в качестве адъюванта, что обеспечило длительный иммунитет у лабораторных животных [54]. Кроме того, экспрессия пептидов в белках-носителях и в формах вирусоподобных частиц (VLP) является еще одним способом повышения иммуногенности. Имеется информация о создании фаговой вакцины на основе VLP, содержащей короткий пептид L2, индуцирующей выработку широкого спектра и высокого титра защитных антител [100]. Использование сильнодействующих адъювантов, таких как гидроксид алюминия/монофосфориллипид А (MPL), является простейшим способом усиления действия данного типа вакцин [6, 91]. В будущем есть перспектива создания вакцин на основе частиц VLP L2, а для профилактики и лечения полного спектра заболеваний предполагается создание вакцин, на основе комбинации антигенов [61]. К при-

меру, комбинации вирусных частиц L2/L1, L2 в сочетании с белками E6/E7, а также переход от текущих монотипических слияний вирусоподобных частиц L2 к мультитипическим могут быть использованы для профилактики заболеваний, вызванных большинством подтипов ВПЧ. Также существуют проблемы, одна из которых заключается в высокой стоимости вакцины VLP типа L1, на основе *Saccharomyces cerevisiae*, а другая — в том, что L1 VLP не имеет перекрестной защиты и может предотвращать инфекцию, вызванную только несколькими подтипами ВПЧ, за счет увеличения типов VLP, что является причиной высокой цены вакцины. Новый целевой антиген типа L2, предполагает использование защиты широкого спектра, что обеспечивает профилактику против нескольких подтипов ВПЧ [51]. Однако он обладает низкой иммуногенностью, что является основной проблемой при разработке вакцин данного типа, а титры индуцированных им нейтрализующих антител намного ниже, чем у вакцины типа L1 VLP [101].

Таким образом, разработка ВПЧ вакцин типа VLP-L1 направлена на снижение материальных затрат и повышение стойкого иммунитета организма против ВПЧ-инфекции, а разработка вакцин на основе белка L2 — на повышение их иммуногенности и, в сочетании с другими антигенами, для достижения широкого профилактического и терапевтического эффекта.

Возникновение рака шейки матки связано с такими факторами, как длительно существующая (персистирующая) инфекция ВПЧ и соматические мутации генома хозяина. Персистирующая инфекция высокого риска (ВПЧ16/18) является наиболее важным фактором в развитии данного вида рака [5, 21, 36, 103].

Основным принципом лечения рака шейки матки является комплексный подход, включающий хирургическое удаление неопластических образований (с обязательным гистологическим исследованием) и применение иммуномодулирующих препаратов [4, 9, 18, 26, 50, 92].

В качестве дополнения к хирургическому вмешательству для предотвращения рецидивов рака и как основной способ лечения инфекции, вызванной ВПЧ, были разработаны терапевтические вакцины. Ожидается, что существующие в настоящее время типы терапевтических вакцин будут вызывать более эффективные иммунные ответы. Большинство этих вакцин ориентировано на антигены-мишени E6 и E7 и предназначено для активации системного клеточного иммунитета, вызванного цитотоксическим ответом Т-лимфоцитов (ЦТЛ), направленных на уничтожение клеток, инфицированных ВПЧ. Тем не менее многие терапевтические вакцины, которые показали поло-

жительные доклинические результаты, в клинических испытаниях работают неэффективно, и существует необходимость оптимизации уже действующих схем вакцинации и разработки новых современных вакцин с терапевтическим действием.

Для лечения заболеваний, вызванных ВПЧ, существует четыре типа терапевтических вакцин, находящихся на разных стадиях разработки: живые векторные вакцины, белковые вакцины, вакцины на основе нуклеиновых кислот и цельноклеточные вакцины. Механизм действия этих вакцин заключается в доставке целевого антигена к АПК, активации специфических для ВПЧ цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) типа CD8 и ответов Т-лимфоцитов-хелперов типа CD4. Онкопротеины E6 и E7 являются двумя наиболее важными антигенами-мишенями для терапевтических ВПЧ-вакцин, играют роль трансформирующих белков, участвующих в возникновении и поддержании злокачественных опухолей, и наиболее широко используются в современных разработках. Большую роль играют вакцины, разработанные на основе антигена E2. E2 является отрицательным регулятором E6 и E7, и его экспрессия при предраковых поражениях (в основном первичных) гораздо выше, чем у E6 и E7, поэтому вакцины типа E2 используются, в основном, для лечения предраковых поражений, остроконечных кондилом и других, менее агрессивных ВПЧ-заболеваний [7, 93].

Живые векторные вакцины можно разделить на две категории: бактериальные и вирусные векторные вакцины. Для данного типа вакцин используются ослабленные (аттенуированные) векторные носители, кодирующие гены специфических антигенов ВПЧ (E6, E7), запускающие репликацию в клетках-хозяевах и индуцирующие иммунный ответ против ВПЧ [109]. Эти вакцины обладают высокой иммуногенностью и могут вызывать сильный гуморальный и клеточный ответы. Иммунный ответ организма на сам вектор (вакцину) может быть сильнее, чем иммунный ответ на соответствующий антиген и данный факт является препятствием для использования вакцин на основе живых векторов [103].

Бактериальные векторные вакцины могут быть синтезированы на основе бактериальных штаммов: *Listeria monocytogenes* (Lm), *Lactobacillus casei* (*L. casei*) и *Salmonella* (SE), и использованы в клинических испытаниях, но в целом их разработка является ограниченной из-за проблем с безопасностью и эффективностью. Тем не менее такие вакцины являются важной частью разработки терапевтических вакцин. К примеру, вакцина ADXS11-001, известная как ADXS-HPV, представляет собой живую

аттенуированную бактериальную векторную вакцину на основе *Listeria monocytogenes* (Lm). Антиген вакцины состоит из человеческого ВПЧ-16 E7, слитого с усеченным негемолитическим фрагментом порообразующего токсина листериолизина O (*listeriolysin O* — LLO), и первое клиническое исследование вакцины было проведено в 2009 г. [69]. *Listeria monocytogenes* (Lm) представляет собой грамположительную факультативную внутриклеточную бактерию, которая для проникновения в клетку хозяина взаимодействует с рецепторным белком. В отличие от других бактерий, она использует порообразующий токсин LLO и фосфолипазу C (*phospholipase C* — PLC), что позволяет ей выходить из фагосомы клетки-хозяина в цитоплазму клетки-хозяина [46]. Для активации адаптивного ответа активируются два пути главного комплекса гистосовместимости (Major Histocompatibility Complex — МНС). Сначала для бактерий, подвергшихся действию фагосом, активируется путь МНС класса II, который стимулирует Т-клетки CD4, а затем для бактерий, которые успешно избегают фагосом клеток-хозяина, используется путь МНС класса I для извлечения полипептидов из бактериальных антигенов с последующим их представлением на поверхности клеток-хозяев, при этом происходит активация Т-клеток CD8 [31].

В клиническом исследовании фазы II оценивалась безопасность и эффективность вакцины ADXS11-001 у пациенток с рецидивирующим раком шейки матки после химиотерапии или лучевой терапии. Анализ результатов исследования показал, что переносимость вакцины ADXS11-001 группой монотерапии была хорошей, а в группе комбинированного лечения, где в дополнение использовался цисплатин, наблюдалось много побочных реакций. Частота общей выживаемости (ОВ) в двух группах показала, что 34,9% пациентов достигли ОВ в течение 12 месяцев, а 24,8% — достигли ОВ в течение 18 месяцев. Результаты являются обнадеживающими и требуют дальнейшего изучения [18]. Еще одна вакцина GLBL101c — производится с помощью термоаттенуированной рекомбинантной бактерии *Lactobacillus casei* (*L. casei*), экспрессирующей мутантный ВПЧ-16 E7, и является вакциной, используемой перорально. Клинические испытания вакцины в фазе I/IIa показали, что вакцина GLBL101c может вызывать регрессию CIN 16, связанного с белком E3 ВПЧ, а частота регрессии от CIN 3 к CIN 2 составила 80% после 9 недель лечения вакциной [55]. В исследовании эффективности и побочного действия вакцины GLBL101c у пациентов с CIN 2, результаты не показали никаких серьезных побочных реакций. Исчезновение всех патогенных очагов (полный ответ, complete response — CR) у груп-

пы, вакцинированной GLBL101c, и группы плацебо составило 11% случаев и 0% случаев соответственно, а суммарная эффективная частота, характеризующая исчезновение всех патогенных очагов и уменьшение суммы их диаметров менее чем на 30% (частичный ответ, partial response — PR), составила 22% [52]. Результаты исследования показали, что клиническая эффективность вакцины невысока и существует необходимость ее доработки.

Вакцины на основе вирусных векторов, где используются аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, альфавирусы, лентивирусы и вирусы коровьей оспы, являются самым многообещающим и наиболее широко цитируемым вариантом вакцин с дефицитом репликации [42, 66]. Технология изготовления векторов на основе аденовируса (AD) является передовой и наиболее выигрышной [10]. Особенностью AD-векторов является их способность вызывать сильный системный ответ Т-лимфоцитов и стимулировать выработку высокого титра сывороточных антител после внутримышечной иммунизации [17]. В качестве вакцинного вектора наиболее широко используется аденовирус AD5, являющийся наиболее распространенным серотипом человека. Векторная технология, с использованием нескольких серотипов AD, достигла хороших результатов при вакцинации различных заболеваний, вызванных ВПЧ [38]. Исследованы терапевтические вакцины AD1 и AD3 с дефицитом репликации делеции E26/E35, экспрессирующих слитый белок ВПЧ16 E6/E7. Иммунизация данным белком мышей вызвала сильный специфический ответ Т-клеток типа CD8, с последующей секрецией многофункциональных цитокинов, однако специфического Т-клеточного ответа CD4 обнаружено не было [31]. Тот же эффект, направленный на лечение всех стадий заболевания, вызванных ВПЧ-инфекцией, лежит в основе работы других терапевтических вакцин AD26 и AD35, экспрессирующих ранние белки E2/E6/E7 ВПЧ16/18. Хорошие результаты как по высокой иммуногенности у мышей, так и на модели опухоли ТС-1 дало использование антигена E2 в сочетании с вариантами N-концевого слияния белков E6 и E7 с образованием двух антигенов [57].

Вирус коровьей оспы представляет собой двухцепочечный ДНК-вирус с большим и стабильным геномом, который может экспрессировать большое количество антигенов. Он широко используется в качестве иммуногена и хорошо переносится. TA-HPV представляет собой живую рекомбинантную вакцину на основе вируса осповакцины, экспрессирующую белки ВПЧ16/18, E6 и E7. В раннем клиническом исследовании фазы I/II с участием 8 пациентов

с распространенным вариантом рака шейки матки, вызванным ВПЧ, у 3 пациенток обнаружен специфический ответ антител, а специфический цитотоксический ответ Т-лимфоцитов ВПЧ был обнаружен у одного пациента. В эксперименте с использованием вакцины TA-ВПЧ и цисплатина на мышинной модели опухоли ТС-1 был получен более сильный E7-специфический ответ Т-лимфоцитов CD8 [63].

Рекомбинантный вирус осповакцины MVA E2 представляет собой вирус коровьей оспы Анкара (Modified Vaccinia Virus Ankara — MVA), содержащий белок вируса папилломы крупного рогатого скота E2. Введенный в качестве ингибитора экспрессии белков E6/E7 и E2 в клетки хозяина, комплекс может ингибировать активность E6 и E7, излечивая предраковые поражения и даже ингибируя рак. Было показано, что комплекс MVA E2 предотвращает рост опухолей у человека и мышей и индуцирует регрессию опухолей у кроликов [86]. Вакцину MVA E2 также использовали для лечения аногенитальных интраэпителиальных поражений, вызванных ВПЧ. В 2014 г. в клиническом исследовании III фазы с участием 1356 пациентов (мужчин и женщин) общая эффективность лечения поражений CIN составила примерно 90%, при этом у всех пациентов-мужчин наблюдалась их полная эрадикация [87]. В клинических исследованиях фазы I/II, оценивающих возможность применения терапевтических вакцин, вакцину MVA E2 использовали для снижения вероятности рецидива респираторного папилломатоза (Recurrent respiratory papillomatosis — RRP): 13 случаев (44,8%) поражений были полностью устранены, а 16 случаев (55,2%) поражений дали рецидив через 6–18 месяцев после лечения. Впоследствии, после второго раунда терапии MVA E2, симптомов новых рецидивов не наблюдалось, что указывает на хороший потенциал вакцины MVA E2 для достижения полной регрессии поражений RRP [25].

Вакцина TG4001 экспрессирует ВПЧ16 E6/E7. В исследовании, оценивающем ее безопасность и эффективность у пациентов с (CIN) 2/3, у 7 из 10 пациентов клиренс мРНК ВПЧ 16 был связан с цитологической и кольпоскопической регрессией CIN 2/3 [22]. Эти многообещающие данные требуют дальнейшего изучения терапевтического действия вакцины TG4001.

Другую терапевтическую противораковую вакцину, сделанную на основе альфавируса Vvax001 и экспрессирующую ВПЧ16 E6/E7, оценивали на людях в отношении иммунологической активности, безопасности и переносимости в первом исследовании фазы I. Результаты показали, что иммунизация вакциной Vvax001 была безопасной и хорошо переносилась пациентами, а в месте инъекции наблюдались лег-

кие реакции, приводящие к Т-клеточным ответам CD4⁺ и CD8⁺ против антигенов Е6 и Е7 [59].

Неплохие перспективы для лечения ВПЧ-ассоциированных раковых заболеваний имеют реплицирующиеся вирусные векторные вакцины на основе пенистых вирусов (foamy virus — FV). Репликационно-активные пенистые вирусы (FV) могут интегрировать в геном хозяина и запускать иммунную передачу сигналов, что приводит к устойчивой экспрессии антигена и надежному иммунному ответу. В отдельном исследовании в качестве каркаса для терапевтической доставки эпитопов В- и Т-клеток *in vitro* был использован белок кошачьего пенистого вируса (feline foamy virus — FFV), прикрепленный к вектору экспрессии, который защищал мышей от трансформированных ВПЧ-16 опухолевых клеток [64].

Вакцины на основе белков представляют собой антигены в виде белков или их части, которые используются и презентуются дендритными клетками (ДК), с дальнейшей активацией путей МНС класса I или II и стимуляцией иммунного ответа Т-клеток CD8 или CD4 [101]. Белковые вакцины богаты Т-клеточными эпитопами CD4 и CD8, что позволяет избежать ограничений со стороны МНС [81]. Белковые вакцины безопасны и стабильны, но их основным недостатком является низкая иммуногенность. Существует необходимость исследования пути презентации класса II МНС, который приводит к менее надежному ответу цитотоксических Т-лимфоцитов. Усовершенствовать белковые вакцины можно с помощью адъювантов или иммуностимулирующих молекул, увеличивающих эндогенный процессинг и усиливающих действие антигенов по пути МНС I [102].

Исследование белка теплового шока mHSP110 на моделях мышей с использованием эпитопа белка Е7 ВПЧ-16 в качестве иммунного адъюванта показало, что белок обладает высоким сродством связывания с антигенами и может повышать их иммуногенность. Был сконструирован белковый комплекс, представляющий собой слитый вариант белков mHSP110 и Е7, меченного флуоресцеин-5-изотиоцианатом (FITC), используемого в качестве индикатора [42, 101, 111]. Иммунизация данным комплексом мышей с опухолями может вызвать сильный ответ цитотоксических Т-лимфоцитов и защитить мышей от атаки опухоли, ингибируя ее рост и увеличивая время жизни животных [85].

Дополнительный домен А белка фибронектина человека (hEDA) является белком-агонистом TLR4 и антигеном для дендритных клеток *in vivo*, индуцируя их созревание путем связывания с TLR4 [70]. Полноразмерный белок Е7

ВПЧ16/18 и hEDA были объединены с образованием двухвалентного рекомбинантного белка, который в сочетании с адъювантами Poly-IC (полиинозин-полицитидиловая кислота) и Poly-ICLC (синтетический комплекс карбоксиметилцеллюлозы, полиинозин-полицитидиловой кислоты и двухцепочечной РНК поли-L-лизина) был использован для оценки эффективности, иммуногенности и потенциальной терапевтической активности в отношении опухолей ВПЧ16 ТС-1 *in situ* в подкожных или генитальных областях. Результаты показали, что действие вакцины стимулирует специфический цитотоксический ответ Т-лимфоцитов (cytotoxic T lymphocyte — CTL) и устраняет имеющиеся опухоли, при этом в некоторых группах для данного комплекса в сочетании с адъювантом был достигнут 100% противоопухолевый эффект [19]. Этот результат является прогрессивным и в будущем обещает хорошие клинические показатели. Данный тип вакцин является многообещающим в отношении терапии рака и усовершенствование ее протоколов позволит улучшить клиническое лечение онкобольных с ВПЧ-инфекцией.

В перспективе будут рассматриваться пути улучшения действия комплексной белковой вакцины, одним из которых является оценка влияния опухолевой супрессивной среды на ее эффективность, предполагающая создание среды, более близкой к росту опухоли *in vivo*. Планируется работа по улучшению экспериментального дизайна вакцины, который, с одной стороны, поможет усовершенствовать способы лечения в экспериментальных группах с крупными опухолями и прогрессирующими раковыми заболеваниями. С другой стороны, определение оптимальной дозы вакцины также является важным фактором иммунной эффективности: высокие дозы введения могут вызывать побочные реакции, которые должны быть зафиксированы по мере их возникновения.

Другим вариантом вакцин для лечения ВПЧ-инфекций являются вакцины на основе нуклеиновых кислот.

Использование ДНК-вакцин стало еще одним преимущественным методом иммунотерапии для лечения рака благодаря таким качествам, как простота, стабильность и эффективность. ДНК-вакцины конструируют на основе бактериальных плазмид, кодирующих антигены, гены которых управляются высокоэффективными эукариотическими промоторами. После инъекции эффективные ДНК-вакцины с помощью молекул МНС класса I проникают в ядро и запускают экспрессию антигенов с последующей активацией иммунной системы [11, 85]. В отличие от живых векторных вакцин, ДНК-вакцины относительно безопасны — при

введении ДНК-вакцин в организм антитела не образуются, и для повышения иммунитета вакцины можно вводить повторно. Одним из главных недостатков ДНК-вакцин является неспособность введенной ДНК к самостоятельной амплификации, что приводит к слабой иммуногенности организма. В целях ее повышения при разработке вакцин используется ряд вспомогательных методов, таких как электропорация дендритных клеток, использование иммуномодуляторов (как правило, это сильные адъюванты) и иммуностимуляторов (цитокины и костимулирующие молекулы) [13]. В клинических исследованиях проводили оценку безопасности, эффективности и иммуногенности ДНК-вакцин у 16 пациентов с CIN 2/3, связанных с ВПЧ [39]. ДНК-вакцина включала экспрессионный вектор рNGVL4a, содержащий кодирующую последовательность ВПЧ 16 E7, связанную с кальретикулином (CRT), белком, связывающим ионы кальция [30]. Из 32 испытуемых пациентов с ВПЧ-16 CIN2/3, вакцинированных с помощью эпидермального введения, внутримышечной инъекции или прямой внутриматочной инъекции у 22 (69%) пациентов наблюдались побочные реакции, связанные с вакциной, а у 8 из 27 (30%) наблюдался гистологический регресс CIN 1. Полученные данные показали возникновение сильного иммунного ответа и появление большого количества Т-лимфоцитов типа CD8 в ответ на введение данной вакцины [16]. Еще одно клиническое исследование было направлено на изучение терапевтического влияния ДНК-вакцины GX-188e на процесс регрессии цервикальной интраэпителиальной неоплазии (CIN3). Вакцина GX-188e включала сигнальную последовательность тканевого активатора плазминогена, лиганд FMS-подобной тирозинкиназы 3 и рекомбинантный ген ВПЧ 16/18 E6/E7 [58]. В результате исследования у 67% пациентов наблюдался гистопатологический регресс, у 77% пациентов с гистологической регрессией наблюдался клиренс ВПЧ. Полученные данные свидетельствуют о том, что введение вакцины GX-188E вызывает значительную активацию клеточного иммунитета, направленного на устранение гистологических поражений, вызванных ВПЧ. При исследовании эффекта действия другой ДНК-вакцины AMV 002 было показано, что вакцина хорошо переносится при введении разных дозировок и повышает специфический иммунитет к опухолеассоциированным антигенам у пациентов, с ранее проведенной терапией [26].

Наиболее многообещающей стратегией в иммунотерапии патологий, вызванных ВПЧ, является использование мРНК-вакцин, которые в настоящее время относятся к наиболее

популярным видам вакцин. В 1989 г. Мэлоун и сотр. показали, что мРНК успешно трансфицируется и экспрессируется в различных эукариотических клетках путем инкапсуляции катионного липида (N-[1-(2,3-диолеилокси)пропил]-N,N,N-хлорида триметиламмония (DOTMA)) [68]. Впоследствии, в 1990 г., мРНК, транскрибируемая *in vitro*, была экспрессирована в клетках скелетных мышц мыши. Таким образом, впервые проведенная успешная экспрессия мРНК *in vitro* продемонстрировала целесообразность разработки мРНК-вакцины.

В состав мРНК включены: 5'-кэп-область, 5'- и 3'-области, кодирующие последовательность белка и 3'-поли-А-хвост [73]. Большое число исследований показало, что мРНК не способна интегрироваться в геном (то есть является безопасной), а новое поколение самоамплифицирующихся мРНК-вакцин (саРНК-вакцин) обладает высокой способностью к автономной репликации. Таким образом, самовоспроизводящиеся мРНК-вирусные векторы имеют высокий уровень экспрессии и обладают лигандной активностью и при введении вместе с TLR7/8, в качестве естественного адъюванта, способны вызывать сильный иммунный ответ [33]. По сравнению с активной разработкой ДНК-вакцин, одной из причин, определяющих медленное развитие исследований в отношении мРНК-вакцин, является их невысокая стабильность и слабая эффективность доставки. Поэтому для введения в организм мРНК часто упаковывают в векторы доставки, включая векторы DC, протамин, катионные липосомные системы доставки и полимерные материалы [67, 78].

Экспериментальных данных об исследовании мРНК-вакцин против ВПЧ немного. Одно из последних направлено на оценку иммуногенности инкапсулированной в липосомальный аппарат мРНК вакцины, экспрессирующей антиген HPV16 E7 с образованием РНК-липидных комплексов (РНК-LPX). Экспериментально было показано, что после внутривенной инъекции мышам вакцина вызвала сильный антиген-специфический эффект и иммунный ответ Т-клеток памяти типа CD-8 [45]. В целом перспективы разработки мРНК-вакцин в настоящее время оцениваются как положительные.

В настоящий момент проведено немного исследований для ВПЧ вакцин на основе нуклеиновых кислот и данные, полученные разными лабораториями в экспериментах на животных, различаются между собой. Исследования, касающиеся мРНК-вакцин, становятся все более популярными благодаря их безопасности и эффективности.

Разновидностью терапевтических ВПЧ-вакцин являются вакцины постоянного тока на основе дендритных клеток. Дендритные

клетки являются наиболее эффективными антиген-презентирующими клетками (АПК) иммунной системы и играют важную роль в иммунной регуляции и презентации антигенов. Они обладают мощной способностью захватывать и обрабатывать антигены для их последующей презентации Т-лимфоцитам *in vivo* и *in vitro*, а многие данные подтверждают способность моноцитарных ДК стимулировать наивные Т-лимфоциты типов CD4 и CD8 *in vivo* и *in vitro*. Кроме того, ДК могут действовать как естественные адьюванты, играя роль в повышении иммуногенности вакцин [89]. Существует два способа приготовления вакцин против ВПЧ, в составе которых используются ДК. Одним из способов является культивирование ДК *in vitro*, а затем их стимуляция антигеном ВПЧ E6/E7. Другой метод заключается в том, что ДК стабильно трансфицируют *in vitro* вектором, экспрессирующим антиген ВПЧ, затем такие клетки вводят в организм пациента, где они представляют антиген наивным Т-клеткам и стимулируют ответ цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) [82, 103]. В создании ДК-вакцин широко используется агонисты Толл-подобных рецепторов (TLR). TLR является частью рецептора распознавания клеток постоянного тока и имеет в составе: рецептор лектина С-типа (CLR), доменоподобный рецептор нуклеотид-связывающей олигомеризации (NLR) и рецептор, подобный гену, индуцированный ретиноевой кислотой (PK) [54, 98]. Лиганд TLR может стимулировать созревание дендритных клеток, а также регулировать метаболизм клеток и продолжительность их жизни [27, 65].

Была исследована безопасность и иммуногенность вакцинации пациентов с раком шейки матки на стадиях IB или IIA зрелыми ДК с гемодицином [89]. Для введения ДК было использовано три дозировки (низкая, средняя и высокая), клетки вводили каждые 21 день (всего 5 раз). Пациенты, получавшие вакцины на основе ДК, показали хорошую переносимость и отсутствие значимых токсических и побочных эффектов, кроме того, отмечено значительное увеличение экспрессии белка E7 и уровня CD4 Т-лимфоцитов после вакцинации.

Интересные исследования были проведены с фрагментами антител (нанотела, или Variable Heavy domain of Heavy chain — VHH), полученными из крови представителей семейства верблюдовых. Установлено, что нанотела распознают белки клеточной поверхности на АПК и могут служить целевыми средствами доставки прикрепленных к ним антигенов. Подобное исследование провели для оценки действия верблюжьих нанотел (VHH) на опухолевые клетки типа DC2.4, а иммунизация мышей с опухолью, вызванной ВПЧ, привела к образованию боль-

шего количества CD8-лимфоцитов, инфильтрирующих данную опухоль [108]. Несмотря на проведенные исследования в отношении вакцин постоянного тока на основе ДК, эти вакцины имеют ограничения. Во-первых, из-за несовершенства технологий, нет гарантии получить ДК, соответствующие требуемому объему и качеству. Эти вакцины также трудно производить в больших масштабах. Таким образом, при разработке данного типа вакцин предстоит преодолеть много препятствий.

Каждый тип рака несет большое количество потенциально опухолевых антигенов, поэтому для вакцинации всех опухолевых клеток оптимальной стратегией является применение опухолевых вакцин, с включением всех потенциально значимых антигенов. Применение данного подхода позволяет обходить ограничения со стороны основного комплекса гистосовместимости (МНС) [97]. Эффективность такого подхода оценивали в клинических испытаниях на протяжении многих лет, исследуя различные виды опухолей, включая колоректальные, легочные опухоли, почечно-клеточный рак, меланому и рак предстательной железы. Поскольку ВПЧ является хорошо известным опухолевым специфическим антигеном, вакцины на основе опухолевых клеток могут являться не самым подходящим вариантом иммунотерапии против рака, связанного с ВПЧ. К настоящему моменту накоплено мало данных, оценивающих полезность этого типа вакцины при ВПЧ-ассоциированных раковых заболеваниях.

Основная роль терапевтических вакцин заключается в повышении адаптивного Т-клеточного иммунитета, в инициации наивных Т-клеток и последующей генерацией цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ, cytotoxic T-cell — CTL), нацеленных на клетки, инфицированные ВПЧ, а также для индукции Т-клеток типа CD4, стимулирующих выработку необходимых цитокинов и усиливающих действие АПК. На сегодняшний день все терапевтические вакцины, которые были проверены в клинических испытаниях, являются безопасными и хорошо переносятся. Тем не менее многие вакцины, испытание которых уже вступило в III клиническую фазу, пока не были объявлены из-за их более низких ожидаемых клинических эффектов. Также эти вакцины показали успешные результаты на животных моделях, но оказались неэффективными при раке, вызванном ВПЧ человека, что подчеркивает ограничения используемых в настоящее время доклинических моделей вакцин [47]. Фактически, в микроокружении опухоли может находиться большое количество иммуносупрессивных сред, влияющих на эффективность индукции вакциной Т-клеток, вызванной различными механизмами

ми уклонения от иммунитета и иммуносупрессивными механизмами, снижающими иммунный эффект. Например, ассоциированные с раком фибробласты (cancer-associated fibroblasts — CAF) обладают проонкогенными функциями и вызывают иммунное уклонение от опухолей с помощью нескольких механизмов. В опухолях человека, богатых CAF, наблюдается отсутствие Т-клеток типа CD8. В другом исследовании обнаружены слабые иммунные эффекты опухолей с CAF, после введения мышам CAF, смешанных с клетками-мишенями для формирования состояния, аналогичного опухолевой среде, с последующим проведением иммунотерапии [40]. Именно поэтому важно учитывать влияние опухолевой среды на эффективность действия вакцины, и существует необходимость исследования большего числа опухолей *in situ*, включая опухоли шейки матки, половых органов, головы и шеи, в целом, для увеличения числа доклинических испытаний. Полученные факты являются весомым доказательством важности влияния опухолевой среды на работу ВПЧ-вакцин, за которым необходимо проведение доконального обсуждения вопросов улучшения качества вакцин. Одним из таких направлений является повышение иммуногенности вакцин на текущем этапе исследований. Хотя многие вакцины на стадии разработки с применением моделей опухолей мышей способны достичь высоких показателей клиренса или даже случаев полного клиренса, их показатели на клинической стадии все еще остаются средними. Это обуславливает необходимость более интенсивного продвижения разработок, к примеру, в отношении мРНК-вакцин или комбинированных схем вакцинно-лекарственной терапии, с точки зрения повышения иммунной эффективности. Сегодня мРНК-вакцины являются самым популярным вариантом вакцин и обладают высокой иммуногенностью в комбинации с использованием липидных наночастиц (lipid nanoparticles — LNP) в качестве естественного адъюванта, что делает эту форму вакцины весьма эффективной. В настоящее время мРНК-вакцины составляют очень небольшую долю в разработках терапевтических вакцин против ВПЧ, но в будущем будет наблюдаться тенденция к более широкому исследованию этой формы вакцины. Кроме того, комбинация вакцин и лекарственных средств может являться эффективным способом лечения ВПЧ-инфекций, дающим наилучший результат. Классическим вариантом такого лечения является комбинация с ингибиторами иммунных контрольных точек. Например, биотерапевтические препараты пембролизумаб и ниволумаб, являющиеся антителами против белка рецептора программируемой клеточной гибели (Programmed

cell death 1 — PD-1), показали хорошую эффективность в сочетании с вакцинами против ВПЧ [108].

В настоящее время представлен новый способ лечения рака — Т-клеточная генно-инженерная терапия, разделенная на терапию CAR-T (химерный антигенный рецептор, сконструированный у Т-клеток) и терапию TCR-T (Т-клеточный рецептор, сконструированный у Т-клеток), показавшая эффективность при гематологических раковых заболеваниях [41]. В отдельном исследовании был идентифицирован TCR высокой чистоты, нацеленный на ВПЧ-16 E7, распознающий эпитопный комплекс E7. Таким образом для лечения метастатического эпителиального рака, вызванного ВПЧ, была разработана терапия с помощью TCR-T. По результатам испытаний у 6 из 12 исследуемых пациентов, получавших лечение в клиническом исследовании фазы I, наблюдалась регрессия опухоли [78]. Эти данные дают представление о стратегиях лечения, предусматривающих сочетание вакцин против ВПЧ с генно-инженерной терапией с участием Т-клеток. Известно, что использование адъювантов позволяет повысить терапевтическую эффективность вакцин. К примеру, использование адъюванта Poly-ICLC позволило добиться 100% регрессии опухоли в некоторых экспериментальных группах. В будущем необходимо увеличивать объем знаний о Poly-ICLC, а также исследовать более эффективные адъюванты.

В поиске новых терапевтических мишеней для большинства современных вакцин основное внимание будет сосредоточено на антигенах E6 и E7, поскольку продолжающееся увеличение экспрессии данных антигенов способствует прогрессированию опухолей. Существуют разработки, ориентированные на антиген E2, касающиеся лечения предраковых симптомов и поражений (к примеру, генитальные кондиломы). Однако для лечения рака антиген E2 никогда не был эффективен, что требовало поиска новых белков-мишеней. Белок E1 необходим для репликации вируса, является самым крупным белком ВПЧ (последовательность белка E1 ВПЧ-16 составляет 649 аминокислот), и вероятно, имеет большее количество потенциальных эпитопов для Т-клеток по сравнению с белками ВПЧ-16 E6 и E7 меньшего размера (154 а.к. и 98 а.к. соответственно). [20]. В последнее время доказана роль белка E1 в канцерогенезе, что позволяет поставить его в ряды белков-кандидатов для разработки терапевтических вакцин. Подобно ему, другой белок, E2, используется для разработки вакцин против предраковых поражений и в будущем ожидается возможность разработки терапевтических схем против рака с его участием. Белок E5 ВПЧ является еще одной,

перспективной мишенью для разработки терапевтических вакцин. Экспериментально показано, что у пациентов с ВПЧ-положительным раком головы и шеи экспрессируются Т-клетки типа CD8, к которым у белка Е5 ВПЧ имеется несколько эпитопов. Таким образом, белок Е5 можно рассматривать в качестве вакцинного антигена, запускающего опухолево-реактивные ответы Т-клеток CD8 [36].

Создание терапевтических ВПЧ вакцин является важным этапом в эволюции вакцин, направленных против патологий, вызванных вирусом папилломы человека и будущие стратегии в исследовании терапевтических вакцин будут направлены на поиск и разработку новых мишеней для ВПЧ-антигенов, создание более мощных адъювантов и обогащение доклинических моделей.

Список литературы/References

1. Аляутдина О.С., Прилуцкая В.Ю. Текущие проблемы и будущие направления вакцинации против вируса папилломы человека (ВПЧ) // Безопасность и риск фармакотерапии. 2020. Т. 8, № 3. С. 141–150. [Alyautdina O.S., Prilutskaya V.Yu. Ongoing challenges and future directions in Human papillomavirus vaccination. *Bezopasnost' i risk farmakoterapii = Safety and Risk of Pharmacotherapy*, 2020, vol. 8, no. 3, pp. 141–150. (In Russ.)] doi: 10.30895/2312-7821-2020-8-3-141-150
2. Винокурова С.В. Вирусы папилломы человека 6 и 11 типов: распространенность, патогенность и онкогенность // Вопросы практической кольпоскопии. Генитальные инфекции. 2022. Т. 4. С. 6–16. [Vinokurova S.V. Human papillomavirus types 6 and 11: prevalence, pathogenicity and oncogenicity. *Voprosy prakticheskoi kolposkopii. Genitalnye infekcii = Issues of Practical Colposcopy*, 2022, vol. 4, pp. 6–16. (In Russ.)] doi: 10.46393/27826392_2022_4_6
3. Зароченцева Н.В., Краснополяский В.И., Белая Ю.М. Успехи вакцинопрофилактики ВПЧ-ассоциированных заболеваний и рака шейки матки в мире и в России. Обзор литературы // Вопросы практической кольпоскопии. Генитальные инфекции. 2022. Т. 1. С. 8–16. [Zarochentseva N.V., Krasnopol'skiy V.I., Belaya Yu.M. Progress in vaccination of HPV-associated diseases and cervical cancer in the world and in Russia. Literature review. *Voprosy prakticheskoi kolposkopii. Genitalnye infekcii = Colposcopy Issues. Genital Infections*, 2020, vol. 1, pp. 8–16. (In Russ.)]
4. Каира А.Н., Свитич О.А., Политова Н.Г. Папилломавирусная инфекция — эпидемиология и профилактика: учебное пособие. М., 2022. [Kaira A.N., Svitich O.A., Politova N.G. Papillomavirus infection — epidemiology and prevention. *Moscow*, 2022. (In Russ.)]
5. Капительный В.А., Ефимова В.А., Лазаренко А.Н. Возможности и перспективы таргетной терапии персистирующей папилломавирусной инфекции // Архив акушерства и гинекологии им. В.Ф. Снегирева. 2023. Т. 10, № 1. С. 13–24. [Kaptilnyy V.A., Efimova V.A., Lazarenko A.N. Possibilities and prospects of targeted therapy for persistent human papillomavirus infection. *Arkhiv akusherstva i ginekologii im. V.F. Snegireva = V.F. Snegirev Archives of Obstetrics and Gynecology*, 2023, vol. 10, no. 1, pp. 13–24. (In Russ.)] doi: 10.17816/2313-8726-2023-10-1-13-24
6. Куценко И.И., Боровиков И.О., Томина О.В., Горринг Х.И., Булгакова В.П., Боровикова О.И. Вакцинация против вируса папилломы человека после адъювантной терапии цервикальных интраэпителиальных неоплазий // Кубанский научный медицинский вестник. 2022. Т. 29, № 3. С. 103–120. [Kutsenko I.I., Borovikov I.O., Tomina O.V., Gorring Kh.I., Bulgakova V.P., Borovikova O.I. Vaccination against human papillomavirus after adjuvant therapy of cervical intraepithelial neoplasia. *Kubanskii nauchnyi medicinskii vestnik = Kuban Scientific Medical Bulletin*, 2022, vol. 29, no. 3, pp. 103–120. (In Russ.)] doi: 10.25207/1608-6228-2022-29-3-103-120
7. Михалев Д.Е., Байдик О.Д., Мухамедов М.Р., Александров Г.О. Роль вируса папилломы человека в развитии потенциально злокачественных заболеваний и плоскоклеточных карцином слизистой оболочки полости рта // Российский стоматологический журнал. 2022. Т. 26, № 3. С. 267–276. [Mikhalev D.E., Baydik O.D., Mukhamedov M.R., Aleksandrov G.O. The role of the human papilloma virus in the development of potentially malignant diseases and squamous cell carcinomas of the oral mucosa. *Rossiiskii stomatologicheskii zhurnal = Russian Journal of Dentistry*, 2022, vol. 26, no. 3, pp. 267–276. (In Russ.)] doi: 10.17816/1728-2802-2022-26-3-267-276
8. Пестрикова Т.Ю., Исмаилова А.Ф., Юрасова Е.А., Юрасов И.В. Папилломавирусная инфекция как междисциплинарная проблема современного здравоохранения // Дальневосточный медицинский журнал. 2022. № 1. С. 99–103. [Pestrikova T.Yu., Ismaylova I.F., Yurasova E.A., Yurasov I.V. Papilloma virus infection as an interdisciplinary problem of current healthcare. *Dal'nevostochnyi meditsinskii zhurnal = Far Eastern Medical Journal*, 2022, no. 1, pp. 99–103. (In Russ.)] doi: 10.35177/1994-5191-2022-1-17
9. Полатова Д.Ш., Мадаминов А.Ю. Основные молекулярные механизмы канцерогенеза, индуцированного вирусом папилломы человека // Злокачественные опухоли. 2021. Т. 11, № 4. С. 39–47. [Polatova D. Sh., Madaminov A.Yu. Main molecular mechanisms of carcinogenesis induced by human papillomavirus. *Zlokachestvennye opykholi = Malignant Tumors*, 2021, vol. 11, no. 4, pp. 39–47. (In Russ.)] doi: 10.1765/2313-805X-2021-11-2-31-40
10. Рябова Е.И., Деркаев А.А., Есмагамбетов И.Б., Щербяков Д.В., Довгий М.А., Бырихина Д.В., Прокофьев В.В., Чемоданова И.П. Сравнение различных технологий получения рекомбинантного аденоассоциированного вируса в лабораторном масштабе // Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2021. Т. 21, № 4. С. 266–278. [Ryabova E.I., Derkaev A.A., Esmagambetov I.B., Shcheryakov D.V., Dovgiy M.A., Byrikhina D.V., Prokofiev V.V., Chemedanova I.P. Comparison of different technologies for producing recombinant adeno-associated virus on a laboratory scale. *Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*, 2021, vol. 21, no. 4, pp. 266–278. (In Russ.)] doi: 10.30895/2221-996X-2021-21-4-266-278
11. Седова Е.С., Первойкина К.А., Щербинин Д.Н., Шмаров М.М. Генетические конструкции, выполняющие функции адъювантов, в составе вакцин на основе аденовирусных векторов // Иммунология. 2022. Т. 43, № 1. С. 5–17. [Sedova E.S., Pervoykina K.A., Shcherbinin D.N., Shmarov M.M. Genetic constructs as adjuvants in vaccines based on adenoviral vectors. *Immunologiya = Immunology*, 2022, vol. 43, no. 1, pp. 5–17. (In Russ.)] doi: 10.33029/0206-4952-2021-42-6-5-17

12. Шамшева О.В. Эволюция национального календаря профилактических прививок. Результаты и перспективы // Детские инфекции. 2022. Т. 21, № 1. С. 5–15. [Shamsheva O.V. Evolution of the national vaccination calendar. Results and prospects. *Det'skie infektsii = Children Infections*, 2022, vol. 21, no. 1, pp. 5–15. (In Russ.)] doi: 10.22627/2072-8107-2022-21-1-5-15
13. Afrough B., Dowall S., Hewson R. Emerging viruses and current strategies for vaccine intervention. *Clin. Exp. Immunol.*, 2019, vol. 196, no. 2, pp. 157–166. doi: 10.1111/cei.13295
14. Alvarez R.D., Huh W.K., Bae S., Lamb L.S., Jr., Conner M.G., Boyer J., Wang C., Hung Ch-Fu, Sauter E., Paradis M., Adams E., Hester Sh., Jackson B., Wu T., Trimble C. A Pilot Study of Pngv14a-CRT/E7(detox) for the Treatment of Patients With HPV16+ Cervical Intraepithelial Neoplasia 2/3 (CIN2/3). *Gynecol. Oncol.*, 2007, vol. 140, no. 2, pp. 245–252. doi: 10.1016/j.ygyno.2015.11.026
15. Angelo M.G., Zima J., Tavares Da Silva F., Baril L., Arellano F. Post-licensure safety surveillance for Human papillomavirus-16/18-AS04-adjuvanted vaccine: more than 4 years of experience. *Pharmacoepidemiol. Drug Saf.*, 2014, vol. 23, no. 5, pp. 456–465. doi: 10.1002/pds.3593
16. Arribillaga L., Echeverria I., Belsue V., Gomez T., Lozano T., Casares N., Villanueva L., Domingos-Pereira S., Romero P., Nardelli-Haeffliger D., Hervás-Stubbs S., Sarobe P., Rodriguez M., Carrascosa J., Zürcher Th., Lasarte J. Bivalent therapeutic vaccine against HPV16/18 genotypes consisting of a fusion protein between the extra domain a from human fibronectin and HPV16/18 E7 viral antigens. *J. Immunother.*, 2020, vol. 8, no. 1: e000704. doi: 10.1136/jitc-2020-000704
17. Barouch D.H., Kik S.V., Weverling G.J., Dilan R., King S.L., Maxfield L.F., Clark S., Ng'ang'a D., Brandariz K.L., Abbink P., Sinangil F., Bruyn G., Gray G. E., Roux S., Bekker L-G., Dilraj A., Kibuuka H., Robb M.L., Michael N.L., Anzala O., Amornkul P.N., Gilmour J., Hural J., Buchbinder S.P., Seaman M.S., Dolin R., Baden L.R., Carville A., Mansfield K.G., Pau M.G., Goudsmit J. International Seroepidemiology of Adenovirus Serotypes 5, 26, 35, and 48 in Pediatric and Adult Populations. *Vaccine*, 2011, vol. 29, no. 32, pp. 5203–5209 doi: 10.1016/j.vaccine.2011.05.025
18. Basu P., Mehta A., Jain M., Gupta S., Nagarkar R.V., John S., Petit R. A Randomized Phase 2 Study of ADXS11-001 Listeria Monocytogenes-Listeriolysin O Immunotherapy With or Without Cisplatin in Treatment of Advanced Cervical Cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer*, 2018, vol. 28, no. 4, pp. 764–772. doi: 10.1097/igc.0000000000001235
19. Becker K.A., Florin L., Sapp C., Sapp M. Dissection of Human Papillomavirus Type 33 L2 Domains Involved in Nuclear Domains (ND) 10 Homing and Reorganization. *Virology*, 2003, vol. 314, no. 1, pp. 161–167. doi: 10.1016/s0042-6822(03)00447-1
20. Boileson D.R., Nielsen K.N., Holst P.J. Novel Antigenic Targets of HPV Therapeutic Vaccines. *Vaccines*, 2021, vol. 9, no. 11: 1262. doi: 10.3390/vaccines9111262
21. Bossler F., Hoppe-Seyler K., Hoppe-Seyler F. PI3K/AKT/mTOR Signaling Regulates the Virus/Host Cell Crosstalk in HPV-Positive Cervical Cancer Cells. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, vol. 20, no. 9: 2188. doi: 10.3390/ijms20092188
22. Brun J.L., Dalstein V., Leveque J., Mathevet P., Raulic P., Baldauf J.J., Scholl S., Huynh B., Douvier S., Riethmuller D., Clavel C., Birembaut Ph., Calenda V., Baudin M., Bory J.P. Regression of High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia With TG4001 Targeted Immunotherapy. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2011, vol. 204, no. 2, pp. 169.e1–169.e8. doi: 10.1016/j.ajog.2010.09.020
23. Buck C.B., Day P.M., Trus B.L. The Papillomavirus Major Capsid Protein L1. *Virology*, 2013, vol. 445, no. 1–2, pp. 169–174. doi: 10.1016/j.virol.2013.05.038
24. Burd E.M. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2003, vol. 16, no. 1, pp. 1–17. doi: 10.1128/cmr.16.1.1-17.2003
25. Cabo Beltran O.R., Rosales Ledezma R. MVA E2 Therapeutic Vaccine for Marked Reduction in Likelihood of Recurrence of Respiratory Papillomatosis. *Head Neck*, 2019, vol. 41, no. 3, pp. 657–665. doi: 10.1002/hed.25477
26. Chandra J., Woo W.P., Finlayson N., Liu H.Y., McGrath M., Ladwa R., Brauer M., Xu Y., Hanson S., Panizza B., Frazer I.H., Porceddu S.V. A Phase 1, Single Centre, Open Label, Escalating Dose Study to Assess the Safety, Tolerability and Immunogenicity of a Therapeutic Human Papillomavirus (HPV) DNA Vaccine (AMV002) for HPV-Associated Head and Neck Cancer (HNC). *Cancer Immunol. Immunother.*, 2021, vol. 70, no. 3, pp. 743–753. doi: 10.1007/s00262-020-02720-7
27. Chen M., Huang L., Wang J. Deficiency of Bim in Dendritic Cells Contributes to Overactivation of Lymphocytes and Autoimmunity. *Blood*, 2007, vol. 109, no. 10, pp. 4360–4367. doi: 10.1182/blood-2006-11-056424
28. Chen C.H., Wu T.C. Experimental Vaccine Strategies for Cancer Immunotherapy. *J. Biomed. Sci.*, 1998, vol. 5, no. 4, pp. 231–252. doi: 10.1007/bf02255855
29. Cheng L., Wang Y., Du J. Human Papillomavirus Vaccines: An Updated Review. *Vaccines*, 2020, vol. 8, no. 3: 3915. doi: 10.3390/vaccines8030391
30. Cheng W.F., Hung C.F., Chai C.Y., Hsu K.F., He L., Ling M., Wu T.-C.T.-C. Tumor-Specific Immunity and Antiangiogenesis Generated by a DNA Vaccine Encoding Calreticulin Linked to a Tumor Antigen. *J. Clin. Invest.*, 2001, vol. 108, no. 5, pp. 669–678. doi: 10.1172/jci12346
31. Cory L., Chu C. ADXS-HPV: A Therapeutic Listeria Vaccination Targeting Cervical Cancers Expressing the HPV E7 Antigen. *Hum. Vaccines Immunotherapeut.*, 2014, vol. 10, no. 11, pp. 3190–3195. doi: 10.4161/hv.34378
32. Çuburu N., Khan S., Thompson C.D., Kim R., Vellinga J., Zahn R., Lowy D.R., Schepher G., Schiller J.T. Adenovirus Vector-Based Prime-Boost Vaccination via Heterologous Routes Induces Cervicovaginal CD8(+) T Cell Responses Against HPV16 Oncoproteins. *Int. J. Cancer*, 2018, vol. 142, no. 7, pp. 1467–1479. doi: 10.1002/ijc.31166
33. Diebold S.S., Kaisho T., Hemmi H., Akira S., Reis e Sousa C. Innate Antiviral Responses by Means of TLR7-Mediated Recognition of Single-Stranded RNA. *Science*, 2004, vol. 303, no. 5663, pp. 1529–1531. doi: 10.1126/science.1093616
34. Dillely S., Miller K.M., Huh W.K. Human Papillomavirus Vaccination: Ongoing Challenges and Future Directions. *Gynecol. Oncol.*, 2020, vol. 156, no. 2, pp. 498–502. doi: 10.1016/j.ygyno.2019.10.018
35. Dyson N., Howley P.M., Münger K., Harlow E. The Human Papilloma Virus-16 E7 Oncoprotein is Able to Bind to the Retinoblastoma Gene Product. *Science*, 1989, vol. 243, no. 4893, pp. 934–937. doi: 10.1126/science.2537532
36. Eberhardt C.S., Kissick H.T., Patel M.R., Cardenas M.A., Prokhnevskaya N., Obeng R.C., Nasti T.H., Griffith C.C., Im S.J., Wang X., Shin D.M., Carrington M., Chen Z.G., Sidney J., Sette A., Saba N.F., Wieland A., Ahmed R. Functional HPV-Specific PD-1(+) Stem-Like CD8 T Cells in Head and Neck Cancer. *Nature*, 2021, vol. 597, no. 7875, pp. 279–284. doi: 10.1038/s41586-021-03862-z

37. Egawa K. Do Human Papillomaviruses Target Epidermal Stem Cells. *Dermatology*, 2003, vol. 207, no. 3, pp. 251–254. doi: 10.1159/000073085
38. Ewer K.J., Lambe T., Rollier C.S., Spencer A.J., Hill A.V., Dorrell L. Viral Vectors as Vaccine Platforms: From Immunogenicity to Impact. *Curr. Opin. Immunol.*, 2016, vol. 41, pp. 47–54. doi: 10.1016/j.coi.2016.05.014
39. Flogging Gardasil. *Nat. Biotechnol.*, 2007, vol. 25, no. 3: 261. doi: 10.1038/nbt0307-261
40. Ford K., Hanley C.J., Mellone M., Szyndralewicz C., Heitz F., Wiesel P., Wood O., Machado M., Lopez M.-A., Ganesan A.-P., Wang C., Chakravarthy A., Fenton T.R., King E.V., Vijayanand P., Ottensmeier C.H., Al-Shamkhani A., Savelyeva N., Thomas G.J. NOX4 Inhibition Potentiates Immunotherapy by Overcoming Cancer-Associated Fibroblast-Mediated CD8 T-Cell Exclusion From Tumors. *Cancer Res.*, 2020, vol. 80, no. 9, pp. 1846–1860. doi: 10.1158/0008-5472.Can-19-3158
41. Gao Q., Dong X., Xu Q., Zhu L., Wang F., Hou Y., Chao C.-C. Therapeutic Potential of CRISPR/Cas9 Gene Editing in Engineered T-Cell Therapy. *Cancer*, 2019, vol. 8, no. 9, pp. 4254–4264. doi: 10.1002/cam4.2257
42. Garland S.M., Kjaer S.K., Muñoz N., Block S.L., Brown D.R., DiNubile M.J., Lindsay B.R., Kuter B.J., Perez G., Dominiak-Felden G., Saah A.J., Drury R., Das R., Velicer C. Impact and Effectiveness of the Quadrivalent Human Papillomavirus Vaccine: A Systematic Review of 10 Years of Real-World Experience. *Clin. Infect. Dis.*, 2016, vol. 63, no. 4, pp. 519–527. doi: 10.1093/cid/ciw354
43. Gomez-Gutierrez J.G., Elpek K.G., Montes de Oca-Luna R., Shirwan H., Sam Zhou H., McMasters K.M. Vaccination With an Adenoviral Vector Expressing Calreticulin-Human Papillomavirus 16 E7 Fusion Protein Eradicates E7 Expressing Established Tumors in Mice. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2007, vol. 56, no. 7, pp. 997–1007. doi: 10.1007/s00262-006-0247-2
44. Graham S.V. The Human Papillomavirus Replication Cycle, and its Links to Cancer Progression: A Comprehensive Review. *Clin. Sci.*, 2017, vol. 131, no. 17, pp. 2201–2221. doi: 10.1042/cs20160786
45. Grunwitz C., Salomon N., Vascotto F., Selmi A., Bukur T., Diken M., Kreitera S., Türecia Ö., Sahin U. HPV16 RNA-LPX Vaccine Mediates Complete Regression of Aggressively Growing HPV-Positive Mouse Tumors and Establishes Protective T Cell Memory. *Oncimmunology*, 2019, vol. 8, no. 9: e1629259. doi: 10.1080/2162402x.2019.1629259
46. Guirnalda P., Wood L., Paterson Y. Listeria Monocytogenes and its Products as Agents for Cancer Immunotherapy. *Adv. Immunol.*, 2012, vol. 113, pp. 81–118. doi: 10.1016/b978-0-12-394590-7.00004-x
47. Hancock G., Hellner K., Dorrell L. Therapeutic HPV Vaccines. *Best Pract. Res. Clin. Obstetr. Gynaecol.*, 2018, vol. 47, pp. 59–72. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2017.09.008
48. Hanna E., Bachmann G. HPV Vaccination With Gardasil: A Breakthrough in Women's Health. *Expert Opin. Biol. Ther.*, 2006, vol. 6, no. 11, pp. 1223–1227. doi: 10.1517/14712598.6.11.1223
49. Herrero R., González P., Markowitz L.E. Present Status of Human Papillomavirus Vaccine Development and Implementation. *Lancet Oncol.*, 2015, vol. 16, no. 5, pp. e206–e216. doi: 10.1016/s1470-2045(14)70481-4
50. Hu Z., Ma D. The Precision Prevention and Therapy of HPV-Related Cervical Cancer: New Concepts and Clinical Implications. *Cancer Med.*, 2018, vol. 7, no. 10, pp. 5217–5236. doi: 10.1002/cam4.1501
51. Huber B., Wang J.W., Roden R.B. S., Kirnbauer R. RG1-VLP and Other L2-Based, Broad-Spectrum HPV Vaccine Candidates. *J. Clin.*, 2021, vol. 10, no. 5: 1044. doi: 10.3390/jcm10051044
52. Ikeda Y., Adachi K., Tomio K., Eguchi-Kojima S., Tsuruga T., Uchino-Mori M., Taguchi A., Komatsu A., Nagamatsu T., Oda K., Kawana-Tachikawa A., Uemura Y., Igimi S., Osuga Y., Fujii T., Kawana K. A Placebo-Controlled, Double-Blind Randomized (Phase IIB) Trial of Oral Administration With HPV16 E7-Expressing Lactobacillus, GLBL101c, for the Treatment of Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade 2 (Cin2). *Vaccines*, 2021, vol. 9, no. 4: 329. doi: 10.3390/vaccines9040329
53. Joura E.A., Giuliano A.R., Iversen O.E., Bouchard C., Mao C., Mehlsen J., Moreira E.D., Ngan Y., Petersen L.K., Lazcano-Ponce E., Pitisuttithum P., Restrepo J.A., Stuart G., Woelber L., Yang Y.C., Cuzick J., Garland S.M., Huh W., Kjaer S.K., Bautista O.M., Chan I.S.F., Chen J., Gesser R., Moeller E., Ritter M., Vuocolo S., Luxembourg A. A 9-Valent HPV Vaccine Against Infection and Intraepithelial Neoplasia in Women. *New Engl. J. Med.*, 2015, vol. 372, no. 8, pp. 711–723. doi: 10.1056/NEJMoa1405044
54. Kalnin K., Chivukula S., Tibbitts T., Yan Y., Stegalkina S., Shen L., Cieszynski J., Costa V., Sabharwal R., Anderson S.F., Christensen N., Jagu S., Roden R.B.S., Kleantous H. Incorporation of RG1 Epitope Concatemers Into a Self-Adjuvanting Flagellin-L2 Vaccine Broaden Durable Protection Against Cutaneous Challenge With Diverse Human Papillomavirus Genotypes. *Vaccine*, 2017, vol. 35, no. 37, pp. 4942–4951. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.07.086
55. Kawana K., Adachi K., Kojima S., Taguchi A., Tomio K., Yamashita A., Nishida H., Nagasaka K., Arimoto T., Yokoyama T., Wada-Hiraike O., Oda K., Sewaki T., Osuga Y., Fujii T. Oral Vaccination Against HPV E7 for Treatment of Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade 3 (CIN3) Elicits E7-Specific Mucosal Immunity in the Cervix of CIN3 Patients. *Vaccine*, 2014, vol. 32, no. 47, pp. 6233–6239. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.09.020
56. Kawasaki T., Kawai T., Akira S. Recognition of Nucleic Acids by Pattern-Recognition Receptors and its Relevance in Autoimmunity. *Immunol. Rev.*, 2011, vol. 243, no. 1, pp. 61–73. doi: 10.1111/j.1600-065X.2011.01048.x
57. Khan S., Oosterhuis K., Wunderlich K., Bunnik E.M., Bhagoe M., Boedhoe S., Karia S., Steenbergen R.D.M., Bosch L., Serroyen J., Janssen S., Schuitemaker H., Vellinga J., Scheper G., Zahn R., Custers J. Development of a Replication-Deficient Adenoviral Vector-Based Vaccine Candidate for the Interception of HPV16- and HPV18-Induced Infections and Disease. *Int. J. Cancer*, 2017, vol. 141, no. 2, pp. 393–404. doi: 10.1002/ijc.30679
58. Kim T.J., Jin H.T., Hur S.Y., Yang H.G., Seo Y.B., Hong S.R., Lee C.-W., Kim S., Woo J.-W., Park K.S., Hwang Y.-Y., Park J., Lee I.-H., Lim K.-T., Lee K.-H., Jeong M.S., Surh C.D., Suh Y.S., Park J.S., Sung Y.C. Clearance of Persistent HPV Infection and Cervical Lesion by Therapeutic DNA Vaccine in CIN3 Patients. *Nat. Commun.*, 2014, vol. 5: 5317. doi: 10.1038/ncomms6317
59. Komdeur F.L., Singh A., van de Wall S., Meulenber J.J.M., Boerma A., Hoogeboom B.N., Pajens S.T., Oyarce C., de Bruyn M., Schuurin E., Regts J., Marra R., Werner N., Sluis J., van der Zee A.G.J., Wilschut J.C., Allersma D.P., van Zanten C.J., Kosterink J.G.W., Jorritsma-Smit A., Yigit R., Nijman H.W., Daemen T. First-In-Human Phase I Clinical Trial of an SFV-Based RNA Replicon Cancer Vaccine Against HPV-Induced Cancers. *Mol. Ther.*, 2021, vol. 29, no. 2, pp. 611–625. doi: 10.1016/j.ythte.2020.11.002

60. Kreimer A.R., González P., Katki H.A., Porras C., Schiffman M., Rodriguez A.C., Solomon D., Jiménez S., Schiller J.T., Lowy D.R., van Doorn L.-J., Struijk L., Quint W., Chen S., Wacholder S., Hildesheim A., Herrero R. Efficacy of a Bivalent HPV 16/18 Vaccine Against Anal HPV 16/18 Infection Among Young Women: A Nested Analysis Within the Costa Rica Vaccine Trial. *Lancet Oncol.*, 2011, vol. 12, no. 9, pp. 862–870. doi: 10.1016/s1470-2045(11)70213-3
61. Lang Kuhs K.A., Gonzalez P., Rodriguez A.C., van Doorn L.J., Schiffman M., Struijk L., Chen S., Quint W., Lowy D.R., Porras C., DelVecchio C., Jimenez S., Safaeian M., Schiller J.T., Wacholder S., Herrero R., Hildesheim A., Kreimer A.R. Reduced Prevalence of Vulvar HPV16/18 Infection Among Women Who Received the HPV16/18 Bivalent Vaccine: A Nested Analysis Within the Costa Rica Vaccine Trial. *J. Infect. Dis.*, 2014, vol. 210, no. 12, pp. 1890–1899. doi: 10.1093/infdis/jiu357
62. Lazcano-Ponce E., Stanley M., Muñoz N., Torres L., Cruz-Valdez A., Salmerón J., Rojas R., Herrero R., Hernández-Ávila M. Overcoming Barriers to HPV Vaccination: non-Inferiority of Antibody Response to Human Papillomavirus 16/18 Vaccine in Adolescents Vaccinated With a Two-Dose vs. A Three-Dose Schedule at 21 Months. *Vaccine*, 2014, vol. 32, no. 6, pp. 725–732. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.11.059
63. Lee S.Y., Kang T.H., Knoff J., Huang Z., Soong R.S., Alvarez R.D., Hung C.-F., Wu T.-C. Intratumoral Injection of Therapeutic HPV Vaccinia Vaccine Following Cisplatin Enhances HPV-Specific Antitumor Effects. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2013, vol. 62, no. 7, pp. 1175–1185. doi: 10.1007/s00262-013-1421-y
64. Lei J., Osen W., Gardyan A., Hotz-Wagenblatt A., Wei G., Gissmann L., Eichmüller S., Löchelt M. Replication-Competent Foamy Virus Vaccine Vectors as Novel Epitope Scaffolds for Immunotherapy. *PLoS One*, 2015, vol. 10, no. 9: e0138458. doi: 10.1371/journal.pone.0138458
65. Li X., Jiang S., Tapping R.I. Toll-Like Receptor Signaling in Cell Proliferation and Survival. *Cytokine*, 2010, vol. 49, no. 1, pp. 1–9. doi: 10.1016/j.cyto.2009.08.010
66. Liu D.W., Tsao Y.P., Kung J.T., Ding Y.A., Sytwu H.K., Xiao X., Shen S.-L. Recombinant Adeno-Associated Virus Expressing Human Papillomavirus Type 16 E7 Peptide DNA Fused With Heat Shock Protein DNA as a Potential Vaccine for Cervical Cancer. *J. Virol.*, 2000, vol. 74, no. 6, pp. 2888–2894. doi: 10.1128/jvi.74.6.2888-2894.2000
67. Lungwitz U., Breunig M., Blunk T., Göpferich A. Polyethylenimine-Based non-Viral Gene Delivery Systems. *Eur. J. Pharmaceut. Biopharmaceut.*, 2005, vol. 60, no. 2, pp. 247–266. doi: 10.1016/j.ejpb.2004.11.011
68. Macartney K.K., Chiu C., Georgousakis M., Brotherton J.M. Safety of Human Papillomavirus Vaccines: A Review. *Drug Saf.*, 2013, vol. 36, no. 6, pp. 393–412. doi: 10.1007/s40264-013-0039-5
69. Maciag P.C., Radulovic S., Rothman J. The First Clinical Use of a Live-Attenuated *Listeria Monocytogenes* Vaccine: A Phase I Safety Study of Lm-LLO-E7 in Patients With Advanced Carcinoma of the Cervix. *Vaccine*, 2009, vol. 27, no. 30, pp. 3975–3983. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.04.041
70. Malone R.W., Felgner P.L., Verma I.M. Cationic Liposome-Mediated RNA Transfection. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1989, vol. 86, no. 16, pp. 6077–6081. doi: 10.1073/pnas.86.16.6077
71. Mansilla C., Berraondo P., Durantez M., Martínez M., Casares N., Arribillaga L., Rudilla F., Fioravanti J., Lozano T., Villanueva L., Sarobe P., Borrás F., Leclerc C., Prieto J, Lasarte J.J. Eradication of Large Tumors Expressing Human Papillomavirus E7 Protein by Therapeutic Vaccination With E7 Fused to the Extra Domain a From Fibronectin. *Int. J. Cancer*, 2012, vol. 131, no. 3, pp. 641–651. doi: 10.1002/ijc.26412
72. Markowitz L.E., Liu G., Hariri S., Steinau M., Dunne E.F., Unger E.R. Prevalence of HPV After Introduction of the Vaccination Program in the United States. *Pediatrics*, 2016, vol. 137, no. 3: e20151968. doi: 10.1542/peds.2015-1968
73. Maruggi G., Zhang C., Li J., Ulmer J.B., Yu D. mRNA as a Transformative Technology for Vaccine Development to Control Infectious Diseases. *Mol. Ther.*, 2019, vol. 27, no. 4, pp. 757–772. doi: 10.1016/j.ymthe.2019.01.020
74. McIntyre M.C., Ruesch M.N., Laimins L.A. Human Papillomavirus E7 Oncoproteins Bind a Single Form of Cyclin E in a Complex With Cdk2 and P107. *Virology*, 1996, vol. 215, no. 1, pp. 73–82. doi: 10.1006/viro.1996.0008
75. Melamed A., Margul D.J., Chen L., Keating N.L., Del Carmen M.G., Yang J., Seagle B.-L.L., Alexander A., Seagle B.-L.L., Alexander A., Shahabi S., Rauh-Hain J.A. Survival After Minimally Invasive Radical Hysterectomy for Early-Stage Cervical Cancer. *New Engl. J. Med.*, 2018, vol. 379, no. 20, pp. 1905–1914. doi: 10.1056/NEJMoa1804923
76. Mohsen M.O., Zha L., Cabral-Miranda G., Bachmann M.F. Major Findings and Recent Advances in Virus-Like Particle (VLP)-Based Vaccines. *Semin. Immunol.*, 2017, vol. 34, pp. 123–132. doi: 10.1016/j.smim.2017.08.014
77. Moody C.A., Laimins L.A. Human Papillomavirus Oncoproteins: Pathways to Transformation. *Nat. Rev. Cancer*, 2010, vol. 10, no. 8, pp. 550–560. doi: 10.1038/nrc2886
78. Nagarsheth N.B., Norberg S.M., Sinkoe A.L., Adhikary S., Meyer T.J., Lack J.B., Warner A.C., Schweitzer C., Doran S.L., Korrapati S., Stevanović S., Trimble C.L., Kanakry J.A., Bagheri M.H., Ferraro E., Astrow S.H., Bot A., Faquin William C., Stroncek D., Gkitsas N., Highfill S., Hinrichs C.S. TCR-Engineered T Cells Targeting E7 for Patients With Metastatic HPV-Associated Epithelial Cancers. *Nat. Med.*, 2021, vol. 27, no. 3, pp. 419–425. doi: 10.1038/s41591-020-01225-1
79. Nardelli-Haeffliger D., Wirthner D., Schiller J.T., Lowy D.R., Hildesheim A., Ponci F., Grandi P. Specific Antibody Levels at the Cervix During the Menstrual Cycle of Women Vaccinated With Human Papillomavirus 16 Virus-Like Particles. *J. Natl Cancer Inst.*, 2003, vol. 95, no. 15, pp. 1128–1137. doi: 10.1093/jnci/djg018
80. Pardi N., Hogan M.J., Porter F.W., Weissman D. mRNA Vaccines — a New Era in Vaccinology. *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2018, vol. 17, no. 4, pp. 261–279. doi: 10.1038/nrd.2017.243
81. Paris R., Bejrachandra S., Thongcharoen P., Nitayaphan S., Pitisuttithum P., Sambor A., Gurunathan S., Francis D., Ratto-Kim S., Karnasuta C., Souza M.S. de, Polonis V.R., Brown A.E., Kim J.H., Stephens H.A. HLA Class II Restriction of HIV-1 Clade-Specific Neutralizing Antibody Responses in Ethnic Thai Recipients of the RV144 Prime-Boost Vaccine Combination of ALVAC-HIV and AIDSVAX(®) B/E. *Vaccine*, 2012, vol. 30, no. 5, pp. 832–836. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.11.002
82. Peng S., Kim T.W., Lee J.H., Yang M., He L., Hung C.F., Wu T.-C. Vaccination With Dendritic Cells Transfected With BAK and BAX siRNA Enhances Antigen-Specific Immune Responses by Prolonging Dendritic Cell Life. *Hum. Gene Ther.*, 2005, vol. 16, no. 5, pp. 584–593. doi: 10.1089/hum.2005.16.584

83. Porras C., Tsang S.H., Herrero R., Guillén D., Darragh T.M., Stoler M.H., Hildesheim A., Wagner S., Boland J., Lowy D.R., Schiller J.T., Schiffman M., Schussler J., Gail M.H., Quint W., Ocampo R., Morales J., Rodríguez A.C., Hu S., Sampson J.N., Kreimer A.R. Efficacy of the Bivalent HPV Vaccine Against HPV 16/18-Associated Precancer: Long-Term Follow-Up Results From the Costa Rica Vaccine Trial. *Lancet Oncol.*, 2020, vol. 21, no. 12, pp. 1643–1652. doi: 10.1016/s1470-2045(20)30524-6
84. Rajcáni J., Mosko T., Rezuchová I. Current Developments in Viral DNA Vaccines: Shall They Solve the Unsolved. *Rev. Med. Virol.*, 2005, vol. 15, no. 5, pp. 303–325. doi: 10.1002/rmv.467
85. Ren F., Xu Y., Mao L., Ou R., Ding Z., Zhang X., Tang J., Li B., Jia Z., Tian Z., Ni B., Wu Y. Heat Shock Protein 110 Improves the Antitumor Effects of the Cytotoxic T Lymphocyte Epitope E7(49-57) in Mice. *Cancer Biol. Ther.*, 2010, vol. 9, no. 2, pp. 134–141. doi: 10.4161/cbt.9.2.10391
86. Rosales C., Graham V.V., Rosas G.A., Merchant H., Rosales R. A Recombinant Vaccinia Virus Containing the Papilloma E2 Protein Promotes Tumor Regression by Stimulating Macrophage Antibody-Dependent Cytotoxicity. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2000, vol. 49, no. 7, pp. 347–360. doi: 10.1007/s002620000125
87. Rosales R., López-Contreras M., Rosales C., Magallanes-Molina J.R., Gonzalez-Vergara R., Arroyo-Cazarez J.M., Ricardez-Arenas A., Follo-Valencia A. del, Padilla-Arriaga S., Guerrero M.V., Pirez M.A., Arellano-Fiore C., Villarreal F. Regression of Human Papillomavirus Intraepithelial Lesions is Induced by MVA E2 Therapeutic Vaccine. *Hum. Gene Ther.*, 2014, vol. 25, no. 12, pp. 1035–1049. doi: 10.1089/hum.2014.024
88. Santesso N., Mustafa R.A., Wiercioch W., Kehar R., Gandhi S., Chen Y., Cheung A., Hopkins J., Khatib R., Ma B., Mustafa A.A., Lloyd N., Wu D., Broutet N., Schünemann H.J. Systematic Reviews and Meta-Analyses of Benefits and Harms of Cryotherapy, LEEP, and Cold Knife Conization to Treat Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Int. J. Gynaecol. Obstet.*, 2016, vol. 132, no. 3, pp. 266–271. doi: 10.1016/j.ijgo.2015.07.026
89. Santin A.D., Bellone S., Palmieri M., Ravaggi A., Romani C., Tassi R., Roman J.J., Burnett A., Pecorelli S., Cannon M.J. HPV16/18 E7-Pulsed Dendritic Cell Vaccination in Cervical Cancer Patients With Recurrent Disease Refractory to Standard Treatment Modalities. *Gynecol. Oncol.*, 2016, vol. 100, no. 3, pp. 469–478. doi: 10.1016/j.ygyno.2005.09.040
90. Santin A.D., Hermonat P.L., Ravaggi A., Chiriva-Internati M., Zhan D., Pecorelli S., Parham G.P., Cannon M.J. Induction of Human Papillomavirus-Specific CD4(+) and CD8(+) Lymphocytes by E7-Pulsed Autologous Dendritic Cells in Patients With Human Papillomavirus Type 16- and 18-Positive Cervical Cancer. *J. Virol.*, 1999, vol. 73, no. 7, pp. 5402–5410. doi: 10.1128/jvi.73.7.5402-5410.1999
91. Schellenbacher C., Roden R., Kirnbauer R. Chimeric L1-L2 Virus-Like Particles as Potential Broad-Spectrum Human Papillomavirus Vaccines. *J. Virol.*, 2009, vol. 83, no. 19, pp. 10085–10095. doi: 10.1128/jvi.01088-09
92. Schiffman M., Solomon D. Clinical Practice. Cervical-Cancer Screening With Human Papillomavirus and Cytologic Cotesting. *New Engl. J. Med.*, 2013, vol. 369, no. 24, pp. 2324–2331. doi: 10.1056/NEJMcp1210379
93. Schwarz T.F., Spaczynski M., Schneider A., Wysocki J., Galaj A., Schulze K., Poncelet S.M., Catteau G., Thomas F., Descamps D. Persistence of Immune Response to HPV-16/18 AS04-Adjuvanted Cervical Cancer Vaccine in Women Aged 15-55 Years. *Hum. Vaccines*, 2011, vol. 7, no. 9, pp. 958–965. doi: 10.4161/hv.7.9.15999
94. Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A. Cancer Statistics. *CA Cancer J. Clin.*, 2016, vol. 66, no. 1, pp. 7–30. doi: 10.3322/caac.21332
95. Smith J.A., Haberstroh F.S., White E.A., Livingston D.M., DeCaprio J.A., Howley P.M. SMCX and Components of the TIP60 Complex Contribute to E2 Regulation of the HPV E6/E7 Promoter. *Virology*, 2018, vol. 470, pp. 311–321. doi: 10.1016/j.virol.2014.08.022
96. Stanley M., Joura E., Yen G.P., Kothari S., Luxembourg A., Saah A., Walia A., Perez G., Khoury H., Badgley D., Brown D.R. Systematic Literature Review of Neutralizing Antibody Immune Responses to non-Vaccine Targeted High-Risk HPV Types Induced by the Bivalent and the Quadrivalent Vaccines. *Vaccine*, 2021, vol. 39, no. 16, pp. 2214–2223. doi: 10.1016/j.vaccine.2021.01.060
97. Tagliamonte M., Petrizzo A., Tornesello M.L., Buonaguro F.M., Buonaguro L. Antigen-Specific Vaccines for Cancer Treatment. *Hum. Vaccines Immunotherapeut.*, 2014, vol. 10, no. 11, pp. 3332–3346. doi: 10.4161/21645515.2014.973317
98. Takeuchi O., Akira S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*, 2010, vol. 140, no. 6, pp. 805–820. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.022
99. Tewari K.S., Sill M.W., Long III H.J., Penson R.T., Huang H., Ramondetta L.M., Landrum L.M., Oaknin A., Reid T.J., Leitao M.M., Michael H.E., Monk B.J. Improved Survival With Bevacizumab in Advanced Cervical Cancer. *New Engl. J. Med.*, 2014, vol. 370, no. 8, pp. 734–743. doi: 10.1056/NEJMoa1309748
100. Tumban E., Peabody J., Peabody D.S., Chackerian B. A Universal Virus-Like Particle-Based Vaccine for Human Papillomavirus: Longevity of Protection and Role of Endogenous and Exogenous Adjuvants. *Vaccine*, 2013, vol. 31, no. 41, pp. 4647–4654. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.07.052
101. Tyler M., Tumban E., Chackerian B. Second-Generation Prophylactic HPV Vaccines: Successes and Challenges. *Expert Rev. Vaccines*, 2014, vol. 13, no. 2, pp. 247–255. doi: 10.1586/14760584.2014.865523
102. Valdez Graham V., Sutter G., José M.V., García-Carranca A., Erfle V., Moreno Mendoza N., Merchant H., Rosales R. Human Tumor Growth is Inhibited by a Vaccinia Virus Carrying the E2 Gene of Bovine Papillomavirus. *Cancer*, 2000, vol. 88, no. 7, pp. 1650–1662. doi: 10.1002/(sici)1097-0142(20000401)88:7<1650::aid-cnrc20>3.0.co;2-l
103. Wang B., Li X., Liu L., Wang M. β -Catenin: Oncogenic Role and Therapeutic Target in Cervical Cancer. *Biol. Res.*, 2020, vol. 53, no. 1: 33. doi: 10.1186/s40659-020-00301-7
104. Wang J.W., Roden R.B. L2, the Minor Capsid Protein of Papillomavirus. *Virology*, 2013, vol. 445, no. 1–2, pp. 175–186. doi: 10.1016/j.virol.2013.04.017
105. Wang R., Pan W., Jin L., Huang W., Li Y., Wu D., Gao C., Ma D., Liao S. Human Papillomavirus Vaccine Against Cervical Cancer: Opportunity and Challenge. *Cancer Lett.*, 2020, vol. 471, pp. 88–102. doi: 10.1016/j.canlet.2019.11.039
106. Wang T.L., Ling M., Shih I.M., Pham T., Pai S.I., Lu Z., Kurman R.J., Pardoll D.M., Wu T.-C. Intramuscular Administration of E7-Transfected Dendritic Cells Generates the Most Potent E7-Specific Anti-Tumor Immunity. *Gene Ther.*, 2000, vol. 7, no. 9, pp. 726–733. doi: 10.1038/sj.gt.3301160

107. Wendel Naumann R., Leath C.A., 3rd. Advances in Immunotherapy for Cervical Cancer. *Curr. Opin. Oncol.*, 2020, vol. 32, no. 5, pp. 481–487. doi: 10.1097/cco.0000000000000663
108. Woodham A.W., Cheloha R.W., Ling J., Rashidian M., Kolifrath S.C., Mesyngier M., Duarte J.N., Bader J.M., Skeate J.G., Da Silva D.M., Kast W.M., Ploegh H.L. Nanobody-Antigen Conjugates Elicit HPV-Specific Antitumor Immune Responses. *Cancer Immunol. Res.*, 2018, vol. 6, no. 7, pp. 870–880. doi: 10.1158/2326-6066.Cir-17-0661
109. Yang A., Farmer E., Wu T.C., Hung C.F. Perspectives for Therapeutic HPV Vaccine Development. *J. Biomed. Sci.*, 2016, vol. 23, no. 1: 75. doi: 10.1186/s12929-016-0293-9
110. Zhai L., Tumban E. Gardasil-9: A Global Survey of Projected Efficacy. *Antiviral Res.*, 2016, vol. 130, pp. 101–109. doi: 10.1016/j.antiviral.2016.03.016
111. Zur Hausen H. Papillomaviruses and Cancer: From Basic Studies to Clinical Application. *Nat. Rev. Cancer*, 2002, vol. 2, no. 5, pp. 342–350. doi: 10.1038/nrc798

Авторы:

Раевская Н.М., к.б.н., эксперт управления аллергенов, цитокинов и других иммуномодуляторов Центра экспертизы и контроля МИБП ФГБУ Научный центр экспертизы средств медицинского применения Минздрава России, Москва, Россия;

Никитина Т.Н., к.м.н., главный эксперт управления аллергенов, цитокинов и других иммуномодуляторов Центра экспертизы и контроля МИБП ФГБУ Научный центр экспертизы средств медицинского применения Минздрава России, Москва, Россия;

Симбирцев А.С., член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор, главный научный сотрудник ФГУП Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов ФМБА, Санкт-Петербург, Россия;

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

Волгин А.Р., к.м.н., зам. директора Центра экспертизы и контроля МИБП ФГБУ Научный центр экспертизы средств медицинского применения Минздрава России, Москва, Россия;

Коровкин А.С., к.м.н., директор Центра экспертизы и контроля МИБП ФГБУ Научный центр экспертизы средств медицинского применения Минздрава России, Москва, Россия.

Authors:

Raevskaya N.M., PhD (Biology), Expert of the Allergens, Cytokines and Other Immunomodulators Department, Centre for Biological Medicinal Products Evaluation and Control, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation;

Nikitina T.N., PhD (Medicine), Head Expert of the Allergens, Cytokines and Other Immunomodulators Department, Centre for Biological Medicinal Products Evaluation and Control, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation;

Simbirtsev A.S., RAS Corresponding Member, DSc (Medicine), Professor, Head Researcher, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russian Federation;

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

Volgin A.R., PhD (Medicine), Deputy Director, Centre for Biological Medicinal Products Evaluation and Control, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation;

Korovkin A.S., PhD (Medicine), Director of the Centre for Biological Medicinal Products Evaluation and Control, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation.

НОВЫЕ ПЕРСПЕКТИВНЫЕ АНТИСЕПТИКИ ДЛЯ ИНДИВИДУАЛЬНОЙ АНТИВИРУСНОЙ ЗАЩИТЫ ПРИ СЕЗОННЫХ ИНФЕКЦИЯХ, ВКЛЮЧАЯ COVID-19

С.А. Лепехова, Г.Е. Григорьев, И.С. Курганский

ФГБУН Иркутский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук, г. Иркутск, Россия

Резюме. Сезонные вирусные инфекции верхних дыхательных путей широко распространены во всем мире. Пандемия коронавируса SARS-CoV-2 показала важную значимость своевременной персонализированной профилактики острых вирусных заболеваний и их бактериальных осложнений. Одним из основных направлений профилактики вирусных инфекций является разработка эффективных антисептиков для инактивации вирусов на руках и слизистых оболочках. Для эффективного уничтожения SARS-CoV-2 ВОЗ рекомендуются два антисептика: 70%-й раствор этанола и гипохлорит натрия. Предложенные антисептики являются устаревшими, обладают раздражающим действием на кожные покровы и слизистые оболочки. В связи с этим перспективным направлением исследований становится разработка новых антисептиков, обладающих избирательной токсичностью, малой летучестью, низким значением коэффициентов в системе «масло–вода», слабовыраженными липофильными свойствами, низкой всасываемостью в вакуольные структуры кожи и низким содержанием токсичных примесей. Одним из таких антисептиков является анавидин. Проведены разработка и отбор молекул, следующим запланированным этапом будет являться оценка эффективности и безопасности новых молекул, включая доклиническую и раннюю фазу клинических испытаний, в том числе в профилактике вирусных инфекций, включая SARS-CoV-2.

Ключевые слова: антисептики, антибиотикорезистентность, вирусная инфекция, раневая инфекция, SARS-CoV-2, профилактика.

NEW PROMISING ANTISEPTICS FOR INDIVIDUAL ANTIVIRAL PROTECTION AGAINST SEASONAL INFECTIONS INCLUDING COVID-19

Lepekhova S.A., Grigor'ev G.E., Kurganskiy I.S.

Irkutsk Research Center, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russian Federation

Abstract. Seasonal viral infections of the upper respiratory tract are widespread throughout the world. The SARS-CoV-2 pandemic has revealed the importance of timely personalized prevention of acute viral diseases and related bacterial complications. One of the main directions in the preventing viral infections relies on the development of effective antiseptics to inactivate viruses on the hands and mucous membranes. To effectively destroy SARS-CoV-2, the WHO recommends two antiseptics: a 70% ethanol solution and sodium hypochlorite. The proposed antiseptics are outdated

Адрес для переписки:

Курганский Илья Сергеевич
664033, Россия, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 134,
Иркутский научный центр СО РАН.
Тел.: 8 (3952) 45-30-80. Факс: 8 (3952) 45-31-60.
E-mail: kurg.is@mail.ru

Contacts:

Ilya S. Kurganskiy
664033, Russian Federation, Irkutsk, Lermontov str., 134,
Irkutsk Scientific Center SB RAS.
Phone: +7 (3952) 45-30-80. Fax: +7 (3952) 45-31-60.
E-mail: kurg.is@mail.ru

Для цитирования:

Лепехова С.А., Григорьев Г.Е., Курганский И.С. Новые перспективные антисептики для индивидуальной антивирусной защиты при сезонных инфекциях, включая COVID-19 // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 4. С. 672–680. doi: 10.15789/2220-7619-NPA-17602

Citation:

Lepekhova S.A., Grigor'ev G.E., Kurganskiy I.S. New promising antiseptics for individual antiviral protection against seasonal infections including COVID-19 // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 4, pp. 672–680. doi: 10.15789/2220-7619-NPA-17602

and have an irritating effect on the skin and mucous membranes. In connection with this, a promising research direction includes development of new antiseptics with selective toxicity, low volatility, low coefficients in the oil-water system, weak lipophilic properties, low absorption into the vacuolar skin structures and low content of toxic impurities. One of these antiseptics is anavidin. The development and selection of molecules has been carried out, the next planned stage will be assessment of the effectiveness and safety of new molecules, including preclinical and early phase clinical trials, also analyzing prevention of viral infections, e.g. COVID-19.

Key words: antiseptics, antibiotic resistance, viral infection, wound infection, SARS-CoV-2, prevention.

Введение

Выполнение трансляционных исследований по разработке перспективных антисептиков для индивидуальной защиты и профилактики сезонных респираторных инфекций, включая COVID-19, приводящих к обострению хронических заболеваний и развитию поражений органов-мишеней, является актуальной проблемой в условиях новых биологических угроз и увеличения числа пациентов, страдающих социально значимыми заболеваниями. Несмотря на объявление окончания пандемии COVID-19, продолжается поиск надежных способов профилактики и индивидуальной защиты, что вызвано быстрым распространением, постоянными новыми мутациями коронавируса SARS-CoV-2 и высокой смертностью при заражении и от осложнений в отдаленном периоде.

Сезонные инфекции, включая COVID-19: профилактика, индивидуальная защита

Сезонные вирусные инфекции верхних дыхательных путей, включая COVID-19, широко распространены, известно более 200 возбудителей, однако преимущественное значение имеют риновирусы (30–50%), вирусы гриппа (5–15%), коронавирус SARS-CoV-2 (5–28%), также вносят свой вклад в структуру сезонных заболеваний аденовирусы, вирусы парагриппа, респираторно-синцитиальный вирус. Пандемия коронавируса SARS-CoV-2 показала важную значимость своевременной профилактики острых вирусных заболеваний верхних дыхательных путей и их бактериальных осложнений. Важным мероприятием профилактики сезонных инфекции является вакцинация населения, а для повышения эффективности вакцинации существенный вклад вносят профилактические мероприятия [7].

В 2020 г. весь мир столкнулся с новой угрозой SARS-CoV-2-инфекции, в результате которой Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) объявила пандемию COVID-19, и были введены карантинные мероприятия. Усилия ученых направлены на создание тест-систем для молекулярно-биологической и серологической

диагностики, проведен непрерывный эпидемиологический мониторинг, а также ведутся разработки клинических исследований этиотропных противовирусных препаратов, эффективных мер профилактики, включая специфическую иммунопрофилактику и активное использование антисептиков, для индивидуальной защиты согласно International Committee on Taxonomy of Viruses [11, 44, 54].

В период пандемии и после нее ведутся постоянные работы по созданию эффективной вакцины от коронавируса. Проблемы вызваны особенностями самой инфекции и частой мутацией коронавируса SARS-CoV-2. В сложившихся условиях важной остается задача разработки профилактических средств защиты организма от инфекции COVID-19.

Ведутся разработки противовирусных средств на основе антимикробных микроэлементов для инактивации вирусов на руках и слизистых оболочках. Оболочка вирусов состоит из липидов, что позволяет ее разрушить обработкой этанолом, органическими растворителями, мылом и другими дезинфицирующими средствами и снизить количество вирусов на руках, контактных предметах. ВОЗ были разработаны методические рекомендации. Для индивидуальной защиты от коронавируса SARS-CoV-2 рекомендуется ношение масок, соблюдение дистанции, ограничение общения, самоизоляция [13].

Главной целью при использовании средств индивидуальной защиты, к которым относятся антисептики, является повышение эффективности профилактики сезонных инфекций, включая COVID-19, выражающееся в предупреждении заболевания в период эпидемий, уменьшение тяжести течения заболевания, снижение количества осложнений у заболевших, обеспечиваемое вирулицидным действием средств с доказанной эффективностью, способностью антисептиков не подавлять естественную микробиоту и местный иммунитет слизистых оболочек, способностью активировать окислительные процессы в тканях и защищать входные ворота для сезонных инфекций — полость носа и ротовую полость [29, 32, 33, 45, 51, 52].

Вирусная нагрузка концентрируется в носоглотке, далее распространяется в нижние дыхательные пути вследствие быстрой ингаляции возбудителя, в результате чего развивается мас-

сивное поражение легочной ткани, особенно у пациентов из групп риска: страдающих онкологическими и социально значимыми заболеваниями и людей старшего поколения (65+) [47].

Одним из главных направлений в деятельности медицинских организаций при сезонных инфекциях является обеспечение безопасности пациентов и персонала. Деятельность медицинских организаций на современном уровне характеризуется широким внедрением в практику новых методов терапии и диагностики, что ведет к внедрению новых технологий и медицинских изделий, в том числе инструментов, медицинской техники, новых материалов. Важнейшим аспектом неспецифической профилактики госпитальных инфекций является использование химических средств дезинфекции и стерилизации [41].

Рекомендовано в коронавирусных клиниках использовать дезинфицирующие средства с доказанной активностью против вирусов, имеющих оболочку, включая гипохлорит натрия (например, 0,1%-й для общей дезинфекции поверхности, перчаток), 62–71%-й этанол, 0,5%-ю перекись водорода, четвертичные аммониевые соединения и фенольные соединения, если они используются в соответствии с рекомендациями производителя. Другие биоцидные агенты, такие как 0,05–0,2%-й хлорид бензалкония или 0,02%-й диглюконат хлоргексидина, могут быть менее эффективными [39].

Итальянскими авторами было показано, что SARS-CoV полностью инактивируется такими дезинфицирующими средствами, как надуксусная кислота, этанол 70%, гипохлорит натрия 0,05% и 0,1%, хлоргексидин биглюконат 1% и 2-бензил-хлорфенол 2% уже после обработки в течении 1 мин. Для бензалкония хлорида требуется больше времени. При обработке биологических отходов (мокрота, выделения человека и т. п.) способность к разрушению вирусной РНК показали только 0,1%-й гипохлорит натрия и 2%-й 2-бензил-хлорфенол при времени контакта более 2 мин [42].

При сравнении известных антисептиков важно учитывать как их свойства, так и опыт применения, международные и национальные рекомендации. Для эффективного уничтожения SARS-CoV-2 ВОЗ рекомендованы два антисептика: 70%-й раствор этанола и гипохлорит натрия [39].

Перспективные антисептики должны быть универсальными, одновременно разрушать вирулентную грамположительную и грамотрицательную микрофлору, вирусы, дрожжеподобную, плесневую, грибковую флору. Предлагается использование антисептиков для обработки рук и контактных поверхностей, а также орошение слизистых оболочек. В пери-

од пандемии коронавирусной инфекции и после нее эта проблема приобретает глобальный характер.

Антисептики: механизмы действия и перспектива использования

Антисептики являются важными средствами для защиты организма от инфекций и заболеваний, вызываемых различными микроорганизмами.

Антисептики стали незаменимыми помощниками при соблюдении правил гигиены. Например, полезным окажется использование спиртосодержащих влажных салфеток для быстрой обработки рук в условиях, когда воспользоваться мылом невозможно.

Антисептики применяются в медицинской практике для обработки ожогов, царапин и порезов. Их использование облегчает заживление ран и предотвращает развитие вторичных инфекций [3, 11, 35, 37]. Для обработки антисептиком кожи пациента рекомендуется применять растворы йодапирона, водородного пероксида, фурацилина.

Чтобы снизить риск развития инфекционных патологий, следует правильно дезинфицировать предметы и поверхности [20]. Например, антисептические средства используются для стерилизации медицинских инструментов перед оперативными вмешательствами, ими обрабатывают столы и ручки дверей, чтобы минимизировать передачу возбудителя между людьми, находящимися в одном помещении.

Многие антисептики могут нарушать процессы обмена веществ в клетках микроорганизмов путем ингибирования ключевых ферментов. Чтобы объяснить, как работает антисептик в данном случае, можно привести в качестве примера йод. Он способствует окислению фосфора, что нарушает функционирование молекул АТФ, которые являются универсальным источником энергии клетки. Уменьшая количество доступной энергии, препарат вызывает быстрый антисептический эффект [22, 24].

Некоторые антисептики, такие как галогены, способны изменять свойства клеточных мембран. Они проникают через липидные слои мембраны и разрушают ее структуру, вызывая необратимое повреждение и гибель микроорганизма [28].

Среди препаратов, используемых в медицине, активное применение нашли синергические комбинации — медикаменты, которые действуют вместе для создания сильного антисептического эффекта [26, 36]. Йод и хлоргексидин ингибируют синтез молекул, необходимых для репарации бактериальной клеточной стенки, в свою очередь снижают способность определенного вида бактерий к размножению [25].

Антисептические средства играют важную роль в медицинской практике и повседневной жизни. В зависимости от химической структуры они разделяются на органические и неорганические. Примерами органических антисептиков служат фенол и его производные, они были одними из первых разработанных антисептиков. Эти средства обладают широким спектром действия и долгим антисептическим эффектом. Примерами фенольных антисептиков являются хлоркрезол, резозин, треххлорфенол, фенол. Они применяются для обработки кожи, предметов ухода и поверхностей, а также в ветеринарии [21].

Спиртосодержащие антисептики, такие как этиловый и изопропиловый спирты, обладают широким антимикробным действием, быстро испаряются и не вызывают раздражения кожи. Свое применение антисептики данной группы нашли в обработке кожных покровов перед инъекциями и операциями, в косметических продуктах [1].

Детергенты обладают бактерицидной и бактериостатической активностью. Наиболее распространенными детергентами, используемыми в антисептике, являются аммониевые соединения, такие как бензалконий хлорид и цетримид. Они входят в состав мыла, гелей, шампуней и других средств по уходу за кожей [15].

Одним из самых известных альдегидов является формальдегид, который обладает выраженным дезинфицирующим эффектом. Формальдегид активно борется с бактериями, грибами и вирусами. Он применяется для обработки медицинского инструментария и поверхностей, активно используется в ветеринарии [4, 5, 23, 33].

Примерами группы красителей служат бриллиантовый зеленый и метиленовый синий. Это синтетические красители анилинового ряда, обладающие антибактериальным и противогрибковым действием. Бриллиантовый зеленый применяется для местного обработки ран, царапин и небольших ожогов [18].

Соли тяжелых металлов (серебра, меди и цинка) оказывают антисептический эффект за счет связывания и инактивации функциональных белков, ДНК и других жизненно важных молекул микроорганизмов [2, 3, 11]. В результате нарушается проницаемость клеточной мембраны, возникает недостаток энергии и развивается клеточный стресс, что в конечном итоге ведет к гибели микробных клеток. В настоящее время применение солей тяжелых металлов в антисептике существенно сократилось, вместо них используются более безопасные и эффективные средства.

Галогенсодержащие антисептики основаны на хлоре, йоде и их производных [10, 19, 38].

Примеры таких средств включают йодопирон, пантоцид, хлорамин. Они обладают антибактериальными свойствами, денатурируя белки протоплазмы микроорганизма. Используются для обработки кожи, полости рта и поверхностей, в том числе в стационарных условиях [6].

Кислоты и щелочи обладают высокой антибактериальной активностью, но использование этих веществ снижается из-за сложности работы с исходными токсичными веществами [20].

Окислители, такие как водородный пероксид, обладают хорошим антибактериальным и антивирусным действием [17].

Ведутся постоянные разработки новых, обладающих большим потенциалом антисептиков, которые постепенно внедряются в практику, например такие, как анавидин.

Разработка новых перспективных молекул

Совместно с сотрудниками Иркутского института химии им. А.Е. Фаворского СО РАН ведутся исследования по разработке и отбору перспективных молекул, которые могут быть включены в трансляционные исследования, с перспективой создания новых лекарственных препаратов и антисептиков. Разрабатываемые антисептики должны обладать избирательной токсичностью, кроме того, поскольку антисептические препараты используются как правило местно, преимущество при выборе получают малолетучие, полярные, ионизируемые антисептики, обладающие свойством электролитов, низким значением коэффициентов в системе «масло—вода», слабовыраженными липофильными свойствами, низкой всасываемостью в вакуольные структуры кожи, вещества, при синтезе или промышленном производстве которых снижено образование токсичных микропримесей [31].

Ранее был создан антисептик на основе гуанидина с улучшенными свойствами — анавидин [30]. В условиях новых угроз возрастает интерес к этому антисептику, который представляет собой фосфорно-кислую соль полигексаметиленгуанидина (ПГМГ) и имеет формулу $[C_7H_{18}N_3O_4P]$. Его средневзвешанная молекулярная масса от 5 до 30 тыс. единиц. Молекула анавидина состоит из двух линейно связанных групп: гуанидинфосфатной и гексаметиленовой. Полярная гуанидинфосфатная группа имеет положительный заряд и придает полимеру свойства флокулянта катионного типа. Наличие гуанидинфосфатной и гексаметиленовой группы обеспечивает молекуле анавидина высокую бактерицидную, альгицидную и фунгицидную активность при одновременной физиологической совместимости

с организмом животных и человека. По показателю «фактора надежной безопасности» препарат в 3662 раза токсичнее для микроорганизмов, чем для теплокровных животных и человека [13, 14, 16, 40].

Антимикробная активность этого препарата в 3–5 раз выше, чем хлорамина, карболовой кислоты, хлорной извести, пергидроля, препаратов ПАВ (катамина АБ, катапола, роккала, этония). В отличие от ближайшего аналога, хлоргексидина биглюконата, аनावидин эффективен в отношении споровых бактерий, аденовирусов, энтеровирусов, вирусов герпеса, энцефалита, азиатского гриппа, парагриппа, ротавирусов и возбудителей туберкулеза [12, 34, 40]. Этот антисептик не имеет запаха, не летучий и может быть предложен в качестве индивидуальной защиты.

Направленный синтез новых молекул является одной из актуальных задач органической химии. Особое место в этой области занимают жизненно важные азотсодержащие гетероциклы и их производные, на основе которых созданы и создаются новые перспективные прекурсоры лекарственных средств. Например, соли пиридиния входят в состав таких известных препаратов, как пиридоксин, мексидол и метадоксин. Активно изучаются также фосфорсодержащие производные пиридина, среди которых выявлены соединения, обладающие цитотоксическими и антимикробными свойствами [8, 9].

Известными производными гуанидина являются функционализированные пиридины, содержащие, в частности, фосфонатные фрагменты, являются высоковольтостребованным классом органических соединений и активно используются как прекурсоры лекарственных средств, лиганды для дизайна металлокомплексов, экстрагенты, а также как строительные блоки в элементорганическом синтезе. Важной задачей современного фармакоориентированного органического синтеза является направленное введение в молекулы фундаментальных гетероциклов фармакофорных фторорганических заместителей [48].

Фторсодержащие фосфорорганические соединения обладают широким спектром свойств и находят применение в различных областях промышленности, сельском хозяйстве, ме-

дицине. Большое внимание исследователей уделяется также фторалкилфосфонатам, среди которых уже выявлены соединения, активные по отношению к различным вирусным и ретровирусным инфекциям, таким как гепатит В и ВИЧ, злокачественным опухолям, а также обладающие противовоспалительным действием [27].

Предложен новый технологический метод, который позволяет контролировать состав сополимеров и, следовательно, их гидрофильно/гидрофобный баланс, растворимость, мембранотропные свойства, изменяя тем самым потенциальную биологическую активность получаемых препаратов [49].

Впервые реализована и изучена реакция радикального присоединения диалкил-(Н)-фосфонатов к виниловым эфирам полифторалканолов, на основе которой синтезированы новые представители фторалкилфосфонатов [46].

Разрабатываются методы синтеза Н-фосфиновых кислот взаимодействием гипофосфорной кислоты, H_3PO_2 (получается из белого фосфора с алкенами, алкинами, алкилгалогенидами. Эти реакции протекают в присутствии Pd-катализаторов или радикальных инициаторов, а также в условиях микроволновой активации [48].

Получены новые данные о синтезе новых молекул для создания прекурсоров лекарственных средств с предполагаемым противовоспалительным, антибактериальным и противоопухолевым эффектами [43, 50, 53].

После разработки, отбора следующим этапом будет являться оценка эффективности и безопасности новых молекул, включая доклиническую и раннюю фазу клинических испытаний, для чего на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения ИИЦ СО РАН совместно с Клинической больницей Иркутского научного центра Сибирского отделения Российской академии наук создана опытная команда исследователей.

Создание новых эффективных средств для профилактики сезонных инфекций, включая SARS-CoV-2, выражающееся в предупреждении заболевания в период эпидемий и рисков, позволит уменьшить тяжесть течения заболевания и снизить количество осложнений у заболевших.

Список литературы/References

1. Адаменко Г.В., Миклис Н.И., Бурак И.И. Токсикологическая безопасность спиртосодержащих лекарственных средств для профилактической антисептики // Вестник ВГМУ. 2020. Т. 19, № 1. С. 86–93. [Adamenko G.V., Miklis N.I., Burak I.I. Toxicological safety of ethanol containing medicinal agents for preventive antiseptics. *Vestnik VGMU = Proceedings of Voronezh State University*, 2020, vol. 19, no. 1, pp. 86–93. (In Russ.)] doi: 10.22263/2312-4156.2020.1.86
2. Акулова С.В., Фролов Г.А., Карасенков Я.Н., Дельцов А.А. Исследование параметров острой токсичности антисептика на основе наночастиц диоксида титана // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. 2022. № 3. С. 65–70. [Akulova S.V., Frolov G.A., Karasenkov J.N., Deltsov A.A. Investigation of acute toxicity parameters of an antiseptic based

- on titanium dioxide nanoparticles. *Veterinariya, zootekhnika i biotekhnologiya = Veterinary, Zootechnics and Biotechnology*, 2022, no. 3, pp. 65–70. (In Russ.) doi: 10.36871/vet.zoo.bio.202203008
3. Бежин А.И., Липатов В.А., Фрончек Э.В., Григорьян А.Ю., Наимзада М.Д., Лазаренко Е.Д., Медведева М.А. Влияние хитозан-коллагенового комплекса с наночастицами серебра на течение раневого процесса в эксперименте // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». 2019. № 2. С. 5–16. [Bezhin A.I., Lipatov V.A., Fronchek E.V., Grigoryan A.Yu., Naimzada M.D., Lazarenko E.D., Medvedeva M.A. Effect of chitosan-collagen complex with silver nanoparticles on the wound progress in experiment. *Kurskii nauchno-prakticheskii vestnik "Chelovek i ego zdorov'e" = Kursk Scientific and Practical Bulletin "Man and His Health"*, 2019, no. 2, pp. 5–16. (In Russ.) doi: 10.21626/vestnik/2019-2/01
 4. Васильева С.А., Родионова Т.Н., Мариничева М.П., Савина С.В., Фокин А.И. Бактерицидные свойства антисептического средства ветеринарного назначения «Смейк-ХУВС» // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. 2021. Т. 42, № 2. С. 53–56. [Vasilyeva S.A., Rodionova T.N., Marinicheva M.P., Savina S.V., Phokin A.I. Bactericidal properties of antiseptic of veterinary assignment "Smeyk-Houws". *Aktual'nye voprosy veterinarnoi biologii = Actual Questions of Veterinary Biology*, 2021, vol. 42, no. 2, pp. 53–56. (In Russ.) doi: 10.24411/2074-5036-2019-10026
 5. Васильева С.А., Родионова Т.Н., Мариничева М.П., Савина С.В., Фокин А.И. Изучение профилактической эффективности антисептического средства «Смейк-ХУВС» при заболевании копытного рога у крупного рогатого скота // Ветеринарная патология. 2021. Т. 78, № 4. С. 36–42. [Vasil'eva S.A., Rodionova T.N., Marinicheva M.P., Savina S.V., Fokin A.I. Study of preventive effectiveness of antiseptic agent "Smeyk-Houws" to disease horn hoof in cattle. *Veterinarnaya patologiya = Russian Journal of Veterinary Pathology*, 2021, vol. 78, no. 4, pp. 36–42. (In Russ.) doi: 10.25690/VETPAT.2021.51.99.005
 6. Викулов Г.Х. Антисептические средства: возможности использования при респираторных инфекциях в условиях пандемии COVID-19 // Инфекционные болезни. 2020. Т. 18, № 2. С. 58–66. [Vikulov G.Kh. Use of antiseptics in respiratory infections during the COVID-19 pandemic. *Infektsionnye bolezni = Infectious Diseases*, 2020, vol. 18, no. 2, pp. 58–66. (In Russ.)] doi: 10.20953/1729-9225-2020-2-58-66
 7. Викулов Г.Х. Новые и возвращающиеся респираторные вирусные инфекции: алгоритмы диагностики, способы терапии и профилактики // Алматы: Медицина, 2019. Т. 205–206, № 7–8. С. 53–64. [Vikulov G.Kh. Emerging and reemerging respiratory viral infections: algorithms of diagnostics, approaches of prophylaxis and therapy. *Almaty: Meditsina = Almaty: Medicina*, 2019, vol. 205–206, no. 7–8, pp. 53–64. (In Russ.)] doi: 10.31082/1728-452X-2019-205-206-7-8-53-64
 8. Волков П.А., Иванова Н.И., Тележкин А.А., Храпова К.О., Беловежец Л.А., Гусарова Н.К., Апарцин К.А., Киреева В.В. Синтез и антимикробная активность новых фосфорсодержащих производных пиридина // Бултеровские сообщения. 2019. Т. 57, № 1. С. 50–56. [Volkov P.A., Ivanova N.I., Telezhkin A.A., Khrapova K.O., Belovezhets L.A., Gusarova N.K., Apartsin K.A., Kireeva V.V. Synthesis and antimicrobial activity of new phosphorus-containing pyridine derivatives. *Butlerovskie soobshcheniya = Butlerov Communications*, 2019, vol. 57, no. 1, pp. 50–56. (In Russ.)] doi: 10.37952/ROI-jbc-01/19-57-1-50
 9. Волков П.А., Храпова К.О., Тележкин А.А., Албанов А.И., Апарцин К.А., Трофимов Б.А. SNHAr-реакция пиридин с бис(полифторалкил)фосфонатами при содействии электронодефицитных ацетиленов // Журнал общей химии. 2022. Т. 92, № 9. С. 1471–1479. [Volkov P.A., Khrapova K.O., Telezhkin A.A., Albanov A.I., Apartsin K.A., Trofimov B.A. SNHAr reaction of pyridines with bis(polyfluoroalkyl)phosphonates assisted by electron-deficient acetylenes. *Zhurnal obshchei khimii = Russian Journal of General Chemistry*, 2022, vol. 92, no. 9, pp. 1471–1479. (In Russ.)] doi: 10.31857/S0044460X2209013X
 10. Горемыкина Е.А., Слукин П.В., Хохлова О.Е., Фурсова Н.К. База данных «Генетические детерминанты вирулентности и устойчивости к антимикотикам клинических штаммов *Candida* spp.» // Бактериология. 2023. Т. 8, № 3. С. 41–47. [Goremykina E.A., Slukin P.V., Khokhlova O.E., Fursova N.K. The database «Genetical determinants of virulence and antimicrobial resistance in clinical *Candida* spp. strains». *Bacteriologiya = Bacteriologiya*, 2023, vol. 8, no. 3, pp. 41–47. (In Russ.)] doi: 10.20953/2500-1027-2023-3-41-47
 11. Горенков Д.В., Хантимирова Л.М., Шевцов В.А., Рукавишников А.В., Меркулов В.А., Олефир Ю.В. Вспышка нового инфекционного заболевания COVID-19: β-коронавирусы как угроза глобальному здравоохранению // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2020. Т. 20, № 1. С. 6–20. [Gorenkov D.V., Khantimirova L.M., Shevtsov V.A., Rukavishnikov A.V., Merkulov V.A., Olefir Yu.V. An outbreak of a new infectious disease COVID-19: β-coronaviruses as a threat to global healthcare. *Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*, 2020, vol. 20, no. 1, pp. 6–20. (In Russ.)] doi: 10.30895/2221-996X-2020-20-1-6-20
 12. Госпитальная инфекция в многопрофильной хирургической клинике. Под ред. Е.Г. Григорьева, А.С. Когана. Новосибирск: Новосибирское отделение издательства «Наука», 2003. 208 с. [Hospital infection in multiprofile surgical clinic. Eds.: E.G. Grigor'ev, A.S. Kogan. *Novosibirskoe otdelenie izdatel'stva "Nauka"*, 2003. 208 p. (In Russ.)]
 13. Григорьев Е.Г., Квашин А.И., Киселева Л.В., Фадеева Т.В. Антисептические свойства анавидина. Новый способ стерилизации инструментария, применяемого в ангиокардиографии и эндоскопии // Сибирский медицинский журнал (Томск). 2004. Т. 19, № 1. С. 16–17. [Grigor'ev E.G., Kvashin A.I., Kiseleva L.V., Fadeeva T.V. Antiseptic properties of anavidin. A new method for sterilizing instruments used in angiocardiology and endoscopy. *Sibirskij medicinskij zhurnal (Tomsk) = Siberian Medical Journal (Tomsk)*, 2004, vol. 19, no. 1, pp. 16–17. (In Russ.)]
 14. Григорьев Е.Г., Киселева Л.В., Фадеева Т.В., Шамеев А.Ю. Антисептические свойства анавидина. Обработка рук хирурга и операционного поля // Сибирский медицинский журнал (Томск). 2004. Т. 19, № 1. С. 13–15. [Grigor'ev E.G., Kiseleva L.V., Fadeeva T.V., Shameev A.Ju. Antiseptic properties of anavidin. Treatment of the surgeon's hands and surgical field. *Sibirskij medicinskij zhurnal (Tomsk) = Siberian Medical Journal (Tomsk)*, 2004, vol. 19, no. 1, pp. 13–15. (In Russ.)]
 15. Закиева Э.Ф., Махмутов А.Р. Экологически безопасные детергенты // Инновационная наука. 2019. № 2. С. 19–23. [Zakieva E.F., Mahmutov A.R. Environmentally friendly detergents. *Innovatsionnaya nauka = Innovative Science*, 2019, no. 2, pp. 19–23. (In Russ.)]
 16. Заруднев Е.А., Фадеева Т.В., Верещагина С.А. Анавидин: универсальный дезинфектант и антисептик. Иркутск: Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования, 2000. 23 с. [Zarudnev E.A., Fadeeva T.V., Vereshhagina S.A. Anavidin: universal disinfectant and antiseptic. *Irkutsk: Irkutsk State Medical Academy of Postgraduate Education*, 2000. 23 p. (In Russ.)]

17. Земляной А.Б., Афиногенова А.Г., Матвеев С.А. Применение антисептиков в лечении ран с высоким риском инфицирования // Вестник Национального медико-хирургического центра им. Н.И. Пирогова. 2020. Т. 15, № 2. С. 129–137. [Zemlyanoy A.B., Afinogenova A.G., Matveev S.A. The use of antiseptics in the treatment of wounds with a high risk of infection. *Vestnik Natsional'nogo mediko-khirurgicheskogo isentra im. N.I. Pirogova = Bulletin of Pirogov National Medical & Surgical Center, 2020, vol. 15, no. 2, pp. 129–137. (In Russ.)*] doi: 10.25881/BPNMSC.2020.61.32.023
18. Кузнецов Д.Н., Кобраков К.И., Ручкина А.Г., Станкевич Г.С. Биологически активные синтетические органические красители // Известия высших учебных заведений. Серия: Химия и химическая технология. 2017. Т. 60, № 1. С. 4–33. [Kuznetsov D.N., Kobrakov K.I., Ruchkina A.G., Stankevich G.S. Biologically active synthetic organic dyes. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedenii. Seriya: Khimiya i khimicheskaya tekhnologiya = Chemistry and Chemical Technology, 2017, vol. 60, no. 1, pp. 4–33. (In Russ.)*] doi: 10.6060/tcct.2017601.5423
19. Кузьмин В.А., Фогель Л.С., Сухинин А.А., Макавчик С.А., Смирнова Л.И., Орехов Д.А. Оценка эффективности дезинфекции поверхностей оборудования препаратом Фумийод в животноводческих и свиноводческих помещениях в период санитарного разрыва // Международный вестник ветеринарии. 2020. № 3. С. 94–99. [Kuzmin V.A., Fogel L.S., Sukhinin A.A., Makavchik S.A., Smirnova L.I., Orekhov D.A. Estimation of efficiency of disinfection of surfaces of equipment with “Fumiod” drug in animal and pig breeding spaces during sanitary break. *Mezhdunarodnyi vestnik veterinarii = International Bulletin of Veterinary Medicine, 2020, no. 3, pp. 94–99. (In Russ.)*] doi: 10.17238/issn2072-2419.2020.3.94
20. Лыков И.Н., Асирова Э.И. Изучение сравнительной антибактериальной активности антисептиков // Международный научно-исследовательский журнал. 2022. № 3-1 (117). С. 198–201. [Lykov I.N., Asirova E.I. A comparative study of the antibacterial activity of antiseptics. *Mezhdunarodnyi nauchno-issledovatel'skii zhurnal = International Research Journal, 2022, no. 3-1 (117), pp. 198–201. (In Russ.)*] doi: 10.23670/IRJ.2022.117.3.035
21. Магеррамова Л.М. Применение спектрофотометрического метода для определения фенола и его производных // Вестник Башкирского университета. 2023. Т. 28, № 2. С. 178–183. [Maharramova L.M. Application of the spectrophotometric method for determination of phenol and its derivatives. *Vestnik Bashkirskogo universiteta = Bulletin of the Bashkir University, 2023, vol. 28, no. 2, pp. 178–183. (In Russ.)*] doi: 10.33184/bulletin-bsu-2023.2.7
22. Малинов Е.С., Шестаков А.Г., Молофеева Н.И., Мерчина С.В., Васильев Д.А. Воздействие полигексаметиленгуанидин гидрохлорида на биопленки образованные бактериями *Pseudomonas aeruginosa* в жидкой синтетической среде и последующее формирование персистеров // Научная жизнь. 2019. Т. 14, № 4 (92). С. 521–529. [Malinov E.S., Shestakov A.G., Molofeeva N.I., Merchina S.V., Vasilyev D.A. Effect of polyhexamethylene guanidine hydrochloride on biofilms formed by *Pseudomonas aeruginosa* bacteria in a liquid synthetic medium and the subsequent formation of persisters. *Nauchnaya zhizn' = Scientific Life, 2019, vol. 14, no. 4 (92), pp. 521–529. (In Russ.)*] doi: 10.26088/INOB.2019.92.30222
23. Мариничева М.П., Дорожкин В.И., Строгов В.В. Оценка общетоксических свойств нового антисептического и дезинфицирующего средства для ветеринарного применения // Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. 2021. Т. 40, № 4. С. 487–494. [Marinicheva M.P., Dorozhkin V.I., Strogov V.V. Evaluation of the general toxic properties of a new antiseptic and disinfectant for veterinary use. *Problemy veterinarnoi sanitarii, gigieny i ekologii = Problems of Veterinary Sanitation, Hygiene and Ecology, 2021, vol. 40, no. 4, pp. 487–494. (In Russ.)*] doi: 10.36871/vet.san.hyg.ecol.202104016
24. Морозов А.М., Сергеев А.Н., Кадыков В.А., Аскеров Э.М., Жуков С.В., Пельтихина О.В., Пичугова А.Н. Современные антисептические средства в обработке операционного поля // Вестник современной клинической медицины. 2020. Т. 13, № 3. С. 51–58. [Morozov A.M., Sergeev A.N., Kadykov V.A., Askerov E.M., Zhukov S.V., Peltikhina O.V., Pichugova A.N. Modern antiseptics in surgical area manipulation. *Vestnik sovremennoi klinicheskoi meditsiny = Bulletin of Modern Clinical Medicine, 2020, vol. 13, no. 3, pp. 51–58. (In Russ.)*] doi: 10.20969/VSKM.2020.13(3).51-58
25. Нестерова С.В., Анохина Т.В., Шаповал О.Г. Сравнительная оценка антибактериальной активности двух антисептиков in vivo и in vitro // Международный студенческий научный вестник. 2018. № 1. [Nesterova S.V., Anohina T.V., Shapoval O.G. Comparative assesment of antibacterial activity of two antiseptics in vivo and in vitro. *Mezhdunarodnyi studencheskii nauchnyi vestnik = International Student Scientific Bulletin, 2018, no. 1. (In Russ.)*] URL: <https://eduherald.ru/ru/article/view?id=18113>
26. Ниязов Б.С., Динлосан О.Р., Уметалиев Ю.К., Овчаренко К.Е., Акматов Т.А. Эффективность комплексного применения мазей и антисептических препаратов в лечении гнойных ран мягких тканей в эксперименте // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2018. № 9. С. 64–68. [Niyazov B.S., Dinlosan O.R., Umetaliev Yu.K., Ovcharenko K.E., Akmatov T.A. Effectiveness of complex application of ointments and antiseptic medicine in treatment of festering wounds of soft tissues in experiment. *Mezhdunarodnyi zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy = International Journal of Applied and Basic Research, 2018, no. 9, pp. 64–68. (In Russ.)*]
27. Опарина Л.А., Хилко М.Я., Колыванов Н.А., Гусарова Н.К., Недоля Н.А., Сапрыгина В.Н., Апарцин К.А., Киреева В.В., Трофимов Б.А. Свободно-радикальное гидрофосфорилирование фторалкилвиниловых эфиров: синтез фторалкилфосфонатов // Журнал общей химии. 2020. Т. 90, № 4. С. 551–556. [Oparina L.A., Khil'ko M.Y., Kolyvanov N.A., Gusarova N.K., Nedolya N.A., Trofimov B.A., Saprygina V.N., Apartsin K.A., Kireeva V.V. Free radical hydrophosphorylation of fluoroalkyl vinyl ethers: synthesis of fluoroalkyl phosphonates. *Zhurnal obshchei khimii = Russian Journal of General Chemistry, 2020, vol. 90, no. 4, pp. 551–556. (In Russ.)*] doi: 10.31857/S0044460X20040095
28. Панасенко О.М., Соколов А.В. Активные формы галогенов, галогенирующий стресс, его биомаркеры. Роль в развитии заболеваний человека // Биорадикалы и антиоксиданты. 2018. Т. 5, № 3. С. 53–56. [Panasenko O.M., Sokolov A.V. Active forms of halogens, halogenating stress, its biomarkers. Role in the development of human diseases. *Bioradikaly i antioksidanty = Bioradicals and Antioxidants, 2018, vol. 5, no. 3, pp. 53–56. (In Russ.)*]
29. Патент № 208289 U1 Российская Федерация, МПК А61М 11/08 (2006.01). Устройство для проведения санации и фотоактивации противовирусного препарата: № 2021108963; заявлено 02.04.2021; опубликовано 13.12.2021 / Небогин С.А., Иванов Н.А., Апарцин К.А. Патентообладатель: ФГБОУ «Иркутский национальный исследовательский технический университет» (ФГБОУ ВО «ИРНИТУ») (RU), ФГБУН Иркутский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук (ИНЦ СО РАН) (RU). 6 с. [Patent No. 208289 U1 Russian Federation, Int. Cl. A61M 11/08 (2006.01). Device

- for sanitization and photoactivation of an antiviral drug. No. 2021108963; application: 02.04.2021; date of publication 13.12.2021 / Nebogin S.A., Ivanov N.A., Aparcin K.A. Proprietors: FGBOU "Irkutskii natsional'nyi issledovatel'skii tekhnicheskii universitet" (FGBOU VO "IRNITU"), FGBUN Irkutskii nauchnyi tsentr Sibirskogo otdeleniya Rossiiskoi akademii nauk (INTs SO RAN). 6 p.]
30. Патент № 2167167 С1 Российская Федерация, МПК C08G 73/00, A61L 2/16, C08L 79/00 (2006.01). Способ получения фосфата полигексаметиленгуанидина и его водного раствора: № 2000101054/04; заявлено 18.01.2000: опубликовано 20.05.2001 / Шелупаев А.П., Станкевич В.К., Кухарев Б.Ф., Баркова Н.П. Патентообладатель: ЗАО «Специализированная промышленная компания ИрИОХ». 6 с. [Patent No. 2167167 C1 Russian Federation, Int. Cl. C08G 73/00, A61L 2/16, C08L 79/00 (2006.01). Method for producing polyhexamethylene guanidine phosphate and its aqueous solution. No. 2000101054/04; application: 18.01.2000; date of publication 20.05.2001 / Shelupaev A.P., Stankevich V.K., Kukharev B.F., Barkova N.P. Proprietors: Zakrytoe aktsionernoe obshchestvo "Spetsializirovannaja promyshlennaja kompanija Ir IOKh". 6 p.]
 31. Патент № 2209622 С1 Российская Федерация, МПК 7A61 К 9/06, 3.3/20, А 61 Р 31/02. Имобилизованная форма натрия гипохлорита для лечения местных гнойно-воспалительных процессов мягких тканей: № 2001134480/14; заявлено 17.12.2001: опубликовано: 10.08.2003 / Набокин И.И., Бежин А.И., Панкрушева Т.А., Удалова С.Н., Иванов С.В., Медведева О.А., Кузьмин Б.В. Патентообладатель: Курский государственный медицинский институт. [Patent No. 2209622 C1 Russian Federation, Int. Cl. 7A61 K 9/06, 3.3/20, A 61 P 31/02. An immobilized form of sodium hypochlorite for the treatment of local purulent-inflammatory processes of soft tissues. No. 2001134480/14; application: 17.12.2001; date of publication: 10.08.2003 / Nabokin I.I., Bezhin A.I., Pankrusheva T.A., Udalova S.N., Ivanov S.V., Medvedeva O.A., Kuz'min B.V. Proprietors: Kurskii gosudarstvennyi meditsinskii institut.]
 32. Патент № 2665959 Российская Федерация, МПК А61К 9/08, А61К 33/14, А61Р 31/12 (2006.01). Спрей для экстренной профилактики острых респираторных вирусных инфекций: № 2017140503; заявлено 21.11.2017: опубликовано: 05.09.2018 / Васильев А.Н., Карпов А.Н., Сакварелидзе С.Н. Патентообладатели: Васильев А.Н., Карпов А.Н., Сакварелидзе С.Н. 10 с. [Patent No. 2665959 Russian Federation, Int. Cl. A61K 9/08, A61K 33/14, A61P 31/12 (2006.01). Spray for emergency prevention of acute respiratory viral infections. No. 2017140503; application: 21.11.2017; date of publication: 05.09.2018 / Vasilev A.N., Karpov A.N., Sakvarelidze S.N. Proprietors: Vasilev A.N., Karpov A.N., Sakvarelidze S.N. 10 p.]
 33. Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19): временные методические рекомендации. Версия 18 от 26.10.2023. [Prevention, diagnosis, and treatment of new coronavirus infection (COVID-19): temporary guidelines. Version 18 of 26.10.2023. (In Russ.)] URL: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_347896
 34. Пхакадзе Т.Я., Богомолов Н.С. Применение новых антисептиков и дезинфектантов в хирургии // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 1999. № 1. С. 28–31. [Phakadze T.Ja., Bogomolov N.S. The use of new antiseptics and disinfectants in surgery. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 1999, no. 1, pp. 28–31. (In Russ.)]
 35. Родин А.В. Выбор местного антисептика для лечения и профилактики раневой инфекции // Амбулаторная хирургия. 2019. № 3–4. С. 47–57. [Rodin A.V. Selection of local antiseptic for treatment and prevention of wound infection. *Ambulatornaya khirurgiya = Ambulatory Surgery (Russia)*, 2019, no. 3–4, pp. 47–57. (In Russ.)] doi: 10.21518/1995-1477-2019-3-4-47-56
 36. Руколь В.М. Терапевтическая эффективность применения «антисептика Жданова» при лечении лошадей с гнойными ранами конечностей // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. 2019. № 1. С. 127–133. [Rukol' V.M. Therapeutic efficiency of application "antiseptics of zhdanov" at treatment of horses with purulent wounds of finitenesses. *Voprosy normativno-pravovogo regulirovaniya v veterinarii = Legal Regulation in Veterinary Medicine*, 2019, no. 1, pp. 127–133. (In Russ.)]
 37. Соловьева А.М. Зубные пасты с местными антисептиками и их роль в комплексном лечении основных стоматологических заболеваний // Институт стоматологии. 2011. Т. 50, № 1. С. 40–43. [Solov'eva A.M. Toothpastes with local antiseptics and their role in the complex treatment of major dental diseases. *Institut stomatologii = Institute of Dentistry*, 2011, vol. 50, no. 1, pp. 40–43. (In Russ.)]
 38. Удавлиев Д., Ленченко Е., Авылов Ч., Абдуллаева А. Устойчивость некоторых микроорганизмов к йодсодержащему препарату Йодлукман // Ветеринария сельскохозяйственных животных. 2020. № 11. С. 49–56. [Udavliev D., Lenchenko E., Avylov Ch., Abdullayeva A. Resistance of some microorganisms to the iodine-containing drug iodlukman. *Veterinariya sel'skokhozyaistvennykh zhivotnykh = Farm Animal Veterinary*, 2020, no. 11, pp. 49–56. (In Russ.)]
 39. Уход на дому за пациентами с COVID-19 с легкими симптомами и мониторинг контактных лиц: временное руководство Всемирной Организации Здравоохранения от 17 марта 2020 г. [Home-based care for COVID-19 patients with mild symptoms and monitoring of contacts: World Health Organization Interim Guidance dated 17 March 2020. (In Russ.)]
 40. Чепурных Е.Е., Лепехова С.А., Фадеева Т.В., Коваль Е.В., Гольдберг О.А., Григорьев Е.Г. Антисептик анавидин в профилактике и лечении гнойно-септических осложнений при повреждении печени в эксперименте // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. 2006. Т. 51, № 5. С. 242–245. [Chepurnykh E.E., Lepekhova S.A., Fadeyeva T.V., Koval E.V., Goldberg O.A., Grigoryev E.G. Antiseptic anavidin in prophylaxis and treatment of purulentseptic complications at liver injuries in experiment. *Byulleten' Vostochno-Sibirskogo nauchnogo tsentra Sibirskogo otdeleniya Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk = Bulletin of the All-Russian Scientific Center SB RAMS*, 2006, vol. 51, no. 5, pp. 242–245. (In Russ.)]
 41. Шестопалов Н.В., Пантелеева Л.Г., Соколова Н.Ф., Абрамова И.М., Лукичев С.П. Федеральные клинические рекомендации по выбору химических средств дезинфекции и стерилизации для использования в медицинских организациях. М., 2015. 67 с. [Shestopalov N.V., Panteleeva L.G., Sokolova N.F., Abramova I.M., Lukichev S.P. Federal clinical recommendations on the choice of chemical disinfection and sterilization products for use in medical organizations. *Moscow*, 2015. 67 p. (In Russ.)]
 42. Ansaldi F., Banfi F., Morelli P., Valle L., Durando P., Sticchi L., Contos S., Gasparini R., Crovari P. SARS-CoV, influenza A and syncytial respiratory virus resistance against common disinfectants and ultraviolet irradiation. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*, 2006, vol. 45, no. 1–2, pp. 5–8.

43. Gotsko M.D., Saliy I.V., Sobenina L.N., Ushakov I.A., Trofimov B.A., Kireeva V.V. Functionalized Bipyrrroles and Pyrrolyl-Aminopyrones from Acylethynylpyrroles and Diethyl Aminomalonate. *Synthesis*, 2022, vol. 54, no. 4, pp. 1134–1144. doi: 10.1055/a-1681-4164
44. Ji W., Wang W., Zhao X., Zai J., Li X. Cross-species transmission of the newly identified coronavirus 2019-nCoV. *J. Med. Virol.*, 2020, vol. 92, no. 4, pp. 433–440. doi: 10.1002/jmv.25682.
45. Keyes M., Jamal Z., Thibodeau R. Dakin Solution. *StatPearls Publishing*, 2024.
46. Khrapova K.O., Gusarova N.K., Telezhkin A.A., Volkov P.A., Ivanova N.I., Larina L.I., Apartsin K.A., Kireeva V.V., Trofimov B.A. Oxidative cross-coupling of cysteamine with secondary phosphine chalcogenides: aspects of reaction chemoselectivity. *Doklady Chemistry*, 2020, vol. 490, no. 1, pp. 11–15. doi: 10.1134/S0012500820010048
47. Mady L.J., Kubik M.W., Baddour K., Snyderman C.H., Rowan N.R. Consideration of povidone-iodine as a public health intervention for COVID-19: Utilization as “Personal Protective Equipment” for frontline providers exposed in high-risk head and neck and skull base oncology care. *Oral Oncol.*, 2020, vol. 105: 104724. doi: 10.1016/j.oraloncology.2020.104724
48. Malysheva S.F., Kuimov V.F., Belogorlova N.A., Khrapova K.O., Gusarova N.K., Apartsin K.A. Chemoselective synthesis of alkylphosphinic acids from red phosphorus and alkyl bromides in the system KOH/H₂O/toluene/micellar catalyst. *Russian Journal of Organic Chemistry*, 2022, vol. 58, no. 2, pp. 192–199. doi: 10.1134/S1070428022020063
49. Markova M.V., Tatarinova I.V., Tarasova O.A., Trofimov B.A., Apartsin K.A., Kireeva V.V. Cationic copolymerization of cholesterol vinyl ether with N-allenylpyrrolidone: a route to pharmacologically promising oligomers. *Doklady Chemistry*, 2019, vol. 485, no. 2, pp. 112–115. doi: 10.1134/S0012500819040037
50. Oparina L.A., Mal'kina A.G., Kolyvanov N.A., Ushakov I.A., Saliy I.V., Apartsin K.A., Trofimov B.A. δ -Keto aminoacrylonitriles and δ -keto aminoenones from 1-pyrrolines, cyanoacetylenes, and acetylenic ketones. *Synthesis*, 2022, vol. 54, no. 11, pp. 2635–2646. doi: 10.1055/a-1742-2736
51. Peng X., Xu X., Li Y., Cheng L., Zhou X., Ren B. Transmission routes of 2019-nCoV and controls in dental practice. *Int. J. Oral Sci.*, 2020, vol. 12, no 1: 9. doi: 10.1038/s41368-020-0075-9.
52. Ramalingam S., Cai B., Wong J., Twomey M., Chen R., M Fu R., Boote T., McCaughan H., Griffiths S.J., Haas J.G. Antiviral innate immune response in nonmyeloid cells is augmented by chloride ions via an increase in intracellular hypochlorous acid levels. *Sci. Rep.*, 2018, vol. 8, no. 1: 13630. doi: 10.1038/s41598-018-31936-y.
53. Sagitova E.F., Tomilin D.N., Sobenina L.N., Ushakov I.A., Apartsin K.A., Trofimov B.A. Acyl-tetrahydroindolyl-capped 1,3-diynes in oxidative [4 + 2]-cycloaddition with benzylamine: a one-pot access to 2-acyl-6-phenyl-5-tetrahydroindolylpyridines. *Mendeleev Communications*, 2022, vol. 32, no. 6, pp. 729–731. doi: 10.1016/j.mencom.2022.11.007
54. Yi Y., Lagniton P.N.P., Ye S., Li E., Xu R.H. COVID-19: what has been learned and to be learned about the novel coronavirus disease. *Int. J. Biol. Sci.*, 2020, vol. 16, no. 10, pp. 1753–1766. doi: 10.7150/ijbs.45134

Авторы:

Лепехова С.А., д.б.н., зав. отделом медико-биологических исследований и технологий ФГБУН Иркутский научный центр Сибирского отделения РАН, г. Иркутск, Россия;
Григорьев Г.Е., к.в.н., младший научный сотрудник отдела медико-биологических исследований и технологий ФГБУН Иркутский научный центр Сибирского отделения РАН, г. Иркутск, Россия;
Курганский И.С., к.м.н., старший научный сотрудник отдела медико-биологических исследований и технологий ФГБУН Иркутский научный центр Сибирского отделения РАН, г. Иркутск, Россия.

Authors:

Lepekhova S.A., DSc (Biology), Head of the Department of Biomedical Research and Technologies, Irkutsk Scientific Center SB RAS, Irkutsk, Russian Federaton;
Grigor'ev G.E., PhD (Veterinary), Junior Researcher, Department of Biomedical Research and Technologies, Irkutsk Scientific Center SB RAS, Irkutsk, Russian Federaton;
Kurganskiy I.S., PhD (Medicine), Senior Researcher, Department of Biomedical Research and Technologies, Irkutsk Scientific Center SB RAS, Irkutsk, Russian Federaton.

Поступила в редакцию 19.02.2024
Принята к печати 03.08.2024

Received 19.02.2024
Accepted 03.08.2024

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ КАРБАПЕНЕМ-УСТОЙЧИВЫХ ШТАММОВ ACINETOBACTER BAUMANNII

А.Е. Алексеева, Н.Ф. Бруснигина, М.А. Махова

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

Резюме. Цель исследования — молекулярно-генетическая характеристика карбапенем-устойчивых штаммов *A. baumannii*, включающая определение клональной принадлежности, анализ структуры резистомы и вирулома, описание генетического окружения детерминант устойчивости, сравнительный генетический анализ, оценку филогенетических связей. **Материалы и методы.** Материалом исследования служили карбапенем-устойчивые штаммы *A. baumannii* ($n = 7$). Проведено полногеномное секвенирование ДНК штаммов *A. baumannii* и биоинформатический анализ результатов с использованием web-сервисов и баз данных. **Результаты.** Исследуемые штаммы *A. baumannii* принадлежали сиквенс-типам ST2^{Pas}/ST2062,2063^{Oxf} ($n = 5$) и ST78^{Pas}/ST1757^{Oxf} ($n = 2$). Согласно данным филогенетического анализа, нуклеотидные последовательности исследуемых штаммов *A. baumannii* ST2^{Pas}/ST2062,2063^{Oxf} группировались в единый кластер, а последовательности штаммов *A. baumannii* ST78^{Pas}/ST1757^{Oxf} объединялись с последовательностью штамма *A. baumannii* AbCTX5, выделенного во Франции в 2015 г. Показано, что штаммы *A. baumannii* характеризовались наличием как собственных генов карбапенемазы (OXA-51 подобных), так и приобретенных генов. В частности, у представителей ST2^{Pas}/ST2062,2063^{Oxf} определены гены *blaOXA-23*, а у штаммов *A. baumannii* ST78^{Pas}/ST1757^{Oxf} — *blaOXA-72* в составе плазмидной ДНК. Установлено, что штаммы *A. baumannii* ST78^{Pas}/ST1757^{Oxf} обладали дополнительными генами бета-лактамаз расширенного спектра. Так, у обоих штаммов присутствует ген цефалоспоринолазы CTX-M-115, ассоциированный с ISKpn26, а штамм *A. baumannii* NNAb_2023.3 имеет дополнительный ген *blaCARB-16*. Для большинства исследуемых штаммов *A. baumannii* характерно наличие приобретенных генов ферментов, связанных с модификацией макролидов (*mph(E)*, *msr(E)*), хлорамфениколов (*catB8*), аминогликозидов (*aadA*, *aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id*, *aac(6)-Ib*, *aph(3')-Ia*, *armA*). Сравнительный анализ показал, что у штаммов *A. baumannii* ST2^{Pas}/ST2062,2063^{Oxf} гены резистентности к макролидам, аминогликозидам и сульфаниламидам находятся в составе Tn6279-подобного транспозона, а гены аминогликозидаз *aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id* ассоциированы с IS91-подобным мобильным элементом. У штаммов *A. baumannii* ST78^{Pas}/ST1757^{Oxf} гены устойчивости к аминогликозидам, макролидам, сульфаниламидам и гены бета-лактамаз сгруппированы на участке от 60 до 80 тыс. п.н. между генами *glmS* и *hutC*. Все штаммы *A. baumannii* характеризовались наличием мутаций в генах *gyrA* и *parC*, ассоциированных с устойчивостью к фторхинолонам. Таким образом, получены новые знания о генетическом профиле карбапенемустойчивых штаммов *A. baumannii*, являющихся представителями эпидемически значимых международных клональных линий.

Ключевые слова: *A. baumannii*, сиквенс-тип, филогенетический анализ, *blaOXA-23*, *blaOXA-72*, интегрон, транспозон.

Адрес для переписки:

Алексеева Анна Евгеньевна
603950, Россия, Нижний Новгород, ул. Малая Ямская, 71,
ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии
им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора.
Тел.: 8 (831) 432-87-91. Факс: 8 (831) 469-79-20.
E-mail: a.e.alexeeva79@mail.ru

Contacts:

Anna E. Alekseeva
603950, Russian Federation, Nizhny Novgorod, Malaya
Yamskaya str., 71, Blokhina I.N. Scientific Research Institute
of Epidemiology and Microbiology of Nizhny Novgorod.
Phone: +7 (831) 432-87-91. Fax: +7 (831) 469-79-20.
E-mail: a.e.alexeeva79@mail.ru

Для цитирования:

Алексеева А.Е., Бруснигина Н.Ф., Махова М.А. Генетический профиль карбапенем-устойчивых штаммов *Acinetobacter baumannii* // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 4. С. 681–689. doi: 10.15789/2220-7619-GPO-17637

Citation:

Alekseeva A.E., Brusnigina N.F., Makhova M.A. Genetic profile of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 4, pp. 681–689. doi: 10.15789/2220-7619-GPO-17637

GENETIC PROFILE OF CARBAPENEM-RESISTANT ACINETOBACTER BAUMANNII STRAINS

Alekseeva A.E., Brusnigina N.F., Makhova M.A.

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

Abstract. The purpose of the research: the molecular genetic characteristic of *A. baumannii* carbapenem-resistant strains, including clonal affiliation, resistome and virulome pattern analysis, description of genetic environment resistance determinants, comparative genetic analysis, and assessment of phylogenetic relationships are presented in the work. The studied *A. baumannii* strains belonged to sequence types ST2^{Pas}/ST2062.2063^{Oxf} (n = 5) and ST78^{Pas}/ST1757^{Oxf} (n = 2). The nucleotide sequences of the studied *A. baumannii* ST2^{Pas}/ST2062.2063^{Oxf} strains were grouped into a single cluster according to phylogenetic analysis. And the sequences of the *A. baumannii* ST78^{Pas}/ST1757^{Oxf} strains were combined with the nucleotide sequence of the *A. baumannii* AbCTX5 strain, isolated in France in 2015. The presence of intrinsic (OXA-51-like) and acquired carbapenemases genes was shown in *A. baumannii* strains. In particular, *blaOXA-23* are identified in members of ST2^{Pas}/ST2062.2063^{Oxf}, and in *A. baumannii* ST78^{Pas}/ST1757^{Oxf} strains — *blaOXA-72* as part of the plasmid DNA. The *A. baumannii* ST78^{Pas} strains possessed additional extended-spectrum beta-lactamase genes. The CTX-M-115 cephalosporinase gene are present in both strains, and the *A. baumannii* strain NNAb_2023.3 has the *blaCARB-16* gene. Most *A. baumannii* strains are characterized by the presence of acquired genes for enzymatic modification of macrolides (*mph(E)*, *msr(E)*), chloramphenicols (*catB8*), aminoglycosides (*aadA*, *aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id*, *aac(6')-Ib*, *aph(3')-Ia*, *armA*). A comparative analysis showed that in *A. baumannii* ST2^{Pas}/ST2062.2063^{Oxf} strains the resistance determinants to macrolides and aminoglycosides are located in the Tn6279-like transposon, and the aminoglycosidases genes *aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id* are associated with the *IS91*-like mobile element. In *A. baumannii* ST78^{Pas}/ST1757^{Oxf} strains, resistance genes to aminoglycosides, macrolides, sulfonamides, and beta-lactamase genes are grouped in a region from 60 to 80 Kb long between the *glmS* and *hutC* genes. The presence of mutations in the *gyrA* and *parC* genes associated with resistance to fluoroquinolones were characterized in all *A. baumannii* strains. Thus, new knowledge about the genetic profile of carbapenem-resistant *A. baumannii* strains representing epidemically significant international clonal lineage has been obtained.

Key words: *A. baumannii*, sequence type, phylogenetic analysis, *blaOXA-23*, *blaOXA-72*, integron, transposon.

Введение

Представители вида *Acinetobacter baumannii*, характеризующиеся устойчивостью к карбапенемам, являются актуальными возбудителями инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи [20]. В 2009 г. Американским обществом инфекционистов они включены в так называемый список ESKAPE, объединяющий представителей проблемных условно-патогенных микроорганизмов — возбудителей нозокомиальных и внебольничных инфекций [6]. *A. baumannii* являются этиологическим агентом инфекций дыхательных путей (вентилятор-ассоциированная пневмония), системы кровотока, мочевыделительной системы, раневых поверхностей, а также центральной нервной системы [6, 7, 8, 9, 19, 20]. Согласно сведениям российской он-лайн платформы AMRmap (<https://amrmap.ru>) [1], в 2021 г. штаммы *A. baumannii* были зарегистрированы в качестве этиологических агентов инфекционных заболеваний в 8,39% случаев.

Известно, что бактерии *A. baumannii* обладают природной устойчивостью к антибиотикам различных классов и основными препаратами этиотропной терапии ацинетобактерной инфекции являются карбапенемы. В последние два десятилетия наблюдается увеличение частоты встречаемости клональных линий штаммов *A. baumannii*, характеризующихся устойчивостью к карбапенемам, что является серьезной клинической проблемой в глобальном масштабе [7, 8,

9, 19]. Многочисленные исследования последних лет показали, что наибольшее эпидемическое распространение получили карбапенем-устойчивые штаммы *A. baumannii*, относящиеся к нескольким определенным клональным линиям (они получили название всемирных эпидемических клонов international clones — IC) и ассоциированные с госпитальными инфекциями [9, 23]. В настоящее время выделяют девять глобальных клональных линий (IC1–IC9), среди которых доминирующими являются штаммы, относящиеся к первым трем международным клональным линиям, а абсолютное лидерство принадлежит представителям IC2 [9, 23].

Использование полногеномного секвенирования позволяет получить расширенную молекулярно-характеристику карбапенем-устойчивых штаммов *A. baumannii*, определить их клональную принадлежность, охарактеризовать структуру резистома и вирулома, изучить генетическое окружение детерминант устойчивости, провести сравнительный генетический анализ, определить филогенетические связи.

Материалы и методы

Объектом исследования являлись семь карбапенем-устойчивых штаммов *A. baumannii*, полученных от пациентов, находящихся на стационарном лечении в медицинских организациях г. Нижнего Новгорода. Антибиотикограмма штаммов *A. baumannii* представлена в табл. 1.

Для выделения ДНК использовали набор «АмплиПрайм ДНКсorb-В» (ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия). Подготовку ДНК-библиотеки для секвенирования осуществляли с использованием набора Shotgun «SG GM» (Raissol, Россия) и комплекта индексированных праймеров для двойного баркодирования (Raissol, Россия). Секвенирование проводили на приборах «iSeq 100» (Illumina, США) и «GenoLab M» (GeneMind Biosciences Co., Китай). Выравнивание и сборку нуклеотидных последовательностей *de novo* осуществляли с использованием web-сервиса Assembly (<https://www.bv-brc.org/app/Assembly2>) и программного обеспечения SPAdes версия v3.13.0. Аннотирование геномных последовательностей штаммов *A. baumannii* проводили с использованием сервиса Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok). С помощью сервисов базы данных *Acinetobacter baumannii* typing database (https://pubmlst.org/bigfdb?db=pubmlst_abaumannii_seqdef) осуществляли типирование штаммов по схеме MLST. Для поиска детерминант патогенности и резистентности использовали поисковые сервисы базы данных Virulence Factor of Pathogenic Bacteria (<http://www.mgc.ac.cn/VFs>) и Resistance Gene Identifier (<https://card.mcmaster.ca/analyze/rgi>). Определение мобильных элементов, ассоциированных с детерминантами резистентности, осуществляли с помощью web-сервисов IS-finder (<https://www.isbiotoul.fr>) и VRprofile2 (<https://tool2-mml.sjtu.edu.cn/VRprofile/home.php>). С использованием сервиса BLASTN проводили поиск гомологичных нуклеотидных последовательностей.

Web-сервис REALPHY (<https://realphy.unibas.ch/realphy>) использовали для выравнивания нуклеотидных последовательностей геномов штаммов *A. baumannii*. Построение дендрограмм проводили с помощью программы MEGA 7.0.26 [17] алгоритм Neighbor joining с бутстрап поддержкой 100 повторов.

Результаты

Общая структура генома исследуемых штаммов *A. baumannii*, полученная в результате биоинформатического анализа результатов полногеномного секвенирования, представлена в табл. 2.

В результате типирования по схемам MLST установлено, что два штамма принадлежат сиквенс-типу (ST) 78^{Pas} (схема Pasteur) [9] и 1757^{Oxf} (схема Oxford) [4]. Другие пять штаммов по схеме Pasteur принадлежат ST2, а по схеме Oxford одновременно принадлежат двум ST (2062, 2063), поскольку в геноме обнаружилось две копии гена *gdhB*, кодирующего дегидрогеназу В, с разными аллельными вариантами.

Проведен филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей генома штаммов *A. baumannii*, принадлежащих генотипу ST2^{Pas}/ST2062,2063^{Oxf} (рис. 1А). Установлено, что все исследуемые штаммы группируются в один кластер с высокой степенью поддержки, в который входит также штамм, выделенный от больного в г. Нижний Новгород в 2022 г. На соседней ветке располагаются штаммы, выделенные в Москве в 2019–2018 гг. [12].

Дендрограмма нуклеотидных последовательностей штаммов *A. baumannii* ST78^{Pas} и кло-

Таблица 1. Антибиотикограмма штаммов *A. baumannii*

Table 1. *A. baumannii* strain antibiogram

Антибактериальный препарат Antibiotic agents	Штамм <i>A. baumannii</i> <i>A. baumannii</i> strain						
	NNAb_1	NNAb_2022.1	NNAb_2023.1	NNAb_2023.2	NNAb_2023.3	NNAb_2023.4	NNAb_2023.5
Амикацин/Amikacin	R	R	R	R	R	R	R
Гентамицин/Gentamicin	R	R	R	R	R	R	R
Тобрамицин/Tobramycin	R	R	R	R	R	R	R
Ципрофлоксацин/Ciprofloxacin	R	R	R	R	R	R	R
Левифлоксацин/Levofloxacin	R	R	R	R	R	R	R
Имипенем/Imipenem	R	R	R	R	R	R	R
Меропенем/Meropenem	R	R	R	R	R	R	R
Дорипенем/Doripenem	R	R	R	R	R	R	R
Триметоприм/сульфаметоксазол Trimethoprim/sulfamethoxazole	R	R	R	R	R	R	R
Полимиксин Е (колистин) Polymyxin E (colistin)	S	S	S	S	S	S	S

Таблица 2. Общая структура генома штаммов *A. baumannii*

Table 2. Genome pattern of *A. baumannii* strains

Показатели Feature	Штамм <i>A. baumannii</i> <i>A. baumannii</i> strain						
	NNAb_1	NNAb_2022.1	NNAb_2023.1	NNAb_2023.2	NNAb_2023.3	NNAb_2023.4	NNAb_2023.5
Размер генома, тыс. п.н. Genome size, kb	4 008	4 012	3 878	3 955	3 993	4 030	3 978
Количество белок- кодирующих последовательностей Number of protein-coding sequences	3 849	3 841	3 663	3 777	3 756	3 863	3 765
Количество тРНК Number of tRNA	58	55	80	74	67	68	72
Количество рРНК Number of rRNA	3	3	6	4	4	4	5
Количество профагов Number of prophages	5	5	5	4	7	6	6
Плазмида, тыс. п.н. Plasmid, kb	11 64,4	15	11	11	15	14 62,5	11
Сиквенс-тип (схема Pasteur/ схема Oxford) Sequence type (Pasteur scheme/Oxford scheme)	2/2062,2063	78/1757	2/2062,2063	2/2062,2063	78/1757	2/2062,2063	2/2062,2063
Международная клональная линия International clonal lineage (IC)	2	6	2	2	6	2	2
KL-тип KL-type	235	130	235	–	130	235	235
OCL-тип OCL-type	1	1	1	1	1	1	1

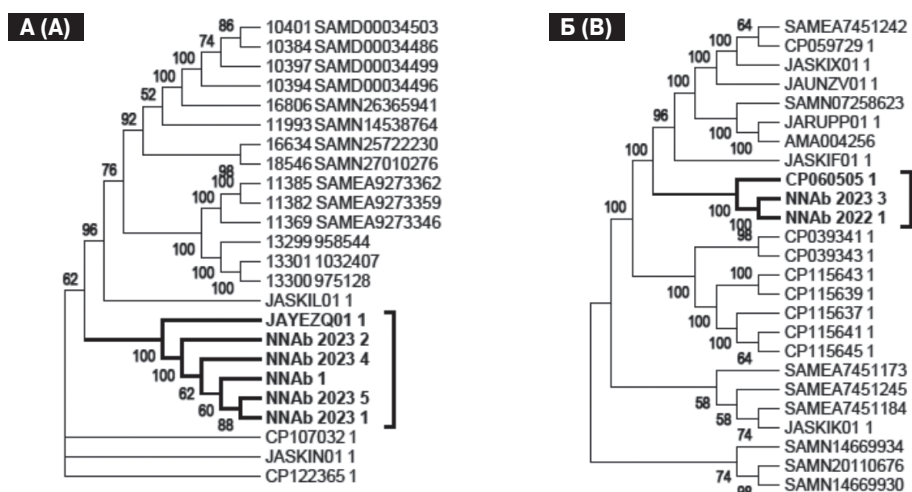


Рисунок 1. Филогенетическое дерево, построенное по алгоритму Neighbor joining, на основе анализа нуклеотидных последовательностей генома штаммов *A. baumannii*, принадлежащих ST2^{Pas}/ST2062,2063^{Oxf} (А) и ST78^{Pas}/CC944^{Oxf} (Б)

Figure 1. Neighbor joining phylogenetic tree based on analysis of *A. baumannii* genome nucleotide sequences belonging to ST2^{Pas}/ST2062,2063^{Oxf} (A) and ST78^{Pas}/CC944^{Oxf} (B)

нального комплекса (CC) 944^{Oxf} представлена на рис. 1Б. Согласно полученным данным, исследуемые штаммы *A. baumannii* образуют единый кластер со штаммом *A. baumannii* AbCTX5 (CP060505.1), выделенным во Франции в 2015 г. [22] и относящимся к ST78^{Pas}/1757^{Oxf}.

С использованием сервиса BLASTN у исследуемых штаммов *A. baumannii* были определены контиги, принадлежащие плазмидной ДНК. Так, у всех исследуемых штаммов *A. baumannii* присутствуют последовательности pAB120-подобной (CP031446.1) плазмиды, у двух штаммов *A. baumannii* выявлены последовательности второй pACICU2-подобной (CP031382.1) плазмиды. Согласно схеме типирования плазмид *A. baumannii*, предложенной Bertini A. и соавт., 2010 [13], данные плазмиды относятся к типам GR2 и GR6 соответственно.

Структуры CRISPR отсутствовали у всех исследуемых штаммов *A. baumannii*, что является характерной особенностью бактерий данного вида. Так, исследования Yadav G. и соавт. [27] показали, что последовательностями CRISPR могут обладать около 14% штаммов *A. baumannii*.

В табл. 3 представлены генетические маркеры резистентности, выявленные в структуре генома исследуемых штаммов *A. baumannii*. Согласно полученным результатам, все штаммы *A. baumannii* обладают собственными генами бета-лактамаз, относящихся к группе ADC-цефалоспориноаз, а также OXA-51-подобных карбапенемаз.

Для исследуемых штаммов *A. baumannii* характерно наличие приобретенных генов бета-лактамаз и ферментов, связанных с модификацией макролидов (*mph(E)*, *msr(E)*), хлорамфениколов (*catB8*), аминогликозидов (*aadA*, *aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id*, *aac(6)-Ib*, *aph(3')-Ia*, *armA*), сульфаниламидов (*sulI*, *sul2*).

С помощью сервисов VRprofile2 и BLAST у исследуемых штаммов *A. baumannii*, принадлежащих ST2^{Pas}, определены нуклеотидные последовательности, несущие гены антибиотико-резистентности, которые являются высокоомологичными последовательностями композитного транспозона Tn6279 (KT317075.1) [15]. Также установлено, что у штаммов *A. baumannii* сиквенс-типа 2 гены *aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id*, *sul2* ассоциированы с IS9I-подобным мобильным элементом, относящимся к группе ISCR2 (*aph(3'')-Ib*→*aph(6)-Id*→ISCR2→*sul2*). Кассетную организацию также имеют гены *cmIA5* и *arr2*, которые расположены в составе короткого контига. Следует отметить, что у представителей *A. baumannii* ST2^{Pas} детерминанты резистентности в структуре плазмидной ДНК выявлены не были.

У штаммов *A. baumannii* ST78^{Pas} гены устойчивости макролидам, аминогликозидам, сульфаниламидам также ассоциированы с мобиль-

ными инсерционными элементами и образуют следующую генетическую структуру: *mph(E)*→*msr(E)*→ISEc29→*armA*→ΔIS5→IS9I-like→*sulI*→*qacEΔI*, у штамма *A. baumannii* NNAb_2023.3 после гена *qacEΔI* присутствует дополнительно ген аминогликозидазы *aadA5*. В структуре резистоста штаммов *A. baumannii* ST78^{Pas} определен ген *blaCTX-M-115*, перед которым расположены последовательности ISKpn26 и ΔISEcp1. У штамма *A. baumannii* NNAb_2023.3 в нуклеотидной последовательности генома также присутствует ген *blaCARB-16*. Последний расположен в составе короткого контига, в последовательности которого мобильные элементы отсутствуют.

Анализ структуры плазмидной ДНК штаммов *A. baumannii* ST78^{Pas} показал наличие гена карбапенемазы *blaOXA-72*.

У всех исследуемых штаммов *A. baumannii* выявлены мутации в генах *gyrA* и *parC*, ассоциированных с устойчивостью к фторхинолонам.

В структуре вирулома штаммов *A. baumannii* определены гены, кодирующие белки системы секреции II (*gspDEFK*) и VI типов (*vgrG/tssI*, *clpV/tssH*, *tssM*); белки, участвующие в синтезе липополисахарида (*lpxABCD*, *lpsB*), пилей IV типа (кластер генов *pil*), фимбрий Csu и Ata-адгезина. Среди факторов инвазии определены гены фосфолипаз C и D, гены белка-сидерофора ацинетобактина (*basD*, *bauA*, *basB*) и системы захвата железа HemO. Также выявлены детерминанты, ответственные за био пленкообразование (*pgaAB*, *bap*).

Нуклеотидные последовательности генома исследуемых штаммов *A. baumannii* депонированы в базу данных GenBank (NCBI) под номерами JAVVDE000000000.1, JAVVDF000000000.1, JAVVDG000000000.1, JAVVDH000000000.1, JAVVDI000000000.1, JAZBGN000000000.1

Обсуждение

Согласно полученным нами данным, все исследуемые штаммы *A. baumannii* принадлежат к международным клональным линиям IC2 и IC6. Известно, что штаммы IC2 занимают доминирующее положение среди карбапенем-устойчивых штаммов *A. baumannii* во всем мире, их распространение приходится на конец 70-х гг. XX в. [23]. Необходимо отметить, что исследуемые штаммы *A. baumannii* согласно схеме Oxford принадлежат сиквенс-типу 2062,2063. Штаммы ST2062,2063 впервые были выявлены в 2014 г. в Непале, затем Таиланде, Индии и в 2018 г. в России [12]. Представители данного генотипа встречаются редко: так, в базе данных PubMLST имеется информация лишь о 15 штаммах из 6804, принадлежащих ST2^{Pas} (на февраль 2024 г.). По данным Mayanskiy N. и соавт. [18] в 2017 г. в России наиболее часто

Таблица 3. Генетические маркеры устойчивости штаммов *A. baumannii*

Table 3. Resistance genetic markers in *A. baumannii* strains

Штамм Strain	Детерминанты устойчивости/Determinants of resistance					Мутации в хромосомных генах Mutations in chromosomal genes
	собственные/natural		приобретенные/acquired		системы эффлюкса efflux systems	
	модификация АБ AB modification	системы эффлюкса efflux systems	модификация АБ AB modification	системы эффлюкса efflux systems		
NNAb_1	<i>blaADC-30</i> , <i>blaOXA-66</i> , <i>ant(3'')-IIC</i>		<i>blaOXA-23 aadA</i> , <i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aph(6)-Ic</i> , <i>aac(6)-Ib</i> , <i>aph(3'')-Ia</i> , <i>mph(E)</i> , <i>msr(E)</i> , <i>armA</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>catB8</i> , <i>arr-2</i>	<i>cmIA5</i>	<i>cmIA5</i>	<i>gyrA</i> (S83I), <i>parC</i> (S84L, V104I, D105E)
NNAb_2022.1	<i>blaADC-152</i> , <i>blaOXA-90</i> , <i>ant(3'')-IIC</i>		<i>blaOXA-72</i> , <i>blaCTX-M-115</i> , <i>mph(E)</i> , <i>msr(E)</i> , <i>armA</i> , <i>sul1</i>	<i>qacEdelta1</i>	<i>qacEdelta1</i>	<i>gyrA</i> (S83I), <i>parC</i> (S84L, V104I, D105E)
NNAb_2023.1	<i>blaADC-30</i> , <i>blaOXA-66</i> , <i>ant(3'')-IIC</i>		<i>blaOXA-23</i> , <i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aph(6)-Ic</i> , <i>aac(6)-Ib</i> , <i>aadA1</i> , <i>mph(E)</i> , <i>msr(E)</i> , <i>armA</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>catB8</i> , <i>arr-2</i>	<i>cmIA5</i> , <i>qacEdelta1</i>	<i>cmIA5</i> , <i>qacEdelta1</i>	<i>gyrA</i> (S83I), <i>parC</i> (S84L, V104I, D105E)
NNAb_2023.2	<i>blaADC-30</i> , <i>blaOXA-66</i> , <i>ant(3'')-IIC</i>	Семейство RND — <i>adeACFGHIJKLNR</i> ; Семейство MATE — <i>pmrM</i> ; Семейство MFS — <i>armA</i> , <i>abaFQ</i> ; Семейство ABC — <i>soxR</i> ; Семейство SMR — <i>abeS</i>	<i>blaOXA-23</i> , <i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aph(6)-Ic</i> , <i>aac(6)-Ib</i> , <i>aadA1</i> , <i>mph(E)</i> , <i>msr(E)</i> , <i>armA</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>catB8</i> , <i>arr-2</i>	<i>cmIA5</i> , <i>qacEdelta1</i>	<i>cmIA5</i> , <i>qacEdelta1</i>	<i>gyrA</i> (S83I), <i>parC</i> (S84L, V104I, D105E)
NNAb_2023.3	<i>blaADC-152</i> , <i>blaOXA-90</i> , <i>ant(3'')-IIC</i>		<i>blaOXA-72</i> , <i>blaCTX-M-115</i> , <i>blaCAPB-16</i> , <i>aac(6)-Ia</i> , <i>aph(3'')-Ia</i> , <i>aadA5</i> , <i>mph(E)</i> , <i>msr(E)</i> , <i>armA</i> , <i>sul1</i>	<i>cmIA5</i> , <i>floR</i> , <i>qacEdelta1</i>	<i>cmIA5</i> , <i>floR</i> , <i>qacEdelta1</i>	<i>gyrA</i> (S83I), <i>parC</i> (S84L, V104I, D105E)
NNAb_2023.4	<i>blaADC-30</i> , <i>blaOXA-66</i> , <i>ant(3'')-IIC</i>		<i>blaOXA-23</i> , <i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aph(6)-Ic</i> , <i>aac(6)-Ib</i> , <i>aadA1</i> , <i>mph(E)</i> , <i>msr(E)</i> , <i>armA</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>catB8</i> , <i>arr-2</i>	<i>cmIA5</i> , <i>qacEdelta1</i>	<i>cmIA5</i> , <i>qacEdelta1</i>	<i>gyrA</i> (S83I), <i>parC</i> (S84L, V104I, D105E)
NNAb_2023.5	<i>blaADC-30</i> , <i>blaOXA-66</i> , <i>ant(3'')-IIC</i>		<i>blaOXA-23</i> , <i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aph(6)-Ic</i> , <i>aac(6)-Ib</i> , <i>aadA1</i> , <i>mph(E)</i> , <i>msr(E)</i> , <i>armA</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>catB8</i> , <i>arr-2</i>	<i>cmIA5</i> , <i>qacEdelta1</i>	<i>cmIA5</i> , <i>qacEdelta1</i>	<i>gyrA</i> (S83I), <i>parC</i> (S84L, V104I, D105E)

Примечание. АБ — антибактериальный препарат.
Note. AB is an antibiotic.

встречались представители клональной группы 92 по схеме Oxford. Клональная линия IC6, к которой принадлежат представители ST78^{Pas}, относится к числу недавно появившихся. Так, штамм *A. baumannii* ST78^{Pas} впервые был выявлен в 2006 г. в Италии [13], затем представители данного генотипа были обнаружены в США, Бразилии [11], Франции [22] и России [18, 24]. Согласно схеме Oxford, исследуемые штаммы *A. baumannii* относятся к ST1757. На февраль 2024 г. в базе данных PubMLST имеется информация только о двух штаммах данного сиквенс-типа, выделенных во Франции (2015 г.) и в России (г. Казань, 2017). Согласно анализу eRURST сиквенс-тип 1757^{Oxf} входит в состав клонального комплекса (CC), образуемого ST944. Показано, что штаммы ST78^{Pas}/CC944^{Oxf} занимают второе ранговое место по распространенности на территории России [2, 3]. С использованием сервиса Kaptive установлено, что по ОС-локусу все штаммы *A. baumannii* принадлежат геногруппе 1, к которой относятся большинство полирезистентных штаммов *A. baumannii*, при этом по К-локусу, штаммы разделились на геногруппы 130 и 235, не являющиеся широко распространенными по данным литературы [12, 26].

Анализ структуры вирулома исследуемых штаммов *A. baumannii* показал отсутствие существенных различий, что согласуется с данными литературы, полученными при проведении крупномасштабных исследований [12, 26].

Структура резистома исследуемых штаммов *A. baumannii* ST2^{Pas} содержит набор детерминант устойчивости, характерный для представителей данной клональной линии [2, 3, 12, 16, 20, 26]. Так, установлено, что последовательности, несущие гены *aph(3')-Ia*, *armA*, *mph(E)*, *msr(E)*, *aacA4*, *aadA1*, *catB8*, *sul1*, *qacEΔ1*, являются высокоомологичными последовательности транспозона Tn6279, впервые описанного у штаммов *A. baumannii* A071 и *A. baumannii* A091 [15]. В структуру данного композитного транспозона входит последовательность Tn6020-подобного транспозона, несущего *aph(3')-Ia*, и Tn1548-подобного транспозона с генами *armA*, *msr(E)*, *mph(E)* и генами *aacA4*, *aadA1*, *catB8*, *sul1*, *qacEΔ1* в составе интегрона первого класса. У исследуемых штаммов длина Tn6279-подобного участка короче на 2409 п.н. и отсутствует последовательность IS*Aba24*.

Установлено, что у исследуемых штаммов *A. baumannii* ST2^{Pas} гены *aph(3')-Ib*, *aph(6)-Id*, *sul2* сгруппированы и ассоциированы с IS91-подобным мобильным элементом, относящимся к группе ISCR2. Известно, что данная генетическая структура входит в состав транспозона Tn6172, который может быть локализован в плазмиде pA297-3 (KU744946.1) [14]. При сравнительном анализе определено, что у исследуе-

мых штаммов *A. baumannii* участок с генами аминогликозидаз идентичен последовательности Tn6172 лишь на 65%, так как отсутствует участок, несущий IS*Aba1* и кластер генов *tni*. Совместная локализация генов *cmlA5* и *arr2* часто встречается у штаммов *A. baumannii*. В первую очередь, данные гены у штаммов *A. baumannii* обнаруживаются в составе интегрона 1-го класса [10, 21], который может быть локализован, как в структуре плазмидной ДНК (pVB82_1, pPM194229_1 и др.), так и входить в состав композитного транспозона, например Tn1548-like-2 [15].

Резистом исследуемых штаммов *A. baumannii* ST78^{Pas}/ST1757^{Oxf} характеризуется набором детерминант схожим с описанными ранее штаммами, принадлежащими IC-6, которые были выявлены и в Бразильском регионе Амазонки [11], во Франции [22] и на территории России [2, 3, 18]. Для всех штаммов данного сиквенс-типа характерно наличие генов *blaCTX-M-115* и *blaOXA-72*, последний находится в составе плазмиды, размер которой может варьировать от 7 до 20 тыс. п.н. [25]. Сравнительный анализ плазмидной нуклеотидной последовательности исследуемых штаммов показал почти 100% совпадение с последовательностью плазмиды pAbCTX5 (CP092029.1), выявленной в филогенетически близком штамме *A. baumannii* AbCTX5 (CP060505.1). У штаммов *A. baumannii* NNAб_2022.1 и NNAб_2023.3 перед геном *blaCTX-M-115* расположен IS*Kpn26*, встроившийся в последовательность IS*Ecp1*. Аналогичное генетическое окружение гена *blaCTX-M-115* было выявлено у штаммов *A. baumannii* в исследованиях Vuillemenot J.B. и соавт. [25], а также в данной работе было показано, что штаммы *A. baumannii* ST78^{Pas}/ST1757^{Oxf} характеризовались наличием гена *blaCARB-16* в отличие от штаммов *A. baumannii* ST78^{Pas}/ST944^{Oxf}, которые обладали геном *blaTEM-1* [18]. Vuillemenot и соавт. [25] установлено, что у большинства штаммов *A. baumannii* гены резистентности сгруппированы на участках длиной от 19 до 80 тыс. п.н. между генами *glmS* и *hutC* [25]. Так, у штаммов *A. baumannii* AbCTX4 и AbCTX5 генотипа ST78^{Pas}/ST1757^{Oxf} данный участок имеет длину 80 тыс. п.н., в котором расположены гены устойчивости к аминогликозидам, макролидам, сульфаниламидам, гены бета-лактамаз CARB-16 и CTX-M-115. Сравнительный анализ показал высокий уровень идентичности нуклеотидных последовательностей исследуемых штаммов *A. baumannii* ST78^{Pas}/ST1757^{Oxf} (более 90%) с последовательностью данного участка штамма *A. baumannii* AbCTX5 (рис. 2, III обложка). Однако у штамма NNAб_2021.1 последовательность участка оказалась более короткой (около 60 тыс. п.н.), поскольку отсутствует фрагмент, несущий гены *aac(6)-Ian*, *floR*, *blaCARB-16*, *sul2*.

Заключение

Таким образом, в результате проведенных исследований получены сведения о генетическом профиле штаммов *A. baumannii*, принадлежащих IC2 и IC6. Все исследуемые штаммы *A. baumannii* характеризовались сходной структурой вирулума, однако в структуре резистома были выявлены различия как между штаммами разных сиквенс-типов, так и принадлежащих к одному сиквенс-типу. Показано широкое разнообразие мобильных элементов, участвующих в распространении генов лекарственной устойчивости. Полученные данные способ-

ствуют расширению представлений о молекулярно-генетических характеристиках штаммов *A. baumannii* — представителях международных эпидемически значимых клональных линий.

Благодарности

Выражаем благодарность старшему научному сотруднику лаборатории микробиологии ФБУН Нижегородского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной, Роспотребнадзора, д.м.н. Гординской Наталье Александровне за помощь в подборе штаммов *Acinetobacter baumannii*.

Список литературы/References

1. Кузьменков А.Ю., Виноградова А.Г., Трушин И.В., Эйдельштейн М.В., Авраменко А.А., Дехнич А.В., Козлов Р.С. AMRmap — система мониторинга антибиотикорезистентности в России // Клиническая микробиология и анти-микробная химиотерапия. 2021. Т. 23, № 2. С. 198–204. [Kuzmenkov A.Yu., Vinogradova A.G., Trushin I.V., Edelstein M.V., Avramenko A.A., Dekhnich A.V., Kozlov R.S. AMRmap — antibiotic resistance surveillance system in Russia. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2021, vol. 23, no. 2, pp. 198–204. (In Russ.)] doi: 10.36488/cm.2021.2.198-204
2. Садеева З.З., Новикова И.Е., Алябьева Н.М., Лазарева А.В., Комягина Т.М., Карасева О.В., Вершинина М.Г., Фисенко А.П. *Acinetobacter baumannii* при инфекциях кровотока и центральной нервной системы у детей в отделениях реанимации и интенсивной терапии: молекулярно-генетическая характеристика и клиническая значимость // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 2. С. 289–301. [Sadееva Z.Z., Novikova I.E., Alyabyeva N.M., Lazareva A.V., Komiyagina T.M., Karaseva O.V., Vershinina M.G., Fisenko A.P. *Acinetobacter baumannii* in blood-borne and central nervous system infections in intensive care unit children: molecular and genetic characteristics and clinical significance. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2023, vol. 13, no. 2, pp. 289–301. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-ABI-2091
3. Шек Е.А., Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Склеенова Е.Ю., Иванчик Н.В., Шайдуллина Э.Р., Кузьменков А.Ю., Дехнич А.В., Козлов Р.С., Семенова Н.В., Слепакова С.А., Шепотайлова Н.В., Стребкова В.В., Рыбина Н.А., Яранцева Н.З., Перевалова Е.Ю., Розанова С.М., Наговицина С.Г., Молдовану М.Г., Насыбуллова З.З. Антибиотикорезистентность, продукция карбапенемаз и генотипы нозокомиальных штаммов *Acinetobacter* spp. в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «МАРАФОН 2015–2016» // Клиническая микробиология и анти-микробная химиотерапия. 2019. Т. 21, № 2. С. 171–180. [Shek E.A., Sukhorukova M.V., Edelstein M.V., Sklelenova E.Yu., Ivanchik N.V., Shajdullina E.R., Mikotina A.V., Kuzmenkov A.Yu., Dekhnich A.V., Kozlov R.S., Semyonova N.V., Slepakova S.A., Shepotajlova N.V., Strebkova V.V., Rybina N.A., Yaranцева N.Z., Perevalova E.Yu., Rozanova S.M., Nagovicina S.G., Moldovanu M.G., Nasybullova Z.Z. Antimicrobial resistance, carbapenemase production, and genotypes of nosocomial *Acinetobacter* spp. isolates in Russia: results of multicenter epidemiological study “MARATHON 2015–2016”. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2019, vol. 21, no. 2, pp. 171–180. (In Russ.)] doi: 10.36488/cm.2019.2.171-180
4. Bartual S.G., Seifert H., Hippler C., Luzon M.A., Wisplinghoff H., Rodríguez-Valera F. Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.*, 2005, vol. 43, no. 9, pp. 4382–4390. doi: 10.1128/JCM.43.9.4382-4390.2005
5. Bertini A., Poirel L., Mugnier P.D., Villa L., Nordmann P., Carattoli A. Characterization and PCR-based replicon typing of resistance plasmids in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010, vol. 54, no. 10, pp. 4168–4177. doi: 10.1128/AAC.00542-10
6. Boucher H.W., Talbot G.H., Bradley J.S., Edwards J.E., Gilbert D., Rice L.B., Scheld M., Spellberg B., Bartlett J. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.*, 2009, vol. 48, no. 8, pp. 1–12. doi: 10.1086/595011
7. Chakravarty B. Genetic mechanisms of antibiotic resistance and virulence in *Acinetobacter baumannii*: background, challenges and future prospects. *Mol. Biol. Rep.* 2020, vol. 47, no. 5, pp. 4037–4046. doi: 10.1007/s11033-020-05389-4
8. Dehbanipour R., Ghalavand Z. *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, virulence factors, novel therapeutic options and mechanisms of resistance to antimicrobial agents with emphasis on tigecycline. *J. Clin. Pharm. Ther.*, 2022, vol. 47, no. 11, pp. 1875–1884. doi: 10.1111/jcpt.13787
9. Diancourt L., Passet V., Nemeč A., Dijkshoorn L., Brisse S. The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. *PLoS One*, 2010, vol. 5, iss. 4: e10034. doi: 10.1371/journal.pone.0010034
10. Firoozeh F., Ghorbani M., Zibaei M., Badmasti F., Farid M., Omidinia N., Bakhshi F. Characterization of class 1 integrons in metallo-β-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* isolates from hospital environment. *BMC Res. Notes*, 2023, vol. 16, no. 1: 365. doi: 10.1186/s13104-023-06646-y

11. Fonseca É.L., Caldart R.V., Freitas F.S., Morgado S.M., Rocha L.T., Dos Santos R.C., Vicente A.C.P. Emergence of extensively drug-resistant international clone IC-6 *Acinetobacter baumannii* carrying blaOXA-72 and blaCTX-M-115 in the Brazilian Amazon region. *J. Glob. Antimicrob. Resist.*, 2020, vol. 20, pp. 18–21. doi: 10.1016/j.jgar.2019.06.014
12. Fursova N.K., Fursov M.V., Astashkin E.I., Fursova A.D., Novikova T.S., Kislichkina A.A., Sizova A.A., Fedyukina G.N., Savin I.A., Ershova O.N. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* causing nosocomial meningitis in the neurological intensive care unit. *Microorganisms*, 2023, vol. 11, no. 8: 2020. doi: 10.3390/microorganisms11082020
13. Giannouli M., Cuccurullo S., Crivaro V., Di Popolo A., Bernardo M., Tomasone F., Amato G., Brisse S., Triassi M., Utili R., Zarrilli R. Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a tertiary care hospital in Naples, Italy, shows the emergence of a novel epidemic clone. *J. Clin. Microbiol.*, 2010, vol. 48, no. 4, pp. 1223–1230. doi: 10.1128/JCM.02263-09
14. Hamidian M., Ambrose S.J., Hall R.M. A large conjugative *Acinetobacter baumannii* plasmid carrying the sul2 sulphonamide and strAB streptomycin resistance genes. *Plasmid*, 2016, vol. 87–88, pp. 43–50. doi: 10.1016/j.plasmid.2016.09.001
15. Karah N., Dwibedi C.K., Sjöström K., Edquist P., Johansson A., Wai S.N., Uhlin B.E. Novel aminoglycoside resistance transposons and transposon-derived circular forms detected in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2016, vol. 60, no. 3, pp. 1801–1818. doi: 10.1128/AAC.02143-15
16. Khongfak S., Thummeepak R., Leungtongkam U., Tسانapak K., Thanwisai A., Sitthisak S. Insights into mobile genetic elements and the role of conjugative plasmid in transferring aminoglycoside resistance in extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* AB329. *PeerJ*, 2022, vol. 10: e13718. doi: 10.7717/peerj.13718
17. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.*, 2016, vol. 33, no. 7, pp. 1870–1874. doi: 10.1093/molbev/msw054
18. Mayanskiy N., Chebotar I., Alyabieva N., Kryzhanovskaya O., Savinova T., Turenok A., Bocharova Y., Lazareva A., Polikarpova S., Karaseva O. Emergence of the uncommon clone ST944/ST78 carrying bla(OXA-40-like) and bla(CTX-M-like) genes among carbapenem-nonsusceptible *Acinetobacter baumannii* in Moscow, Russia. *Microb. Drug Resist.*, 2017, vol. 23, no. 7, pp. 864–870. doi: 10.1089/mdr.2016.030
19. Morris F.C., Dexter C., Kostoulas X., Uddin M.I., Peleg A.Y. The mechanisms of disease caused by *Acinetobacter baumannii*. *Front. Microbiol.*, 2019, no. 10: 1601. doi: 10.3389/fmicb.2019.01601
20. Nguyen M., Joshi S.G. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*, and their importance in hospital-acquired infections: a scientific review. *J. Appl. Microbiol.*, 2021, vol. 131, no. 6, pp. 2715–2738. doi: 10.1111/jam.15130
21. Nikibakhsh M., Firoozeh F., Badmasti F., Kabir K., Zibaei M. Molecular study of metallo-β-lactamases and integrons in *Acinetobacter baumannii* isolates from burn patients. *BMC Infect. Dis.*, 2021, vol. 21, no. 1: 782. doi: 10.1186/s12879-021-06513-w
22. Pfeifer Y., Hunfeld K.P., Borgmann S., Maneg D., Blobner W., Werner G., Higgins P.G. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* ST78 with OXA-72 carbapenemase and ESBL gene blaCTX-M-115. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2016, vol. 71, no. 5, pp. 1426–1428. doi: 10.1093/jac/dkv462
23. Shelenvov A., Akimkin V., Mikhaylova Y. International clones of high risk of *Acinetobacter baumannii*-definitions, history, properties and perspectives. *Microorganisms*, 2023, vol. 11, no. 8: 2115. doi: 10.3390/microorganisms11082115
24. Shelenvov A., Petrova L., Zamyatin M., Mikhaylova Y., Akimkin V. Diversity of international high-risk clones of *Acinetobacter baumannii* revealed in a Russian Multidisciplinary Medical Center during 2017–2019. *Antibiotics*, 2021, vol. 10, no. 8: 1009. doi: 10.3390/antibiotics10081009
25. Vuilleminot JB, Bour M, Beyrouthy R, Bonnet R, Laaberki MH, Charpentier X, Ruimy R, Plésiat P, Potron A. Genomic analysis of CTX-M-115 and OXA-23/-72 co-producing *Acinetobacter baumannii*, and their potential to spread resistance genes by natural transformation. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2022, vol. 77, no. 6, pp. 1542–1552. doi: 10.1093/jac/dkac099
26. Wyres K.L., Cahill S.M., Holt K.E., Hall R.M., Kenyon J.J. Identification of *Acinetobacter baumannii* loci for capsular polysaccharide (KL) and lipooligosaccharide outer core (OCL) synthesis in genome assemblies using curated reference databases compatible with Kaptive. *Microb. Genom.*, 2020, vol. 6, no. 3: e000339. doi: 10.1099/mgen.0.000339
27. Yadav G., Singh R. In silico analysis reveals the co-existence of CRISPR-Cas type I-F1 and type I-F2 systems and its association with restricted phage invasion in *Acinetobacter baumannii*. *Front. Microbiol.*, 2022, no. 13: 909886. doi: 10.3389/fmicb.2022.909886

Авторы:

Алексеева А.Е., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории метагеномики и молекулярной индикации патогенов ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия;

Бруснигина Н.Ф., к.м.н., доцент, зав. лабораторией метагеномики и молекулярной индикации патогенов ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия;

Махова М.А., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории метагеномики и молекулярной индикации патогенов ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия.

Authors:

Alekseeva A.E., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Metagenomics and Molecular Indication of Pathogens, I.N. Blokhina Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Brusnigina N.F., PhD (Medicine), Associate Professor, Head of the Laboratory of Metagenomics and Molecular Indication of Pathogens, I.N. Blokhina Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Makhova M.A., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Metagenomics and Molecular Indication of Pathogens, I.N. Blokhina Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russian Federation.

Поступила в редакцию 11.04.2024
Принята к печати 13.08.2024

Received 11.04.2024
Accepted 13.08.2024

ОЦЕНКА СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА ЛИМФОЦИТОВ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И ИНДУЦИРОВАННОЙ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОМ ЦИТОКИНСЕКРЕТОРНОЙ АКТИВНОСТИ В КУЛЬТУРАХ МОНОНУКЛЕАРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ БОЛЬНЫХ С ЛИХОРАДОЧНОЙ И МЕНИНГЕАЛЬНОЙ ФОРМАМИ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

Е.Н. Ильинских, О.В. Воронкова, А.В. Решетова, Р.Р. Хасанова, И.Е. Есимова, Н.А. Чернышов, О.В. Ямпольская, А.В. Ямпольская, Е.М. Поломошнова, Е.В. Минакова

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

Резюме. *Введение.* Результаты многих исследований особенностей иммунного ответа у больных с различными клиническими формами клещевого энцефалита (КЭ) являются достаточно противоречивыми. Целью исследования было изучение особенностей изменений субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови и активности спонтанной и липополисахарид (ЛПС)-стимулированной продукции цитокинов в культурах мононуклеарных лейкоцитов у больных с лихорадочной и менингеальной формами острого КЭ. *Материалы и методы.* I и II группы соответственно включали 16 и 12 больных с лихорадочной и менингеальной формами острого КЭ, а контрольная группа — 13 здоровых доноров, у которых в первую неделю болезни в периферической крови методом проточной цитофлуориметрии были проанализированы гемограмма, абсолютное и относительное число Т-лимфоцитов, Т-хелперов/индукторов, Т-цитотоксических лимфоцитов и NK-клеток, а также дважды в динамике — при госпитализации и через 2 недели при выписке — методом иммуноферментного анализа в кондиционной среде культур мононуклеарных лейкоцитов крови была проведена оценка концентраций спонтанной и ЛПС-стимулированной секреции TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-8 и MCP-1. Для статистического анализа использовали U-критерии Манна–Уитни и критерий Вилкоксона. *Результаты.* Во II группе у больных

Адрес для переписки:

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

Contacts:

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

Для цитирования:

Ильинских Е.Н., Воронкова О.В., Решетова А.В., Хасанова Р.Р., Есимова И.Е., Чернышов Н.А., Ямпольская О.В., Ямпольская А.В., Поломошнова Е.М., Минакова Е.В. Оценка субпопуляционного состава лимфоцитов в периферической крови и индуцированной липополисахаридом цитокинсекреторной активности в культурах мононуклеарных лейкоцитов больных с лихорадочной и менингеальной формами клещевого энцефалита // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 4. С. 690–700. doi: 10.15789/2220-7619-EPB-17647

Citation:

Ilyinskikh E.N., Voronkova O.V., Reshetova A.V., Hasanova R.R., Esimova I.E., Chernyshov N.A., Yampolskaya O.V., Yampolskaya A.V., Polomoshnova E.M., Minakova E.V. Evaluating peripheral blood lymphocyte subset composition and lipopolysaccharide-induced cytokine secretory activity in mononuclear leukocyte cultures from patients with febrile and meningeal forms of tick-borne encephalitis // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 4, pp. 690–700. doi: 10.15789/2220-7619-EPB-17647

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-15-20010 (<https://rscf.ru/project/22-15-20010>) и средств Администрации Томской области.

The study was supported by the grant of the Russian Science Foundation No. 22-15-20010 (<https://rscf.ru/project/22-15-20010>) and the Tomsk Region Administration.

с клинически более тяжелой менингеальной формой КЭ уровни спонтанной и/или ЛПС-стимулированной секреции провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6, MCP-1 и TNF α были существенно ниже, а IL-8, напротив, выше, чем у пациентов с лихорадочной формой КЭ. Кроме того, у больных с менингеальной формой КЭ уровни спонтанной и/или ЛПС-индуцированной секреции IL-6 и TNF α не имели статистически значимых различий от контрольных значений, что также свидетельствовало о подавлении их продукции. Напротив, в I группе уровни спонтанной и/или ЛПС-индуцированной продукции IL-1 β , IL-6, MCP-1 и TNF α были значительно выше, чем в контроле. Спонтанная секреция иммуносупрессорного цитокина IL-10 у пациентов обеих групп существенно превышала таковую у здоровых лиц. Независимо от клинической формы у пациентов с КЭ в крови выявлено существенное снижение по сравнению с условно-здоровыми донорами относительного числа лимфоцитов, относительного и абсолютного числа Т-цитотоксических клеток. У больных с менингеальной формой КЭ отмечалось статистически значимое повышение числа нейтрофилов в гемограмме, снижение относительного и абсолютного количества НК-клеток по сравнению с больными с менее тяжело протекающей лихорадочной формой КЭ. **Выводы.** Развитие менингеальной формы у больных острым КЭ ассоциировано с более выраженной дисрегуляцией иммунного ответа, приводящей к дефициту НК-клеток, количественному дисбалансу субпопуляций Т-лимфоцитов, увеличению числа нейтрофилов в периферической крови и подавлению продукции провоспалительных цитокинов, ответственных за реакции врожденного иммунитета.

Ключевые слова: клещевой энцефалит, лихорадочная форма, менингеальная форма, цитокины, субпопуляции лимфоцитов, липополисахарид, мононуклеарные лейкоциты крови.

EVALUATING PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTE SUBSET COMPOSITION AND LIPOPOLYSACCHARIDE-INDUCED CYTOKINE SECRETORY ACTIVITY IN MONONUCLEAR LEUKOCYTE CULTURES FROM PATIENTS WITH FEBRILE AND MENINGEAL FORMS OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS

Ilyinskikh E.N., Voronkova O.V., Reshetova A.V., Hasanova R.R., Esimova I.E., Chernyshov N.A., Yampolskaya O.V., Yampolskaya A.V., Polomoshnova E.M., Minakova E.V.

Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Abstract. Introduction. Multiple studies on immune response in patients with various clinical forms of tick-borne encephalitis (TBE) have shown conflicting results. The study aim was to estimate the changes in peripheral blood lymphocyte subset counts and activity of spontaneous and lipopolysaccharide (LPS)-stimulated cytokine production in the mononuclear leukocyte cultures in patients with febrile and meningeal acute TBE. **Materials and methods.** Groups 1 and 2 included 16 and 12 patients with febrile and meningeal acute TBE, respectively. The control group included 13 healthy donors. Hemogram and T-lymphocyte, T-helper cell, T-cytotoxic and NK cell counts were analyzed by flow cytometry at week 1 of the disease as well as the spontaneous and LPS-stimulated secretion levels of TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-8, and MCP-1 were assessed by ELISA in the supernatants of mononuclear cell cultures twice: during hospitalization and two weeks later. Statistical analysis was performed by the Mann–Whitney U-test, and Wilcoxon test. **Results.** Group 2 demonstrated significant decrease in spontaneous and/or LPS-stimulated levels of proinflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, MCP-1, and TNF α , but showed higher IL-8 level as compared with Group 1. In addition, spontaneous and/or LPS-induced levels of IL-6 and TNF α in Group 2 did not significantly differ from the controls, which presumably also indicated the suppression of their production. In contrast, spontaneous and/or LPS-induced levels of IL-1 β , IL-6, MCP-1, and TNF α in Group 1 were higher than in the controls. The spontaneous IL-10 level in the patients from both groups were higher than in the controls. Peripheral blood lymphocyte and T-cytotoxic T-lymphocyte counts in both groups of TBE patients were lower than in the controls. There was significant increase in neutrophil counts, decrease in NK cell count in Group 2 as compared to the patients with a milder febrile form. **Conclusion.** Meningeal acute TBE patients was presumably associated with inadequate immune response with NK cell deficiency, T-cell dysfunction, increased neutrophil count in the peripheral blood and impaired pro-inflammatory cytokine production related to innate immune response.

Key words: tick-borne encephalitis, febrile form, meningeal form, cytokines, lymphocyte subpopulations, lipopolysaccharide, mononuclear blood leukocytes.

Введение

Клещевой энцефалит (КЭ) — это самая распространенная на территории России, в особенности в Западной Сибири, природно-очаговая арбовирусная инфекционная болезнь с трансмиссивным механизмом передачи возбудителя, клинически преимущественно протекающая в виде лихорадочной формы (ЛФ), а также с воз-

можностью поражения ЦНС и развитием менингеальной или очаговой форм (МФ или ОФ) болезни [2].

Исследования закономерностей иммунного ответа у больных КЭ, которые в основном ограничены определением различных параметров цитокинового статуса в сыворотке периферической крови пациентов, проведенные различными авторами, показали противоречивые ре-

зультаты [3, 6, 7, 12, 23]. Кроме того, в литературе недостаточно информации об изменениях спонтанной и митоген-индуцированной секреции цитокинов в клеточных культурах лейкоцитов, полученных от больных КЭ в зависимости от различных клинических форм КЭ [3]. Известно, что общий иммунорегуляторный эффект цитокинов связан с их сложным сетевым взаимодействием, когда усиление секреции одних цитокинов может сопровождаться подавлением синтеза других, что во многом определяет особенности клинического течения заболевания [4].

Как известно, оценка функциональной активности иммунитета может проводиться с использованием культуральных методов, преследующих оценку продукции цитокинов и интенсивности пролиферации лимфоцитов периферической крови в ответ на стимуляцию клеток различными неспецифическими поликлональными митогенами растительного или бактериального происхождения, что в условиях *in vitro* позволяет получить информацию о реактивности клеточных факторов иммунитета у пациентов в динамике в зависимости от биологических свойств возбудителя, клинической формы и тяжести течения изучаемой патологии, включая бактериальные и вирусные инфекции, островоспалительные или аутоиммунные заболевания [4].

Одним из широко применяемых митогенов является липополисахарид (ЛПС), представляющий собой основной компонент клеточной стенки грамотрицательных бактерий, который используется для оценки в условиях *in vitro* состоятельности преимущественно факторов врожденного иммунитета [4]. Основными рецепторами распознавания ЛПС являются Toll-подобные рецепторы (TLR)4 при участии CD14, активация которых посредством транскрипционного ядерного фактора каппа (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells, NF-κB) инициирует экспрессию генов интерлейкинов (IL)-1β, IL-6, IL-12, фактора некроза опухоли (TNF)-α, а также хемокинов — хемоаттрактантного белка моноцитов (MCP)-1 (CCL2) и IL-8 (CXCL8), обладающих провоспалительными свойствами [14, 17].

Показано, что различные вирусы и их антигены по-разному взаимодействуют с мононуклеарными лейкоцитами, стимулированными ЛПС, что позволяет изучать особенности врожденного иммунного ответа при этих заболеваниях. В частности, нейраминидаза вируса гриппа усиливает ЛПС-стимулированную экспрессию NF-κB и гиперпродукцию провоспалительных цитокинов врожденного иммунного ответа, что может способствовать развитию «цитокинового шторма» и повреждению легких [19]. В то же время герпесвирусы способны устанавливать персистентную инфекцию, благодаря стратегии уклонения от иммунитета, в том числе за счет

подавления механизмов врожденного иммунного ответа [15]. Известно, что РНК вируса КЭ распознается TLR3, TLR7 и TLR8, что стимулирует экспрессию генов провоспалительных цитокинов — IL-1β и TNFα, а также секрецию интерферонов (IFN) типа I, запуская реакции врожденного иммунитета [18]. Особенности врожденного иммунного ответа на вирус КЭ изучены недостаточно, хотя предполагают, что от этого зависит клиническое течение заболевания и риск диссеминации возбудителя в ЦНС с развитием более тяжелых форм инфекции [13, 18].

Целью исследования было изучение особенностей изменений субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови и активности спонтанной и ЛПС-стимулированной продукции цитокинов в культурах мононуклеарных лейкоцитов у больных с ЛФ и МФ острого КЭ.

Материалы и методы

В исследовании приняли участие 28 больных с ЛФ и МФ острого КЭ, госпитализированных в первую неделю болезни в инфекционную клинику Сибирского государственного медицинского университета (СибГМУ) Минздрава России. У всех пациентов диагноз среднетяжелого течения ЛФ или МФ КЭ был подтвержден данными эпидемиологического анамнеза, клинического и клинико-лабораторного обследования, включая исследование спинномозговой жидкости (СМЖ), и сформулирован в соответствии с клинической классификацией [2]. Лабораторная верификация диагноза проводилась с помощью определения коэффициентов позитивности (КП) для специфических иммуноглобулинов (Ig) классов M и G к вирусу КЭ методом иммуноферментного анализа (ИФА) в день госпитализации пациентов и через 14 дней с использованием тест-систем АО «Вектор-Бест» (Россия). Кроме того, у всех обследованных больных на основании отрицательных результатов определения специфических IgM и IgG к *Borrelia burgdorferi s.l.* в ИФА, а также ДНК *Borrelia miyamotoi* и *Anaplasma phagocytophilum* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) (наборы АО «Вектор-Бест», Россия), были исключены иксодовый клещевой боррелиоз (ИКБ), возвратная клещевая лихорадка и гранулоцитарный анаплазмоз человека. Вышеперечисленные методы ИФА также были применены в контрольной группе условно-здоровых доноров для исключения лиц, сероположительных по клещевым инфекциям.

Письменное добровольное информированное согласие дали все участники исследования. Проведение исследования получило одобрение этического комитета СибГМУ Минздрава России (протоколы № 9119/1 от 30.05.2022 г. и № 9568 от 30.10.2023 г.).

Группа больных ЛФ КЭ включала 16 пациентов (7 мужчин и 9 женщин; средний возраст: $47,0 \pm 3,2$ лет), а группа с МФ КЭ состояла из 12 пациентов (5 мужчин и 7 женщин; средний возраст: $43,5 \pm 2,4$ лет). Контролем послужили 13 условно-здоровых доноров крови, сопоставимых с основными группами по полу и возрасту (6 мужчин и 7 женщин; средний возраст: $46,3 \pm 2,2$ лет).

Критерии включения пациентов с КЭ в исследование: поступление в стационар в первую неделю от начала болезни, подтверждение диагнозов ЛФ или МФ острого КЭ, исключение других клещевых инфекций, возраст от 20 до 60 лет. Критериями исключения были беременность, сопутствующая инфекционная (ВИЧ-инфекция, туберкулез и др.) и/или декомпенсированная фооновая соматическая патология.

Материалом для исследования служили пробы венозной крови, которые для определения субпопуляционного состава лимфоцитов в периферической крови и лейкоцитарной формулы брали однократно при госпитализации в первые семь дней болезни, а для оценки продукции цитокинов в первичной культуре мононуклеарных клеток получали дважды — при поступлении в стационар и через 2 недели при выписке (после курса терапии).

Метод иммунофенотипирования лимфоцитов с применением флуоресцентно-меченых моноклональных антител (Elabscience, КНР) и последующим многоцветным цитометрическим анализом на проточном цитофлуориметре «Accuri C6» (BD Biosciences, США) был использован для определения абсолютного количества и относительного числа В-лимфоцитов $CD19^+CD3^-$, Т-лимфоцитов $CD3^+CD19^-$, Т-хелперов/индукторов $CD3^+CD4^+CD45^+$, Т-цитотоксических лимфоцитов $CD3^+CD8^+CD45^+$ и натуральных киллеров — НК-клеток $CD3^-CD56^+CD45^+$.

Первичные культуры мононуклеарных лейкоцитов, выделенных из венозной крови методом градиентного центрифугирования на фиколле (ООО «БиолоТ», Россия), были получены для оценки спонтанной и ЛПС-стимулированной секреции $TNF\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$, $IL-10$, $IL-8$ и МСР-1 методом ИФА в образцах кондиционной среды с помощью наборов АО «Вектор-Бест» (Россия). Кроме того, рассчитывали индекс стимуляции (ИС) как отношение показателя интенсивности митоген-стимулированной продукции цитокина в культуральной жидкости к соответствующему спонтанному уровню. Культивирование клеток осуществляли в полной питательной среде на основе RPMI-1640 (ООО «БиолоТ», Россия) без применения митогена для оценки уровней спонтанной продукции цитокинов или после стимуляции 10 нг/мл бактериальным ЛПС *Escherichia coli* (Servicebio, КНР) в CO_2 -инкубаторе HF90 (Heal Force, КНР) при $37^\circ C$ и 5% концентрации CO_2 в течение 24 ч.

Статистическую обработку результатов проводили с применением STATISTICA 12.0 (StatSoft, США). Данные были представлены как медиана (Me) и первый и третий квартили (Q1; Q3), поскольку они не подчинялись нормальному закону распределения в тесте Шапиро–Уилка. Статистический анализ различий между не связанными выборками выполняли при помощи U-критерия Манна–Уитни [5]. Для статистического анализа параметров в связанных группах в динамике применялся критерий Вилкоксона. Ранговая корреляция Спирмена была использована для корреляционного анализа. При уровне значимости $p < 0,05$ различия двух сравниваемых величин считали статистически значимыми.

Результаты

Установлено (табл. 1), что в начале заболевания уровни спонтанной продукции провоспалительных цитокинов $IL-1\beta$ и $TNF\alpha$, а также хемокина МСР-1 (CCL2) в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов, полученных от больных с ЛФ КЭ, были существенно выше, чем у больных с МФ КЭ ($p = 0,017$, $p = 0,035$, $p = 0,035$), а также по сравнению с соответствующими показателями в группе условно-здоровых лиц ($p = 0,009$, $p = 0,018$, $p < 0,001$). Уровни базальной продукции $IL-6$ в культуральной жидкости мононуклеарных лейкоцитов у пациентов с ЛФ КЭ в первую неделю болезни оказались достоверно выше, чем у здоровых доноров ($p = 0,035$), однако существенных различий этого показателя от группы больных с МФ обнаружено не было ($p > 0,05$). Кроме того, у больных с МФ КЭ уровни спонтанной секреции мононуклеарными клетками $IL-1\beta$, $IL-6$ и $TNF\alpha$ статистически значимо не отличались от соответствующих параметров в группе контроля ($p > 0,05$ во всех случаях), что, по-видимому, свидетельствовало о подавлении продукции этих цитокинов в случае клинически более тяжелой формы заболевания.

Изучение спонтанной продукции этих цитокинов в супернатантах культур мононуклеарных клеток через 2 недели показало, что в группе пациентов с ЛФ КЭ уровни $IL-1\beta$ значительно повышались ($p = 0,005$), в то время как уровни $IL-6$, $TNF\alpha$ и МСР-1 не имели статистических значимых изменений в динамике, оставаясь, также как и концентрации $IL-1\beta$, выше соответствующих значений в контрольной группе ($p < 0,001$ во всех случаях, кроме $p = 0,005$ для $TNF\alpha$). В группе больных МФ КЭ в динамике через 2 недели после курса терапии отмечалось существенное повышение уровней спонтанной секреции $IL-1\beta$, $TNF\alpha$ и МСР-1 ($p = 0,025$, $p = 0,012$ и $p = 0,034$ соответственно). Кроме того, концентрации этих цитокинов в культурах больных с МФ КЭ после курса терапии превышали соответствующую

Таблица 1. Результаты оценки спонтанной и липополисахарид-стимулированной продукции цитокинов в культуре мононуклеарных лейкоцитов периферической крови больных с лихорадочной и менингеальной формами клещевого энцефалита в начале болезни и в динамике через 2 недели, Me (Q1; Q3)

Table 1. Assessment of spontaneous and lipopolysaccharide-stimulated cytokine production in the peripheral blood mononuclear cell cultures from patients with febrile and meningeal tick-borne encephalitis at disease onset and two weeks later, Me (Q1; Q3)

Параметр Parameter		Больные клещевым энцефалитом Patients with tick-borne encephalitis		Здоровые доноры Healthy donors n = 13
		Лихорадочная форма Febrile form n = 16	Менингеальная форма Meningeal form n = 12	
IL-1β	сп. I, пг/мл sp. I, pg/ml	106,4 (23,4; 314,9) p ₁ = 0,009	11,4 (2,29; 51,3) p ₂ = 0,017	20,5 (9,6; 25,0)
	сп. II, пг/мл sp. II, pg/ml	322,9 (294,3; 334,0) p ₁ < 0,001; p ₃ = 0,005	25,4 (6,50; 281,8) p ₁ = 0,044; p ₂ < 0,001; p ₃ = 0,025	
	ст. I, пг/мл st. I, pg/ml	349,5 (343,5; 368,3) p ₁ < 0,001	353,9 (340,9; 368,4) p ₁ < 0,001	165,0 (110,0; 230,0)
	ст. II, пг/мл st. II, pg/ml	357,6 (348,4; 369,6) p ₁ < 0,001	350,5 (340,6; 378,5) p ₁ < 0,001	
	ИС I ratio I	4,80 (1,17; 14,8)	29,9 (1,15; 84,1) p ₁ = 0,009; p ₂ = 0,007	7,92 (6,11; 10,00)
	ИС II ratio II	1,12 (1,06; 1,27) p ₁ < 0,001; p ₃ = 0,005	14,3 (1,31; 59,2) p ₁ = 0,001; p ₂ < 0,001	
IL-6	сп. I, пг/мл sp. I, pg/ml	298,0 (278,6; 436,9) p ₁ = 0,035	366,2 (102,3; 407,5)	220,2 (92,2; 353,2)
	сп. II, пг/мл sp. II, pg/ml	570,9 (348,7; 573,7) p ₁ < 0,001	170,1 (154,3; 270,2) p ₂ < 0,001	
	ст. I, пг/мл st. I, pg/ml	570,8 (563,0; 574,6) p ₁ < 0,001	501,4 (485,8; 504,2) p ₂ < 0,001	500,4 (495,8; 501,1)
	ст. II, пг/мл st. II, pg/ml	574,7 (564,3; 586,6) p ₁ = 0,001	495,0 (492,9; 495,7) p ₂ < 0,001	
	ИС I ratio I	1,90 (1,44; 2,03)	1,32 (1,23; 4,95) p ₁ = 0,045; p ₂ < 0,001	2,25 (1,42; 5,43)
	ИС II ratio II	1,02 (0,99; 2,75) p ₁ = 0,043	1,84 (1,63; 2,91)	
IL-8	сп. I, пг/мл sp. I, pg/ml	180,6 (119,9; 207,7)	351,3 (287,5; 420,4) p ₁ < 0,001; p ₂ < 0,001	78,1 (58,6; 344,9)
	сп. II, пг/мл sp. II, pg/ml	154,8 (94,4; 178,7) p ₃ = 0,009	403,6 (375,8; 430,3) p ₁ < 0,001; p ₂ < 0,001	
	ст. I, пг/мл st. I, pg/ml	199,3 (186,9; 213,0) p ₁ < 0,001	447,7 (415,0; 449,5) p ₂ < 0,001	450,7 (445,0; 453,3)
	ст. II, пг/мл st. II, pg/ml	189,0 (180,5; 201,1) p ₁ < 0,001	446,0 (444,0; 447,90) p ₂ < 0,001	
	ИС I ratio I	1,78 (0,93; 1,87) p ₁ < 0,001	1,28 (1,06; 1,79) p ₁ < 0,001	5,78 (1,31; 7,59)
	ИС II ratio II	1,15 (1,03; 6,64) p ₃ = 0,002	1,11 (1,03; 1,17) p ₁ = 0,002; p ₃ = 0,005	
MCP-1	сп. I, пг/мл sp. I, pg/ml	3519,0 (680,4; 4532,0) p ₁ < 0,001	761,5 (159,5; 2534,0) p ₁ < 0,001; p ₂ = 0,035	213,1 (118,1; 1520,3)
	сп. II, пг/мл sp. II, pg/ml	3430,0 (2412,0; 5150,0) p ₁ < 0,001	1057,0 (257,1; 3849,0) p ₁ < 0,001; p ₃ = 0,034	
	ст. I, пг/мл st. I, pg/ml	4470,5 (2448,0; 4687,0) p ₁ < 0,001	2757,0 (880,5; 3907,0) p ₁ < 0,001; p ₂ = 0,040	1104,4 (328,9; 1453,7)
	ст. II, пг/мл st. II, pg/ml	1870,5 (1658,0; 2034,0) p ₁ < 0,001; p ₃ = 0,002	2130,5 (1639,0; 3129,0) p ₁ < 0,001	
	ИС I ratio I	1,24 (0,64; 6,31) p ₁ < 0,001	3,38 (0,45; 18,2)	9,20 (4,43; 17,2)
	ИС II ratio II	0,59 (0,32; 0,72) p ₁ < 0,001	2,15 (0,43; 18,1) p ₂ < 0,001	

Параметр Parameter		Больные клещевым энцефалитом Patients with tick-borne encephalitis		Здоровые доноры Healthy donors n = 13
		Лихорадочная форма Febrile form n = 16	Менингеальная форма Meningeal form n = 12	
TNF α	сп. I, пг/мл sp. I, pg/ml	20,1 (5,12; 40,8) $p_1 = 0,018$	11,1 (3,36; 11,9) $p_2 = 0,035$	3,31 (2,15; 12,5)
	сп. II, пг/мл sp. II, pg/ml	20,0 (13,6; 45,9) $p_1 = 0,005$	49,6 (38,5; 50,9) $p_1 < 0,001; p_2 = 0,025; p_3 = 0,012$	
	ст. I, пг/мл st. I, pg/ml	614,3 (591,9; 624,7) $p_1 < 0,001$	345,3 (330,1; 351,2) $p_2 < 0,001$	334,4 (323,8; 335,4)
	ст. II, пг/мл st. II, pg/ml	620,4 (587,3; 663,8) $p_1 < 0,001$	338,6 (330,1; 345,4) $p_2 < 0,001$	
	ИС I ratio I	67,8 (27,1; 123,2)	29,7 (29,6; 96,5) $p_1 = 0,023$	95,2 (16,4; 150,7)
	ИС II ratio II	34,2 (18,0; 48,9) $p_1 < 0,001; p_3 = 0,009$	6,83 (6,42; 8,67) $p_1 < 0,001; p_2 < 0,001; p_3 = 0,013$	
IL-10	сп. I, пг/мл sp. I, pg/ml	41,2 (22,9; 75,7) $p_1 = 0,014$	28,5 (12,9; 53,7) $p_1 = 0,015$	9,36 (2,45; 12,7)
	сп. II, пг/мл sp. II, pg/ml	66,0 (30,9; 95,9) $p_1 < 0,001$	12,3 (7,51; 15,1) $p_2 < 0,001; p_3 = 0,012$	
	ст. I, пг/мл st. I, pg/ml	128,2 (67,9; 229,7) $p_1 = 0,043$	112,2 (96,5; 135,0)	63,8 (43,5; 111,4)
	ст. II, пг/мл st. II, pg/ml	153,3 (53,1; 248,0) $p_1 = 0,031$	143,2 (140,1; 149,8) $p_1 = 0,018$	
	ИС I ratio I	2,22 (1,67; 12,0) $p_1 = 0,019$	7,49 (2,51; 10,4)	8,81 (3,62; 23,1)
	ИС II ratio II	2,10 (1,71; 2,58)	11,6 (9,4; 37,5) $p_2 < 0,001$	

Примечание. сп. — спонтанный уровень; ст. — стимулированный липополисахаридом уровень; ИС — индекс стимуляции; p_1 — уровень значимости различий при сравнении параметров между больными и здоровыми донорами, U-критерий Манна-Уитни; p_2 — уровень значимости различий при сравнении параметров между больными с лихорадочной и менингеальной формами клещевого энцефалита, U-критерий Манна-Уитни; p_3 — уровень значимости различий при сравнении параметров у больных в динамике в начале болезни и через 2 недели, критерий Вилкоксона.
Note. sp. — spontaneous level; st. — lipopolysaccharide-stimulated level; ratio — stimulated to basal level ratio; p_1 — a significance level for differences while comparing parameters between patients and healthy donors, Mann–Whitney U-test; p_2 — a significance level for differences while comparing parameters between patients with febrile and meningeal tick-borne encephalitis, Mann–Whitney U-test; p_3 — a significance level for differences while comparing parameters in patients at disease onset and two weeks later, Wilcoxon test.

щие значения у условно-здоровых лиц ($p = 0,044$, $p < 0,001$ и $p < 0,001$ для IL-1 β , TNF α и MCP-1 соответственно).

Вместе с тем в начале заболевания и через 2 недели в динамике уровни спонтанной продукции хемокина IL-8 (CXCL8), который вызывает активацию и дегрануляцию нейтрофилов, в супернатантах культур мононуклеарных клеток больных с МФ КЭ, в отличие от других провоспалительных цитокинов, оказались существенно выше, чем у больных с ЛФ КЭ и в контрольной группе ($p < 0,001$ во всех случаях).

Кроме того, в начале болезни у больных с ЛФ и МФ КЭ уровни спонтанной секреции иммуносупрессорного цитокина IL-10 были существенно выше, чем в контрольной группе ($p = 0,014$ и $p = 0,015$). Через 2 недели у больных ЛФ КЭ уровни продукции этого цитокина по-прежнему оставались повышенными по сравнению с контролем ($p < 0,001$), а у больных с МФ КЭ, напротив, были существенно ниже, чем у больных с ЛФ КЭ ($p < 0,001$), снижаясь в динамике ($p = 0,012$) до уровней, сопоставимых с значениями в группе условно-здоровых лиц ($p > 0,05$).

Стимуляция культур мононуклеарных лейкоцитов ЛПС у больных МФ КЭ в первую неделю заболевания приводила к существенному подавлению уровней секреции таких провоспалительных цитокинов врожденного иммунного ответа, как IL-6, MCP-1 и TNF α по сравнению с уровнями соответствующих параметров у пациентов с ЛФ КЭ ($p < 0,001$ во всех случаях, кроме $p = 0,040$ для MCP-1), что в отношении ЛПС-индуцированной продукции IL-6 и TNF α сохранялось неизменным в динамике и через 2 недели ($p < 0,001$ во всех случаях). Кроме того, у больных с МФ КЭ уровни ЛПС-стимулированной секреции IL-6 и TNF α не имели статистически значимых различий от контрольных значений, что также свидетельствовало о подавлении их продукции ($p > 0,05$). Вместе с тем в начале заболевания и в динамике после курса терапии в культурах мононуклеарных лейкоцитов группы пациентов с ЛФ КЭ уровни ЛПС-индуцированной продукции IL-1 β , IL-6, IL-10, MCP-1 и TNF α были значительно выше, чем в контроле ($p < 0,001$ во всех случаях для IL-1 β , IL-6, MCP-1 и TNF α ; $p = 0,043$, $p = 0,031$ для IL-10 соответ-

ственно). Напротив, ЛПС-индуцированная секреция IL-8 в клеточных культурах у пациентов с ЛФ КЭ была значительно подавлена по сравнению с больными МФ КЭ и контролем ($p < 0,001$ во всех случаях), а в группе пациентов с МФ не имела существенных отличий от условно-здоровых лиц ($p > 0,05$).

Кроме того, в группе пациентов с МФ КЭ в начале заболевания индексы стимуляции (ИС) для IL-8 ($p < 0,001$), IL-6 ($p = 0,045$) и TNF α ($p = 0,023$) были существенно ниже, а ИС MCP-1 не имел существенных различий ($p > 0,05$) от соответствующих параметров у условно-здоровых

лиц, что, по-видимому, отражало угнетение продукции этих цитокинов в культурах мононуклеарных лейкоцитов у больных КЭ с менингеальным синдромом.

В табл. 2 приведены результаты оценки субпопуляционного состава лимфоцитов в периферической крови больных с ЛФ и МФ КЭ в первую неделю заболевания. Наряду с этим показано, что больные с МФ КЭ по сравнению с ЛФ и с контрольной группой имели существенно более высокие значения общего количества лейкоцитов крови ($p = 0,008$ и $p = 0,006$), главным образом за счет повышения относительного и абсолют-

Таблица 2. Результаты оценки субпопуляционного состава лимфоцитов в периферической крови больных с лихорадочной и менингеальной формами клещевого энцефалита, Me (Q1; Q3)

Table 2. Assessment of peripheral blood lymphocyte subset composition in patients with febrile and meningeal tick-borne encephalitis, Me (Q1; Q3)

Параметр Parameter	Больные клещевым энцефалитом Patients with tick-borne encephalitis		Здоровые доноры Healthy donors n = 13
	Лихорадочная форма Febrile form n = 16	Менингеальная форма Meningeal form n = 12	
WBC, $\times 10^9/L$	5,85 (4,82; 6,04)	10,3 (7,00; 12,3) $p_1 = 0,008; p_2 = 0,006$	5,76 (4,32; 5,90)
NEUT, %	56,70 (49,90; 64,15)	70,70 (63,70; 77,20) $p_1 < 0,001; p_2 = 0,012$	51,40 (47,50; 55,40)
NEUT, $\times 10^9/L$	3,21 (3,17; 4,44)	5,49 (3,20; 5,63) $p_1 < 0,001; p_2 = 0,026$	2,83 (2,11; 3,51)
LYMP, %	22,8 (15,5; 25,3) $p_1 = 0,003$	22,5 (17,1; 28,9) $p_1 = 0,025$	36,0 (32,0; 37,0)
LYMP, $\times 10^9/L$	1,38 (1,18; 1,44) $p_1 = 0,031$	2,03 (0,98; 2,40)	2,08 (1,45; 2,18)
CD3 ⁺ CD19 ⁻ , %	66,8 (53,5; 79,7) $p_1 = 0,021$	73,8 (67,5; 86,1)	80,3 (78,2; 82,0)
CD3 ⁺ CD19 ⁻ , $\times 10^9/L$	0,94 (0,29; 1,09) $p_1 = 0,035$	1,33 (0,75; 1,96)	1,70 (1,09; 1,71)
CD19 ⁺ CD3 ⁻ , %	2,90 (1,50; 12,7)	9,75 (7,59; 15,68)	9,07 (8,97; 9,80)
CD19 ⁺ CD3 ⁻ , $\times 10^9/L$	0,07 (0,01; 0,17)	0,22 (0,09; 0,31) $p_2 = 0,030$	0,16 (0,14; 0,19)
CD3 ⁻ CD56 ⁺ CD45 ⁺ , %	17,4 (16,1; 45,0) $p_1 < 0,001$	11,4 (8,0; 20,9) $p_2 = 0,026$	11,0 (8,98; 12,9)
CD3 ⁻ CD56 ⁺ CD45 ⁺ , $10^9/L$	0,25 (0,23; 0,28)	0,16 (0,10; 0,18) $p_1 = 0,003; p_2 = 0,003$	0,21 (0,19; 0,26)
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45 ⁺ , %	21,1 (17,2; 23,1) $p_1 = 0,004$	17,4 (11,3; 22,5) $p_1 = 0,002$	31,0 (29,9; 32,1)
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45 ⁺ , $\times 10^9/L$	0,27 (0,09; 0,34) $p_1 < 0,001$	0,30 (0,15; 0,42) $p_1 < 0,001$	0,62 (0,47; 0,70)
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45 ⁺ , %	49,5 (36,2; 58,5)	58,2 (46,5; 69,1)	49,3 (47,3; 51,1)
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45 ⁺ , $10^9/L$	0,68 (0,20; 0,82)	0,92 (0,52; 1,44)	1,01 (0,66; 1,08)
ИС ratio	2,77 (2,10; 2,85)	3,27 (1,81; 4,25)	1,59 (1,54; 1,70)

Примечание. WBC — лейкоциты; NEUT — нейтрофилы; LYMP — лимфоциты; CD3⁺CD19⁻ — Т-лимфоциты; CD19⁺CD3⁻ — В-лимфоциты; CD3⁻CD56⁺CD45⁺ — NK-клетки; CD3⁺CD4⁺CD45⁺ — Т-хелперы/индукторы; CD3⁺CD8⁺CD45⁺ — Т-цитотоксические лимфоциты; ИС — индекс соотношения (Т-хелперов к Т-цитотоксическим лимфоцитам); p_1 — уровень значимости различий при сравнении с параметрами между больными и здоровыми донорами, U-критерий Манна-Уитни; p_2 — уровень значимости различий при сравнении с параметрами между больными с лихорадочной и менингеальной формами клещевого энцефалита, U-критерий Манна-Уитни.

Note. WBC — leukocytes; NEUT — neutrophils; LYMP — lymphocytes; CD3⁺CD19⁻ — T lymphocytes; CD19⁺CD3⁻ — B lymphocytes; CD3⁻CD56⁺CD45⁺ — NK cells; CD3⁺CD4⁺CD45⁺ — T helper/inducer cells; CD3⁺CD8⁺CD45⁺ — T-cytotoxic lymphocytes; ratio — T-helper to T-cytotoxic cells ratio; p_1 — a significance level for differences while comparing parameters between patients and healthy donors, Mann-Whitney U-test; p_2 — a significance level for differences while comparing parameters between patients with febrile and meningeal tick-borne encephalitis, Mann-Whitney U-test.

ного числа нейтрофилов ($p = 0,012$, $p = 0,026$, $p < 0,001$, $p < 0,001$) в гемограмме. В периферической крови обеих групп пациентов с КЭ по сравнению с условно-здоровыми донорами было выявлено существенное снижение относительного числа лимфоцитов ($p = 0,003$ и $p = 0,025$), а в группе больных с ЛФ КЭ было обнаружено уменьшение абсолютного количества этих клеток ($p = 0,031$), что, по-видимому, прежде всего было обусловлено значительно более низкими уровнями относительного и абсолютного числа Т-цитотоксических $CD3^+CD8^+CD45^+$ клеток у больных КЭ вне зависимости от клинической формы заболевания ($p = 0,004$, $p = 0,002$, $p < 0,001$ и $p < 0,001$). Кроме того, больные с ЛФ КЭ по сравнению с контролем имели существенное увеличение относительного числа NK-клеток $CD3^-CD56^+CD45^+$ ($p < 0,001$) в периферической крови. В то же время у больных с МФ КЭ отмечалось статистически значимое снижение относительного и абсолютного числа NK-клеток $CD3^-CD56^+CD45^+$ в крови по сравнению с больными с более легким течением ЛФ КЭ ($p = 0,026$, $p = 0,003$).

Дополнительно нами выявлены отрицательные корреляционные зависимости между значениями максимальной высоты лихорадки у больных в начале заболевания, которые являются одними из критериев тяжести клинического течения ЛФ и МФ КЭ, и относительным числом лимфоцитов в периферической крови ($r = -0,66$, $p < 0,001$), а также уровнями ЛПС-стимулированной продукции IL-6 ($r = -0,68$, $p < 0,001$) и TNF α ($r = -0,69$, $p < 0,001$) в культурах мононуклеарных лейкоцитов крови. Более того, выявлены положительные корреляционные зависимости между относительным и абсолютным количеством нейтрофилов в гемограмме и уровнем спонтанной продукции IL-8 в культурах мононуклеарных лейкоцитов больных КЭ ($r = 0,76$, $p < 0,001$ и $r = 0,69$, $p < 0,001$).

Обсуждение

Известно, что клиническое течение КЭ может варьировать от инспарантной или легкой ЛФ до тяжелых форм заболевания с диссеминацией возбудителя в ЦНС с развитием менингита или энцефалита, что, по-видимому, зависит как от биологических свойств штамма вируса КЭ, так и от индивидуальных особенностей иммунологической резистентности хозяина [1, 16]. Сравнительное изучение особенностей врожденного и адаптивного иммунного ответа в культурах клеток крови, инфицированных штаммами вирусов КЭ с различной патогенностью [16], показало, что высокопатогенный штамм был способен быстро проникать и активно реплицироваться в клетках в условиях *in vitro*, подавляя экспрессию молекул адгезии и активации на моноцитах, NK-клетках и $CD8^+$ Т-лимфоцитах, приводя к подавлению врожденного иммуни-

тета, в то время как низкопатогенный штамм, напротив, медленно реплицировался в клетках крови, вызывая значительное увеличение экспрессии молекул адгезии и активации, запуская врожденные защитные механизмы и обеспечивая быструю элиминацию вируса из организма, что может предрасполагать к клинически более легкому течению заболевания. Не исключено, что эти данные позволяют в значительной степени объяснить полученные нами результаты различий параметров иммунного ответа между группами больных с ЛФ и МФ КЭ.

Известно, что МФ КЭ клинически протекает более тяжело, чем ЛФ, что сопровождается не только менингеальным синдромом, выраженными симптомами интоксикации и лихорадки, но и тенденцией к умеренному увеличению количества нейтрофилов в гемограмме, которые играют существенную роль во врожденном иммунном ответе [2], что нашло подтверждение в проведенном нами исследовании, а также в положительной корреляционной зависимости между количеством нейтрофилов в периферической крови и уровнями спонтанной секреции в культурах мононуклеарных клеток хемокина IL-8 (CXCL8), который вызывает активацию и дегрануляцию полиморфноядерных лейкоцитов [4].

Как свидетельствуют данные литературы, большинство исследователей, так же, как и мы, при анализе показателей, характеризующих гемограмму и количественную структуру основных субпопуляций лимфоцитов, указывают на уменьшение относительного содержания и/или абсолютного количества лимфоцитов в крови у пациентов с МФ и/или ОФ КЭ по сравнению с условно-здоровым контролем. Однако, в отличие от полученных нами результатов, в литературе представлены сведения о том, что лимфоцитопения формируется, главным образом за счет снижения количества клеток, экспрессирующих антигены Т-хелперов ($CD3^+CD4^+$), но не маркеры Т-цитотоксических лимфоцитов ($CD3^+CD8^+CD45^+$) [3, 6].

Известно, что NK-клетки являются важной частью врожденного иммунитета и активируются при многих вирусных инфекциях человека. Противовирусный ответ NK-клеток включает прямое уничтожение инфицированных вирусом клеток, опосредованное преимущественно высвобождением перфоринов и гранзимов, а также продукцией нескольких провоспалительных цитокинов, включая TNF α [9, 10]. Несколькими авторами было высказано предположение, что при инфекциях, вызванных флавивирусами, включая вирус денге [20, 21] и вирус японского энцефалита [22], NK-клетки играют важную роль в противовирусном контроле и оказывают влияние на тяжесть течения и исход этих заболеваний, хотя основные механизмы такого влияния остаются неизвестными. Установлено, что

у больных острым КЭ с симптомами менингита и менингоэнцефалита в ранний период заболевания также происходит подавление функциональной активности НК-клеток в отношении клеток-мишеней, хотя это не всегда подтверждается какими-либо достоверными изменениями общего количества НК-клеток среди общего числа лимфоцитов [10].

У обследованных нами пациентов с МФ КЭ было выявлено существенное снижение концентрации НК-клеток $CD3^-CD56^+CD45^+$ в периферической крови по сравнению с больными с менее тяжело протекающей ЛФ КЭ. В то же время в группе пациентов с ЛФ КЭ количество НК-клеток было значительно выше, чем у здоровых лиц, что в целом соотносится с результатами Н.В. Крыловой с соавт. [3], продемонстрировавших аналогичное разнонаправленное изменение числа НК-клеток ($CD3^-CD16^+CD56^+$) в периферической крови больных с ОФ и ЛФ КЭ в остром периоде заболевания. Снижение количества НК-клеток и дефицит Т-клеточного звена иммунитета в крови у пациентов с тяжелым течением ОФ КЭ эти авторы рассматривали как один из критериев прогрессирования КЭ, в то время как умеренная активация системного цитокинового ответа Th1-типа и компенсаторный характер изменений параметров Т-клеточного иммунитета у больных с ЛФ может рассматриваться как адекватный иммунный ответ на инфекцию [3]. Не исключено, что эта закономерность указывает на миграцию НК-клеток через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), поскольку они были обнаружены в СМЖ пациентов с МФ и ОФ острого КЭ [11].

Исследования, включающие анализ концентраций цитокинов в биологических жидкостях у больных в зависимости от клинической формы КЭ демонстрируют противоречивые результаты [3, 6, 7, 12, 23]. По данным одних авторов у больных с МФ и ОФ КЭ в сыворотке крови [6, 23] и в особенности в СМЖ [10, 12, 23] было обнаружено значительное повышение уровней провоспалительных хемокинов/цитокинов IL-8, MCP-1, IL-6, IFN γ и/или TNF α по сравнению с группой условно-здоровых лиц и пациентов с ЛФ КЭ. Повышенные уровни провоспалительных цитокинов в сыворотке крови постепенно нормализовались в стадию реконвалесценции у больных с благоприятным исходом заболевания [12]. Кроме того, уровни иммуносупрессорного цитокина IL-10 в СМЖ обратнo коррелировали с более тяжелым течением менингоэнцефалита, вызванного вирусом КЭ [12, 23].

Другие исследователи, напротив, при ОФ острого КЭ выявили недостаточность ответа Th1-типа и отсутствие значимых различий по сравнению с группой условно-здоровых лиц для концентрации провоспалительных цитокинов IL-8, IL-1 β и/или TNF α в сыворотке крови, а также обнаружили существенное снижение

уровней этих цитокинов в сыворотке и индексов стимуляции (ИС) TNF α и IL-10 в супернатантах культур мононуклеарных клеток, индуцированных конканавалином А, по сравнению с больными ЛФ КЭ [3]. В то же время у больных с ЛФ КЭ концентрации этих цитокинов в сыворотке крови существенно превышали аналогичные показатели в контроле, что в целом соотносится с полученными нами данными и свидетельствует о разнонаправленных изменениях активности факторов врожденного иммунитета у больных с разными формами КЭ: при более легкой ЛФ и при тяжелом течении с поражением ЦНС [3, 7]. Подавление в культурах мононуклеарных лейкоцитов крови спонтанной и ЛПС-стимулированной продукции провоспалительных цитокинов, таких как IL-6, TNF α и IFN α , было выявлено при тяжелом течении некоторых других инфекционных заболеваний, в частности, при коронавирусной инфекции COVID-19 [8]. Менингеальная форма у больных острым КЭ, характеризующаяся проникновением вируса КЭ через ГЭБ, по-видимому, сопровождается более выраженной дисрегуляцией иммунного ответа, приводящей к дефициту НК-клеток, количественному дисбалансу субпопуляций Т-лимфоцитов, увеличению числа нейтрофилов в периферической крови и подавлению спонтанной и/или митоген-стимулированной продукции провоспалительных цитокинов, ответственных за реакции врожденного иммунитета, главным образом, IL-6, TNF α и MCP-1.

Заключение

Таким образом, установлено, что в группе больных МФ КЭ, имевших более тяжелое клиническое течение заболевания, интенсивность спонтанной и/или ЛПС-стимулированной секреции мононуклеарными лейкоцитами крови провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6, MCP-1 и TNF α была существенно ниже, а IL-8, напротив, выше, чем у пациентов с ЛФ КЭ. Кроме того, у больных с МФ КЭ уровни спонтанной и/или ЛПС-индуцированной выработки IL-6 и TNF α либо не имели статистически значимых различий, либо оказались ниже соответствующих контрольных значений, что также свидетельствует об угнетении функциональной активности клеток. Напротив, в группе пациентов с ЛФ КЭ уровни спонтанной и/или ЛПС-индуцированной продукции IL-1 β , IL-6, MCP-1 и TNF α были значительно выше, чем у здоровых лиц. При этом спонтанная секреция иммуносупрессорного цитокина IL-10 у пациентов обеих групп существенно превышала таковую в контроле. Независимо от клинической формы у пациентов с КЭ в крови выявлено существенное снижение по сравнению с условно-здоровыми донорами относительного числа лимфо-

цитов, относительного и абсолютного числа Т-цитотоксических клеток. У больных с МФ КЭ отмечалось статистически значимое повышение числа нейтрофилов в гемограмме, снижение относительного и абсолютного количества НК-клеток по сравнению с больными с менее тяжело протекающей ЛФ КЭ. По-видимому, развитие МФ у больных острым КЭ ассоциировано с более выраженной дисрегуляцией иммунного ответа, приводящей к дефициту НК-клеток,

количественному дисбалансу субпопуляций Т-лимфоцитов, увеличению числа нейтрофилов в периферической крови и подавлению продукции провоспалительных цитокинов, ответственных за реакции врожденного иммунитета.

Дополнительная информация

Конфликт интересов. Авторы данной статьи сообщают об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы/References

1. Аитов К.А., Бурданова Т.М., Верхозина М.М., Демина Т.В., Джиоев Ю.П., Козлова И.В., Лемешевская М.В., Малов С.И., Орлова Л.С., Ткачев С.Е., Малов И.В., Злобин В.И. Клещевой энцефалит в Восточной Сибири: этиология, молекулярная эпидемиология, особенности клинического течения // *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2018. Т. 7, № 3 (26). С. 31–40. [Aitov K.A., Burdanova T.M., Verkhovina M.M., Demina T.V., Dzhioev Yu.P., Kozlova I.V., Lemeshevskaya M.V., Malov S.I., Orlova L.S., Tkachev S.E., Malov I.V., Zlobin V.I. Tick-borne encephalitis in Eastern Siberia: etiology, molecular epidemiology and peculiarities of the clinical course. *Infection Diseases: News, Opinions, Training*, 2018, vol. 7, no. 3 (26), pp. 31–40. (In Russ.) doi: 10.24411/2305-3496-2018-13005]
2. Иерусалимский А.П. Клещевой энцефалит: руководство для врачей. Новосибирск: Государственная медицинская академия МЗ РФ, 2001. 360 с. [Jerusalimsky A.P. Tick-borne encephalitis. Manual for physicians. *Novosibirsk: State Medical Academy Publishers*, 2001. 360 p. (In Russ.)]
3. Крылова Н.В., Леонова Г.Н., Павленко Е.В., Запорожец Т.С., Смолина Т.П., Гажа А.К., Новиков Д.В., Ченцова И.В. Комплексная оценка состояния иммунной системы при различных формах клещевого энцефалита в остром периоде // *Медицинская иммунология*. 2012. Т. 14, № 4–5. С. 313–320. [Krylova N.V., Leonova G.N., Pavlenko E.V., Zaporozhets T.S., Smolina T.P., Gazha A.K., Novikov D.V., Chenzova I.V. Comprehensive assessment of immune system in various forms of tick-borne encephalitis in acute phase. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2012, vol. 14, no. 4–5, pp. 313–320. (In Russ.) doi: 10.15789/1563-0625-2012-4-5-313-320]
4. Мерфи К., Уивер К. Иммунобиология по Джанвэю. Под ред. Г.А. Игнатъевой, О.А. Свитич, И.Н. Дьякова. М.: Логосфера, 2020. 1184 с. [Murphy K., Weaver C. *Janeway's Immunology*. Eds.: Ignat'eva G.A., Svitich O.A., D'yakova I.N. *Moscow: Logosfera*, 2020. 1184 p. (In Russ.)]
5. Петри А., Сэбин К. Наглядная медицинская статистика. Под ред. В.П. Леонова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2021. 232 с. [Petrie A., Sabin K. *Medical statistics at a glance*. Ed. Leonov V.P. *Moscow: GEOTAR-Media*, 2021. 232 p. (In Russ.)]
6. Стенько Е.А., Ратникова Л.И., Ермакова Н.В. Состояние клеточного и гуморального иммунитета при инфицировании вирусом семейства Flaviviridae // *Известия высших учебных заведений. Уральский регион*. 2013. № 2. С. 138–144. [Stenko E.A., Ratnikova L.I., Ermakova N.V. Cellular and humoral immunity when infected by a virus of the family Flaviviridae. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedeniy. Ural'skiy region = News of Higher Educational Institutions. Ural Region*, 2013, no. 2, pp. 138–144. (In Russ.)]
7. Сумливая О.Н., Воробьева Н.Н., Каракулова Ю.В. Диагностическое значение определения концентрации серотонина и высокочувствительного С-реактивного белка в крови у больных клещевым энцефалитом // *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*. 2014. № 2. С. 25–29. [Sumlivaya O.N., Vorobyova N.N., Karakulova Yu.V. Diagnostic value of determining the concentration of serotonin and high-sensitivity C-reactive protein in the blood in patients with tick-borne encephalitis. *Meditsinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni = Medical Parasitology and Parasitic Diseases*, 2014, no. 2, pp. 25–29. (In Russ.)]
8. Arunachalam P.S., Wimmers F., Mok C.K.P., Perera R.A.P.M., Scott M., Hagan T., Sigal N., Feng Y., Bristow L., Tak-Yin Tsang O., Wagh D., Collier J., Pellegrini K.L., Kazmin D., Alaaeddine G., Leung W.S., Chan J.M.C., Chik T.S.H., Choi C.Y.C., Huerta C., Paine McCullough M., Lv H., Anderson E., Edupuganti S., Upadhyay A.A., Bosinger S.E., Maecker H.T., Khatri P., Rouphael N., Peiris M., Pulendran B. Systems biological assessment of immunity to mild versus severe COVID-19 infection in humans. *Science*, 2020, vol. 369, no. 6508, pp. 1210–1220. doi: 10.1126/science.abc6261
9. Björkström N.K., Strunz B., Ljunggren H.G. Natural killer cells in antiviral immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, 2022, vol. 22, no. 2, pp. 112–123. doi: 10.1038/s41577-021-00558-3
10. Blom K., Braun M., Pakalniene J., Lunemann S., Enqvist M., Dailidyte L., Schaffer M., Lindquist L., Mickiene A., Micha Isson J., Ljunggren H.G., Gredmark-Russ S. NK Cell responses to human tick-borne encephalitis virus infection. *J. Immunol.*, 2016, vol. 197, no. 7, pp. 2762–2771. doi: 10.4049/jimmunol.1600950
11. Blom K., Cuapio A., Sandberg J.T., Varnaite R., Michaëlsson J., Björkström N.K., Sandberg J.K., Klingström J., Lindquist L., Gredmark Russ S., Ljunggren H.G. Cell-mediated immune responses and immunopathogenesis of human tick-borne encephalitis virus-infection. *Front. Immunol.*, 2018, no. 9: 2174. doi: 10.3389/fimmu.2018.02174
12. Bogovič P., Kastrin A., Lotrič-Furlan S., Ogrinc K., Avšič Županc T., Korva M., Knap N., Resman Rus K., Strle K., Strle F. Comparison of laboratory and immune characteristics of the initial and second phase of tick-borne encephalitis. *Emerg. Microbes Infect.*, 2022, vol. 11, no. 1, pp. 1647–1656. doi: 10.1080/22221751.2022.2086070
13. Bogovič P., Lusa L., Korva M., Lotrič-Furlan S., Resman-Rus K., Pavletič M., Avšič-Županc T., Strle K., Strle F. Inflammatory immune responses in patients with tick-borne encephalitis: dynamics and association with the outcome of the disease. *Microorganisms*, 2019, vol. 7, no. 11: 514. doi: 10.3390/microorganisms7110514

14. Ciesielska A., Matyjek M., Kwiatkowska K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2021, vol. 78, no. 4, pp. 1233–1261. doi: 10.1007/s00018-020-03656-y
15. Gerada C., Campbell T.M., Kennedy J.J., McSharry B.P., Steain M., Slobedman B., Abendroth A. Manipulation of the innate immune response by varicella zoster virus. *Front. Immunol.*, 2020, no. 11: 1. doi: 10.3389/fimmu.2020.00001
16. Krylova N.V., Smolina T.P., Leonova G.N. Molecular mechanisms of interaction between human immune cells and Far Eastern tick-borne encephalitis virus strains. *Viral Immunol.*, 2015, vol. 28, no. 5, pp. 272–281. doi:10.1089/vim.2014.0083
17. Lannoy V., Côté-Biron A., Asselin C., Rivard N. TIRAP, TRAM, and Toll-Like receptors: the untold story. *Mediators Inflamm.*, 2023: 2899271. doi: 10.1155/2023/2899271
18. Lindqvist R., Upadhyay A., Överby A.K. Tick-borne Flaviviruses and the type I interferon response. *Viruses*, 2018, vol. 10, no. 7: 340. doi: 10.3390/v10070340
19. Ma N., Li X., Jiang H., Dai Y., Xu G., Zhang Z. Influenza virus neuraminidase engages CD83 and promotes pulmonary injury. *J. Virol.*, 2021, vol. 95, no. 3: e01753-20. doi: 10.1128/JVI.01753-20
20. Mathew A. Defining the role of NK cells during dengue virus infection. *Immunology*, 2018, vol. 154, no. 4, pp. 557–562. doi: 10.1111/imm.12928
21. Sekaran S.D., Ismail A.A., Thergarajan G., Chandramathi S., Rahman S.K.H., Mani R.R., Jusof F.F., Lim Y.A.L., Manikam R. Host immune response against DENV and ZIKV infections. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2022, no. 12: 975222. doi: 10.3389/fcimb.2022.975222
22. Sharma K.B., Chhabra S., Kalia M. Japanese encephalitis virus-infected cells. *Subcell. Biochem.*, 2023, no. 106, pp. 251–281. doi: 10.1007/978-3-031-40086-5_10
23. Zidovec-Lepej S., Vilibic-Cavlek T., Ilic M., Gorenec L., Grgic I., Bogdanic M., Radmanic L., Ferenc T., Sabadi D., Savic V., Hruskar Z., Svitek L., Stevanovic V., Peric L., Lisnjic D., Lakoseljic D., Roncevic D., Barbic L. Quantification of antiviral cytokines in serum, cerebrospinal fluid and urine of patients with tick-borne encephalitis in Croatia. *Vaccines (Basel)*, 2022, vol. 10, no. 11: 1825. doi: 10.3390/vaccines10111825

Авторы:

Ильинских Е.Н., д.м.н., доцент, профессор кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Томск, Россия;

Воронкова О.В., д.м.н., доцент, зав. кафедрой биологии и генетики ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Томск, Россия;

Решетова А.В., аспирант кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Томск, Россия;

Хасанова Р.Р., к.м.н., доцент кафедры биологии и генетики ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Томск, Россия;

Есимова И.Е., д.м.н., доцент кафедры биологии и генетики ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Томск, Россия;

Чернышов Н.А., аспирант кафедры биологии и генетики ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Томск, Россия;

Ямпольская О.В., студент ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Томск, Россия;

Ямпольская А.В., студент ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Томск, Россия;

Поломошнова Е.М., студент ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Томск, Россия;

Минакова Е.В., студент ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Томск, Россия.

Authors:

Ilyinskikh E.N., DSc (Medicine), Associate Professor, Professor of the Division of Infectious Diseases and Epidemiology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation;

Voronkova O.V., DSc (Medicine), Associate Professor, Head of the Division of Biology and Genetics, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation;

Reshetova A.V., PhD Student of the Division of Infectious Diseases and Epidemiology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation;

Hasanova R.R., PhD (Medicine), Associate Professor of the Division of Biology and Genetics, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation;

Esimova I.E., DSc (Medicine), Associate Professor of the Division of Biology and Genetics, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation;

Chernyshov N.A., PhD Student of the Division of Biology and Genetics, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation;

Yampolskaya O.V., Student, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation;

Yampolskaya A.V., Student, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation;

Polomoshnova E.M., Student, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation;

Minakova E.V., Student, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

ASSESSED CORRELATION BETWEEN BIOLOGICAL DIVERSITY OF OROPHARYNGEAL MICROBIOTA AND ATOPIC DERMATITIS SEVERITY AND EXACERBATIONS

O.O. Pobezhimova, A.V. Zhestkov, A.V. Lyamin, V.P. Reshetnikova, A.A. Ereshchenko, D.V. Alekseev

Samara State Medical University of Ministry of Healthcare of Russian Federation, Samara, Russian Federation

Abstract. Atopic dermatitis (AtD) is a multifactorial inflammatory skin disease characterized by itching, chronic recurrent course and age-related features of lesions. AtD pathogenesis has not been fully elucidated yet. An important factor for AtD emergence and progression is the imbalance in symbiotic microbiota. The research publications provide a few studies about a role for oropharyngeal microorganisms in AtD immunopathogenesis. The aim of the study is to analyze biological diversity of oropharyngeal microbial communities in varying AtD severity. 97 male patients, aged from 16 to 19 years, with different AtD severity were included in the study. Culture study of oropharyngeal discharge was also performed. Biological material was seeded on the expanded list of growth media and incubated for 5 days at the 37°C. To assess the biological diversity of the oropharyngeal microbiota, the coefficient of constancy (C) was used, in order to classify individual microorganisms as permanent, additional or transient. Statistical data processing was performed using the Stat Tech software (version 4.0.0, Stattech LLC, Russia). While examining biological diversity of the oropharyngeal microbiota in AtD patients, 58 microbial species were isolated and identified. After statistical analysis the significant differences in frequency of isolation, depending on different AtD severity were observed for microbes such as *Streptococcus vestibularis* and *Rothia dentocariosa*. When *R. dentocariosa* is isolated from the oropharynx, the chances of AtD exacerbation emergence decreased by 6 times, whereas in case of *S. vestibularis*, on the contrary, it increased by 5 times. Therefore, identification of transitions of individual microbes from transient to additional and permanent microbiota and vice versa, depending on the AtD stage and severity, allows to analyze an influence of specific microorganisms in AtD pathological processes and to establish definite new microbiological predictors of AtD exacerbation and remission.

Key words: atopic dermatitis, oropharyngeal microbiota, biological diversity, skin diseases, immunological disorders, microbiome.

ОЦЕНКА КОРРЕЛЯЦИИ БИОЛОГИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ МИКРОБИОТЫ РОТОГЛОТКИ СО СТЕПЕНЬЮ ТЯЖЕСТИ И ЧАСТОТОЙ ОБОСТРЕНИЙ У ПАЦИЕНТОВ С АТОПИЧЕСКИМ ДЕРМАТИТОМ

Побежимова О.О., Жестков А.В., Лямин А.В., Решетникова В.П., Ерещенко А.А., Алексеев Д.В.

ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия

Резюме. Атопический дерматит (АтД) — многофакторное воспалительное заболевание кожи, характеризующееся зудом, хроническим рецидивирующим течением и различными возрастными особенностями. Патогенез АтД еще полностью не выяснен. Важным фактором возникновения и прогрессирования АтД явля-

Адрес для переписки:

Лямин Артем Викторович
443099, Россия, г. Самара, ул. Чапаевская, 89,
Самарский государственный медицинский университет.
Тел.: 8 927 696-88-29. E-mail: a.v.lyamin@samsmu.ru

Contacts:

Artem V. Lyamin
443079, Russian Federation, Samara, Chapaevskaya str., 89,
Samara State Medical University.
Phone: +7 927 696-88-29. E-mail: a.v.lyamin@samsmu.ru

Для цитирования:

Побежимова О.О., Жестков А.В., Лямин А.В., Решетникова В.П.,
Ерещенко А.А., Алексеев Д.В. Оценка корреляции биологического
разнообразия микробиоты ротоглотки со степенью тяжести и частотой
обострений у пациентов с атопическим дерматитом // Инфекция
и иммунитет. 2024. Т. 14, № 4. С. 701–708. doi: 10.15789/2220-7619-
ACB-17609

Citation:

Pobezhimova O.O., Zhestkov A.V., Lyamin A.V., Reshetnikova V.P.,
Ereshchenko A.A., Alekseev D.V. Assessed correlation between biological
diversity of oropharyngeal microbiota and atopic dermatitis severity and
exacerbations // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya
i immunitet, 2024, vol. 14, no. 4, pp. 701–708. doi: 10.15789/2220-7619-
ACB-17609

ется дисбаланс симбиотической микробиоты. Научная литература содержит небольшое количество информации об участии микроорганизмов ротоглотки в иммунопатогенезе АтД. Цель исследования — провести анализ биологического разнообразия микробных сообществ ротоглотки в группах пациентов с различной степенью тяжести АтД и на разных стадиях АтД (ремиссия/обострение). В исследование были включены 97 пациентов с различной степенью тяжести АтД. Также было проведено культуральное исследование выделений из ротоглотки. Посев материала проводили на расширенный перечень питательных сред и инкубировали при температуре 37°C в течение 5 суток. Для оценки биологического разнообразия микробиоты ротоглотки использовался коэффициент постоянства (С), позволяющий классифицировать отдельные микроорганизмы как постоянные, дополнительные или временные. Статистические расчеты проводились с использованием программного обеспечения StatTech (версия 4.0.0, разработчик ООО «Статтех», Россия). В ходе исследования у включенных в него пациентов было выделено и идентифицировано 58 видов микроорганизмов. В ходе статистического анализа были получены значимые различия в частоте выделения, в зависимости от различной степени тяжести АтД, для таких микроорганизмов, как *Streptococcus vestibularis* и *Rothia dentocariosa*. При выделении *R. dentocariosa* из ротоглотки вероятность возникновения обострения АтД снижалась в 6 раз. При выделении *S. vestibularis* вероятность возникновения обострения АтД, в отличие от *R. dentocariosa*, увеличивалась в 5 раз. Таким образом, выявление переходов отдельных микроорганизмов от транзитной к дополнительной и постоянной микробиоте и наоборот, в зависимости от стадии и тяжести АтД, позволяет нам проанализировать влияние определенных микроорганизмов на патологические процессы при АтД и установить предпосылки для открытия новых микробиологические предикторов обострения и ремиссии АтД.

Ключевые слова: атопический дерматит, микробиота ротоглотки, биологическое разнообразие, кожные болезни, иммунологические нарушения, микробиом.

Introduction

Atopic dermatitis (AtD) is a multifactorial inflammatory skin disease characterized by itching, chronic recurrent course and age-related features of skin lesions. This is one of the most common skin diseases (from 20% to 40% in the structure of this group), emerging in all countries, mainly in young people of both genders. The prevalence of AtD in Europe has amounted to 15.6%, in the USA — 17.2%, in Japan — 24%, in Russia — 30–35%, reflecting the steady increase in the frequency of AtD detection over the past three decades [20, 28, 29].

The pathogenesis of AtD has not been fully elucidated yet. Presumably, several factors might be the initiators of the inflammatory processes. One of such factors is hereditary determinism, leading to a violation of the skin barrier, defects in the immune system, hypersensitivity to allergens and non-specific stimuli, colonization by pathogenic microorganisms, and also to an imbalance of the autonomic nervous system with increased production of inflammatory mediators [3, 13].

According to the clinical recommendations of the American Academy of Allergy, Asthma, and Immunology (AAAAI), AtD is a chronic inflammatory process of the skin that emerges due to a genetic malfunction, under the influence of external factors, a violation of the skin barrier and a defect in the immune defense [19].

Recent scientific data increasingly indicate that cytokines play one of the main roles in the AtD pathogenesis. In particular, much attention is paid to the proinflammatory cytokines of the IL-36 subfamily: IL-36a, IL-36 β and IL-36 γ and their receptor antagonist IL-36Ra. These molecules are produced

by keratinocytes, Langerhans cells and macrophages and they serve as activators of the innate and acquired defense systems [22, 32].

Another important factor contributing to the emergence and progression of AtD is the imbalance of the symbiotic microbiota of the human body [2, 27].

As a rule, most researches, dedicated to relations between microorganisms and allergic or autoimmune diseases, mainly concentrate on the microbiota of the skin or intestines. At the same time, microbial communities of the upper respiratory tract remain ignored. These anatomical structures are the most diverse and plastic in the composition of the microbiome. The qualitative characteristics of the microbiota in them varies depending on the biotope (nasal cavity, nasopharynx and oropharynx) [5, 10].

Microbiota of the oropharynx is especially interesting in the context of our topic, as it is the most abundant and diverse biotope. The surface of the tonsils is characterized by a particularly high microbial diversity.

The scientific literature provides a certain amount of information about the participation of microorganisms in the immunopathological processes. However, only a small part of data on the involvement of individual oropharyngeal species in the immunopathogenesis of AtD. This fact requires a more detailed further study of the microbial diversity of the upper respiratory tract in patients with varying AtD severity degrees.

Although much is known about the diagnosis and severity assessment of AtD, there are too many ambiguous points about this disease. Additional knowledge about the pathogenesis is needed in order to introduce different biomarkers into practical work for more accurate diagnosis and monitoring

of patients' condition. This requires an integrated approach to the problem of AtD, which will take into account various aspects of the pathogenesis of this disease.

Aim of the study is to analyze the biological diversity of oropharyngeal microbial communities in groups of patients at different stages of AtD in order to identify certain microbiological predictors.

Materials and methods

The study included 97 male AtD patients, aged from 16 to 19. 15 of them had remission, 82 had an exacerbation of varying severity (22 — mild, 53 — moderate and 7 — severe). Only patients with no exacerbations of other chronic diseases were included.

The semi-quantitative SCORAD (Scoring of Atopic Dermatitis) scale was used to assess the severity of the skin pathological process. The SCORAD scale provides a score assessment of six objective symptoms: erythema, edema/papular elements, crusts/weeping, excoriation, peeling, dry skin.

Atopic dermatitis of mild severity corresponds to a SCORAD value < 25, moderate severity — 25–50, and severe atopic dermatitis corresponds to a SCORAD value > 50.

A smear was taken from the walls of the oropharynx for cultural examination with a sterile cotton swab. In a tube with a liquid transport medium, the material was delivered to a bacteriological laboratory. The material was seeded on the following growth media: universal chromogenic agar (HiMedia, India), 5% blood agar with mutton blood (HiMedia, India), chocolate agar (HiMedia, India), selective media for the isolation of lactobacilli (HiMedia, India), bifidobacteria (HiMedia, India), clostridium (HiMedia, India), obligate anaerobes (HiMedia, India), veilonella (HiMedia, India), non-fermenting Gram-negative bacteria (HiMedia, India), enterobacteria (HiMedia, India), Saburo agar (HiMedia, India).

The preparation of the material for seeding was carried out by homogenizing it in a liquid Ames growth medium (GEM LLC, Russia), followed by spreading 100 µl of the final suspension on the surface of each growth medium.

Media were incubated in aerobic, microaerophilic (using a CO₂ incubator (Sanyo, Japan) and anaerobic conditions (using gas-generating packages (Anaerogaz, Russia), at a temperature of 37°C for 5 days.

Colonies of all grown microorganisms were identified using the MALDI-ToF mass spectrometry on the Microflex LT device (Bruker, Germany) by direct application and extended application with the use of formic acid. During identification, the obtained spectra of microorganisms were compared with the database of the Bruker Daltonik GmbH standard library. The accuracy of identification was assessed

automatically using the MALDI Biotyper RTC software according to the level of the coincidence coefficient (Score) from 0 to 3. The level of 0.000–1.699 was regarded as the result of low-confidence identification, the level of Score from 1.700 to 1.999 was considered as identification on the level of genus; highly reliable identification to the species level was accepted at Score values of 2.000–2.999.

To assess the biological diversity of the oropharyngeal microbiota, the coefficient of constancy (C) was used. According to this assessment, microorganisms were considered as participants of permanent, additional or transient microbiota.

In the case of isolation of individual microorganisms from more than 50% of patients, this microorganism was regarded as permanent. The isolation from patients in the range of 25–50% corresponded to an additional microbiota, isolation less than in 25% of cases corresponded to transient microbiota. Coefficient was calculated using the following formula:

$$C = (p \times 100)/P,$$

in which p — number of isolations of individual microorganisms, P — total number of isolations.

Accumulation, correction, systematization of the obtained data and visualization of the results were carried out in Microsoft Office Excel 2016 spreadsheets. Statistical calculations were performed using the Stat Tech software (version 4.0.0, Stattech LLC, Russia).

A predictive model, reflecting the dependence of a quantitative variable on factors, was created using the linear regression method. The construction of a predictive model of the possibility of a certain outcome was performed using the logistic regression method. The Nigekirk coefficient R² served as a measure of certainty, indicating the part of the variance that can be explained using logistic regression.

For assessment of the diagnostic significance of quantitative signs, during predicting a certain outcome, the ROC curve analysis method was used. The dividing value of the quantitative feature at the cut-off point was determined by the highest value of the Yuden index.

Results

During examination of the biological diversity of the oropharyngeal microbiota in AtD patients, 58 species of microorganisms were isolated and identified.

To assess the contribution of different species to biological diversity, for each microbe the coefficient of constancy was calculated in three groups of patients with different severity and in patients with remission.

Microbes of additional and permanent oropharyngeal microbiota are shown in Fig. 1.

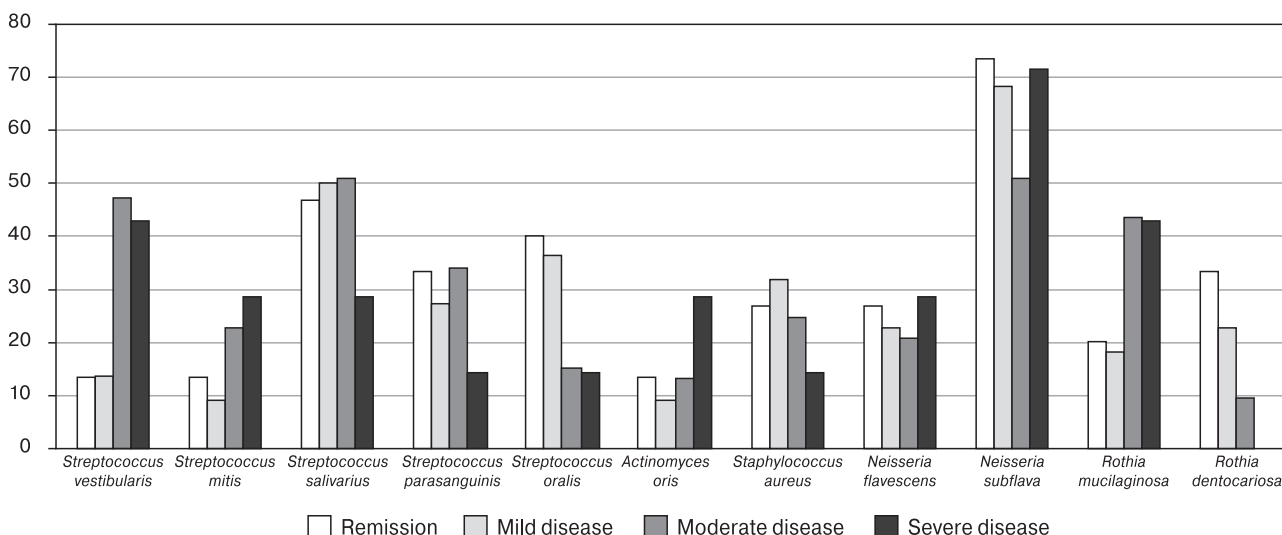


Figure 1. AtD severity-driven Species diversity for permanent and additional oropharyngeal microbiota

The only species that can be classified as permanent for AtD patients with all severity degrees was *Neisseria subflava*, which was isolated in 50.9–73.3% of the examined individuals. For the rest of the microbes, three types of patterns were identified: an increase of the coefficient of constancy with the transition from transient to additional and permanent microbiota along with increase of AtD severity (*Streptococcus vestibularis*, *Streptococcus mitis*, *Actinomyces oris*, *Rothia mucilaginosa*); a decrease of the coefficient of constancy with transition to transient species along with increase of AtD severity (*Streptococcus salivarius*, *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus oralis*, *Staphylococcus aureus*, *Rothia dentocariosa*); the absence of significant changes in the coefficient of constancy depending on the AtD severity (*Neisseria flavescens*).

For individual microorganisms of the first and second groups, significant differences in frequency of isolation were obtained depending on the stage of AtD (remission or exacerbation) (Table 1).

The isolation of *S. vestibularis* was significantly more often in the group of patients with exacerbations of AtD, whereas *S. oralis* and *R. dentocariosa* were more often isolated in patients with remission.

Above written data, on the one hand, shows the possibilities of the culture method in assessing

the biological diversity of the oropharyngeal microbiota. On the other hand, it opens up opportunities for searching for new potential microbial markers that determine the severity of AtD.

The species of microorganisms, which were isolated from the oropharynx with statistically significant differences between patients with different stages and severity degrees of AtD, were also considered as potential microbiological predictors.

To predict the emergence of AtD exacerbation, mathematical models were created, which were characterized by a higher quality of the prognostic test. These models included such microbiological criteria as the isolation of *R. dentocariosa* and *S. vestibularis* from the oropharynx.

For *R. dentocariosa*, the dependence with AtD stage is described by the equation:

$$P = 1 / (1 + e^{-z}) \times 100\%$$

$$z = 1,83 - 1,83 \times R.d.$$

in which P — possibility of AtD exacerbation, R.d. — isolation of *R. dentocariosa* from oropharynx (0 — not isolated, 1 — isolated).

Created regression model is statistically significant (p = 0.013). When *R. dentocariosa* is isolated

Table 1. Analyzed frequency of AtD stage-related isolation for individual oropharyngeal microorganisms

Species	Result of culture study	AtD stage		p
		Remission, abs. (%)	Exacerbation, abs. (%)	
<i>S. vestibularis</i>	Isolated	2 (13.3)	36 (43.9)	0.039*
	Not isolated	13 (86.7)	46 (56.1)	
<i>S. oralis</i>	Isolated	6 (40.0)	13 (15.9)	0.042*
	Not isolated	9 (60.0)	69 (84.1)	
<i>R. dentocariosa</i>	Isolated	5 (33.3)	6 (7.4)	0.016*
	Not isolated	10 (66.7)	76 (92.6)	

Note. abs. — absolute number; * — significant differences at p < 0,05.

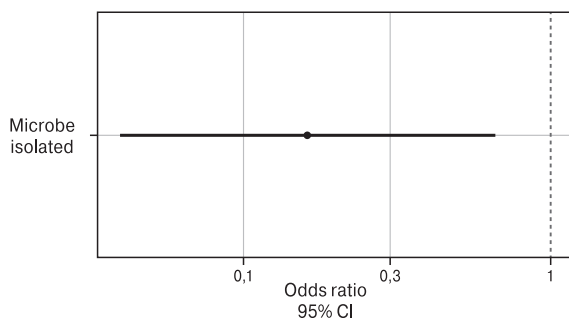


Figure 2. Assessed odds ratio with 95% confidence intervals for isolation of oropharyngeal *R. dentocariosa* as a predictor of emerging AtD exacerbation

from the oropharynx, the chances of AtD exacerbation emergence decreased by 6 times, which is shown in Fig. 2.

For *S. vestibularis*, the observed dependence is described by the equation:

$$P = 1 / (1 + e^{-z}) \times 100\%$$

$$z = 1,07 + 1,6 \times S.v.$$

in which P — possibility of AtD exacerbation, S.v. — isolation of *S. vestibularis* from oropharynx (0 — not isolated, 1 — isolated).

Created regression model is statistically significant ($p = 0.021$). When isolating *S. vestibularis*, the chances of AtD exacerbation emergence, in opposite to *R. dentocariosa*, increased by 5 times, which is shown in Figure 3.

Depending on the isolation of *S. vestibularis* from the oropharynx, a prognostic model has also been developed to determine the possibility of emergence of moderate AtD by binary logistic regression. The observed dependence is described by the equation:

$$P = 1 / (1 + e^{-z}) \times 100\%$$

$$z = 0,39 + 1,73 \times S.v.$$

in which P — possibility of emergence of AtD with moderate severity, S.v. — isolation of *S. vestibularis* from oropharynx (0 — not isolated, 1 — isolated).

Created regression model is statistically significant ($p = 0.004$). In the presence of *S. vestibularis* in the oropharynx, the chances of emergence of AtD

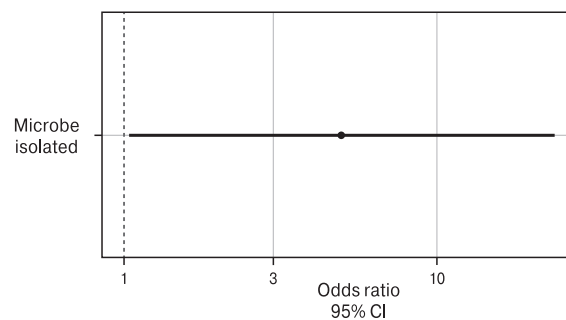


Figure 3. Assessed odds ratio with 95% confidence intervals for isolation of oropharyngeal *S. vestibularis* as a predictor of emerging AtD exacerbation

of moderate severity increased in 5.7 times, which is shown in Table 2.

Discussion

The microbiota of the oropharynx is divided into permanent, additional, and transient groups. As an example, *Streptococcus* spp. is a part of the permanent microbiota; coagulase-negative staphylococci, *Corynebacterium* spp., *Haemophilus influenzae* — additional microbiota (25–50% of people); *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp., *Moraxella* spp., *Micrococcus* spp. represent a transient group (5–20% of people). The main flora of the tonsils consists of such microorganisms as: *Staphylococcus* spp. (44.3%) and *Streptococcus* spp. (40.2%) [9].

The structure of oropharyngeal microbiota depends on the factors of the pathogenicity of the commensals and on the nature of the interaction between microorganisms and biotope, colonized by them. The published studies show that *Staphylococcus* spp. and *Aerococcus* spp. are most likely to increase virulent properties, and that an indifferent process is detected in the microbiota of a healthy human body, when pathogenic commensals are stabilized by the eubiosis of the tonsils of a healthy person [16].

In our study, we identified significant variations in the species composition of the oropharyngeal microbiota. This fact allows us to think about its possible functional connection with the emergence of atopic dermatitis. In addition, the question arises whether changes in the microbiota and pathological processes in AtD are interdependent, or is modified microbiocenosis a consequence of AtD?

Table 2. Features of correlation between *S. vestibularis* isolation and odds for AtD moderate emergence

Predictors	Unadjusted		Adjusted	
	COR; 95% CI	p	AOR; 95% CI	p
Isolation of <i>Streptococcus vestibularis</i> from oropharynx	5.655; 1.493–21.413	0.011*	5.655; 1.493–21.413	0.011*

Note. * — significant predictor's influence ($p \leq 0,05$); CI — confidence interval; Unadjusted — odds ratio is unadjusted; Adjusted — odds ratio is adjusted; COR — crude odds ratio (rough odds ratio), i.e. the odds ratio calculated for one of the factors without taking into account the influence of other factors; AOR — adjusted odds ratio (corrected odds ratio), i.e. odds ratio calculated for one of the factors, taking into account the influence of other factors.

Most of the studies, dedicated to relations between microorganisms and AtD, focus on the skin or intestinal microbiota. The most common theory about the influence of the human microbiome on the emergence of AtD is associated with the dysbiosis in these loci, which in turn leads to the emergence of inflammatory processes. Defects of the skin and intestinal barrier occur, which leads to the leakage of different bacterial toxins and metabolites into the systemic bloodstream. Among these harmful factors there are such as lipopolysaccharides, metabolic products of tryptophan and serotonin, which can cause immunological dysfunctions [23, 31].

Significant number of researches concentrate on *S. aureus*, the number of which increases significantly in the areas of skin lesions during AtD. As a rule, this is associated with a reduced amount of an important structural skin protein — phyllogrin [12, 17]. On the contrary, some authors consider the predominance of *S. aureus* not only as a consequence of AtD. It is believed that its presence may have a direct connection with the emergence of immunological disorders, especially through the induction of synthesis of such factors as IL-31 and IL-33 [11]. Moreover, increased expression of these molecules is not always associated with the death of epithelial cells — it is associated with the direct presence of *S. aureus* at the locus [6]. It is noteworthy that in our study, with an increase in the severity of AtD, the coefficient of constancy of *S. aureus* in the oropharynx decreased on the contrary.

The oropharyngeal locus is often not paid with enough attention from researchers when studying AtD. And this is despite the fact that, on the one hand, the oropharynx is one of the most microbial-populated biotopes in the human body, and on the other hand, individual oropharyngeal microorganisms are very often associated with other immunological (including allergic ones) disorders [14, 21, 30]. Perhaps this is due to the close relationship between the microbiota and the immune system, mediated by colonization of the tonsils. Especially interesting is that tonsils are normally colonized by such clinically important microbes in the context of AtD as *Staphylococcus* spp. and *Streptococcus* spp.

Only individual attempts have been made to assess the biological diversity of oropharyngeal microorganisms in relation to the AtD. In some early studies, there was information about a direct correlation between the cutaneous and oropharyngeal microbiota in patients with AtD [4]. Later, targeted studies were conducted to compare the colonization of tonsils, affected and unaffected skin by *S. aureus*, but the difference in results was almost not analyzed [7]. Beheshti et al. [8] conducted a molecular genetic examination of patients with AtD. However, saliva was used as the material, not

smears or scrapings, and in addition, the study was linked only to the total load of microbial RNAs and a correlation was found only with a large group of bacteria — *Proteobacteria*.

The most interesting correlations with the stages of AtD in our study were found for *Streptococcus* spp. Scientific works, which investigate the skin microbiota, provided information about a decrease in the number of these microorganisms in the species structure in AtD patients [17]. On the contrary, studies of the correlation between the intestinal microbiota and AtD associate the *Streptococcus* spp. with the onset and progression of this disease [18, 26]. In our study, controversial correlations were established for individual microbes from this genus. Summarizing all the information provided, it is possible to indicate a heterogeneous immunological effect of *Streptococcus* spp.

Regarding the effect of *R. dentocariosa* (which in our study was correlated with a more favorable course of the disease) on the emergence of AtD, no scientific publications were found.

Many allergic diseases are characterized by a pathogenetic relation with the microbiota and the presence of certain microbiological predictors. In the context of AtD, this is the above mentioned increase of *S. aureus* in the composition of the skin microbiota. The intestinal microbiota in AtD, in addition to the already described role of *Streptococcus* spp., is characterized by an increased contribution to the species structure from various opportunistic flora (*Parabacteroides* spp., *Clostridium difficile*, *Escherichia coli*) and a decrease in the number of *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp. [1, 15].

The oropharyngeal microbiota so far lacks microorganisms that could definitely be called predictors of AtD, or predictors of exacerbation or remission. Therefore, the patterns identified in our study should be further analyzed, and the search for such correlations should be continued.

Conclusion

Therefore, we have identified significant correlations between the various stages of AtD and the frequency of isolation of individual oropharyngeal microorganisms. Taking into account our data, as well as data on the possible influence of oropharyngeal flora on various immunological processes, we believe that it is necessary to continue work in this direction in order to identify additional microbiological predictors of AtD and its exacerbations. Moreover, studies with a larger studied groups are needed, including a comparison of the microbial diversity between different loci and a deeper analysis of their differences, as well as taking into account various clinical and laboratory parameters, including the level of interleukin expression.

References

1. Гончаров А.Г., Продеус А.П., Шевченко М.А., Мархайчук А.З., Разина А.С., Гончарова Е.А., Маляров А.М., Русина Е.В. Роль микробиоты в патофизиологических механизмах формирования аллергического ринита: обзор // Вестник Балтийского федерального университета им. И. Канта. Серия: Естественные и медицинские науки. 2020. № 3. С. 100–121. [Goncharov A.G., Prodeus A.P., Shevchenko M.A., Markhaichuk A.Z., Razina A.S., Goncharova E.A., Malyarov A.M., Rusina E.V. Role of Microbiota in Pathophysiological Mechanisms of Emergence of Allergic Rhinitis. *Vestnik Baltijskogo Federal'nogo Universiteta im. I. Kanta. Serija: estestvennye i medicinskie nauki = Bulletin of the I. Kant Baltic Federal University. Series: Natural and Medical Sciences*, 2013, no. 3, pp. 100–121. (In Russ.)]
2. Жестков А.В., Лямин А.В., Побежимова О.О. Оценка культурома отделяемого верхних дыхательных путей и содержимого толстой кишки у пациентов с атопическим дерматитом // Вестник современной клинической медицины. 2022. Т. 15, № 1. С. 17–25. [Zhestkov A.V., Lyamin A.V., Pobezhimova O.O. Evaluation of the culturoma of the discharge of the upper respiratory tract and the contents of the colon in patients with atopic dermatitis. *Vestnik sovremennoi klinicheskoi meditsiny = The Bulletin of Contemporary Clinical Medicine*, 2022, vol. 15, no. 1, pp. 17–25. (In Russ.)] doi: 10.20969/VSKM.2022.15(1).17-25
3. Побежимова О.О., Жестков А.В., Сидорова О.С., Кулагина В.В. Особенности иммунопатогенеза атопического дерматита // Российский аллергологический журнал. 2020. Т. 17, № 2. С. 74–80. [Pobezhimova O.O., Zhestkov A.V., Sidorova O.S., Kulagina V.V. Features of immunopathogenesis of atopic dermatitis. *Rossiyskiy allergologicheskij zhurnal = Russian Journal of Allergy*, 2020, vol. 17, no. 2, pp. 74–80. (In Russ.)] doi: 10.36691/RJA1357
4. Репецкая М.Н., Маслов Ю.Н., Шайдуллина Е.В., Бурдина О.М. Микробиоценоз кожи и слизистых при атопическом дерматите у детей // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2014. Т. 91, № 6. С. 112–116. [Repetskaya M.N., Maslov Y.N., Shaidullina E.V., Burdina O.M. Skin and mucous membrane microbiocenosis during atopic dermatitis in children. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2014, vol. 91, no. 6, pp. 112–116. (In Russ.)]
5. Aggor F.E.Y., Bertolini M., Zhou C., Taylor T.C., Abbott D.A., Musgrove J. A gut-oral microbiome-driven axis controls oropharyngeal candidiasis through retinoic acid. *JCI Insight*, 2022, vol. 7, no. 18: e160348. doi: 10.1172/jci.insight.160348
6. Al Kindi A., Williams H., Matsuda K., Alkahtani A.M., Saville C., Bennett H., Alshammari Y., Tan S.Y., O'Neill C., Tanaka A., Matsuda H., Arkwright P.D., Pennock J.L. Staphylococcus aureus second immunoglobulin-binding protein drives atopic dermatitis via IL-33. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2021, vol. 147, no. 4, pp. 1354–1368. doi: 10.1016/j.jaci.2020.09.023
7. Alsterholm M., Strömbeck L., Ljung A., Karami N., Widjestam J., Gillstedt M., Åhren C., Faergemann J. Variation in Staphylococcus aureus colonization in relation to disease severity in adults with atopic dermatitis during a five-month follow-up. *Acta Derm. Venereol.*, 2017, vol. 97, no. 7, pp. 802–807. doi: 10.2340/00015555-2667
8. Beheshti R., Halstead S., McKeone D., Hicks S.D. Understanding immunological origins of atopic dermatitis through multi-omic analysis. *Pediatr. Allergy Immunol.*, 2022, vol. 33, no. 6: e13817. doi: 10.1111/pai.13817
9. Bellussi L.M., Passali F.M., Ralli M., De Vincentiis M., Greco A., Passali D. An overview on upper respiratory tract infections and bacteriotherapy as innovative therapeutic strategy. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, 2019, vol. 23, no. 1, pp. 27–38. doi: 10.26355/eurrev_201903_17345
10. Bertolini M., Costa R.C., Barão V.A.R., Cunha Villar C., Retamal-Valdes B., Feres M., Silva Souza J.G. Oral microorganisms and biofilms: new insights to defeat the main etiologic factor of oral diseases. *Microorganisms*, 2022, vol. 10, no. 12: 2413. doi: 10.3390/microorganisms10122413
11. Bonzano L., Borgia F., Casella R., Miniello A., Nettis E., Gangemi S. Microbiota and IL-33/31 axis linkage: implications and therapeutic perspectives in atopic dermatitis and psoriasis. *Biomolecules*, 2023, vol. 13, no. 7: 1100. doi: 10.3390/biom13071100
12. Edslev S.M., Agner T., Andersen P.S. Skin microbiome in atopic dermatitis. *Acta Derm. Venereol.*, 2020, vol. 100, no. 12: adv00164. doi: 10.2340/00015555-3514
13. Facheris P., Jeffery J., Del Duca E., Guttman-Yassky E. The translational revolution in atopic dermatitis: the paradigm shift from pathogenesis to treatment. *Cell. Mol. Immunol.*, 2023, vol. 20, no. 5, pp. 448–474. doi: 10.1038/s41423-023-00992-4
14. Fadlallah J., El Kafsi H., Sterlin D., Juste C., Parizot C., Dorgham K., Autaa G., Gouas D., Almeida M., Lepage P., Pons N., Le Chatelier E., Levenez F., Kennedy S., Galleron N., de Barros J.P., Malphettes M., Galicier L., Boutboul D., Mathian A., Miyara M., Oksenhendler E., Amoura Z., Doré J., Fieschi C., Ehrlich S.D., Larsen M., Gorochov G. Microbial ecology perturbation in human IgA deficiency. *Sci. Transl. Med.*, 2018, vol. 10, no. 439: eaan1217. doi: 10.1126/scitranslmed.aan1217
15. Fang Z., Li L., Zhang H., Zhao J., Lu W., Chen W. Gut Microbiota, probiotics, and their interactions in prevention and treatment of atopic dermatitis: a review. *Front. Immunol.*, 2021, no. 12: 720393. doi: 10.3389/fimmu.2021.720393
16. Hanson B.M., Kates A.E., O'Malley S.M., Mills E., Herwaldt L.A., Torner J.C., Dawson J.D., Farina S.A., Klostermann C., Wu J.Y., Quick M.K., Forshey B.M., Smith T.C. Staphylococcus aureus in the nose and throat of Iowan families. *Epidemiol. Infect.*, 2018, vol. 146, no. 14, pp. 1777–1784. doi: 10.1017/S0950268818001644
17. Hrestak D., Matijašić M., Čipčić Paljetak H., Ledić Drvar D., Ljubojević Hadžavdić S., Perić M. Skin Microbiota in Atopic Dermatitis. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, vol. 23, no. 7: 3503. doi: 10.3390/ijms23073503
18. Kang M.J., Lee S.Y., Park Y.M., Kim B.S., Lee M.J., Kim J.H., Jeong S., Lee S.H., Park M.J., Rhee E.S., Jung S., Yoon J., Cho H.J., Lee E., Yang S.I., Suh D.I., Kim K.W., Sheen Y.H., Ahn K., Hong S.J. Interactions Between IL-17 Variants and Streptococcus in the Gut Contribute to the Development of Atopic Dermatitis in Infancy. *Allergy Asthma Immunol. Res.*, 2021, vol. 13, no. 3, pp. 404–419. doi: 10.4168/air.2021.13.3.404
19. Katoh N., Ohya Y., Ikeda M., Ebihara T., Katayama I., Saeki H., Shimojo N., Tanaka A., Nakahara T., Nagao M., Hide M., Fujita Y., Fujisawa T., Futamura M., Masuda K., Murota H., Yamamoto-Hanada K.; Committee for Clinical Practice Guidelines for the Management of Atopic Dermatitis 2018, The Japanese Society of Allergology, The Japanese Dermatology Association. Japanese guidelines for atopic dermatitis 2020. *Allergol. Int.*, 2020, vol. 69, no. 3, pp. 356–369. doi: 10.1016/j.alit.2020.02.006

20. Laughter M.R., Maymone M.B.C., Mashayekhi S., Arents B.W.M., Karimkhani C., Langan S.M., Dellavalle R.P., Flohr C. The global burden of atopic dermatitis: lessons from the Global Burden of Disease Study 1990–2017. *Br. J. Dermatol.*, 2021, vol. 184, no. 2, pp. 304–309. doi: 10.1111/bjd.19580
21. Losol P., Park H.S., Song W.J., Hwang Y.K., Kim S.H., Holloway J.W., Chang Y.S. Association of upper airway bacterial microbiota and asthma: systematic review. *Asia Pac. Allergy*, 2022, vol. 12, no. 3: e32. doi: 10.5415/apallergy.2022.12.e32
22. Makowska K., Nowaczyk J., Blicharz L., Wałkiel-Burnat A., Czuwara J., Olszewska M., Rudnicka L. Immunopathogenesis of Atopic Dermatitis: Focus on Interleukins as Disease Drivers and Therapeutic Targets for Novel Treatments. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, vol. 24, no. 1: 781. doi: 10.3390/ijms24010781
23. Mohammad S., Karim M.R., Iqbal S., Lee J.H., Mathiyalagan R., Kim Y.J., Yang D.U., Yang D.C. Atopic dermatitis: Pathophysiology, microbiota, and metabolome — a comprehensive review. *Microbiol. Res.*, 2024, no. 281: 127595. doi: 10.1016/j.micres.2023.127595
24. Nakashima C., Yanagihara S., Otsuka A. Innovation in the treatment of atopic dermatitis: emerging topical and oral Janus kinase inhibitors. *Allergol. Int.*, 2022, vol. 71, no. 1, pp. 40–46. doi: 10.1016/j.alit.2021.10.004
25. Okereke I.C., Miller A.L., Hamilton C.F., Booth A.L., Reep G.L., Andersen C.L., Reynolds S.T., Pyles R.B. Microbiota of the oropharynx and endoscope compared to the esophagus. *Sci. Rep.*, 2019, vol. 9, no. 1: 10201. doi: 10.1038/s41598-019-46747-y
26. Park Y.M., Lee S.Y., Kang M.J., Kim B.S., Lee M.J., Jung S.S., Yoon J.S., Cho H.J., Lee E., Yang S.I., Seo J.H., Kim H.B., Suh D.I., Shin Y.H., Kim K.W., Ahn K., Hong S.J. Imbalance of gut Streptococcus, Clostridium, and Akkermansia determines the natural course of atopic dermatitis in infant. *Allergy Asthma Immunol. Res.*, 2020, vol. 12, no. 2, pp. 322–337. doi: 10.4168/aaair.2020.12.2.322
27. Pothmann A., Illing T., Wiegand C., Hartmann A.A., Elsner P. The microbiome and atopic dermatitis: a review. *Am. J. Clin. Dermatol.*, 2019, vol. 20, no. 6, pp. 749–761. doi: 10.1007/s40257-019-00467-1
28. Santamaria-Babi L.F. Atopic dermatitis pathogenesis: lessons from immunology. *Dermatol. Pract. Concept.*, 2022, vol. 12, no. 1: e2022152. doi: 10.5826/dpc.1201a152
29. Schuler CF 4th, Billi A.C., Maverakis E., Tsoi L.C., Gudjonsson J.E. Novel insights into atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2023, vol. 151, no. 5, pp. 1145–1154. doi: 10.1016/j.jaci.2022.10.023
30. Thorsen J., Stokholm J., Rasmussen M.A., Roggenbuck-Wedemeyer M., Vissing N.H., Mortensen M.S., Breyndrod A.D., Fleming L., Bush A., Roberts G., Singer F., Frey U., Hedlin G., Nordlund B., Murray C.S., Abdel-Aziz M.I., Hashimoto S., van Aalderen W., Maitland-van der Zee A.H., Shaw D., Fowler S.J., Sousa A., Sterk P.J., Chung K.F., Adcock I.M., Djukanovic R., Auffray C., Bansal A.T., Wagers S., Chawes B., Bønnelykke K., Sørensen S.J., Bisgaard H. Asthma and wheeze severity and the oropharyngeal microbiota in children and adolescents. *Ann. Am. Thorac. Soc.*, 2022, vol. 19, no. 12, pp. 2031–2043. doi: 10.1513/AnnalsATS.202110-1152OC
31. Xue Y., Zhang L., Chen Y., Wang H., Xie J. Gut microbiota and atopic dermatitis: a two-sample Mendelian randomization study. *Front. Med.*, 2023, no. 10: 1174331. doi: 10.3389/fmed.2023.1174331
32. Yang W., Dong H.P., Wang P., Xu Z.G., Xian J., Chen J., Wu H., Lou Y., Lin D., Zhong B. IL-36γ and IL-36Ra reciprocally regulate colon inflammation and tumorigenesis by modulating the cell-matrix adhesion network and wnt signaling. *Adv. Sci. (Weinh.)*, 2022, vol. 9, no. 10: e2103035. doi: 10.1002/advs.202103035

Авторы:

Побезимова О.О., старший лаборант кафедры общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава РФ, г. Самара, Россия;
Жестков А.В., заслуженный деятель науки РФ, д.м.н., профессор, зав. кафедрой общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава РФ, г. Самара, Россия;
Лямин А.В., д.м.н., доцент, профессор кафедры общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия;
Решетникова В.П., к.м.н., доцент, доцент кафедры общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия;
Ерещенко А.А., к.м.н., ассистент кафедры фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой СамГМУ, г. Самара, Россия
Алексеев Д.В., студент Института клинической медицины ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия.

Authors:

Pobezhimova O.O., Senior Laboratory Technician, Department of General and Clinical Microbiology, Immunology and Allergology, Samara State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Samara, Russian Federation;
Zhestkov A.V., Honored Worker of Science of the Russian Federation, DSc (Medicine), Professor, Head of the Department of General and Clinical Microbiology, Immunology and Allergology, Samara State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Samara, Russian Federation;
Lyamin A.V., DSc (Medicine), Associate Professor, Professor of the Department of General and Clinical Microbiology, Immunology and Allergology, Samara State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Samara, Russian Federation;
Reshetnikova V.P., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of General and Clinical Microbiology, Immunology and Allergology, Samara State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Samara, Russian Federation;
Ereshchenko A.A., PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Fundamental and Clinical Biochemistry with Laboratory Diagnostics, Samara State Medical University, 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.

ОСОБЕННОСТИ ГЕНОВ ГЕМАГГЛЮТИНИНА ВИРУСОВ ГРИППА И ВОЗМОЖНОСТИ ИХ РЕКОДИРОВАНИЯ

Е.П. Харченко

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

Резюме. Мир уже вступил в стадию возрастания вероятности возникновения новой пандемии, что побуждает к поиску новых вакцин против гриппа, поскольку эффективность существующих к нему вакцин лишь субоптимальная. С пандемией COVID-19 открылась возможность использования мРНК-вакцин, и перспектива поиска новых противогриппозных вакцин на основе мРНК гена гемагглютинаина (НА) представляется весьма привлекательной. Как правило, мРНК-вакцина является продуктом рекодирования, обеспечивающего стабильность мРНК. Однако результаты рекодирования мРНК бывают неоднозначными. Цель данного сообщения — проанализировать особенности генов и белков НА и рассмотреть возможности и ограничения их рекодирования. Источником первичных структур белков НА и их генов служили общедоступные в Интернете базы данных. Определяли аминокислотный состав и частоту дипептидов, нуклеотидный и динуклеотидный составы, %GC, трансляционный код и составы соседствующих ди- и трикодонов, распределение по первичной структуре НА явных и синонимических мутаций. Подтипы H1N1 и H3N2 имеют в их НА генах как частные, так и общие особенности (ограничения), различаясь не только по числу замен в самом белке, но и по числу и распределению синонимических кодонов в гене, не проявляющихся в первичной структуре самого белка НА, но выступающих, по-видимому, как скрытый фактор, обуславливающий низкую эффективность классических противогриппозных вакцин. Выявление нескольких ограничений в структуре генов НА предполагает, что любая ее модификация (в любом гене) должна не противоречить каждому из ограничений, установленных природой. Частота динуклеотидов CpG у всех исследованных штаммов низкая, но возможность оптимизации ее у штаммов H1N1 из-за запрета квартета в гене НА кодонов, кодирующих аргинин, особенно ограничена и может быть реализована через синонимические кодоны других аминокислот (аланина, пролина, треонина или серина). По сравнению с подтипом H1N1 у подтипа H3N2 можно предвидеть больше возможностей в конструировании стабильной мРНК гена НА.

Ключевые слова: вирус гриппа, ген гемагглютинаина, особенности структуры, рекодирование, мРНК, вакцины.

FEATURES OF INFLUENZA VIRUS HEMAGGLUTININ GENES AND THEIR RECODING POSSIBILITIES

Kharchenko E.P.

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

Abstract. The world has already entered the stage of increasing odds for a new pandemic, which prompts to seek out for new flu vaccines, because existing vaccines demonstrate only suboptimal effectiveness. With the COVID-19 pandemic,

Адрес для переписки:

Харченко Евгений Петрович
194223, Россия, Санкт-Петербург, пр. Мориса Тореза, 44,
ИЭФБ им. И.М. Сеченова РАН.
Тел.: 8 904 338-22-80 (моб.).
E-mail: neuro.children@mail.ru

Contacts:

Eugene P. Kharchenko
194223, Russian Federation, St. Petersburg, Toreza pr., 44,
Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry.
Phone: +7 904 338-22-80 (mobile).
E-mail: neuro.children@mail.ru

Для цитирования:

Харченко Е.П. Особенности генов гемагглютинаина вирусов гриппа и возможности их рекодирования // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 4. С. 709–718. doi: 10.15789/2220-7619-FOA-17578

Citation:

Kharchenko E.P. Features of influenza virus hemagglutinin genes and their recoding possibilities // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 4, pp. 709–718. doi: 10.15789/2220-7619-FOA-17578

the possibility of using mRNA vaccines has been opened up, and a prospect of finding hemagglutinin (HA) gene mRNA-based new influenza vaccines seems very attractive. As a rule, the mRNA vaccine is a product of recoding, which ensures the mRNA stability. However, the results of mRNA recoding can be ambiguous. The purpose of this report is to analyze the features of genes and proteins and to consider opportunities and limitations in their recoding. Primary structures of NA proteins and relevant genes were retrieved from Internet publicly available databases. The amino acid composition and frequency of dipeptides, nucleotide and dinucleotide compositions, %GC, translational code and compositions of neighboring di- and tricodones, distribution along primary structure for explicit and synonymous mutations were determined. H1N1 and H3N2 subtypes have both specific and general features (limitations) in their genes, differing not only in the number of protein substitutions, but also in the number and distribution of gene synonymous codons, which do not manifest in the protein primary structure, but appear, apparently, as a hidden factor, which causes the low effectiveness of classical influenza vaccines. The identification of several limitations in gene structure suggests that its any modification (in any gene) must not contradict each of the restrictions established by nature. The frequency of CpG dinucleotides in all studied strains is low, but a potential for optimizing it in H1N1 strains due to the prohibition of the quartet in the gene for arginine-encoding codons is especially limited and can be implemented through synonymous codons of other amino acids (alanine, proline, threonine or serine). Compared to the H1N1 subtype, the H3N2 subtype can be expected to have more possibilities in constructing stable NA gene mRNA.

Key words: *influenza virus, hemagglutinin gene, structural features, recoding, mRNA, vaccine.*

Введение

Пандемии гриппа возникают с интервалом 10–40 лет, и с 2020 года мир уже вступил в стадию возрастания вероятности возникновения новой пандемии, что побуждает к поиску против нее новых вакцин. Призыв к переосмыслению подходов к разработке вакцин против вирусов, вызывающих респираторные инфекции, представляется своевременным, поскольку эффективность существующих к ним вакцин лишь субоптимальная [11].

Стремительно развивающаяся синтетическая биология открыла возможности быстрого конструирования новых генов и их продуктов [12]. С пандемией COVID-19 прояснилась перспектива использования для иммунизации мРНК-вакцин [3, 7]. В распространении вирусов гриппа и в формировании популяционного иммунитета к ним роль гемагглютинина (HA) является определяющей. Можно предположить, что применительно к гриппу мРНК-вакцины на основе HA могут иметь превосходство над классическими вакцинами прежде всего в том, что мРНК-вакцина как носитель информации о вирусе позволяет избавиться от антигенного груза других белков вируса, не вовлеченных в формирование иммунитета к нему, ограничивая ее состав (в минимальном варианте) 4 молекулами мРНК HA, представляющими 4 разных подтипа вирусов гриппа, рекомендуемых ВОЗ для изготовления классических вакцин из цельных вирионов. В этом аспекте перспектива поиск новых противогриппозных вакцин на основе мРНК HA представляется весьма рациональной.

Как правило, мРНК-вакцина является продуктом рекодирования отдельного гена либо генома, например вируса, подвергнутого разным модификациям, обеспечивающим стабиль-

ность мРНК [9, 10, 13, 14]. Ныне признано, что мРНК не только задает первичную структуру белка, но и содержит в себе регуляторный код. О наличии последнего свидетельствуют возможности изменения синонимическими мутациями стабильности мРНК и ее вторичной структуры, эффективности трансляции, локализации и сплайсинга мРНК и котрансляционного свертывания белка [6, 8].

Успех в новом поиске противогриппозных вакцин на основе мРНК HA определяется прежде всего знанием особенностей кодирования ген HA и допустимыми возможностями его рекодирования. Цель данного сообщения — проанализировать особенности генов HA и рассмотреть возможности и ограничения их рекодирования.

Материалы и методы

Для сравнительного компьютерного анализа были использованы пандемические штаммы H1N1 A/Brevig Mission/1/18, H1N1 A/California/08/2009, H2N2 A/Japan/305/1957 и H3N2 A/Aichi/2/1968 и произвольно выбранные циркулирующие в эпидсезоне 2023–2024 гг. штаммы H1N1 A/New_Jersey/56/2023 и H1N1 A/Berlin/34/2023. Источником первичных структур HA и их генов служили общедоступные в Интернете базы данных (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, <http://platform.gisaid.org>, <http://viralzone.expasy.org>).

52 гена белков человека, разных как по длине, так и по функциям (от гистона H4 до титина) были использованы для выявления редких дикодонов в первичных структурах генов. Их общая длина составила более 300 000 нуклеотидов. Источником первичных структур генов и белков служила общедоступная в Интернете база данных (<http://www.nextprot.org>). В них

определяли аминокислотный состав и частоту дипептидов, нуклеотидный и динуклеотидный составы, %GC, трансляционный код и составы соседствующих ди- и трикодонов, распределение по первичной структуре НА явных и синонимических мутаций

Для выявления ограничений в кодировании генов были построены также линейные последовательности оцифрованных трикодонов, считанных (имитируя процесс трансляции на рибосомах) со сдвигом рамки на один кодон [2]. Их числовым показателем служил индекс комплементарности (ИК) — сумма водородных связей, которые способны образовывать составляющие их кодоны с тРНК. ИК отдельных кодонов приведены в таблице генетического кода (рис. 1). Были подсчитаны частоты встречаемости разницы между ИК соседствующих трикодонов/кодонов для каждого гена (табл.).

В статье используется международный код аминокислот: А — аланин, С — цистеин, D — аспарагиновая кислота, Е — глутаминовая кислота, F — фенилаланин, G — глицин, H — гистидин, I — изолейцин, K — лизин, L — лейцин, M — метионин, N — аспарагин, P — пролин, Q — глутамин, R — аргинин, S — серин, T — треонин, V — валин, W — триптофан, Y — тирозин. Для обозначения нуклеиновых оснований используется следующая аббревиатура: А — аденин, G — гуанин, С — цитозин, Т — тимин.

Результаты

Чаще всего при рекодировании вирусов или их генов применяют оптимизацию и деоптимизацию частот кодонов и их пар и динуклеотидов CpG и UpA, модификации нуклеотидов [6, 10]. Поиски противогриппозных вакцин до последнего времени не учитывали роль синонимических мутаций в гене НА. Поэтому в этом разделе приводятся данные расширенного анализа, используемые при рекодировании генов.

Специфика кодирования генов НА у вирусов гриппа разных подтипов проявляется прежде

TCT S 7	TGT C 7	TTT F 6	TAT Y 6
TCC S 8	TGC C 8	TTC F 7	TAC Y 7
TCA S 7	TGA Z 0	TTA L 6	TAA Z 0
TCG S 8	TGG W 8	TTG L 7	TAG Z 0
ACT T 7	AGT S 7	ATT I 6	AAT N 6
ACC T 8	AGC S 8	ATC I 7	AAC N 7
ACA T 7	AGA R 7	ATA I 6	AAA K 6
ACG T 8	AGG R 8	ATG M 7	AAG K 7
CCT P 8	CGT R 8	CTT L 7	CAT H 7
CCC P 9	CGC R 9	CTC L 8	CAC H 8
CCA P 8	CGA R 8	CTA L 7	CAA Q 7
CCG P 9	CGG R 9	CTG L 8	CAG Q 8
GCT A 8	GGT G 8	GTT V 7	GAT D 7
GCC A 9	GGC G 9	GTC V 8	GAC D 8
GCA A 8	GGA G 8	GTA V 7	GAА E 7
GCG A 9	GGG G 9	GTG V 8	GAG E 8

Рисунок 1. Таблица генетического кода с приведенными значениями индексов комплементарности кодонов

Figure 1. Table of the genetic code with the given values of the codon complementarity indices

всего по их составу динуклеотидов. На рис. 2 представлены данные по их частотам у штаммов, вызвавших 4 последние пандемии гриппа.

Их выраженные различия практически по всем динуклеотидам предполагают применение разных подходов модификации их мРНК при рекодировании с целью использования в качестве противогриппозных вакцин

Следующим важным источником информации об особенностях кодирования генов НА служит его трансляционный код, позволяющий выявить уровень использования разных синонимических кодонов (СК), и он оказывается особенным у вирусов подтипа H1N1 тем, что из него исключен квартет кодонов CGC, CGT, CGA и CGG, кодирующих аргинин. Последний кодируются в НА лишь двумя оставшимися кодонами AGA и AGG. Примечательно, что этот запрет на квартет кодонов аргинина в гене НА сохраняется, по крайней мере, с 1918 г. и не рас-

Таблица. Различия трикодонов, считываемых со сдвигом на один шаг, по их ИК

Table. Differences of tricodons, read with a shift of one step, according to their complementarity indices

Источник гена гемагглютинаина вирусов гриппа A source of the hemagglutinin gene of influenza viruses	%GC гена %GC of the gene	Длина гена в кодонах The length of the gene in codons	Частота встречаемости разницы последовательных трикодонов по ИК Frequency of occurrence of the difference of successive tricodons in CI			
			Значения разницы Difference values			
			0	1	2	3
HA H1N1 A/Brevig Mission/1/1918	42	566	186	279	105	10
HA H2N2 A/JAPAN/305/1957	42	562	187	280	98	11
HA H3N2 A/AICHI/2/1968	45	566	223	243	105	9
HA H1N1 A/California/04/2009	41	566	207	267	94	12

H1N1 A/SouthCarolina/1/1918				H2N2 A/JAPAN/305/1957				H3N2 A/AICHI/2/1968				H1N1 A/California/04/2009							
A	G	T	C	A	G	T	C	A	G	T	C	A	G	T	C				
A	199	124	156	98	A	197	130	151	93	A	180	120	128	110	A	218	128	150	105
G	142	104	79	68	G	159	115	78	59	G	136	118	71	82	G	127	104	79	66
T	99	128	92	90	T	77	142	96	87	T	73	130	108	93	T	109	117	100	81
C	137	37	82	65	C	138	24	77	65	C	149	39	97	66	C	147	27	78	64

Рисунок 2. Состав динуклеотидов в генах НА пандемических штаммов вирусов гриппа
 Figure 2. The composition of dinucleotides in the genes of pandemic strains of influenza viruses

пространяется на другие белки вируса подтипа H1N1, а в гене НА вирусов подтипа H3N2 у разных штаммов не используется лишь 1 или 2 кодона из упомянутого квартета кодонов аргинина, чаще всего кодоны CGC и CGT (рис. 3).

Хотя по использованию СК гены НА A/Brevig Mission/1/18 и A/California/08/2009 существенно отличаются, общим для них является наиболее редкое использование кодонов, содержащих преимущественно G и C, и наиболее высокая частота (для большинства аминокислот) кодонов, содержащих A и T, что обуславливает низкое значение %GC в генах НА — 41–42%. Расширяет и уточняет описание особенностей кодирования генов встречаемость в них дикодонов. Из-за различий в использовании СК каждому штамму вируса одного подтипа (даже при идентичности первичной структуры белка НА) свойственна своя картина дикодонов. В качестве иллюстрации наличия ограничений в кодировании генов НА на рис. 4 представлена встречаемость дикодонов в гене НА пандемического штамма НА H1N1 A/Brevig Mission/1/1918. Заметим, что при наличии 61 смыслового кодона в генетическом коде минимальная длина гена белка, которая могла бы охватывать хотя бы по одному разу соседствование всех кодонов в дикодонах, должна составлять 3721 кодон. Длина же гена НА составляет всего 564 кодона, поэтому большинство возмож-

ных дикодонов на рис. 4 отсутствуют. Рис. 4 позволяет уточнить численность и состав дикодонов (а также и дипептидов) по первой или второй позициям. Из 564 возможных разных дикодонов для гена НА использованными оказались лишь 490 дикодонов, и из них 426 встречаются только один раз, что свидетельствует, с одной стороны, об ограничениях (уникальности) в соседствовании кодонов и, с другой стороны, о предпочтении у значительно меньшего числа кодонов находиться в соседстве с одним и тем же кодоном для одних и тех же дипептидов. Повторяемость дикодонов не более 3.

Для выяснения, используются ли в генах НА редкие дикодоны, приняв за последние те, что редко встречаются в генах человека, был первоначально выполнен поиск редко встречающихся дикодонов в генах человека. Выявлены 2 их группы (рис. 5). Одна из них включает очень редко встречающиеся дикодоны. Другая охватывает дикодоны, которые отсутствовали в исследованных генах человека. Ни один из дикодонов обеих групп не был выявлен в исследованных генах НА вирусов гриппа.

В природе НА вирусов гриппа относятся к числу наиболее изменчивых, поэтому проведен анализ первичной структуры их генов на существование ограничений в их кодировании. Оцифровка кодонов обозначила возможность

H1N1 A/Brevig Mission/1/1918										H1N1 A/California/04/2009													
TCT	S	7	TGT	C	10	TTT	F	9	TAT	Y	17	TCT	S	8	TGT	C	9	TTT	F	8	TAT	Y	13
TCC	S	6	TGC	C	6	TTC	F	10	TAC	Y	9	TCC	S	4	TGC	C	6	TTC	F	11	TAC	Y	14
TCA	S	16	TGA	Z	1	TTA	L	11	TAA	Z	0	TCA	S	18	TGA	Z	0	TTA	L	5	TAA	Z	1
TCG	S	3	TGG	W	11	TTG	L	9	TAG	Z	0	TCG	S	1	TGG	W	10	TTG	L	10	TAG	Z	0
ACT	T	7	AGT	S	6	ATT	I	10	AAT	N	26	ACT	T	9	AGT	S	7	ATT	I	18	AAT	N	27
ACC	T	8	AGC	S	11	ATC	I	8	AAC	N	16	ACC	T	2	AGC	S	9	ATC	I	7	AAC	N	14
ACA	T	20	AGA	R	12	ATA	I	14	AAA	K	21	ACA	T	23	AGA	R	14	ATA	I	12	AAA	K	27
ACG	T	2	AGG	R	8	ATG	M	8	AAG	K	12	ACG	T	3	AGG	R	4	ATG	M	7	AAG	K	15
CCT	P	2	CGT	R	0	CTT	L	2	CAT	H	10	CCT	P	2	CGT	R	0	CTT	L	1	CAT	H	8
CCC	P	5	CGC	R	0	CTC	L	6	CAC	H	3	CCC	P	4	CGC	R	0	CTC	L	5	CAC	H	7
CCA	P	9	CGA	R	0	CTA	L	9	CAA	Q	10	CCA	P	9	CGA	R	0	CTA	L	15	CAA	Q	7
CCG	P	3	CGG	R	0	CTG	L	14	CAG	Q	7	CCG	P	5	CGG	R	0	CTG	L	10	CAG	Q	8
GCT	A	6	GGT	G	10	GTT	V	5	GAT	D	15	GCT	A	5	GGT	G	9	GTT	V	7	GAT	D	13
GCC	A	7	GGC	G	2	GTC	V	9	GAC	D	10	GCC	A	9	GGC	G	4	GTC	V	5	GAC	D	13
GCA	A	18	GGA	G	22	GTA	V	9	GAA	E	26	GCA	A	17	GGA	G	13	GTA	V	17	GAA	E	24
GCG	A	6	GGG	G	10	GTG	V	9	GAG	E	9	GCG	A	2	GGG	G	14	GTG	V	7	GAG	E	11

Рисунок 3. Таблица трансляционного кода НА штаммов H1N1 A/Brevig Mission/1/1918 и A/California/04/2009

Figure 3. Translation code table for H1N1 strains A/Brevig Mission/1/1918 and A/California/04/2009

А (А)	Б (В)
TCC(S)–GGT(G)	TCC(S)–TCA(S)
TCG(S)–TCC(S)	TCG(S)–TCG(S)
TCG(S)–CTC(L)	TCG(S)–TAC(Y)
TCG(S)–ACA(T)	TCG(S)–CGT(R)
TCG(S)–AGA(R)	TCG(S)–CGC(R)
TCG(S)–ATT(I)	TCG(S)–ATA(I)
TCG(S)–GGT(G)	TCG(S)–CAA(Q)
AGT(S)–CAT(H)	TGC(C)–GCG(A)
AGC(S)–GTA(V)	CTC(L)–GCG(A)
TGT(C)–GCG(A)	CTA(L)–TCG(S)
TGC(C)–GGA(G)	CTA(L)–CGG(R)
TTA(L)–CGC(R)	CTA(L)–CCG(P)
CTC(L)–GTA(V)	CTA(L)–GCG(A)
CTC(L)–GAA(E)	CGT(R)–AGC(S)
ACG(T)–CGT(R)	CGT(R)–ACG(T)
ACG(T)–ATA(I)	CGT(R)–CCG(P)
CGT(R)–TCG(S)	CGC(R)–GTA(V)
CGT(R)–CTA(L)	CCG(P)–TCG(S)
CGT(R)–CGC(R)	CCG(P)–CGA(R)
CGT(R)–GCG(A)	CAC(H)–TCG(S)
CGC(R)–CCG(P)	GCG(A)–CGA(R)
CGC(R)–CAT(H)	GCG(A)–ATA(I)
CGC(R)–GCG(A)	GGT(G)–ACG(T)
CGC(R)–GGA(G)	GGT(G)–CCG(P)
CGA(R)–TCG(S)	
CGA(R)–GCG(A)	
CGG(R)–TTA(L)	
CGG(R)–GCG(A)	
ATA(I)–TCG(S)	
ATA(I)–CGG(R)	
CCG(P)–CAC(H)	
CAA(Q)–CGC(R)	
GCG(A)–CGT(R)	
GCG(A)–ATG(M)	
GTA(V)–ACG(T)	

Рисунок 5. Список редко встречающихся (А) и не обнаруженных (Б) в исследованных генах человека дикодонов

Figure 5. List of rare (A) and undetected (B) dicodons in the studied human genes

23, 23, 22, 22, 23, 23, 21, 20, 21, 21, 22, 22, 23, 21, 21, 22, 23, 21, 20, 19, 22, 22, 23, 23, 22, 22, 20, 22, 23, 23, 22, 22, 22, 22, 20, 21, 22, 24, 23, 23, 22, 22, 21, 22, 23, 23, 23, 23, 24, 23, 23, 21, 21, 20, 20, 19, 18, 20, 20, 23, 23, 23, 21, 20, 23, 22, 22, 19, 20, 22, 24, 25, 24, 23, 23, 22, 24, 23, 24, 22, 21, 21, 22, 23, 24, 24, 24, 23, 23, 22, 20, 19, 20, 21, 22, 22, 22, 22, 21, 22, 21, 22, 21, 22, 23, 23, 22, 21, 22, 21, 21, 20, 22, 23, 24, 23, 22, 22, 22, 23, 22, 23, 21, 21, 19, 20, 20, 19, 21, 22, 23, 22, 23, 24, 25, 23, 22, 20, 21, 22, 21, 22, 21, 23, 23, 24, 24, 24, 22, 23, 23, 25, 24, 23, 21, 20, 20, 20, 20, 21, 23, 24, 23, 22, 21, 22, 23, 23, 22, 22, 22, 22, 22, 22, 22, 22, 22, 23, 21, 22, 21, 21, 19, 21, 21, 22, 21, 22, 22, 23, 23, 22, 21, 23, 24, 25, 24, 23, 22, 21, 22, 20, 22, 21, 23, 21, 22, 21, 22, 23, 23, 20, 19, 19, 21, 22, 22, 22, 24, 24, 22, 21, 23, 24, 25, 22, 22, 20, 21, 21, 22, 24, 25, 24, 22, 20, 20, 21, 22, 21, 20, 20, 23, 24, 25, 23, 21, 20, 19, 21, 22, 23, 23, 21, 21, 19, 21, 22, 24, 22, 22, 21, 23, 23, 22, 21, 21, 22, 23, 23, 24, 23, 22, 21, 21, 22, 23, 24, 24, 23, 22, 21, 21, 22, 22, 21, 21, 22, 22, 21, 21, 22, 22, 21, 21, 22, 22, 21, 21, 22, 22, 21, 21, 22, 22, 21, 21, 22, 22, 21, 21, 22, 22, 21, 21, 22, 22, 21, 21, 21, 21, 21, 21, 21, 21, 20, 20, 21, 23, 22, 20, 19, 20, 21, 23, 24, 23, 22, 20, 22, 23, 24, 23, 21, 21, 22, 24, 24, 23, 21, 22, 23, 22, 22, 22, 24, 25, 25, 24, 23, 22, 23, 22, 22, 21, 20, 22, 22, 23, 22, 23, 23, 21, 21, 20, 21, 22

Рисунок 6. Последовательность значений индексов комплементарности трикодонов НА штамма H1N1 A/Brevig Mission/1/1918 при сдвиге рамки считывания на 1 кодон

Figure 6. The sequence of values of the tricondon complementarity indices of the H1N1 A/Brevig Mission/1/1918 HA gene when the reading frame is shifted by 1 codon

штаммов. У генов НА пандемических штаммов вирусов гриппа не более 2,1% соседствующих пар трикодонов (табл.) ИК имеют разницу 3, а разницу по ИК 0 или 1 имеют 82–84% соседствующих трикодонов, то есть даже разница между ИК, равной 2, в генах НА не предпочтительна. Следует специально оговорить, что при свойственной ГК композиции выявленные общие ограничения в кодировании генов, благодаря вырожденности генетического кода, не ведут к запретам соседствования аминокислот в первичной структуре белков.

В качестве иллюстрации, что каждый штамм вирусов гриппа уникален хотя бы по распределению в его НА гене СК, для сравнения были выбраны две пары штаммов. Одна из них включает пандемические штаммы A/Brevig Mission/1/1918 и A/California/04/2009, разделенные по времени возникновения более чем в 90 лет, другая пара — два штамма подтипа H1N1, выделенные в ноябре 2023 г. Сравнение первичных структур белков и генов пандемических штаммов 1918 г. и 2009 г. выявил, что белки НА A/California/04/2009 отличается от НА A/South Carolina/1/1918 по 79 позициям, которым сопутствуют различия по 191 СК. На рис. 7 представлен фрагмент последовательностей белков и генов НА обоих штаммов со специальной пометкой (*) позиций, различающихся по СК. Очень примечательна весьма частая сблоченность последних и чередование их с мутациями, вызвавшими замены аминокислот. Два штамма H1N1 эпидсезона 2023/2024 гг. естественно имели более скромные различия их первичных структур белков НА (всего по 14 позициям) и более вы-

сокий показатель, как и в случае НА пандемических штаммов, по СК их генов — 21. Столь высокое преобладание синонимических замен и особенности их локализации возможно связаны с «выравниванием» разницы по ИК между соседствующими кодонами, позволяющим закрепить в структуре гена тем мутациям, что привели к замещениям аминокислот.

Обсуждение

Данные выполненного нами анализа свидетельствуют о наличии у генов НА вирусов гриппа разных подтипов как частных, так и общих особенностей (ограничений), которые необходимо учитывать при их рекодировании, имея в виду, что и штаммы одного подтипа в пределах эпидсезона могут иметь различия НА не только по числу замен в самом белке, которые могут затрагивать до 30–40 позиций, но и еще большие различия по числу и распределению СК в гене, не проявляющиеся в первичной структуре самого белка НА и выступающие, по-видимому, как скрытый фактор, обуславливающий низкую эффективность классических противогриппозных вакцин.

По динуклеотидам различия между генами НА выражены не только между подтипами, но и для штаммов одного и того же подтипа, выделенных в разное время. При рекодировании оптимизация и деоптимизация частот динуклеотидов по CpG и UpA проводится посредством введения в ген СК [6, 10]. Частота CpG у всех исследованных штаммов самая низкая, но возможность оптимизации ее у штаммов H1N1 из-за запрета квартета кодонов, кодирующих аргинин, ограничена и может быть реализована через СК других аминокислот (аланина, пролина, треонина или серина).

Следует сразу оговорить, что оптимизация частот динуклеотидов через СК должна быть подчинена соблюдению ограничения, накладываемого значениями разности ИК между соседствующими трикодонами, учитывая очень низкую частоту встречаемости разности, равной 3. Поясним это на конкретном примере — на фрагменте последовательности НА H1N1 A/Brevig Mission/1/18, представленного на рис. 8. Выберем в качестве мишени для оптимизации частоты динуклеотида CpG кодон АСА, кодирующий треонин и находящийся в третьей позиции выделенного серым цветом трикодона, и заменим его синонимическим триплетом АСG, имеющим значение ИК, равное 8 (см. рис. 1). В результате такой замены выделенный серым цветом трикодон превратится в трикодон GCA GAC АСG и с его ИК, равным 24, разница между соседними трикодонами, будет равна 3. Последняя очень редко встречается

61 L = TTA CTA*	91 S = AGC =
62 K R AAA AGA	92 S = TCA =
63 G = GGA GGG*	93 W = TGG =
64 I V ATA GTA	94 S = TCC =
65 A = GCC =	95 Y = TAT TAC*
66 P = CCA =	96 I = ATT =
67 L = TTA TTG*	97 V = GTA GTG*
68 Q H CAA CAT	98 E = GAA =
69 L = TTG =	99 T = ACA =
70 G = GGG GGT*	100 S P TCG CCT
71 K = AAA =	101 N S AAC AGT
72 C = TGT =	102 S = TCA =
73 N = AAT AAC*	103 E D GAG GAC
74 I = ATC ATT*	104 N = AAT =
75 A = GCC GCT*	105 G = GGA =
76 G = GGA GGC*	106 T = ACA ACG*
77 W = TGG =	107 C = TGT =
78 L I CTC ATC	108 Y = TAC =
79 L = TTG CTG*	109 P = CCA =
80 G = GGA =	110 G = GGA =
81 N = AAC AAT*	111 D = GAT =
82 P = CCG CCA*	112 F = TTC =
83 E = GAA GAG*	113 I = ATC =
84 C = TGC TGT*	114 D = GAC GAT*
85 D E GAT GAA	115 Y = TAT =
86 L S TTA TCA	116 E = GAA GAG*
87 L = CTG CTC*	117 E = GAA GAG*
88 L S CTC TCC	118 L = CTG CTA*
89 T = ACA =	119 R = AGG AGA*
90 A = GCG GCA*	120 E = GAG =

Рисунок 7. Различия первичных структур фрагмента НА пандемических штаммов A/Brevig Mission/1/1918 и A/California/04/2009

Figure 7. Differences in the primary structures of the HA fragment in the pandemic strains A/Brevig Mission/1/1918 and A/California/04/2009

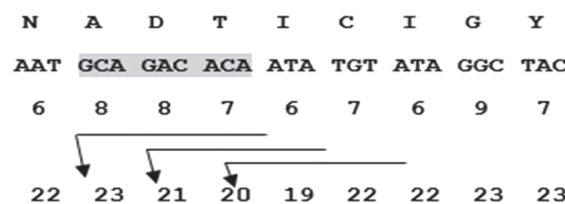


Рисунок 8. Иллюстрация расчета индексов комплементарности трикодонов, считываемых сдвигом на 1 кодон

Figure 8. An illustration of the calculation of a complementarity index in tricodons read by a shift of one codon

Примечание. 1-й ряд букв — последовательность аминокислот, 2-й ряд — обозначения кодонов, 3-й ряд — обозначения индексов комплементарности кодонов, 4-й ряд — обозначения индексов комплементарности трикодонов.

Note. The 1st row of letters is a sequence of amino acids, the 2nd row — a designation of codons, the 3rd row — a designation of codon complementarity indices, the 4th row — a designation of tricodon complementarity indices.

```

143 W W
144 A .V[1]A[213]T[164]
145 G G
146 V .I[2]V[375]A[1]
147 T .K[138]T[240]
148 Q Q
149 N N
150 G .E[1]G[377]
151 T .K[175]A[2]N[1]T[200]
152 S S
153 S .F[7]S[371]
154 A .A[309]S[69]
155 C C

```

Рисунок 9. Фрагмент доминирующей последовательности гемагглютинаина для штаммов H3N2 эпидсезона 2018–2019 гг.

Figure 9. Fragment of the dominant hemagglutinin sequence for H3N2 strains of the epidemic seasons 2018–2019

между соседними трикодонами в HA вирусов гриппа. Ее частота, варьируя у HA в диапазоне 1,6–2,1%, на 1% ниже чем у генов человека, то есть возможности модуляции частоты CpG при рекодировании, используемой, как правило, с целью стабилизации мРНК, у гена H1 HA, по сравнению с H3 HA, весьма ограничены.

По использованной нами модели считывания триплетов в мРНК каждый кодон, за исключением первых и последних трех кодонов, включается, как и при трансляции мРНК на рибосомах, в три последовательно считываемые трикодона, и очевидно, что ИК каждого кодона в трикодоне связан с ИК двух предшествующих и двух последующих кодонов. Это подводит к признанию существования в генах континуума связности кодонов по значениям их ИК и ограничения на их мутагенез. Свидетельством связности кодонов служит иллюстрируемая на рис. 7, на примере генов HA штаммов A/Brevig Mission/1/18 и A/California/04/2009, высокая частота и линейное распределение СК между теми кодонами, с которыми связана замена аминокислот. Как метко подмечено Комаром А.А., «синонимические кодоны размещены в мРНК стратегически (в определенных местах) таким образом, что они задают специфическую кинетику трансляции, обеспечивающую, в свою очередь, эффективное поэтапное котрансляционное сворачивание белка», то есть являются вторичным кодом для сворачивания белка [8].

У штаммов вируса гриппа одного и того же подтипа, как отмечалось выше, и эпидсезона различия HA связаны не только с заменами аминокислот, но и с еще большим различием в числе и распределении СК. Последние служат причиной образования у каждого штамма вируса гриппа своего конформера HA и своей мозаики обнажения и доступности в нем эпитопов. Социркуляция в эпидсезоне штаммов вируса гриппа с разными первичными структурами HA и составами СК в их генах и отличие от них

по этим же показателям вакцинного штамма являются (следует признать) другим фактором, обрекающим противогриппозные вакцины любой конструкции на невысокую эффективность. В США, например, эффективность вакцины против гриппа на субоптимальном уровне — 14–60%, а иммунитет к гриппу сохраняется лишь несколько месяцев [11].

Если таблица трансляционного кода (рис. 3) служит обобщающей информацией об использовании СК в мРНК, то двумерная комбинированная таблица (рис. 4) служит источником информации по дипептидам в белке HA и соответствующим им дикодоном в мРНК и полезна особенно тем, что в ней видно, какие СК сочетаются (или не сочетаются) друг с другом и как часто. Избирательность в соседствовании между кодонами служит, наряду с ограничениями в разнице по ИК между соседними кодонами, вторым барьером, который нужно обходить при рекодировании генов. Третьим же барьером являются редко встречающиеся и не обнаруженные в исследованных нами генах человека дикодоны, перечисленные на рис. 5. Эти дикодоны можно рассматривать как запретные для использования при рекодировании.

Учет перечисленных нами барьеров в рекодировании генома/гена посредством изменения состава СК переводит синтетическую биологию на другой уровень, способствуя избегания неудач. Ведь известно, что результаты рекодирования мРНК неоднозначны и могут привести к ухудшению свойств у новых вариантов синтетических геномов или генов. Более того, введенные в геном вируса синонимические замены могут реверсироваться к кодонам диких штаммов [6, 10], что можно рассматривать как существование ограничений в их рекодировании и подтверждение реальности выявленных нами барьеров, которые нельзя игнорировать, модифицируя гены или вирусы.

Нельзя обойти вниманием избирательность и неизменный консерватизм при исключении из гена H1 HA квартета кодонов, кодирующих аргинин. Если вновь обратиться к списку редко встречающихся и не обнаруженных в исследованных нами генах человека дикодонов (рис. 5), то нетрудно заметить, что в нем преобладают, с одной стороны, кодоны аминокислот (серин, лейцин и аргинин), кодируемых 6 кодонами, а с другой стороны, кодоны с динуклеотидом CpG, что побуждает объяснить исключение квартета кодонов CGC, CGT, CGA и CGG из гена H1 HA как проявление общего запрета по дикодоном. Однако эта аргументация отмечается ограниченностью исключения только генами H1 HA и не распространением ее на другие гены вирусов гриппа подтипа H1N1 и на другие подтипы вирусов гриппа.

Приемлемым объяснением исключения квартета кодонов CGC, CGT, CGA и CGG из гена H1 HA может быть связано с особенностями структуры самого белка HA, в частности ограничениями в его инвариантной последовательности. Так, следствием запрета в трансляционном коде гена H1 HA на кодоны CGC, CGT, CGA и CGG будут соответственно ограничения на замены по 8 аминокислотам (см. рис. 3): глицину, триптофану, цистеину, серину (в случае кодирования его кодонами с корнем AG), пролину, лейцину (в случае кодирования его кодонами с корнем СТ), гистидину и глутамину. Ограничения на цистеин, триптофан, глицин и лейцин связаны с присутствием их в инвариантных позициях первичной структуры белка H1, и запрет на использование в коде гена H1 всего квартета триплетов аргинина с корнем CG пресекает возможности мутирования кодонов этих аминокислот.

Выявление скрытой роли СК в невысокой эффективности противогриппозных вакцин еще более убеждает в том, что возможность успешного использования принципа «один иммуноген для всех штаммов подтипа вируса» маловероятна. Один из путей решения проблемы с увеличением эффективности противогриппозных вакцин применительно к мРНК вакцин мог бы заключаться в привлечении против штаммов одного подтипа 2–3 иммуногенов, то есть 2–3 мРНК, охватывающих более широкий спектр циркулирующих в эпидсезоне штаммов соответствующего подтипа, опираясь на представление о доминантных штаммах подтипа, упоминаемых в планах США и ВОЗ по поиску универсальных противогриппозных вакцин [4, 5]. Конструирование соответствующих им мРНК могло бы основываться на том же принципе (но более расширенном), что был предложен нами ранее для построения доминантной белковой структуры HA одного или нескольких эпидсезонов, в зависимости от целевой установки [1].

Приведем с помощью рис. 9 краткое изложение процедуры построения фрагмента аминокислотной последовательности доминантного H3 HA эпидсезона 2018–2019 гг., которая легко трансформируется в доминантную мРНК заменой аминокислот соответствующими кодонами. На рис. 9 первый вертикальный числовой ряд — нумерация позиций аминокислот в HA, второй вертикальный ряд аминокислот — собственно сама построенная доминантная последовательность HA эпидсезона, параллельно ей, правее — «скелет» молекулы с расположением инвариантных (представлены обозначениями аминокислот) и вариабельных (представлены точками) сайтов. За последними следует горизонтальный ряд всех замещающих аминокислот, обнаруженных в этих позициях HA у разных штаммов эпидсезона, с указанием (в скобках) для каждой аминокислоты частоты ее встречаемости. Строилась доминантная последовательность HA вставлением в цепь с инвариантными блоками доминантной аминокислоты из приводимого горизонтального ряда заменяемых аминокислот [1].

Как следует из рис. 9, доминантная последовательность HA не охватывает все циркулирующие штаммы, и нередки ситуации (например, позиции 147 и 151), когда в соответствующей позиции доминантная аминокислота по численности не намного превосходит другую аминокислоту в этой же вариабельной позиции. Последнюю условно можно назвать как субдоминантную. Поэтапно можно построить несколько субдоминантных HA, замещая каждую вариабельную позицию инвариантной последовательности HA новыми уменьшающимися по частоте встречаемости аминокислотами. В совокупности с доминантной последовательностью HA они обеспечивают более широкий охват HA штаммов соответствующего подтипа. В отличие от мРНК вакцин, использование описанного подхода применительно к классическим вакцинам из вирионов сопряжено с возрастанием антигенной нагрузки вакцины за счет белков вирусов, не вовлеченных в формирование к ним иммунитета.

Завершая обсуждение результатов биоинформационного анализа первичной структуры генов HA вирусов гриппа хотелось бы подчеркнуть полезность его в выявлении тех их особенностей, которые потенциально могли бы ограничивать успешность их рекодирования с целью получения на их основе мРНК вакцины. Выявление нескольких ограничений в структуре генов предполагает, что любая ее модификация (в любом гене) должна не противоречить каждому из ограничений, установленных природой. Сравнивая HA подтипов H1N1 и H3N2, можно предвидеть больше возможностей в конструировании стабильной мРНК у подтипа H3N2 из-за исключения из трансляционного кода у гена подтипа H1N1 квартета кодонов, кодирующих аргинин.

Завершая обсуждение результатов биоинформационного анализа первичной структуры генов HA вирусов гриппа хотелось бы подчеркнуть полезность его в выявлении тех их особенностей, которые потенциально могли бы ограничивать успешность их рекодирования с целью получения на их основе мРНК вакцины. Выявление нескольких ограничений в структуре генов предполагает, что любая ее модификация (в любом гене) должна не противоречить каждому из ограничений, установленных природой. Сравнивая HA подтипов H1N1 и H3N2, можно предвидеть больше возможностей в конструировании стабильной мРНК у подтипа H3N2 из-за исключения из трансляционного кода у гена подтипа H1N1 квартета кодонов, кодирующих аргинин.

Список литературы/References

1. Харченко Е.П. Поиски универсальной противогриппозной вакцины: возможности и ограничения // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2019. Т. 18, № 5. С. 70–84. [Kharchenko E.P. The search for a universal influenza vaccine: possibilities and limitations. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccine Prevention*, 2019, vol. 18, no. 5, pp. 70–84. (In Russ.)] doi: 10.31631/2073-3046-2019-18-5-70-84

2. Харченко Е.П. Проблемы и коллизии вакцинологии // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2023. Т. 22, № 6. С. 183–200. [Kharchenko E.P. Problems and Collisions of Vaccinology. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccine Prevention*, 2023, vol. 22, no. 6, pp. 183–200. (In Russ.)] doi: 10.31631/2073-3046-2023-22-6-183-200
3. Altmann D.M., Boyton R.J. COVID-19 vaccination: the road ahead. *Science.*, 2022, vol. 375, no. 6585, pp. 1127–1132. doi: 10.1126/science.abn1755
4. Erbeling E.J., Post D.J., Stemmy E.J., Roberts P.C., Augustine A.D., Ferguson S., Paules C.I., Graham B.S., Fauci A.S. A universal influenza vaccine: the strategic plan for the National Institute of Allergy and Infectious Diseases. *J. Infect. Dis.*, 2018, vol. 218, no. 3, pp. 347–354. doi: 10.1093/infdis/jiy103
5. Global influenza strategy 2019–2030. World Health Organization. URL: <https://www.who.int/publications/i/item/978924151532015>
6. Gonçalves-Carneiro D., Bieniasz P.D. Mechanisms of attenuation by genetic recoding of viruses. *mBio*, 2021, vol. 12, no. 1: e02238-20. doi: 10.1128/mBio.02238-20
7. Knyazev S., Chhugani K., Sarwal V., Ayyala R., Singh H., Karthikeyan S., Deshpande D., Baykal P.I., Comarova Z., Lu A., Porozov Y., Vasylyeva T.I., Wertheim J.O., Tierney B.T., Chiu C.Y., Sun R., Wu A., Abedalthagafi M.S., Pak V.M., Nagaraj S.H., Smith A.L., Skums P., Pasaniuc B., Komissarov A., Mason C.E., Bortz E., Lemey P., Kondrashov F., Beerenwinkel N., Lam T.T., Wu N.C., Zelikovsky A., Knight R., Crandall K.A., Mangul S. Unlocking capacities of genomics for the COVID-19 response and future pandemics. *Nat. Methods*, 2022, vol. 19, no. 4, pp. 374–380. doi: 10.1038/s41592-022-01444-z
8. Komar A.A. [Synonymous codon usage — a guide for co-translational protein folding in the cell]. *Mol. Biol. (Mosk.)*, 2019, vol. 53, no. 6, pp. 883–898. doi: 10.1134/S0026898419060090
9. Lin B.C., Kaissarian N.M., Kimchi-Sarfaty C. Implementing computational methods in tandem with synonymous gene recoding for therapeutic development. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2023, vol. 44, no. 2, pp. 73–84. doi: 10.1016/j.tips.2022.09.008
10. Martínez M.A., Jordan-Paiz A., Franco S., Nevot M. Synonymous virus genome recoding as a tool to impact viral fitness. *Trends Microbiol.*, 2016, vol. 24, no. 2, pp. 134–147. doi: 10.1016/j.tim.2015.11.002
11. Morens D.M., Taubenberger J.K., Fauci A.S. Rethinking next-generation vaccines for coronaviruses, influenzaviruses, and other respiratory viruses. *Cell. Host Microbe*, 2023, vol. 31, no. 1, pp. 146–157. doi: 10.1016/j.chom.2022.11.016
12. Ostrov N., Nyerges A., Chiappino-Pepe A., Rudolph A., Baas-Thomas M., Church G.M. Synthetic genomes with altered genetic codes. *Curr. Opin. Syst. Biol.*, 2020, vol. 24, pp. 32–40. doi: 10.1016/j.coisb.2020.09.007
13. Tian Y., Deng Z., Yang P. mRNA vaccines: A novel weapon to control infectious diseases. *Front. Microbiol.*, 2022, no. 13: 1008684. doi: 10.3389/fmicb.2022.1008684
14. Yang L., Tang L., Zhang M., Liu C. Recent advances in the molecular design and delivery technology of mRNA for vaccination against infectious diseases. *Front. Immunol.*, 2022, no. 13: 896958. doi: 10.3389/fimmu.2022.896958

Автор:

Харченко Е.П., д.б.н., ведущий научный сотрудник Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия.

Поступила в редакцию 27.01.2024
Принята к печати 08.08.2024

Author:

Kharchenko E.P., DSc (Biology), Senior Researcher, Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation.

Received 27.01.2024
Accepted 08.08.2024

ГРИПП И НЕГРИППОЗНЫЕ ОРВИ У ДЕТЕЙ. ВЗАИМОСВЯЗЬ ПРОФИЛЯ ЦИТОКИНОВ, ПАРАМЕТРОВ СИСТЕМЫ «ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ — АНТИОКСИДАНТНАЯ ЗАЩИТА» С КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫМИ ПОКАЗАТЕЛЯМИ

М.А. Даренская, Е.Д. Казанцева, А.Г. Петрова, Л.В. Рычкова, С.И. Колесников,
Н.В. Семенова, Н.А. Курашова, А.С. Лесная, Л.Ф. Шолохов, Л.И. Колесникова

ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск, Россия

Резюме. Грипп и другие острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ) наносят существенный ущерб здоровью населения РФ по причине их сезонной циркуляции и преимущественному поражению детей раннего возраста. Данных о показателях профиля цитокинов, неспецифической системы «ПОЛ—АОЗ» и их взаимосвязях с клиническими характеристиками при данных заболеваниях у детей дошкольного возраста крайне мало. Целью настоящего исследования явилась оценка параметров цитокинового профиля, системы «ПОЛ—АОЗ» и их взаимосвязи с клинико-лабораторными характеристиками заболеваний у детей дошкольного возраста с гриппом и другими ОРВИ. Обследовано 86 детей дошкольного возраста (3–6 лет): с установленным диагнозом грипп ($n = 31$), негриппозными ОРВИ ($n = 28$), практически здоровые дети (контрольная группа ($n = 27$)). Всем детям методом твердофазного иммуноферментного анализа проводили определение в сыворотке крови концентрации С-реактивного белка и цитокинов IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, TNF α , IFN α , IFN γ . Для оценки состояния системы «ПОЛ—АОЗ» использовались спектрофотометрические, флуориметрические и иммуноферментные методы анализа. В группе детей с гриппом в сравнении с другими ОРВИ выявлена более высокая частота встречаемости интоксикационного синдрома. В цитокиновом профиле у детей обеих клинических групп в сравнении с контрольными значениями увеличивались показатели, как провоспалительного, так и противовоспалительного характера. В группе детей с негриппозными ОРВИ в неспецифической системе «ПОЛ—АОЗ» найдены более высокие значения конечных продуктов ПОЛ на фоне сниженной концентрации жирорастворимых витаминов, общей антиокислительной активности, уровня GSH, активности СОД. В группе с гриппом повышены значения первичных и конечных продуктов ПОЛ, снижены значения ретинола, α -токоферола, общей антиокислительной активности, выше уровни GSSG и СОД. Отмечены многочисленные корреляционные зависимости в группе детей с ОРВИ: IL-1 β —кетоны, IL-6—кетоны, IL-8—кетоны, TNF α —кетоны, IL-4—кетоны, IFN γ —одышка, IFN α —кашель, Дв.св.—лихорадка, Дв.св.—АСТ, ШО—интоксикация, ретинол—лихорадка, GSSG—кашель. Группа с гриппом отличалась следующими взаимосвязями: IL-4—кетоны, IL-4—лихорадка, IFN α —кетоны, ДК—АСТ. Можно заключить,

Адрес для переписки:

Даренская Марина Александровна
664003, Россия, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16, ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека.
Тел.: 8 964 227-52-72 (моб.).
E-mail: marina_darenskaya@inbox.ru

Contacts:

Marina A. Darenskaya
664003, Russian Federation, Irkutsk, Timiryaseva str., 16, Scientific Center for Family Health and Human Reproduction Problems.
Phone: +7 964 227-52-72 (mobile).
E-mail: marina_darenskaya@inbox.ru

Для цитирования:

Даренская М.А., Казанцева Е.Д., Петрова А.Г., Рычкова Л.В., Колесников С.И., Семенова Н.В., Курашова Н.А., Лесная А.С., Шолохов Л.Ф., Колесникова Л.И. Грипп и негриппозные ОРВИ у детей. взаимосвязь профиля цитокинов, параметров системы «перекисное окисление липидов — антиоксидантная защита» с клинико-лабораторными показателями // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 4. С. 719–730. doi: 10.15789/2220-7619-IAN-17573

Citation:

Darenskaya M.A., Kazantseva E.D., Petrova A.G., Rychkova L.V., Kolesnikov S.I., Semenova N.V., Kurashova N.A., Lesnaya A.S., Sholokhov L.F., Kolesnikova L.I. Influenza and non-influenza ARVI in children. A relationship between cytokine profile, parameters of the “lipid peroxidation–antioxidant defense system” as well as clinical and laboratory indicators // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 4, pp. 719–730. doi: 10.15789/2220-7619-IAN-17573

что у детей дошкольного возраста с ОРВИ и гриппом изменения в цитокиновом профиле сопровождаются ростом про- и противовоспалительных цитокинов, повышенной интенсивностью реакций липопероксидации на фоне сниженных значений антиоксидантных факторов. В группе с ОРВИ отмечаются взаимосвязи конечных токсичных продуктов липопероксидации — шиффовых оснований — с показателем интоксикации, а также наличие защитных механизмов в виде связей интерферонов с клиническими проявлениями заболевания. Группа с гриппом отличалась наличием зависимостей протективного характера, что может иметь благоприятный эффект в условиях развития патологического процесса. Полученные данные помогут расширить понимание патогенетических механизмов иммунной реактивности и неспецифических реакций липопероксидации у пациентов дошкольного возраста и сформулировать соответствующие мероприятия по коррекции.

Ключевые слова: грипп, острые респираторные вирусные инфекции, дети, дошкольный возраст, цитокины, перекисное окисление липидов, антиоксидантная защита, интоксикация.

INFLUENZA AND NON-INFLUENZA ARVI IN CHILDREN. A RELATIONSHIP BETWEEN CYTOKINE PROFILE, PARAMETERS OF THE “LIPID PEROXIDATION – ANTIOXIDANT DEFENSE SYSTEM” AS WELL AS CLINICAL AND LABORATORY INDICATORS

Darenskaya M.A., Kazantseva E.D., Petrova A.G., Rychkova L.V., Kolesnikov S.I., Semenova N.V., Kurashova N.A., Lesnaya A.S., Sholokhov L.F., Kolesnikova L.I.

Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation

Abstract. Influenza and acute respiratory viral infections (ARVI) impose a substantial damage to the population health in the Russian Federation due to their seasonal circulation and predominantly affect young children. A very few data on the cytokine profile, the nonspecific LPO — AOD system and their relationships with clinical characteristics in such diseases in preschool children are available. The aim of this study was to assess the cytokine profile, LPO — AOD system parameters and their relationship with the clinical and laboratory characteristics of diseases in preschool children with influenza and other ARVI. 86 preschool children (3–6 years old) were examined: with an established diagnosis of influenza (n = 31), non-influenza ARVI (n = 28), apparently healthy children (control group (n = 27)). All pediatric samples were analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay assessing blood serum concentrations of C-reactive protein and cytokines IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, TNF α , IFN α , IFN γ . Spectrophotometric, fluorometric and enzyme immunoassay methods to assess the state of the “LPO — AOD” system were used. In the group of children with influenza vs other ARVI, a higher incidence of intoxication syndrome was revealed. Cytokine profile in children from both clinical groups compared with control cohort was featured with higher indicators of both pro-inflammatory and anti-inflammatory origin. Children with non-influenza ARVI, had increased magnitude of LPO final products in the nonspecific LPO — AOD system along with lowered concentration of fat-soluble vitamins, general antioxidant activity, GSH level, and SOD activity. In the group with influenza, the level of primary and final lipid peroxidation products was increased, whereas that of for retinol, α -tocopherol, and total antioxidant activity was decreased paralleled with higher GSSG and SOD levels. Numerous correlations were noted in the group of children with ARVI: IL-1 β /ketones, IL-6/ketones, IL-8/ketones, TNF α /ketones, IL-4/ketones, IFN γ /shortness of breath, IFN α /cough, double bonds/fever, double bonds/AST, SO/intoxication, retinol/fever, GSSG/cough. The influenza group differed in the following relationships: IL-4/ketones, IL-4/fever, IFN α /ketones, CDs/AST. It can be concluded that in preschool children with ARVI and influenza, changes in the cytokine profile are accompanied by increased pro- and anti-inflammatory cytokine levels, increased intensity of lipid peroxidation reactions along with reduced magnitude of antioxidant factors. In the group with ARVI, there was a relationship between the final toxic products of lipid peroxidation — Schiff bases — and the intoxication index, as well as the presence of protective mechanisms in the form of connections between interferons and disease clinical manifestations. The group with influenza was distinguished by the presence of protective relations, which may have a beneficial effect in the context of developing pathological process. The data obtained will help expand the understanding of the pathogenetic mechanisms related to immune reactivity and nonspecific lipid peroxidation reactions in preschool patients and formulate appropriate measures for correction.

Key words: influenza, acute respiratory viral infections, children, preschool age, cytokines, lipid peroxidation, antioxidant defense, intoxication.

Введение

Грипп и острые респираторно-вирусные инфекции (ОРВИ) наносят существенный ущерб здоровью населения РФ, сравнимый по частоте с травматизмом и сердечно-сосудистыми заболеваниями [33]. Частота диагностирования ОРВИ негриппозной этиологии (парагрипп,

аденовирусная, респираторно-синцитиальная, коронавирусная, бокавирусная, метапневмовирусная и риновирусная инфекция) в 2023 г. составила 13,4% [8]. Серьезной проблемой гриппа и других ОРВИ является поражение лиц, относящихся к группам риска (дети раннего возраста, пожилые люди, лица с ослабленным иммунитетом и лица с хроническими заболе-

ваниями) [31]. Так, число заболевших среди лиц детской популяции в период эпидемий может превышать 30%. Стоит отметить, что риск заболевания в детском возрасте обычно в 1,5–3 раза превышает данные по взрослым [36]. Эпидемиологическая ситуация по новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2, также требует более пристального внимания к новому сезону гриппа, и в первую очередь это касается пациентов из групп риска [35]. Способность вируса гриппа к антигенным изменениям определяет недостаточную эффективность противогриппозных вакцин и снижает возможности фармакотерапии заболевания, что диктует необходимость исследований патогенетических механизмов гриппа и других ОРВИ [33].

Основным фактором, определяющим скорость клинической манифестации и течение инфекционного заболевания, считается реактивность системы иммунитета [12]. В настоящий момент существует достаточное число исследований о значимости цитокинов при пандемическом гриппе у взрослых и подростков, однако результаты изучения динамики показателей цитокинового профиля в зависимости от особенностей течения респираторных заболеваний у детей немногочисленны и иногда носят противоречивый характер [20]. Система неспецифической системы перекисного окисления липидов—антиоксидантной защиты (ПОЛ—АОЗ) может иметь большое значение в течении инфекционного процесса [19]. Доказана роль ПОЛ в процессах фагоцитоза и разрушения микроорганизмов, метаболизме печени ксенобиотиков, биосинтезе некоторых биологически активных веществ, например, простагландинов [10, 34]. Сообщалось, что респираторные инфекции приводят к индукции реакций окислительного стресса (ОС), а гиперпродукция активных форм кислорода (АФК), оказывает выраженный повреждающий эффект в отношении многочисленных клеточных структур, что способствует, в свою очередь, излишней активности иммунной системы [5, 6, 7]. Избыточному образованию АФК противодействует система АОЗ, ведущим звеном которой являются антиоксиданты — соединения, способные ингибировать или снижать интенсивность АФК окисления, нейтрализовать свободные радикалы, обменивая их атом водорода на кислород свободных радикалов [17, 25]. Несмотря на имеющиеся исследования, данных об активности показателей цитокинового профиля, неспецифической системы ПОЛ—АОЗ и их взаимосвязях с клиническими характеристиками у детей дошкольного возраста, больных гриппом и негриппозными ОРВИ крайне мало.

В связи с этим, целью настоящего исследования явилось оценить параметры цитокинового профиля, системы ПОЛ—АОЗ и их взаимосвязь с клиническими характеристиками заболевания у детей дошкольного возраста с гриппом и другими ОРВИ.

Материалы и методы

Обследовано 86 детей дошкольного возраста (3–6 лет): с установленным диагнозом «Грипп» (n = 31), негриппозными ОРВИ (n = 28), и практически здоровые дети (контрольная группа (n = 27)). Все дети находились на стационарном лечении в ОГБУЗ «Иркутская областная инфекционная клиническая больница» с декабря 2018 по январь 2019 г., до начала эпидемии COVID-19.

Диагноз ОРВИ ставился на основании клинико-лабораторных данных. При постановке диагноза ОРВИ в 86% (n = 24) случаев вирус не был этиологически идентифицирован и исключена бактериальная инфекция, в 3,5% (n = 1) случаев был определен вирус парагриппа 4 типа, в 3,5% (n = 1) — риновирус, в 3,5% (n = 1) — респираторно-синцитиальный вирус, в 3,5% (n = 1) — микст-вирусная инфекция (аденовирус + парагрипп 1 типа + коронавирус OC43/НКУ 1).

Диагноз гриппа был лабораторно верифицирован методом ПЦР с типированием штаммов гриппа А/В у 94% (n = 29) детей в группе исследования. В этиологической структуре преобладал серотип гриппа А(Н1N1)sw2009, он определялся в 81% (n = 25) случаев. Второе место по частоте выявления принадлежало гриппу А(Н3N2) в 13% (n = 4) случаев. У 6% штамм вируса гриппа не был идентифицирован. Дети с гриппом имели преимущественно среднюю степень тяжести заболевания.

Анализ клинических особенностей течения гриппа и ОРВИ у детей проводился с учетом длительности заболевания, количества дней пребывания в стационаре, диагноза основного и сопутствующего, наличия осложнений, исхода заболевания, наличия в анамнезе сведений о вакцинации от гриппа. Клиническая картина оценивалась по предъявляемым жалобам, наличию, характеру и длительности симптомов: ринита, кашля, интоксикации (вялость, отказ от еды, тошнота или рвота на пике лихорадки, общая слабость, нарушение сна) и лихорадки (учитывалось повышение температуры тела от 37,2 до 38,0°C — субфебрильная лихорадка, от 38,1 до 39,0°C — фебрильная лихорадка, от 39,1 до 40,0°C — пиретическая лихорадка), другим клиническим проявлениям (сыпь, судороги, боль в горле, головная, мышечная боли), отклонениям лабораторных показателей общего, биохимического анализов крови и общего

анализа мочи при поступлении, объему и продолжительности инфузионной, противовирусной и антибактериальной терапии в течение всего заболевания.

Контрольная группа включала практически здоровых детей ($n = 27$) без признаков ОРВИ или спустя 14 дней после перенесенной ОРВИ и была сопоставима по возрасту, антропометрическим данным и половым признакам с группами больных детей.

Критериями включения в группу детей с ОРВИ и гриппом были: дети 3–6 лет включительно, подтвержденный диагноз «Грипп» или «ОРВИ», подписанное информированное согласие со стороны родителей и/или законных представителей ребенка.

Критерии включения в группу контроля: практически здоровые дети 3–6 лет, без признаков ОРВИ или спустя 14 дней после перенесенной ОРВИ, подписанное информированное согласие со стороны родителей и/или законных представителей ребенка.

Критерии исключения: нежелание родителей и/или законных представителей пациента принимать участие в исследовании на любом из этапов, несоответствие пациента критериям включения.

Взятие крови из периферического кровотока у детей осуществляли утром натощак из локтевой вены в первый день госпитализации. В качестве материала исследования использовали плазму, сыворотку и гемолизат эритроцитов.

Проведено определение концентрации С-реактивного белка и цитокинов IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, TNF α , IFN α , IFN γ в сыворотке крови методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием диагностических тест-систем производства «Вектор-Бест» (г. Новосибирск). Измерения проводили на микропланшетном фотометре («Multiskan EX», Финляндия).

Анализ активности неспецифической системы липопероксидации проводили по содержанию ненасыщенных двойных связей (Дв.св.), первичных — диеновых конъюгатов (ДК) и вторичных — кетодиенов и сопряженных триенов (КД и СТ) продуктов в плазме крови по методу И.А. Волчегорского (1989) [3]. Содержание конечных продуктов ПОЛ, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-АП) определяли флуориметрически с помощью набора реактивов «Агат» (Россия). О состоянии системы антиоксидантной защиты (АОЗ) судили по общей антиокислительной активности (АОА), активности супероксиддисмутазы (СОД) в сыворотке крови (с помощью коммерческого набора фирмы «Randox» (Великобритания), содержанию восстановленного и окисленного глутатионов (GSH и GSSG) в эритроцитах (гемолизате) [24], α -токоферола и ретинола в сыворотке

крови [14]. Измерения производили на спектрофотометре «СФ-2000» (Россия), спектрофлюорофотометре «BTS-350» (Испания) и полуавтоматическом люминесцентно-фотометрическом анализаторе «Флюорат 02 АБФФ-Т» (Россия).

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием программы Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США). Использовали визуально-графический метод и критерии согласия Колмогорова—Смирнова с поправкой Лиллиефорса и Шапиро—Уилка для определения близости к нормальному распределению данных; критерий Фишера для оценки равенства генеральных дисперсий. Статистическая значимость межгрупповых различий по качественным признакам оценивалась с помощью двустороннего точного критерия Фишера. Статистическая значимость двух несвязанных групп оценивалась по критерию Манна—Уитни (U-test). Корреляционный анализ выполнен по методике ранговой корреляции Спирмена. Качественные признаки представлены в виде абсолютных (n) и относительных величин (P), количественные признаки представлены с указанием медианы (Me) 25% и 75% квартилей (Q_{25} ; Q_{75}). За уровень статистической значимости уровень принимали $p < 0,05$.

Протокол исследования был одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» (Выписка из протокола заседания № 8.4 от 02.11.2018 г.). Подписание информированного согласия со стороны родителей/опекунов являлось обязательной процедурой для участия в исследовании.

Данная работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Центр разработки прогрессивных персонализированных технологий здоровья» ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ, Иркутск.

Результаты

При сравнении клинико-anamnestических данных, статистически значимых различий между группами детей с негриппозными ОРВИ и гриппом получено не было, за исключением показателя интоксикации, чаще проявляющегося у детей с гриппом ($p = 0,044$) (табл. 1).

Кроме того, длительность лихорадки при гриппе была дольше (средние значения температуры составили $38,5 \pm 0,7^\circ\text{C}$), чем при негриппозных ОРВИ (средние значения температуры составили $37,6 \pm 0,9^\circ\text{C}$), также не было отмечено случаев одышки, в отличие от иных респираторных инфекций (табл. 1). Локализация поражений респираторного тракта при гриппе в основном была представлена трахеитом, однако структура топических диагнозов при ОРВИ не-

гриппозной этиологии представлена более обширно: ринофарингит — в 18% (n = 5), фарингит — в 18% (n = 5), трахеобронхит — в 11% (n = 3), острый бронхит — в 32% (n = 9), обструктивный бронхит — в 21% (n = 6) случаев.

В отношении осложнений основного заболевания и сопутствующих диагнозов различий между группами выявлено не было (p > 0,05) (табл. 1).

Лабораторное обследование детей с ОРВИ иной этиологии и гриппом включало ряд стандартных исследований (табл. 2).

При этом показатель моноцитов в крови у пациентов с гриппом обнаруживал более низкие значения (p = 0,017) в сравнении с другими ОРВИ. Также у детей с гриппом отмечались повышенные уровни АСТ (p = 0,002) (табл. 2).

Далее был проведен анализ цитокинового профиля в исследуемых группах детей (табл. 3).

У детей с негриппозными ОРВИ было отмечено наличие статистически значимого роста показателя СРБ (p < 0,0001), провоспалительных — IL-1 β (p < 0,0001), IL-6 (p < 0,0001), IL-8 (p < 0,0001), TNF α (p < 0,0001) и противовоспалительных — IL-4 (p < 0,0001), IFN γ (p < 0,0001), IFN α (p = 0,0003) факторов в сравнении с контрольной группой (табл. 3).

Изменения в цитокиновом профиле у детей с гриппом носили аналогичный характер: более высокие значения СРБ (p < 0,0001), IL-1 β (p < 0,0001), IL-6 (p < 0,0001), IL-8 (p < 0,0001), TNF α (p < 0,0001), IL-4 (p < 0,0001), IFN γ (p = 0,032) и IFN α (p < 0,0001) по отношению к контролю (табл. 3). Данная группа также отличалась от группы детей с ОРВИ повышенным содержанием СРБ (p = 0,001), IFN α (p = 0,015), более низким уровнем IL-8 (p = 0,025), TNF α (p = 0,001), IFN γ (p = 0,003) (табл. 3).

Параметры неспецифической системы «ПОЛ — АОЗ» в группе детей с другими ОРВИ касались более высоких значений Дв.св. (p = 0,016), ТБК-АП (p < 0,0001), сниженной концентрации ретинола (p < 0,0001), α -токоферола (p = 0,001), общей АОА (p < 0,0001), GSH (p = 0,003), активности СОД (p < 0,0001) в сравнении с контрольными значениями (табл. 4).

У детей с гриппом отмечались повышенные уровни ДК (p < 0,0001), КД и СТ (p < 0,0001), ТБК-АП (p < 0,001), сниженные значения ретинола (p < 0,001), α -токоферола (p = 0,029), общей АОА (p < 0,001), повышенные уровни GSSG (p = 0,018), СОД (p = 0,013). Межгрупповая разница в показателях касалась более высоких значений ДК (p < 0,001), КД и СТ (p = 0,001), ретинола (p < 0,0001), α -токоферола (p = 0,039), общей АОА (p = 0,015), GSH (p = 0,027), GSSG (p < 0,001), СОД (p < 0,0001) в группе с диагностированным гриппом в сравнении с показателями группы с ОРВИ (табл. 4).

Таблица 1. Клинико-anamнестические характеристики детей дошкольного возраста с ОРВИ и гриппом

Table 1. Comparative analysis of the main clinical symptoms in preschool children with acute respiratory viral infections and influenza

Показатель Parameters	ОРВИ ARVI (n = 28)	Грипп Influenza (n = 31)
Возраст, годы Age, years	4 \pm 1,3	4 \pm 1,1
Пол/Sex		
мужской/male	14 (50%)	18 (58%)
женский/female	14 (50%)	13 (42%)
Частота клинических проявлений Frequency of clinical manifestations		
Гиперемия зева Hyperemia of the pharynx	27 (96%)	30 (97%)
Ринорея Rhinorrhea	19 (68%)	20 (65%)
Кашель Cough	24 (86%)	26 (84%)
Интоксикация Intoxication	5 (18%)	13 (42%)*
Лихорадка Fever	25 (89%)	28 (90%)
Одышка Dyspnea	5 (18%)	–
Острая кишечная инфекция Intestinal infection	2 (7%)	6 (19%)
Продолжительность клинических проявлений Duration of clinical manifestations		
Длительность ринита, дни Rhinitis, days	5 \pm 2,7	4,5 \pm 2,6
Длительность кашля, дни Cough, days	5 \pm 2,5	5 \pm 2,2
Длительность лихорадки, дни Fever, days	1 \pm 1,1	3 \pm 1,5*
Частота осложнений Complication rate		
Синдром кетоацидоза Ketoacidosis syndrome	1 (3%)	4 (13%)
Пневмония Pneumonia	–	4 (13%)
Фебрильные судороги Febrile seizures	–	1 (3%)
Частота сопутствующих диагнозов Frequency of concomitant diagnoses		
Гипохромная анемия Hypochromic anemia	2 (7%)	5 (16%)
Энтеробиоз Enterobiosis	–	2 (6%)

Примечание. * — статистически значимые различия (точный критерий Фишера), p < 0,05.

Note. * — significant differences (Fisher's exact test), p < 0.05.

Далее в исследуемых группах был проведен корреляционный анализ параметров цитокинового профиля и ПОЛ—АОЗ с клинико-лабораторными показателями. Данный анализ показал наличие многочисленных статистически значимых взаимосвязей в группе с ОРВИ: IL-1 β —кетоны ($r = 0,56$; $p = 0,002$), IL-6—кетоны ($r = 0,48$; $p = 0,010$), IL-8—кетоны ($r = 0,43$; $p = 0,023$), TNF α —кетоны ($r = 0,45$; $p = 0,017$), IL-4—кетоны ($r = 0,41$; $p = 0,031$), IFN γ —одышка ($r = 0,70$; $p < 0,0001$), IFN α —кашель ($r = -0,45$; $p = 0,016$), Дв.св.—лихорадка ($r = 0,50$; $p = 0,007$), Дв.св.—АСТ ($r = 0,45$; $p = 0,017$), Шиффовы основания (ШО)—интоксикация ($r = 0,43$; $p = 0,022$), ретинол—лихорадка ($r = -0,41$; $p = 0,030$), GSSG—кашель ($r = 0,57$; $p = 0,001$). Группа с гриппом отличалась значимыми

взаимосвязями между IL-4 и кетонами ($r = 0,40$; $p = 0,026$), IL-4 и лихорадкой ($r = 0,38$; $p = 0,035$), IFN α и кетонами ($r = 0,39$; $p = 0,029$), ДК и АСТ ($r = -0,49$; $p = 0,005$).

Обсуждение

В результате анализа клинических данных в двух группах, в отношении большинства показателей (гиперемия зева, ринорея, кашель, лихорадка) значимых различий выявлено не было, за исключением более высокой частоты встречаемости интоксикационного синдрома в группе детей с гриппом в сравнении с другими ОРВИ. Показатель интоксикации отражает суммарные клинические проявления (повышенную утом-

Таблица 2. Сравнение лабораторных показателей у детей дошкольного возраста с ОРВИ и гриппом (Me [Q₂₅; Q₇₅])

Table 2. Comparison of laboratory parameters in preschool children with acute respiratory viral infections and influenza (Me [Q₂₅; Q₇₅])

Показатель Parameters	ОРВИ ARVI (n = 28)	Грипп Influenza (n = 31)
Эритроциты, $\times 10^{12}/л$ Red blood cells, $\times 10^{12}/l$	4,48 [4,00; 4,80]	4,23 [3,93; 4,38]
Гемоглобин, г/л Hemoglobin, g/l	124 [118,75; 130,25]	122 [114,00; 126,75]
Тромбоциты, $\times 10^9/л$ Platelets, $\times 10^9/l$	240 [185,75; 346,00]	213 [179,50; 246,25]
Лейкоциты, $\times 10^9/л$ Leukocytes, $\times 10^9/l$	4,38 [2,85; 5,00]	3,88 [3,24; 4,86]
Лимфоциты, $\times 10^9/л$ Lymphocytes, $\times 10^9/l$	1,65 [0,84; 2,39]	1,38 [1,10; 1,09]
Моноциты, $\times 10^9/л$ Monocytes, $\times 10^9/l$	0,61 [0,32; 1,66]	0,38 [0,32; 0,49]*
Эозинофилы, $\times 10^9/л$ Eosinophils, $\times 10^9/l$	0,02 [0,01; 0,17]	0,03 [0,01; 0,06]
СОЭ, мм/ч ESR, mm/h	17 [11,00; 23,00]	16,5 [10,00; 23,50]
Общий белок, г/л Total protein, g/l	68 [65,10; 71,00]	68,90 [62,90; 70,50]
Глюкоза, ммоль/л Glucose, mmol/l	4,00 [3,60; 4,68]	3,78 [3,17; 4,27]
АСТ, Ед/л AST, Units/l	42 [32,57; 53,62]	57,95 [46,25; 76,50]*
АЛТ, Ед/л ALT, Units/l	17,50 [13,42; 21,70]	19,60 [16,00; 23,40]
Креатинин, мкмоль/л Creatinine, $\mu\text{mol}/l$	47 [41,75; 49,25]	44,9 [43,35; 49,22]
Мочевина, ммоль/л Urea, mmol/l	4,10 [4,00; 5,25]	4,31 [3,00; 12,60]
Удельный вес мочи, г/л Specific gravity of urine, g/l	1020 [1020,00; 1025,00]	1020 [1015,00; 1025,00]
Кетоны в моче, мг/дл Ketones in urine, mg/dl	0 [0,00; 0,10]	0 [0,00; 0,65]

Примечание. * — статистически значимые различия (U-test), $p < 0,05$.

Note. * — significant differences (U-test), $p < 0.05$.

Таблица 3. Анализ уровня СРБ и цитокинового профиля у детей дошкольного возраста с ОРВИ и гриппом (Me [Q₂₅; Q₇₅])Table 3. C-reactive protein and cytokine profile in preschool children with acute respiratory viral infections and influenza (Me [Q₂₅; Q₇₅])

Параметры Parameters	Контрольная группа Control group (n = 27)	ОРВИ ARVI (n = 28)	Грипп Influenza (n = 31)
СРБ, мг/л CRP, mg/L	0,71 [0,31; 1,00]	10,67 [5,90; 13,22]*	17,2 [7,3; 19,1]**, #
TNF α , пг/мл TNF α , pg/ml	0,01 [0,01; 1,15]	3,98 [2,62; 6,54]*	1,8 [1,3; 3,7]**, #
IL-1 β , пг/мл IL-1 β , pg/ml	0,01 [0,01; 0,01]	10,50 [4,33; 25,71]*	6,75 [3,00; 23,20]**
IL-6, пг/мл IL-6, pg/ml	0,35 [0,01; 2,21]	18,93 [15,24; 23,49]*	20,15 [14,50; 32,80]**
IL-8, пг/мл IL-8, pg/ml	2,91 [2,08; 5,36]	274,80 [114,80; 457,10]*	177,60 [73,90; 255,00]**, #
IL-4, пг/мл IL-4, pg/ml	0,01 [0,01; 0,32]	2,34 [1,42; 3,66]*	3,20 [1,30; 5,10]**
IFN γ , пг/мл IFN γ , pg/ml	0,01 [0,01; 1,66]	2,98 [2,06; 5,91]*	19,95 [10,00; 77,00]**, #
IFN α , пг/мл IFN α , pg/ml	0,01 [0,01; 0,26]	13,36 [0,39; 18,00]*	19,95 [10,00; 77,00]**, #

Примечание. * — статистически значимые различия между контрольной группой и группой с ОРВИ; ** — статистически значимые различия между контрольной группой и группой с гриппом; # — статистически значимые различия между группами с ОРВИ и гриппом.

Note. * — significant differences between control and group with respiratory acute viral infections; ** — significant differences between control and influenza group; # — significant differences between groups with respiratory acute viral infections and influenza.

Таблица 4. Анализ активности неспецифической системы ПОЛ — АОЗ у детей дошкольного возраста с ОРВИ и гриппом (Me [Q₂₅; Q₇₅])Table 4. Analysis of nonspecific LPO – AOD system activity in preschool children with respiratory acute viral infections and influenza (Me [Q₂₅; Q₇₅])

Параметры Parameters	Контрольная группа Control (n = 27)	ОРВИ ARVI (n = 28)	Грипп Influenza (n = 31)
Дв.св., усл.ед. Double bounds, units	1,92 [1,66; 2,18]	2,30 [1,72; 2,96]*	2,04 [1,28; 2,56]
ДК, мкмоль/л CD, μ mol/L	0,96 [0,78; 1,38]	1,00 [0,65; 1,38]	2,29 [1,11; 2,85]**
КД и СТ, усл.ед. KD and CT, units	0,34 [0,22; 0,62]	0,30 [0,15; 0,41]	0,48 [0,36; 0,88]**
ТБК-активные продукты, мкмоль/л TBA-active products, μ mol/L	0,82 [0,62; 1,03]	1,64 [1,13; 2,36]*	1,23 [0,94; 2,15]**
ШО, усл.ед. SB, units	0,05 [0,04; 0,06]	0,05 [0,04; 0,10]	0,05 [0,03; 0,10]
Общая антиокислительная активность, усл.ед. Total antioxidant activity, units	18,42 [14,98; 26,81]	10,00 [8,16; 12,39]*	13,41 [9,89; 16,21]**
Активность СОД, усл.ед. SOD activity, units	1,56 [1,46; 1,59]	1,38 [1,20; 1,51]	1,61 [1,55; 1,73]**
α -токоферол, мкмоль/л α -tocopherol, μ mol/l	8,73 [6,61; 10,74]	7,09 [6,28; 8,50]*	5,78 [4,05; 7,61]**
Ретинол, мкмоль/л Retinol, μ mol/l	1,32 [1,14; 2,20]	1,00 [0,84; 1,30]*	0,56 [0,47; 0,74]**
GSH, ммоль/л mmol/l	2,51 [2,22; 2,66]	2,25 [1,99; 2,38]*	2,41 [2,22; 2,80]
GSSG, ммоль/л mmol/l	1,85 [1,68; 2,46]	1,83 [1,62; 2,08]	2,41 [2,03; 2,63]**

Примечание. * — статистически значимые различия между контрольной группой и группой с ОРВИ; ** — статистически значимые различия между контрольной группой и группой с гриппом.

Note. * — significant differences between control and ARVI group; ** — significant differences between control and influenza group.

ляемость, вялость, слабость, головную боль, головокружение, общее недомогание) и в целом имеет преобладающий характер при гриппе в дошкольном возрасте.

Оценка лабораторных показателей в целом не показала значимых различий в группах, за исключением сниженного уровня моноцитов и высоких значений АСТ у детей с гриппом. В данном случае можно говорить о развитии лейкопенического синдрома, сниженном уровне лейкоцитов за счет снижения уровня моноцитов. Более выраженные изменения были зарегистрированы у детей с гриппом в отношении показателя печеночного фермента — АСТ. Данный показатель значительно повышался также относительно общепринятых нормативов в данном возрасте [11, 13].

Изменения в цитокиновом профиле у детей обеих клинических групп, как с ОРВИ, так и с гриппом, сопровождалось ростом значений всех показателей, как провоспалительного, так и противовоспалительного характера, в сравнении с контрольными значениями. Дети дошкольного возраста, как известно, находятся в четвертом критическом периоде становления системы иммунитета, который характеризуется определенными значениями, отчасти присущими уже взрослому возрасту [16]. К настоящему времени накоплен достаточно большой массив данных в изучении цитокинового профиля при вирусных инфекциях у детей [13]. Установлено, что цитокиновый ответ напрямую влияет на клиническое течение вирусной инфекции у детей вне зависимости от возраста [27]. Так, повышение в крови концентраций $\text{TNF}\alpha$ и IL-6 являлось маркером тяжелого течения пандемического гриппа А(Н1N1)pdm09 у подростков [9]. Пандемический грипп у детей, осложненный пневмонией, сопровождался повышенным синтезом противовоспалительных медиаторов — $\text{IL-1}\beta$, $\text{TNF}\alpha$. Данным маркерам также отводилась ведущая роль в развитии цитокинового шторма при гриппе [22]. При гриппе, вызванном вирусом гриппа А, наблюдалась продукция цитокинов с преобладанием Th2 воспаления, увеличенной оказалась продукция IL-4 , чего нельзя отметить при гриппе В [29]. Было отмечено также, что у детей с гриппом средней степени тяжести в крови повышено содержание IL-1 , IL-4 , IL-10 на фоне снижения $\text{IFN}\gamma$ [4].

Интерфероны являются цитокинами врожденной резистентности и имеют первостепенное значение в противовирусной защите [13]. В нашем исследовании было зарегистрировано увеличение содержания ряда цитокинов относительно контроля у детей обеих групп. При этом особого внимания заслуживает значительный рост концентраций IL-6 и IL-8 . IL-6 как ранний медиатор воспаления продуцируется макрофа-

гами, активированными Т- и В-лимфоцитами, активно участвует в созревании, преобразовании В-лимфоцитов в плазматические клетки, секретирующие иммуноглобулины [9]. IL-8 относится к семейству хемокинов, синтезируется моноцитами, лимфоцитами, гранулоцитами, участвует в активации нейтрофилов, усилении хемотаксиса, повышении экспрессии рецепторов к комплементу [30]. Высокие концентрации данного цитокина приводят к активации миграции клеток иммунной системы в очаги повреждения при развитии воспалительно-деструктивных явлений [9]. В обеих группах детей содержание уровней IL-6 и IL-8 значительно превышало нормативные значения [13].

Заслуживают внимания также высокие концентрации СРБ у детей с ОРВИ и гриппом. СРБ, как известно, является одним из основных маркеров воспаления, а его образование повышается при действии IL-1 , IL-6 , $\text{TNF}\alpha$ на гепатоциты при повреждениях тканей различной этиологии [7]. Подобные результаты также были получены в ряде исследований [9, 15]. Данный факт объяснялся развитием острого воспалительного процесса при вирусной инфекции.

По данным литературы известно, что интерфероны являются наиболее важными цитокинами в противовирусном иммунном ответе. Так, α -интерфероны тормозят репликацию вирусов, а роль γ -интерферонов реализуется в виде стимуляции фагоцитоза, направленного на инфицированные клетки, бактерии, на стимуляцию антителообразования [2, 27]. По мнению многих исследователей, активность продукции $\text{IFN}\gamma$ имеет важное значение в развитии эффективности специфических иммунных реакций в детском возрасте [4]. В нашем исследовании была выявлена повышенная концентрация $\text{IFN}\gamma$ и $\text{IFN}\alpha$, особенно выраженная при гриппе. Физиологический сдвиг популяционного состава лимфоцитов в сторону Th2, а также активация наряду с провоспалительным противовоспалительного иммунологического ответа могут обеспечивать определенные компенсаторно-приспособительные резервы у детей дошкольного возраста, соответственно — отсутствие перехода заболевания в более тяжелые формы [8].

Согласно нашим данным, изменения в неспецифической системе «ПОЛ — АОЗ» у детей обеих групп носили выраженный прооксидантный характер с развитием дефицитов основных факторов защиты. Выяснено, что основные симптомы при заболеваниях гриппозной и негриппозной природы возникают вследствие цитопатического воздействия на клетки эпителия, выстилающего дыхательные пути, а также высвобождения иммуноактивных посредников, запускающих каскад событий, направленных на ликвидацию вируса [26].

Активные формы кислорода (АФК) считаются ответственными за многие патологические изменения, возникающие при респираторных инфекциях [28]. Установлено, что определенные подтипы вирусов гриппа индуцируют различную экспрессию провоспалительных генов, которые, в свою очередь, определяют тяжесть заболевания [31]. Активация провоспалительных стадий приводит к реакциям прооксидантного характера. Среди молекулярных мишеней АФК особенно уязвимыми считаются липидные компоненты биомембран клеток [12]. Реакции ПОЛ могут существенно изменить физико-химические свойства бислоя мембранных липидов, что приводит к тяжелой клеточной дисфункции. Так, реакции перекисного повреждения липидов могут иметь значимость в патогенезе гриппозной инфекции при выраженном дефиците антиоксидантных компонентов, что наблюдалось в нашем исследовании.

В условиях ОРВИ у детей отмечалась сниженная концентрация ретинола, α -токоферола, а также общей АОА, GSH, активности СОД. Витамины считаются ведущими факторами защиты от респираторных инфекций. Было выяснено, что добавки витамина Е мышам, инфицированным H1N1, значительно снижали концентрацию продуктов ПОЛ (сопряженных диенов и МДА) и увеличивали время выживания животных [21]. Сообщалось также, что добавление витамина Е эффективно в плане снижения репликации H3N2 у мышей C57BL/6N1A [23].

Глутатион является основным свободным тиолом в большинстве клеток организма, субстратом для глутатион-зависимых ферментов (глутатионпероксидазы и глутатион-S-трансферазы) и ключевым антиоксидантом животных клеток [32]. Проявления его противогриппозной активности отмечены как *in vitro*, так и *in vivo* исследованиях [18]. Так, добавка GSH ингибировала экспрессию белка вирусного матрикса в дыхательных путях эпителиальных клеток человека, а также клетках почек, инфицированных A/X-31 штаммом вируса гриппа [18]. У мышей BALB/c включение в рацион GSH снижало вирусную нагрузку в гомогенатах легких и трахеи через четыре дня после интраназальной инокуляции штамма гриппа A/X-31 [19].

СОД является ключевым ферментом, обеспечивающим врожденный антиоксидантный ответ за счет обезвреживания активных форм кислорода на первичных этапах [10]. Дисбаланс в системе ПОЛ — АОЗ, регулирующий уровень АФК, являлся одним из основных факторов, которые усугубляли инфекцию IAV и повреждение клеток [23].

Интересным представлялся анализ функциональных взаимосвязей параметров цито-

кинового профиля и ПОЛ — АОЗ с клинико-лабораторными показателями. Многообразием зависимостей отличалась группа с ОРВИ, причем наибольшее число цитокинов было связано с показателем кетонов в моче. Кетоновые тела образуются в результате окисления неэстерифицированных или свободных жирных кислот печенью и используются в качестве источника энергии многими тканями в периоды дефицита глюкозы, являются метаболитами липидов, в частности продуктом β -окисления [1]. Показано, что накопление кетоновых тел может оказывать негативное воздействие, но в то же время и иметь протективный эффект за счет провоспалительного действия, усиления окислительной функции митохондрий, увеличения производства АТФ. Отмечено снижение образования свободных радикалов, улучшение работы комплекса дыхательной цепи митохондрий [1].

В группе с ОРВИ примечательными являлись также взаимосвязи конечных токсичных продуктов липопероксидации — ШО — с показателем интоксикации, а также наличие защитных механизмов в виде связей интерферонов с клиническими проявлениями заболевания. Группа с гриппом отличалась наличием зависимостей протективного характера, что может иметь благоприятный эффект в условиях развития патологического процесса.

Заключение

Таким образом, у детей дошкольного возраста с ОРВИ и гриппом изменения в цитокиновом профиле сопровождаются ростом про- и противовоспалительных цитокинов, повышенной интенсивностью реакций липопероксидации, сниженными значениями антиоксидантных факторов, а также наличием взаимосвязей с клиническими проявлениями заболевания. Группа с гриппом отличалась наличием зависимостей протективного характера, что может иметь благоприятный эффект в условиях развития патологического процесса. Полученные результаты могут способствовать более точной оценке течения респираторных инфекций у детей дошкольного возраста, что должно являться важной составляющей в профилактике осложнений.

Благодарности

Авторы статьи выражают благодарность администрации и врачам Иркутской областной инфекционной клинической больницы, администрации Ивано-Матренинской детской городской клинической больницы и лично Ильюшиной Т.С. за помощь в проведении исследования.

Список литературы/References

1. Бобылова М.Ю., Новячкова Е.И., Романовская К.С., Мухина Л.Н., Мухин К.Ю. Роль кетогенной диеты при эпилепсии. Краткая литературная справка и клинический пример // Русский журнал детской неврологии. 2023. Т. 18, № 1. С. 57–64. [Bobylova M.Yu., Novyachkova E.I., Romanovskaya K.S., Mukhina L.N., Mukhin K.Yu. The role of the ketogenic diet in epilepsy. Brief literary reference and clinical example. *Russkii zhurnal detskoi neurologii = Russian Journal of Child Neurology*, 2023, vol. 18, no. 1, pp. 57–64. (In Russ.)]
2. Верткин А.Л., Кнорринг Г.Ю. Комбинированная терапия гриппа на амбулаторном этапе // Поликлиника. 2021. № 1. С. 87–90. [Vertkin A.L., Knorring G.Ju. Combination therapy of influenza at the outpatient stage. *Poliklinika = Poliklinika*, 2021, no. 1, pp. 87–90. (In Russ.)]
3. Волчегорский И.А., Налимов А.Г., Яровинский Б.Г., Лившиц В.И. Сопоставление различных подходов к определению продуктов перекисного окисления липидов в гептан-изопропанольных экстрактах крови // Вопросы медицинской химии. 1989. Т. 35, № 1. С. 127–131. [Volchegorskiy I.A., Nalimov A.G., Yarovinskiy B.G., Livshits V.I. Comparison of different approaches to the determination of lipid peroxidation products in heptane-isopropanol extracts of blood. *Voprosy meditsinskoi khimii = Medicinal Chemistry Issues*, 1989, vol. 35, no. 1, pp. 127–131. (In Russ.)]
4. Головачева Е.Г., Афанасьева В.С., Осидак Л.В., Афанасьева О.И., Образцова Е.В., Королева Е.Г., Тимченко В.Н. Особенности динамики иммунного ответа при гриппе у детей на фоне интерферонотерапии // Детские инфекции. 2017. Т. 16, № 1. С. 7–12. [Golovacheva E.G., Afanasyeva V.S., Osidak L.V., Afanasyeva O.I., Obratsova E.V., Koroleva E.G., Timchenko V.N. The dynamics of the immune response to influenza in children treated with interferon. *Detskie infektsii = Children Infections*, 2017, vol. 16, no. 1, pp. 7–12. (In Russ.)]
5. Даренская М.А., Колесникова Л.И., Колесников С.И. COVID-19: окислительный стресс и актуальность антиоксидантной терапии // Вестник Российской академии медицинских наук. 2020. Т. 75, № 4. С. 318–325. [Darenskaya M.A., Kolesnikova L.I., Kolesnikov S.I. COVID-19: oxidative stress and the relevance of antioxidant therapy. *Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk = Herald of the Russian Academy of Sciences*, 2020, vol. 75, no. 4, pp. 318–325. (In Russ.)] doi: 10.15690/vramn1360
6. Даренская М.А., Колесникова Л.И., Колесников С.И. Свободнорадикальные реакции при социально значимых инфекционных заболеваниях: ВИЧ-инфекции, гепатитах, туберкулезе // Вестник Российской академии медицинских наук. 2020. Т. 75. № 3. С. 196–203. [Darenskaya M.A., Kolesnikova L.I., Kolesnikov S.I. Free radical reactions in socially significant infectious diseases: HIV infection, hepatitis, tuberculosis. *Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk = Herald of the Russian Academy of Sciences*, 2020, vol. 75, no. 3, pp. 196–203. (In Russ.)] doi: 10.15690/vramn1328
7. Даренская М.А., Рычкова Л.В., Колесников С.И., Семенова Н.В., Никитина О.А., Лесная А.С., Колесникова Л.И. Показатели окислительного повреждения ДНК, белков и С-реактивного белка у девушек и юношей с экзогенно-конституциональным ожирением // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2023. Т. 176, № 9. С. 307–311. [Darenskaya M.A., Rychkova L.V., Kolesnikov S.I., Semenova N.V., Nikitina O.A., Lesnaya A.S., Kolesnikova L.I. Oxidative damage of dna, proteins and c-reactive protein parameters in girls and boys with exogenous constitutional obesity. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2023, vol. 176, no. 9, pp. 307–311. (In Russ.)] doi: 10.47056/0365-9615-2023-176-9-307-311
8. Еженедельный национальный бюллетень по гриппу и ОРВИ за 47 неделю 2023 года (20.11.23–26.11.23) [National weekly influenza bulletin of the Russian Federation week 47 of 2023 (20.11.23–26.11.23)] URL: https://www.influenza.spb.ru/import/2023_47_ld_ru/index.pdf
9. Иванов В.В., Шипилов М.В. Провоспалительные цитокины и их значение при гриппе рН1N1 // Медицинский вестник Северного Кавказа. 2012. Т. 28, № 4. С. 70–72. [Ivanov V.V., Shipilov M.V. Proinflammatory cytokines and their significance in рН1N1 influenza. *Meditsinskii vestnik Severnogo Kavkaza = Medical Bulletin of the North Caucasus*, 2012, vol. 28, no. 4, pp. 70–72. (In Russ.)]
10. Колесникова Л.И., Даренская М.А., Колесников С.И. Свободнорадикальное окисление: взгляд патофизиолога // Бюллетень сибирской медицины. 2017. Т. 16, № 4. С. 16–29. [Kolesnikova L.I., Darenskaya M.A., Kolesnikov S.I. Free radical oxidation: a pathophysiological view. *Byulleten' sibirskoi meditsiny = Bulletin of Siberian Medicine*, 2017, vol. 16, no. 4, pp. 16–29. (In Russ.)] doi: 10.20538/1682-0363-2017-4-16-29
11. Петрова А.Г., Рычкова Л.В., Ваняркина А.С., Келешева И.Ю., Москалева Е.В., Новикова Е.А. Клинико-лабораторные характеристики гриппа у детей с ожирением // Вопросы практической педиатрии. 2020. Т. 15, № 4. С. 8–14. [Petrova A.G., Rychkova L.V., Vanyarkina A.S., Kelesheva I.Yu., Moskaleva E.V., Novikova E.A. Clinical and laboratory characteristics of influenza in obese children. *Voprosy prakticheskoy pediatrii = Clinical Practice in Pediatrics*, 2020, vol. 15, no. 4, pp. 8–14. (In Russ.)] doi: 10.20953/1817-7646-2020-4-8-14
12. Рычкова Л.В., Даренская М.А., Петрова А.Г., Семенова Н.В., Москалева Е.В., Колесников С.И., Ваняркина А.С., Колесникова Л.И. Взаимосвязь отдельных показателей иммунного статуса с активностью системы «липидпероксидация — антиоксидантная защита» у новорожденных с COVID-19 // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 3. С. 497–505. [Rychkova L.V., Darenskaya M.A., Petrova A.G., Semenova N.V., Moskaleva E.V., Kolesnikov S.I., Vanyarkina A.S., Kolesnikova L.I. A relation between specific immune status indicators and activity of “lipid peroxidation — antioxidant defense” system in COVID-19 neonates. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2023, vol. 13, no. 3, pp. 497–505. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-ARB-8057
13. Рябиченко Т.И., Скосырева Г.А., Обухова О.О., Митрофанов И.М., Тимофеева Е.П., Карцева Т.В., Курская О.Г. Изучение продукции некоторых цитокинов при вирусных инфекциях, протекающих с диарейным синдромом у де-

- тей // Детские инфекции. 2020. Т. 19, № 4. С. 12–18. [Ryabichenko T.I., Skosyreva G.A., Obukhova O.O., Mitrofanov I.M., Timofeeva E.P., Kartseva T.V., Kurskaya O.G. Study of the production of certain cytokines in viral infections occurring with diarrheal syndrome in children. *Detskie infektsii = Children Infections*, 2020, vol. 19, no. 4, pp. 12–18. (In Russ.)] doi: 10.22627/2072-8107-2020-19-4-12-18
14. Черняускене Р.Ч., Варшкявичене З.З., Грибаускас П.С. Одновременное определение концентрации витаминов Е и А в сыворотке крови // Лабораторная работа. 1984. Т. 6. С. 362–365. [Chernyauskene R.C., Varshkevichene Z.Z., Grybauskas P.S. Simultaneous determination of the concentration of vitamins E and A in blood serum. *Laboratornaya delo = Laboratory Science*, 1984, vol. 6, pp. 362–365. (In Russ.)]
 15. Шарипова Е.В., Орлова Е.Д., Бабаченко И.В., Козырев Е.А., Тянь Н.С. Клинико-лабораторные особенности острых респираторных вирусных инфекций у госпитализированных детей // Детские инфекции. 2022. Т. 21, № 2. С. 5–10. [Sharipova E.V., Orlova E.D., Babachenko I.V., Kozyrev E.A., Tyan N.S. Clinical and laboratory features of acute respiratory viral infections in hospitalized children. *Detskie infektsii = Children Infections*, 2022, vol. 21, no. 2, pp. 5–10. (In Russ.)] doi: 10.22627/2072-8107-2022-21-2-5-10
 16. Щеплягина Л.А., Круглова И.В. Возрастные особенности иммунитета у детей // Русский медицинский журнал. 2009. Т. 17, № 23. С. 1564–1569. [Shcheplyagina L.A., Kruglova I.V. Age-related features of immunity in children. *Russkii meditsinskii zhurnal = Russian Medical Journal*, 2009, vol. 17, no. 23, pp. 1564–1569. (In Russ.)]
 17. Aydin O., Kaynak M.O., Sabuncuoglu S., Girgin G., Oygur P.D., Ozsurekci Y., Teksam O. The Effects of COVID-19 on Oxidative Stress and Antioxidant Defense Mechanism in Children. *J. Pediatr. Infect. Dis.*, 2022, vol. 17, no. 2, pp. 112–118. doi: 10.1055/s-0042-1743577
 18. Cai J., Chen Y., Seth S., Compans R.W., Jones D.P. Inhibition of influenza infection by glutathione. *Free Radic. Biol. Med.*, 2003, vol. 34, no. 7, pp. 928–936. doi: 10.1016/s0891-5849(03)00023-6
 19. Chen K.K., Minakuchi M., Wuputra K., Ku C.C., Pan J.B., Kuo K.K., Lin Y.C., Saito S., Lin C.S., Yokoyama K.K. Redox control in the pathophysiology of influenza virus infection. *BMC Microbiol.*, 2020, vol. 20, no. 1: 214. doi: 10.1186/s12866-020-01890-9
 20. Curatola A., Chiaretti A., Ferretti S., Bersani G., Lucchetti D., Capossela L., Gatto A. Cytokine response to SARS-CoV-2 infection in children. *Viruses*, 2021, vol. 13, no. 9: 1868. doi: 10.3390/v13091868
 21. Erkekoğlu P., Aşçı A., Ceyhan M., Kızılgün M., Schweizer U., Ataş C., Kara A., Koçer Giray B. Selenium levels, selenoenzyme activities and oxidant/antioxidant parameters in H1N1-infected children. *Turk. J. Pediatr.*, 2013, vol. 55, no. 3, pp. 271–282.
 22. Hagau N., Slavcovic A., Gongnanu D.N., Oltean S., Dirzu D.S., Brezozski E.S., Maxim M., Ciuce C., Mlesnite M., Gavrus R.L., Laslo C., Hagau R., Petrescu M., Studnicska D.M. Clinical aspects and cytokine response in severe H1N1 influenza A virus infection. *Critical Care Medicine*, 2010, vol. 14, no. 6: R203. doi: 10.1186/cc9324
 23. Haque M.M., Murale D.P., Lee J.S. Role of microRNA and oxidative stress in influenza A virus pathogenesis. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, vol. 21, no. 23: 8962. doi: 10.3390/ijms21238962
 24. Hisin P.J., Hilf R. Fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal. Biochem.*, 1976, vol. 74, pp. 214–226. doi: 10.1016/0003-2697(76)90326-2
 25. Hosakote Y.M., Rayavara K. Respiratory syncytial virus-induced oxidative stress in lung pathogenesis. In: *Oxidative Stress in Lung Diseases*. Eds. Chakraborti S., Parinandi N., Ghosh R., Ganguly N., Chakraborti T. *Singapore: Springer*, 2020, pp. 297–330. doi: 10.1007/978-981-32-9366-3_13
 26. Kelekçi S., Evliyaoğlu O., Şen V., Yolbaş I., Uluca Ü., Tan I., Gürkan M.F. The relationships between clinical outcome and the levels of total antioxidant capacity (TAC) and coenzyme Q (CoQ10) in children with pandemic influenza (H1N1) and seasonal flu. *European Review for Medical & Pharmacological Sciences*, 2012, vol. 16, no. 8, pp. 1033–1038.
 27. Lai C., Wang X., Yang P. Cytokines network and influenza virus infection. *Clin. Microbiol.*, 2014, vol. 3, iss. 3: 1000147. doi: 10.4172/2327-5073.1000147
 28. Liu M., Chen F., Liu T., Chen F., Liu S., Yang J. The role of oxidative stress in influenza virus infection. *Microbes Infect.*, 2017, vol. 19, no. 12, pp. 580–586. doi: 10.1016/j.micinf.2017.08.008
 29. Masatoki S., Mitsuaki H., Peter F.W. Differences in serum cytokine levels between influenza virus A and B infections in children. *Cytokine*, 2009, vol. 47, no. 1, pp. 65–68. doi: 10.1016/j.cyto.2009.05.003
 30. Matsushima K., Yang D., Oppenheim J.J. Interleukin-8: an evolving chemokine. *Cytokine*, 2022, vol. 153: 155828. doi: 10.1016/j.cyto.2022.155828
 31. Qiao M., Moyes G., Zhu F., Li Y., Wang X. The prevalence of influenza bacterial co-infection and its role in disease severity: a systematic review and meta-analysis. *J. Glob. Health*, 2023, vol. 13: 04063. doi: 10.7189/jogh.13.04063
 32. Rychkova L.V., Darenskaya M.A., Petrova A.G., Semenova N.V., Moskaleva E.V., Kolesnikov S.I., Vanyarkina A.S., Kolesnikova L.I. Pro- and antioxidant status in newborn with COVID-19. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2023, vol. 174, no. 4, pp. 464–467. doi: 10.1007/s10517-023-05730-4
 33. Shapiro A., Marinsek N., Clay I., Bradshaw B., Ramirez E., Min J., Trister A., Wang Y., Althoff T., Foschini L. Characterizing COVID-19 and Influenza Illnesses in the Real World via Person-Generated Health Data. *Patterns (NY)*, 2020, vol. 2, no. 1: 100188. doi: 10.1016/j.patter.2020.100188
 34. To E.E., Erlich J.R., Liang F., Luong R., Liang S., Esaq F., Oseghale O., Anthony D., McQualter J., Bozinovski S., Vlahos R., O’Leary J.J., Brooks D.A., Selemidis S. Mitochondrial Reactive Oxygen Species Contribute to Pathological Inflammation During Influenza A Virus Infection in Mice. *Antioxid Redox Signal.*, 2020, vol. 32, no. 13, pp. 929–942. doi: 10.1089/ars.2019.7727
 35. Vittucci A.C., Piccioni L., Coltella L., Ciarlito C., Antilici L., Bozzola E., Midulla F., Palma P., Perno C.F., Villani A. The Disappearance of Respiratory Viruses in Children during the COVID-19 Pandemic. *Int. J. Environ. Res. Public Health.*, 2021, vol. 18, no. 18: 9550. doi: 10.3390/ijerph18189550

36. Wang X., Li Y., O'Brien K.L., Madhi S.A., Widdowson M.A., Byass P., Omer S.B., Abbas Q., Ali A., Amu A., Azziz-Baumgartner E., Bassat Q., Abdullah Brooks W., Chaves S.S., Chung A., Cohen C., Echavarria M., Fasce R.A., Gentile A., Gordon A., Groome M., Heikkinen T., Hirve S., Jara J.H., Katz M.A., Khuri-Bulos N., Krishnan A., de Leon O., Lucero M.G., McCracken J.P., Mira-Iglesias A., Mo'isi J.C., Munywoki P.K., Ourohiré M., Polack F.P., Rahi M., Rasmussen Z.A., Rath B.A., Saha S.K., Simões E.A., Sotomayor V., Thamthitawat S., Treurnicht F.K., Wamukoya M., Yoshida L.M., Zar H.J., Campbell H., Nair H.; Respiratory Virus Global Epidemiology Network. Global burden of respiratory infections associated with seasonal influenza in children under 5 years in 2018: a systematic review and modelling study. *Lancet Glob. Health*, 2020, vol. 8, no. 4, pp. e497–e510. doi: 10.1016/S2214-109X(19)30545-5

Авторы:

Даренская М.А., д.б.н., профессор РАН, главный научный сотрудник лаборатории патофизиологии ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск, Россия;

Казанцева Е.Д., врач-педиатр, младший научный сотрудник лаборатории инфектологии и иммунопрофилактики в педиатрии ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск, Россия;

Петрова А.Г., д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории инфектологии и иммунопрофилактики в педиатрии ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск, Россия;

Рычкова Л.В., член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор, директор ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск, Россия;

Колесников С.И., академик РАН, д.м.н., профессор, главный научный сотрудник ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск, Россия;

Семенова Н.В., д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории патофизиологии ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск, Россия;

Курашова Н.А., д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории патофизиологии ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск, Россия;

Лесная А.С., к.б.н., младший научный сотрудник лаборатории патофизиологии ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск, Россия;

Шолохов Л.Ф., д.м.н., главный научный сотрудник лаборатории физиологии и патологии эндокринной системы ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск, Россия;

Колесникова Л.И., академик РАН, д.м.н., профессор, научный руководитель ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск, Россия.

Authors:

Darenskaya M.A., DSc (Biology), Professor of the RAS, Leading Researcher, Laboratory of Pathophysiology, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation;

Kazantseva E.D., Pediatrician, Junior Researcher, Laboratory of Infectology and Immunoprophylaxis, Pediatrics Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation;

Petrova A.G., DSc (Medicine), Professor, Leading Researcher, Laboratory of Infectology and Immunoprophylaxis in Pediatrics, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation;

Rychkova L.V., RAS Corresponding Member, DSc (Medicine), Professor, Director of the Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation;

Kolesnikov S.I., RAS Full Member, DSc (Medicine), Professor, Head Researcher, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation;

Semenova N.V., DSc (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Pathophysiology, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation;

Kurashova N.A., DSc (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Pathophysiology, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation;

Lesnaya A.S., PhD (Biology), Junior Researcher, Laboratory of Pathophysiology, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation;

Sholokhov L.F., DSc (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Pathophysiology, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation;

Kolesnikova L.I., RAS Full Member, DSc (Medicine), Professor, Scientific Director, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation.

ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ ЛЕЙКОЦИТАРНОЙ ФОРМУЛЫ КРОВИ В ПЕРИОД ПАНДЕМИИ

С.Н. Костарев^{1,2,3}, Т.Г. Середа¹

¹ Пермский государственный аграрно-технологический университет им. акад. Д.Н. Прянишникова, г. Пермь, Россия

² Пермский национальный исследовательский политехнический университет, г. Пермь, Россия

³ Пермский институт ФСИН России, г. Пермь, Россия

Резюме. *Актуальность.* Возможность зоонозной передачи высокопатогенных штаммов коронавируса человека не вызывала большой обеспокоенности у медицинских работников, что стало неожиданностью и привело к пандемии, вызванной коронавирусной инфекцией, весной 2020 г. Осенью 2023 г. наблюдалось увеличение количества инфицированных коронавирусом людей. В 2024 г. наблюдаются вспышки гриппа, характеризующиеся волновым изменением температуры, что может говорить о появлении нового штамма вируса. В настоящее время представляет интерес изучение последствий влияния новой коронавирусной инфекции на иммунную систему человека. К настоящему времени были изучены отдельные параметры лейкоцитарной формулы крови, но совокупному воздействию уделено недостаточно внимания, в связи с тем, что многие показатели ведут себя неоднозначно и не было возможности определить суммарное воздействие на иммунную систему. Целью работы является исследование моделей, описывающих динамику изменения показателей иммунограмм в период пандемии у детей и подростков, проживающих в Пермском крае. Задачи исследований заключались в анализе дифференциальных уравнений, описывающих изменение параметров иммунограмм; обобщении результатов исследований по деструкции иммунитета в результате воздействия коронавирусной инфекции. *Результаты.* Исследованы дифференциальные уравнения на экстремум и определены возрастные параметры пациентов, имеющие наибольшее отклонение показателей от референтного интервала. *Заключение.* Несмотря на то что отдельные элементы проточного цитофотометрического анализа носят колебательный характер с большими импульсами, обобщение показателей проточного цитофотометрического анализа (ПЦФМ) показало интересную картину, характеризующуюся плавным изменением в сторону увеличения отклонения у старшего подросткового возраста при всех исследуемых параметрах. Показатели ПЦФМ, находящиеся в референтном интервале, имели одинаковое направление в сторону отрицательного отклонения с увеличением возраста с тем отличием, что в состоянии болезни отклонение было в 2 раза больше. В состоянии отсутствия заболевания превышение показателей ПЦФМ имело положительную тенденцию с увеличением возраста, а понижение показателей ПЦФМ от референтного интервала имело отрицательную тенденцию. В состоянии заболевания при пониженных иммуноглобулинах при превышении референтного интервала ПЦФМ наблюдается выпуклое отклонение в отрицательную сторону при увеличении возраста. При понижении от референтного интервала наблюдается выпуклая кривая с положительным отклонением. При повышенных иммуноглобулинах при превышении референтного интервала ПЦФМ имеет выгнутое положительное отклонение, при понижении референтного интервала ПЦФМ также имеет выгнутое положительное отклонение, превышающее почти в 5 раз.

Ключевые слова: коронавирус, SARS-CoV-2, иммунограмма, проточный цитофотометрический анализ, лейкоциты, системный анализ.

Адрес для переписки:

Костарев Сергей Николаевич
614990, Россия, г. Пермь, ул. Петропавловская, 23,
Пермский ГАТУ им. акад. Д.Н. Прянишникова.
Тел.: 8 (906) 878-39-29. E-mail: iums@dom.raid.ru

Contacts:

Sergey N. Kostarev
614990, Russian Federation, Perm, Petropavlovskaja str., 23,
Perm State Agrarian-Technological University named after
academician D.N. Prianishnikov.
Phone: +7 (906) 878-39-29. E-mail: iums@dom.raid.ru

Для цитирования:

Костарев С.Н., Середа Т.Г. Исследование изменений лейкоцитарной формулы крови в период пандемии // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 4. С. 731–739. doi: 10.15789/2220-7619-ALB-17608

Citation:

Kostarev S.N., Sereda T.G. Altered leukocyte blood count in COVID-19 pandemic period // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 4, pp. 731–739. doi: 10.15789/2220-7619-ALB-17608

ALTERED LEUKOCYTE BLOOD COUNT IN COVID-19 PANDEMIC PERIOD

Kostarev S.N.^{a,b,c}, Sereda T.G.^a

^a Perm State Agrarian-Technological University named after academician D.N. Prianishnikov, Perm, Russian Federation

^b Perm National Research Polytechnic University, Perm, Russian Federation

^c Perm Institute of the FPS of Russia, Perm, Russian Federation

Abstract. Relevance. A potential for zoonotic transmission of highly pathogenic coronavirus strains to humans was of little concern to health care providers, which came as a surprise and led to a coronavirus pandemic in 2020 spring. In 2023 fall, there was higher number of humans infected with coronavirus infection. In 2024, influenza outbreaks characterized by wave-like temperature changes are observed, which may indicate the emergence of a new virus strain. Currently, it is of interest to study the effects related to novel coronavirus infection on human immune system. To date, the immune responses for individual parameters from leukocyte blood formula have been studied, but insufficient attention has been paid to the cumulative impact, due to the fact that many parameters behave ambiguously and it has not been possible to determine the cumulative impact on the immunogram. The aim of the study is to investigate models describing the dynamics in immunogram changes during the pandemic in adolescents living in Perm Krai. The objectives were to analyze differential equations describing a change in immunogram parameters; to summarize study results on impaired immunity due to exposure to coronavirus infection. **Results.** Differential equations were analyzed and the extremum and age patient parameters with the greatest deviation from the reference interval were determined. **Conclusion.** Despite the fact that individual elements of flow cytophotometric analysis are oscillatory in nature with large impulses, the generalization of flow cytophotometric analysis indices showed an interesting pattern characterized by a smooth change towards increasing deviation in older adolescence for all studied parameters. Flow cytophotometric analysis indices being within the reference range had the same modality towards negative trend with increasing age only differed by the fact that in the disease state the deviation was twice as large. Without disease, the excess of flow cytophotometric analysis indicators had a positive trend with increasing age, and the decrease of flow cytophotometric analysis indicators from the reference interval had a negative trend. In the disease state with decreased immunoglobulins, when flow cytophotometric analysis exceeded the reference interval, there was a convex deviation in the negative direction with increasing age. When decreasing from the reference interval, a convex curve with a positive trend is observed. Upon elevated immunoglobulins exceeding the reference interval flow cytophotometric analysis has a convex positive trend, whereas for at lowering the reference interval flow cytophotometric analysis also has a convex positive trend exceeding 5 times.

Key words: coronavirus, SARS-CoV-2, immunogram, flow cytophotometric analysis, leukocytes, systemic analysis.

Введение

В настоящее время стали появляться новые инфекции, вызванные зоонозной передачей высокопатогенных штаммов вирусов. Особую проблему вызвал коронавирус. Коронавирусы (CoV) представляют собой группу одноцепочечных РНК-вирусов, инфицирующих различных позвоночных. Впервые они были обнаружены у человека в 1960-х гг. [8] и в основном вызывали легкие респираторные заболевания. Однако к ним относятся первый вирус атипичного тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV-1) в 2002 г. и коронавирус ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV) в 2012 г., которые характеризуются высокой смертностью от респираторных заболеваний. В декабре 2019 г. в провинции Wuhan (Ухань) КНР произошла мутация коронавируса SARS-CoV-1 и появился новый бетакоронавирус, получивший название SARS-CoV-2. Вопросы, связанные с лечением, профилактикой и вакцинацией населения, являются очень актуальными, в связи с чем было уделено большое внимание иммунному ответу. Оценке Т-клеточного иммунитета у переболевших COVID-19 и иммунного ответа по-

сле вакцинации посвящены исследования [5, 7]. Многочисленные исследования посвящены изучению иммунитета у детей во время пандемии [3, 4]. Также представляло интерес воздействие новой коронавирусной инфекции на пациентов, имеющих побочные заболевания. Иммунотерапевтические подходы к лечению и состояние липидтранспортной системы рассмотрены в работах [1, 9].

Материалы и методы

Материалом исследования служили иммунограммы пациентов в возрасте до 18 лет, проживающие в Пермском крае. План проведения эксперимента показан на рис. 1 и состоял в следующем: иммунограммы детей и подростков были предварительно сгруппированы на три возрастные интервала: до 3 лет, от 4 до 9 лет и до 17 лет. Далее в зависимости от иммуноглобулинов иммунограммы разделены на больных (С2) и здоровых детей (С1). В состоянии С1 изучалось отклонение параметров проточной цитофотометрии (ПЦФМ) крови пациентов от референтного интервала в обе стороны, а также находящихся в референтном интервале. Отличие измерений в состоянии С2

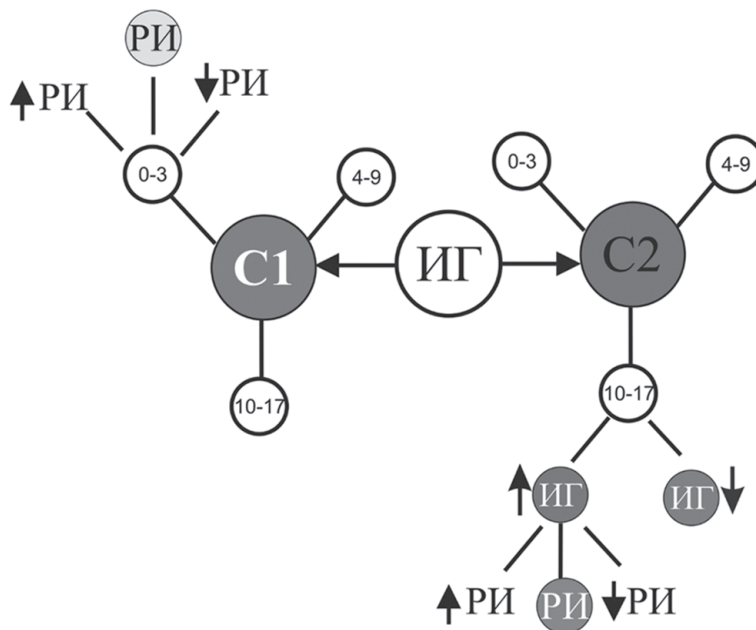


Рисунок 1. План проведения эксперимента

Figure 1. Experimental design

состояло в предварительной сортировке иммунограмм по отклонению иммуноглобулинов, таким образом формировались 2 массива, учитывающие повышение или понижение от референтного интервала. Исследования были проведены на базе медицинского учреждения «Философия красоты и здоровья». Построение иммунограмм выполнено на приборе Pab Taugus. Было проанализировано около 300 иммунограмм. Материалом для данных исследований являлись результаты, полученные в ранних публикациях [6, 10].

Результаты

Состояние иммунной системы человека может охарактеризовать иммунограмма. Иммунограмма обычно содержит три поля: массив иммуноглобулинов, поле иммунного статуса и поле показателей проточного цитометрического анализа. Рассмотрим подходы математического моделирования при описании системы модулей иммунограммы [6, 11].

Показатель иммуноглобулинов $\Delta\Theta(\text{ИГ})$ характеризуется отклонением параметров трех иммуноглобулинов ИГА, ИГГ и ИГМ:

$$\Delta\Theta(\text{ИГ}) = \frac{\partial\Theta}{\partial\text{ИГА}} \Delta\text{ИИА} + \frac{\partial\Theta}{\partial\text{ИГМ}} \Delta\text{ИИМ} + \frac{\partial\Theta}{\partial\text{ИГГ}} \Delta\text{ИИГ}. \quad (1)$$

Суммарный показатель отклонения лейкоцитарной формулы крови $\Delta N(t)$ от возраста пациента (t) описан параметрами проточной цитометрии:

$$\Delta N(t) = \frac{\partial n_1}{\partial t} \Delta t + \frac{\partial n_2}{\partial t} \Delta t + \frac{\partial n_3}{\partial t} \Delta t + \frac{\partial n_4}{\partial t} \Delta t + \frac{\partial n_5}{\partial t} \Delta t, \quad (2)$$

где n_1 — Лейкоциты, n_2 — Лимфоциты, n_3 — НК-клетки ($\text{CD16}^+\text{CD56}^+$), n_4 — Т-хелперы, n_5 — Индекс иммунорегуляции ($\text{CD4}^+\text{CD8}^+$).

Суммарное отклонение показателя фагоцитозов $\Delta F(t)$ описывается параметрами иммунного статуса:

$$\Delta F(t) = \frac{\partial f_1}{\partial t} \Delta t + \frac{\partial f_2}{\partial t} \Delta t + \frac{\partial f_3}{\partial t} \Delta t, \quad (3)$$

где f_1 — Абсолютное значение фагоцитоза; f_2 — Фагоцитарное число; f_3 — Фагоцитарный индекс.

В целом показатель иммунограммы $\Delta\Phi(\text{И})$ можно оценить по аддитивной функции отклонения параметров иммунограммы [8, 10]:

$$\Delta\Phi(\text{И}) = \frac{\Phi(N)^{PI} - \Phi(N)}{\Phi(N)^{PI}} + \frac{\Phi(\Theta)^{PI} - \Phi(\Theta)}{\Phi(\Theta)^{PI}} + \frac{\Phi(F)^{PI} - \Phi(F)}{\Phi(F)^{PI}}, \quad (4)$$

где PI — показатели референтного интервала.

В данном исследовании рассмотрены характерные параметры (2) цитометрического анализа плазмы крови пациентов.

В ранних исследованиях были получены зависимости полиномов отклонений Лейкоцитов, Лимфоцитов, НК-клеток, Т-хелперов, Индекса иммунорегуляции и других от возраста пациента и состояния болезни [6, 10]. В данной работе представлял интерес обобщенный показатель ПЦФМ.

На первом этапе проведено исследование для всех параметров ПЦФМ, находящихся в ре-

Таблица 1. Зависимости показателей при нахождении ПЦФМ и иммуноглобулинов в референтном интервале (РИ) (состояние С1)

Table 1. A relation between indices for flow cytophotometric analysis and immunoglobulin level within reference interval (RI) (state C1)

Показатель Indicator	Аппроксимационная функция Approximation function
$n_1(t)$	$\frac{\partial n_1}{\partial t} \Delta t = -18,18t^2 + 77,91t + 13,19$
$n_2(t)$	$\frac{\partial n_2}{\partial t} \Delta t = 40,37 \ln(t) + 51,44$
$n_3(t)$	$\frac{\partial n_3}{\partial t} \Delta t = -12,79 \ln(t) + 93,33$
$n_4(t)$	$\frac{\partial n_4}{\partial t} \Delta t = 69,74 \ln(t) + 16,62$
$n_5(t)$	$\frac{\partial n_5}{\partial t} \Delta t = -32,29t^2 + 14,81t - 93,76$
Суммарный показатель Total Score	$\Delta N(t) = -50,47t^2 + 92,72t + 97,32 \ln(t) + 80,82$

Таблица 2. Зависимости показателей ПЦФМ в состоянии С1 при превышении референтного интервала (\uparrow РИ)Table 2. A relation for flow cytophotometric analysis indicators at C1 state exceeding reference interval (\uparrow RI)

Показатель Indicator	Аппроксимационная функция Approximation function
$n_1(t)$	$\frac{\partial n_1}{\partial t} \Delta t = 30,9t^2 - 145,59t + 364,2e^{-1,61t} - 2,76 \ln(t) + 473$
$n_2(t)$	$\frac{\partial n_2}{\partial t} \Delta t = 24,81t^2 - 122,6t + 147,78$
$n_3(t)$	$\frac{\partial n_3}{\partial t} \Delta t = -2,76 \ln(t) + 6,07$
$n_4(t)$	$\frac{\partial n_4}{\partial t} \Delta t = 364,2e^{-1,61t}$
$n_5(t)$	$\frac{\partial n_5}{\partial t} \Delta t = 38,21t^2 - 188,49t + 231,52$
Суммарный показатель Total Score	$\Delta N(t) = 30,9t^2 - 145,59t + 364,2e^{-1,61t} - 2,76 \ln(t) + 473$

Таблица 3. Зависимости показателей ПЦФМ крови в состоянии С1 при \downarrow РИ*Table 3. A relation between blood flow cytophotometric analysis indicators in at C1 state for \downarrow RI*

Показатель Indicator	Аппроксимационная функция Approximation function
n_1	$\frac{\partial n_1}{\partial t} \Delta t = 1,665t - 1,6033$
n_2	$\frac{\partial n_2}{\partial t} \Delta t = 1,665t + 2,7167$
n_3	$\frac{\partial n_3}{\partial t} \Delta t = -4,625t^2 + 26,835t - 22,21$
n_4	$\frac{\partial n_4}{\partial t} \Delta t = -22,405t^2 + 91,285t - 68,88$
n_5	$\frac{\partial n_5}{\partial t} \Delta t = 36,517 \ln(t) + 0,1667$
Суммарный показатель Total Score	$\Delta N(t) = -27,03t^2 + 36,517 \ln(t) + 121,45t - 89,81$

Примечание. * \downarrow РИ — при понижении показателей от референтного интервала.Note. * \downarrow RI — when indicators decrease below reference interval.

Таблица 4. Зависимости показателей ПЦФМ в РИ при состоянии С2

Table 4. A relation between flow cytophotometric analysis indicators at C2 state within RI

Показатель Indicator	Зависимость Dependence	ИГА, ИГМ IgA, IgM	Status*
n_1	$\frac{\partial n_1}{\partial t} = 10,53t^2 - 31,57t + 21,05$	↓	РИ/RI
n_2	$\frac{\partial n_2}{\partial t} = -16,45t^2 + 74,34t - 32,89$		
n_3	$\frac{\partial n_3}{\partial t} = -50t^2 + 200t - 150$		
n_4	$\frac{\partial n_4}{\partial t} = -27,96t^2 + 121,38t - 80,92$		
n_5	$\frac{\partial n_5}{\partial t} = -26,65t^2 + 117,44t - 78,29$		
Суммарный показатель Total Score	$\Delta N(t) = -110,53t^2 + 481,59t - 321$		

Примечание. *РИ — референтный интервал.

Note. *RI — reference interval.

Таблица 5. Зависимости ↑РИ показателей ПЦФМ при состоянии С2

Table 5. A relation between ↑RI flow cytophotometric analysis indicators at C2 state

Показатель Indicator	Зависимость Dependence	ИГА, ИГМ IgA, IgM	Status*
n_1	$\frac{\partial n_1}{\partial t} = -43,75t^2 + 168,75t - 112,5$	↓	↑РИ/RI
n_2	$\frac{\partial n_2}{\partial t} = 0$		
n_3	$\frac{\partial n_3}{\partial t} = 0$		
n_4	$\frac{\partial n_4}{\partial t} = 0$		
n_5	$\frac{\partial n_5}{\partial t} = 0$		
Суммарный показатель Total Score	$\frac{\partial n_1}{\partial t} = -43,75t^2 + 168,75t - 112,5$		

Примечание. *РИ — референтный интервал, ↑РИ — при превышении показателей от референтного интервала.

Note. *RI — reference interval, ↑RI — values exceeding reference interval.

Таблица 6. Зависимости показателей ПЦФМ лейкоцитарной формулы крови при состоянии болезни (отклонение иммуноглобулинов ИГА, ИГМ от референтного интервала)

Table 6. A relation between flow cytophotometric analysis indicators of leukocyte blood formula in disease (deviation of immunoglobulins IgA, IgM from reference interval)

Показатель Indicator	Зависимость Dependence	ИГА, ИГМ IgA, IgM	Status*
n_1	$\frac{\partial n_1}{\partial t} = 0$	↓	↓РИ/RI
n_2	$\frac{\partial n_2}{\partial t} = 18,42t^2 - 55,26t + 36,84$		
n_3	$\frac{\partial n_3}{\partial t} = 34,21t^2 - 102,63t + 68,42$		
n_4	$\frac{\partial n_4}{\partial t} = -27,96t^2 + 121,38t - 80,92$		
n_5	$\frac{\partial n_5}{\partial t} = -26,65t^2 + 117,44t - 78,29$		
Суммарный показатель Total Score	$\Delta N(t) = -1,98t^2 + 80,74t - 54$		

Примечание. *РИ — референтный интервал, ↓РИ — при занижении показателей от референтного интервала.

Note. *RI — reference interval, ↓RI — in case of indicators below reference interval.

Таблица 7. Зависимости показателей лейкоцитарной формулы крови при состоянии болезни (превышение показателей иммуноглобулинов ИГА, ИГМ от референтного интервала)

Table 7. A relation between leukocyte blood formula indices in disease (IgA, IgM immunoglobulin indices above reference interval)

Показатель/Indicator	Зависимость/Dependence	ИГА, ИГМ IgA, IgM	Status*
n_1	$\frac{\partial n_1}{\partial t} = -43,75t + 133,33$	↑	РИ/RI
n_2	$\frac{\partial n_2}{\partial t} = -37,5t + 116,67$		
n_3	$\frac{\partial n_3}{\partial t} = -50t^2 + 200t - 150$		
n_4	$\frac{\partial n_4}{\partial t} = 0$		
n_5	$\frac{\partial n_5}{\partial t} = -37,5t^2 + 137,5t - 75$		
Суммарный показатель Total Score	$\Delta N(t) = -87,5t^2 + 336,99t - 30$		

Примечание. *РИ — референтный интервал.

Note. *RI — reference interval.

Таблица 8. Зависимости показателей лейкоцитарной формулы крови при состоянии болезни (отклонение иммуноглобулинов ИГА, ИГМ от референтного интервала)

Table 8. A relation between leukocyte blood formula indices in disease states (deviation of immunoglobulins IgA, IgM from reference interval)

Показатель/Indicator	Зависимость/Dependence	ИГА, ИГМ IgA, IgM	Status*
n_1	$\frac{\partial n_1}{\partial t} = 0$	↑	↑РИ/RI
n_2	$\frac{\partial n_2}{\partial t} = 0$		
n_3	$\frac{\partial n_3}{\partial t} = 0$		
n_4	$\frac{\partial n_4}{\partial t} = 18,42t^2 - 55,26t + 36,84$		
n_5	$\frac{\partial n_5}{\partial t} = 45,72t^2 - 199,68t + 216,45$		
Суммарный показатель Total Score	$\Delta N(t) = 64,14t^2 - 254,94t + 253,29$		

Примечание. *РИ — референтный интервал, ↑РИ — при превышении показателей от референтного интервала.

Note. *RI — reference interval, ↑RI — indicators exceed the reference interval.

Таблица 9. Зависимости показателей лейкоцитарной формулы крови при состоянии болезни (отклонение иммуноглобулинов ИГА, ИГМ от референтного интервала)

Table 9. A relation between leukocyte blood formula indices in disease states (deviated immunoglobulins IgA, IgM from the reference interval)

Показатель/Indicator	Зависимость/Dependence	ИГА, ИГМ IgA, IgM	Status*
n_1	$\frac{\partial n_1}{\partial t} = 0$	↑	↓РИ/RI
n_2	$\frac{\partial n_2}{\partial t} = 10,52t^2 - 31,57t + 21,05$		
n_3	$\frac{\partial n_3}{\partial t} = 15,79t^2 - 47,37t + 31,58$		
n_4	$\frac{\partial n_4}{\partial t} = 0$		
n_5	$\frac{\partial n_5}{\partial t} = 0$		
Суммарный показатель Total Score	$\Delta N(t) = 26,31t^2 - 78,94t + 52,6$		

Примечание. *РИ — референтный интервал, ↓РИ — при занижении показателей от референтного интервала.

Note. *RI — reference interval, ↓RI — values below reference interval.

ферентном интервале и получены суммарные показатели (состояние С1) (табл. 1).

Зависимости показателей ПЦФМ в состоянии С1 при превышении от референтного интервала (\uparrow РИ) представлены в табл. 2.

Зависимости показателей ПЦФМ в состоянии С1 при занижении от референтного интервала (\downarrow РИ) представлены в табл. 3.

Рассмотрим также показатели иммунограммы ПЦФМ в состоянии С2.

В табл. 4, 5 и 6 показаны результаты исследований, полученных при занижении иммуноглобулинов от референтного интервала.

Зависимости показателей ПЦФМ, находящиеся в референтном интервале при состоянии С2, представлены в табл. 4.

Результаты, полученные при превышении/понижении ПЦФМ от референтного интервала в состоянии С2 показаны в табл. 5 и 6.

Результаты, показанные в табл. 7, 8 и 9 однотипны с табл. 4, 5 и 6 с одним отличием, касающегося отклонения иммуноглобулинов в сторону превышения референтного интервала.

Графические зависимости показателей ПЦФМ в состоянии С2 показаны на рис. 3.

Обсуждение

Почти все графики суммарных показателей проточной цитофотометрии имеют небольшой экстремум у детей в возрасте 2–3 лет. Несмотря на то что отдельные параметры ПЦФМ имели колебательный характер, для всех графиков характерно плавное изменение с увеличением отклонения у подростков.

Показатели ПЦФМ, находящиеся в референтном интервале имели одинаковое направление в сторону отрицательного отклонения с увеличением возраста с тем отличием, что в состоянии болезни отклонение было в 2 раза больше.

В состоянии отсутствия заболевания превышение показателей ПЦФМ имело положительную тенденцию с увеличением возраста, а понижение показателей ПЦФМ от референтного интервала имело отрицательную тенденцию.

В состоянии заболевания при пониженных иммуноглобулинах при превышении референтного интервала ПЦФМ наблюдается выпуклое отклонение в отрицательную сторону при увеличении возраста. При понижении от референтного интервала наблюдается выпуклая кривая с положительным отклонением.

При повышенных иммуноглобулинах при превышении референтного интервала ПЦФМ имеет выгнутое положительное отклонение, при понижении референтного интервала ПЦФМ также имеет выгнутое положительное отклонение в 5 раз больше.

Выводы

Обобщение показателей ПЦФМ при коронавирусной инфекции у детей и подростков, несмотря на некоторые отличия, имеет тенденцию к увеличению отклонения к старшему подростковому возрасту, на что нужно обратить внимание при дальнейшей диагностике последствий инфекции.

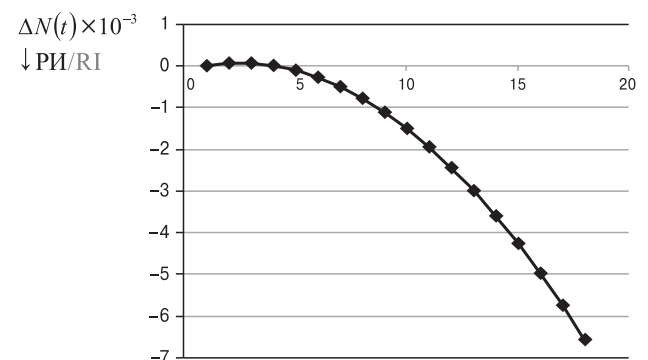
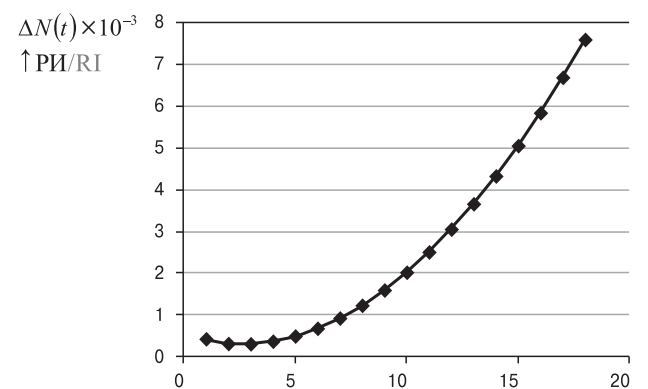
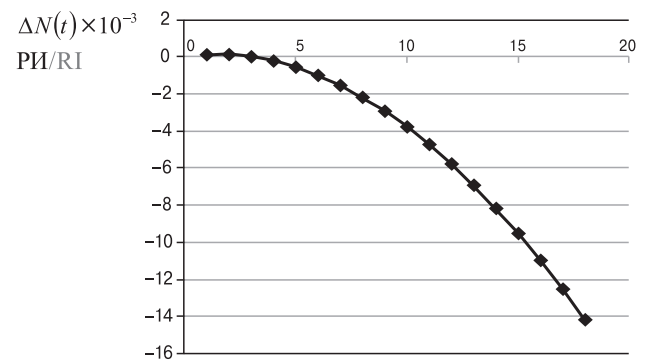


Рисунок 2. Зависимости отклонения суммарных показателей ПЦФМ ($\Delta N(t) \times 10^{-3}$) в состоянии С1 от возраста пациентов (t) и отклонения от референтного интервала (РИ)

Figure 2. A relation between deviation modality for total flow cytophotometric analysis ($\Delta N(t) \times 10^{-3}$) indices at С1 state and patient age (t) and deviation from reference interval (RI)

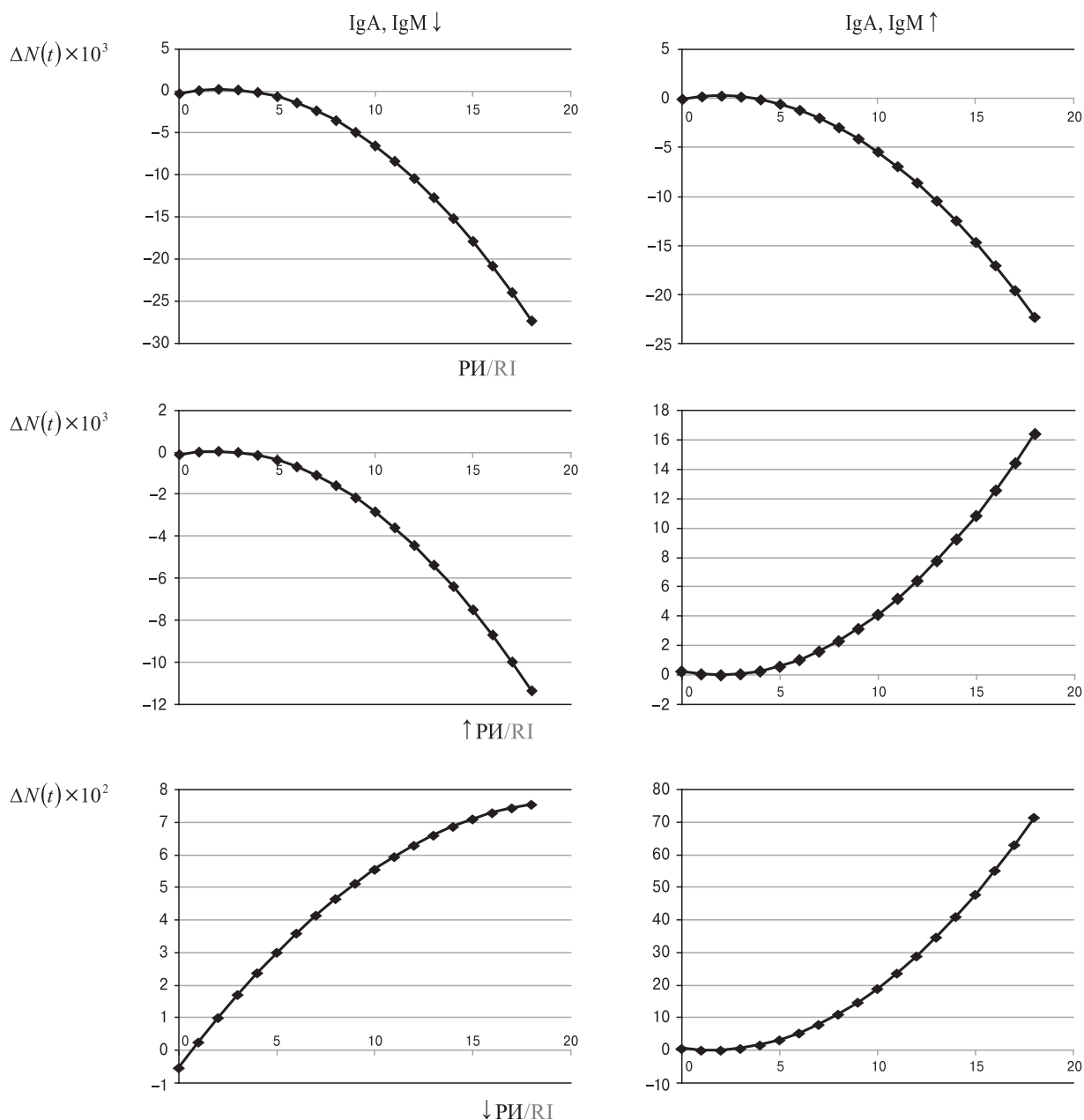


Рисунок 3. Зависимости отклонения суммарных показателей ПЦФМ ($\Delta N(t)$) в состоянии С2 от возраста пациентов (t), отклонения от референтного интервала (РИ) при пониженных (ИГА, ИГМ↓)/повышенных (ИГА, ИГМ↑) уровнях иммуноглобулинов

Figure 3. A relation between deviation modality for total flow cytophotometric analysis indices at C2 state and patient age (t), deviation from the reference interval (RI) at decreased (IgA, IgM↓)/increased (IgA, IgM↑) immunoglobulin levels

Список литературы/References

1. Абакушина Е.В. Иммунотерапевтические подходы в лечении COVID-19 // Гены и клетки. 2020. Т. 15, № 4. С. 19–26. [Abakushina E.V. Immunotherapeutic approaches in the treatment of COVID-19. *Geny i kletki = Genes & Cells*, 2020, vol. 15, no. 4, pp. 19–26. (In Russ.)] doi: 10.23868/202012003
2. Абдуллаева К.А. Состояние иммунологического статуса больных постковидной пневмонией // Экономика и социум. 2022. № 11(102)-1. С. 376–379. [Abdullaeva K.A. State of the immunological status of patients with post-COVID pneumonia. *Ekonomika i sotsium = Economy and Society*, 2022, no. 11(102)-1, pp. 376–379. (In Russ.)]
3. Доценко Т.М., Бугашева Н.В., Парахина О.Н. Здоровье детей, иммунитет, иммунопрофилактика в условиях экологического неблагополучия // Главврач. 2019. № 12. С. 52–56. [Dotsenko T.M., Bugasheva N.V., Parakhina O.N. Children's health, immunity, immunoprophylaxis in conditions of environmental disadvantage. *Glavvrach = Glavvrach*, 2019, no. 12, pp. 52–56. (In Russ.)] doi: 10.33920/med-03-1911-05

4. Есенбекова Э.Ж., Жиёмуратова Г.К., Жаксылыкова Г.Б. Особенности иммунного ответа у детей на новую коронавирусную инфекцию // Новый день в медицине. 2022. № 9 (47). С. 74–78. [Esenbekova E.J., Zhiemuratova G.K., Zhaksylykova G.B. Features of the immune response in children to a new coronavirus infection. *Novyi den' v meditsine = New Day in Medicine*, 2022, no. 9 (47), pp. 74–78. (In Russ.)]
5. Инвиева Е.В., Вторушина В.В., Драпкина Ю.С., Кречетова Л.В., Долгушина Н.В., Хайдуков С.В. Клеточный и гуморальный иммунный ответ после введения комбинированной векторной вакцины Гам-Ковид-Вак // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 6. С. 1051–1060. [Inviyeva E.V., Vtorushina V.V., Drapkina J.S., Krechetova L.V., Dolgushina N.V., Khaidukov S.V. Post-Gam-Covid-Vac combined vector vaccine cellular and humoral immune response. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2022, vol. 12, no. 6, pp. 1051–1060. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-PCV-1975
6. Костарев С.Н., Файзрахманов Р.А., Татарникова Н.А., Новикова О.В., Серeda Т.Г. Системный анализ и математическое моделирование инфекционной безопасности заболевания, вызываемого штаммами коронавируса COVID-19 // Известия Юго-Западного государственного университета. Серия: Управление, вычислительная техника, информатика. Медицинское приборостроение. 2023. Т. 13, № 2. С. 76–94. [Kostarev S.N., Fayzrakhmanov R.A., Tatarnikova N.A., Novikova O.V., Sereda T.G. System analysis and mathematical modeling of infection safety human caused by COVID-19 coronavirus strains. *Izvestiya Yugo-Zapadnogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Upravlenie, vychislitel'naya tekhnika, informatika. Meditsinskoe priborostroenie = Proceedings of the Southwest State University. Series: IT Management, Computer Science, Computer Engineering. Medical Equipment Engineering*, 2023, vol. 13, no. 2, pp. 76–94. (In Russ.)] doi: 10.21869/2223-1536-2023-13-2-76-94
7. Платонова Т.А., Скляр М.С., Голубкова А.А., Семенов Т.А., Карбовнича Е.А., Чернышев М.А., Воробьев А.В., Смирнова С.С. Оценка специфического Т-клеточного иммунитета у переболевших и вакцинированных против COVID-19 // Журнал инфектологии. 2022. Т. 14, № 1. С. 96–104. [Platonova T.A., Sklyar M.S., Golubkova A.A., Semenenko T.A., Karbovnichaya E.A., Chernyshev M.A., Vorobyov A.V., Smirnova S.S. Assessment of specific T-cell immunity in patients who have been ill and vaccinated against COVID-19. *Zhurnal infektologii = Journal Infectology*, 2022, vol. 14, no. 1, pp. 96–104. (In Russ.)] doi: 10.22625/2072-6732-2022-14-1-96-104
8. Шелканов М.Ю., Попова А.Ю., Дедков В.Г., Акимкин В.Г., Малеев В.В. История изучения и современная классификация коронавирусов (Nidovirales: Coronaviridae) // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 2. С. 221–246. [Shchelkanov M.Yu., Popova A.Yu., Dedkov V.G., Akimkin V.G., Maleev V.V. History of investigation and current classification of coronaviruses (Nidovirales: Coronaviridae). *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2020, vol. 10, no. 2, pp. 221–246. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-HOI-1412
9. Юпатов Г.И., Доценко М.Л. Противовирусный иммунитет и состояние липидтранспортной системы / Медицинская панорама. 2002. № 8. С. 22. [Yupatov G.I., Dotsenko M.L. Antiviral immunity and the state of the lipid transport system. *Meditsinskaya panorama = Medical Review*, 2002, no. 8, p. 22. (In Russ.)]
10. Kostarev S., Komayagina O., Fayzrakhmanov R., Kurushin D., Tatarnikova N., Novikova Kochetova O., Sereda T. Impact of the new coronavirus infection on the immune system of children and adolescents in the region of the Russian Federation. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2022, vol. 19, no. 20: 13669. doi: 10.3390/ijerph192013669
11. Sereda T.G., Kostarev S.N., Kochinov Y.A., Kochinova T.V. Building a tool model for the study of the ecosystem “Coronavirus - vector – human – environment”. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.*, 2020, vol. 548: 042030.

Авторы:

Костарев С.Н., д.т.н., профессор кафедры ИТАС Пермского национального исследовательского политехнического университета, г. Пермь, Россия; профессор кафедры безопасности жизнедеятельности Пермского государственного аграрно-технологического университета им. акад. Д.Н. Прянишникова, г. Пермь, Россия; профессор кафедры зоотехнии Пермского института ФСИН России, г. Пермь, Россия;

Серeda Т.Г., д.т.н., профессор кафедры безопасности жизнедеятельности Пермского государственного аграрно-технологического университета им. акад. Д.Н. Прянишникова, г. Пермь, Россия.

Authors:

Kostarev S.N., DSc (Technology), Professor of the Department ITAS, Perm National Research Polytechnic University, Perm, Russian Federation; Professor of the Department of Life Safety, Perm State Agrarian-Technological University named after academician D.N. Prianishnikov, Perm, Russian Federation; Professor of the Department of Animal Science, Perm Institute of the FPS of Russia, Perm, Russian Federation;

Sereda T.G., DSc (Technology), Professor of the Department of Life Safety, Perm State Agrarian-Technological University named after academician D.N. Prianishnikov, Perm, Russian Federation.

Поступила в редакцию 22.02.2024
Принята к печати 13.08.2024

Received 22.02.2024
Accepted 13.08.2024

ВЛИЯНИЕ НОВОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ НА ПОКАЗАТЕЛИ ГЕМОГРАММЫ В РАННЕМ ПЕРИОДЕ ВЫЗДОРОВЛЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА

Н.М. Агарков^{1,2}, Т.И. Якунченко², О.И. Охотников³, К.Ф. Макконен², М.В. Алымова¹

¹ ФГБОУ ВО Юго-Западный государственный университет, г. Курск, Россия

² ФГАОУ ВО Белгородский государственный национальный исследовательский университет, г. Белгород, Россия

³ ФГБОУ ВО Курский государственный медицинский университет, г. Курск, Россия

Резюме. Лабораторные данные, особенно общий анализ крови, играют важную роль при лечении инфекционных заболеваний, в том числе COVID-19. Однако у больных с ишемической болезнью сердца (ИБС) и COVID-19 общий анализ крови анализируется редко и недостаточно, чтобы полностью оценить воздействие новой коронавирусной инфекции на пациентов с кардиологическими заболеваниями. Цель исследования — изучение влияния новой коронавирусной инфекции на показатели гемограммы в раннем периоде выздоровления пациентов с ИБС зрелого и пожилого возраста. Исследование выполнено в Курской городской клинической больнице скорой медицинской помощи в 2021–2022 гг. В нем приняли участие 58 пациентов зрелого возраста (45–59 лет), страдающих ИБС, перенесших новую коронавирусную инфекцию, и 62 пациента пожилого возраста, страдающих ИБС, перенесших новую коронавирусную инфекцию. Забор крови проводился в утренние часы из поверхностных вен предплечья в специальные пробирки Vacutainer с активатором свертываемости. У пожилых пациентов через 3–4 недели после выздоровления сохранялись значимые изменения показателей красной крови — снижение содержания в периферической крови эритроцитов, гемоглобина и гематокрита. У пожилых пациентов с ИБС, перенесших новую коронавирусную инфекцию средней степени тяжести, через 3–4 недели отмечался также повышенный относительно группы сравнения уровень лейкоцитов, нейтрофилов, сегментоядерных нейтрофилов и СОЭ. Следует обратить внимание, что в раннем периоде реконвалесценции пациентов с ИБС пожилого возраста с перенесенной новой коронавирусной инфекцией была статистически значимо повышена величина СОЭ, что подтверждает сохранение воспалительного процесса. Проведя оценку информативности исследованных параметров общего анализа крови по рассчитанным показателям Кульбака, установлена наибольшая информативность для тромбоцитов, лейкоцитов и СОЭ. Таким образом, среди проанализированных показателей общего анализа крови наибольшей информативностью и прогностической значимостью в отношении протекания раннего реконвалесцентного периода пациентов с ИБС пожилого возраста, переболевших новой коронавирусной инфекцией, обладают тромбоциты, СОЭ и лейкоциты, которые предлагается использовать в качестве биомаркеров раннего реконвалесцентного периода.

Ключевые слова: COVID-19, гемограмма, пожилой возраст, средний возраст, ишемическая болезнь сердца, ранний период выздоровления.

Адрес для переписки:

Агарков Николай Михайлович
305040, Россия, г. Курск, ул. 50 лет Октября, 94,
ФГБОУ ВО Юго-Западный государственный университет.
Тел.: 8 910 740-96-13.
E-mail: vitalaxen@mail.ru

Contacts:

Nikolay M. Agarkov
305040, Russian Federation, Kursk, 50 years of October str., 94,
South-West State University.
Phone: +7 910 740-96-13.
E-mail: vitalaxen@mail.ru

Для цитирования:

Агарков Н.М., Якунченко Т.И., Охотников О.И., Макконен К.Ф., Алымова М.В. Влияние новой коронавирусной инфекции на показатели гемограммы в раннем периоде выздоровления пациентов с ишемической болезнью сердца // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 4. С. 740–746. doi: 10.15789/2220-7619-TEO-17587

Citation:

Agarkov N.M., Yakunchenko T.I., Okhotnikov O.I., Makkonen K.F., Alymova M.V. The effect of a new coronavirus infection on hemogram parameters in the early convalescence period of patients with coronary heart disease // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 4, pp. 740–746. doi: 10.15789/2220-7619-TEO-17587

THE EFFECT OF A NEW CORONAVIRUS INFECTION ON HEMOGRAM PARAMETERS IN THE EARLY CONVALESCENCE PERIOD OF PATIENTS WITH CORONARY HEART DISEASE

Agarkov N.M.^{a,b}, Yakunchenko T.I.^b, Okhotnikov O.I.^c, Makkonen K.F.^b, Alymova M.V.^a

^a South-West State University, Kursk, Russian Federation

^b Belgorod State National Research University, Belgorod, Russian Federation

^c Kursk State Medical University, Kursk, Russian Federation

Abstract. Laboratory data, especially a general blood test, play an important role in the treatment of infectious diseases, including COVID-19. However, in patients with coronary heart disease (CHD) and COVID-19, a general blood test is rarely analyzed and is insufficient to fully assess an impact of the new coronavirus infection on patients with cardiac diseases. The aim of the study was to analyze a COVID-19 effect on hemogram parameters in the early recovery period of patients with coronary heart disease. The study was performed at the Kursk City Clinical Hospital for Emergency Medical Care in the years 2021–2022, which involved 58 mature-aged patients (45–59 years old) suffering from coronary heart disease who had a new coronavirus infection and 62 elderly patients suffering from coronary heart disease alone. Morning blood sampling was carried out from the forearm superficial veins into Vacutainer test tubes added with a coagulation activator. In elderly patients, 3–4 weeks after recovery, significant changes in red blood parameters persisted — a decline in the level of peripheral blood erythrocytes, hemoglobin and hematocrit. Elderly patients with coronary heart disease comorbid with a moderate new coronavirus infection, 3–4 weeks later had also higher count of leukocytes, neutrophils, segmented neutrophils and ESR level relative to comparison group. It should be noted that in the early convalescence period elderly patients with coronary heart disease and COVID-19 had significantly elevated ESR, which confirms ongoing sustained inflammatory process. After evaluating the information content according to the calculated Kullback informativeness assessment for analyzed general blood test parameters, it was found to peak for platelet and leukocyte counts as well as ESR level. Thus, among the analyzed indicators in the general blood test, it turned out that platelet and leukocyte count along with ESR level were most informative and of prognostic significance during early convalescent period of elderly patients with coronary heart disease comorbid with a new coronavirus infection, which are proposed to be used as biomarkers of early convalescent period.

Key words: COVID-19, hemogram, old age, middle age, coronary heart disease, early recovery period.

Введение

Пандемия новой короновиральной инфекции, ассоциируемая с SARS-CoV-2 и официально признанная Всемирной организацией здравоохранения в марте 2020 г., сохраняет свою актуальность и в настоящее время, поскольку в различных странах, в том числе в Российской Федерации, несмотря на существенное снижение заболеваемости COVID-19, данное заболевание продолжает регистрироваться и вызывает серьезные осложнения, особенно в группах высокого риска, к которым относятся пациенты с ишемической болезнью сердца (ИБС) [2, 8].

В связи с ростом числа случаев COVID-19 по всему миру из-за его высокой контагиозности были проведены многочисленные исследования, в которых сообщалось о предикторах тяжести заболевания у пациентов с COVID-19. Исследования показали, что тяжелые или смертельные случаи заболевания COVID-19 связаны с повышенным количеством лейкоцитов, мочевины в крови, креатинином, маркерами функции печени и почек, С-реактивным белком, интерлейкином-6, снижением количества лимфоцитов и тромбоцитов, а также уровнем альбумина, по сравнению с более легкими случаями COVID-19, что влияет на выживаемость пациентов [6, 7, 8].

Лабораторные данные, особенно общий анализ крови, играют важную роль при диагности-

ке и лечении инфекционных заболеваний, в том числе при COVID-19. Однако у больных с ишемической болезнью сердца и COVID-19 общий анализ крови анализируется редко и недостаточно, чтобы полностью оценить воздействие новой коронавирусной инфекции на пациентов с исследуемым кардиологическим заболеванием. Цель нашего исследования — изучение влияния новой коронавирусной инфекции на показатели гемограммы в раннем периоде выздоровления пациентов с ИБС зрелого и пожилого возраста.

Материалы и методы

В исследовании, выполненном в Областном бюджетном учреждении здравоохранения «Курская городская клиническая больница скорой медицинской помощи» в 2021–2022 гг., участвовало 58 пациентов зрелого возраста, страдающих ИБС, которые перенесли новую коронавирусную инфекцию и 62 пациента пожилого возраста, страдающих ИБС, перенесших новую коронавирусную инфекцию.

Диагностика COVID-19 осуществлялась по результатам ПЦР и положительного теста на вирус SARS-CoV-2. Верификация ИБС проведена по критериям, изложенным в Клинических рекомендациях «Стабильная ишемическая болезнь сердца», подготовленной специалистами Российского кардиологического общества [1].

Гематологические исследования. При заборе венозной крови в утренние часы путем венопункции из поверхностных вен предплечья использовали специальные пробирки Vacutainer с активатором свертываемости.

Общий анализ крови выполнялся с соблюдением общепринятых требований и включал определение уровней:

- эритроцитов, $n \times 10^{12}/л$;
- гемоглобина в г/л;
- гематокрита в %;
- тромбоцитов, $n \times 10^9/л$;
- лимфоцитов, $n \times 10^9/л$;
- лейкоцитов, $n \times 10^9/л$;
- нейтрофилов, $n \times 10^9/л$;
- сегментоядерных нейтрофилов в %;
- палочкоядерных нейтрофилов в %;
- эозинофилов в %;
- моноцитов в %;
- лимфоцитов в %;
- СОЭ в мм/ч.

Изучение вышеперечисленных показателей общего анализа крови выполнено на автоматическом гематологическом анализаторе Quintus (Швеция).

Пациенты в основную и контрольную группы включались после получения письменного информированного согласия. Исследование осуществлялось с соблюдением общепринятых этических норм.

Статистическая обработка данных. При статистической обработке результатов исследо-

вания применялась ЭВМ типа «Pentium» с использованием стандартного прикладного пакета «Statistica 10.0». При анализе результатов исследования рассчитаны информативность Кульбака и прогностические коэффициенты по общепринятым формулам. Результаты исследования оценивались по критерию χ^2 с учетом числа степеней свободы и различие принималось статистически значимым при $p < 0,05$.

Результаты

Среди обследованных пациентов в возрасте 60–74 через 3–4 недели после выздоровления от новой коронавирусной инфекции с сочетанной ИБС в общем анализе крови выявлены существенные и значимые изменения относительно представителей зрелого возраста с перенесенной новой коронавирусной инфекцией и ИБС (табл. 1).

В частности, у пациентов основной группы через 3–4 недели после выздоровления сохранялись значимые изменения показателей красной крови — снижение содержания в периферической крови эритроцитов, гемоглобина и гематокрита.

Одновременно установлены статистически значимые другие отклонения среди обследованных пациентов с ИБС в возрасте 60–74 лет через 3–4 недели реконвалесцентного периода после перенесенной новой коронавирусной инфекции. Наиболее выражено среди последних наблюдалось повышенное содержание тромбоцитов, достигающее $259,3 \pm 3,8 \times 10^9/л$.

Таблица 1. Изменения показателей общего анализа крови среди пациентов с ИБС в возрасте 45–59 лет и 60–74 лет через 3–4 недели после выздоровления от новой коронавирусной инфекции ($M \pm m$)

Table 1. Changes in general blood test indicators among patients with coronary heart disease aged 45–59 years and 60–74 years 3–4 weeks after recovery from a new coronavirus infection ($M \pm m$)

Показатели общего анализа крови, единица измерения General blood test indicators, unit of measurement	Пациенты 45–59 лет с ИБС через 3–4 недели после COVID-19 Patients 45–59 years old with coronary heart disease 3–4 weeks after COVID-19	Пациенты 60–74 лет с ИБС через 3–4 недели после COVID-19 Patients 60–74 years with coronary heart disease 3–4 weeks after COVID-19	Значимость различий P value
Эритроциты, $\times 10^{12}/л$ Red blood cells, $\times 10^{12}/l$	4,8 \pm 0,2	4,1 \pm 0,3	< 0,05
Уровень гемоглобина, г/л Hemoglobin level, g/l	118,5 \pm 4,1	92,6 \pm 2,8	< 0,001
Гематокрит, % Hematocrit, %	38,6 \pm 1,4	30,7 \pm 0,9	< 0,01
Тромбоциты, $\times 10^9/л$ Platelets, $\times 10^9/l$	177,8 \pm 3,4	259,3 \pm 3,8	< 0,001
Лимфоциты, $\times 10^9/л$ Lymphocytes, $\times 10^9/l$	2,6 \pm 0,1	2,1 \pm 0,2	< 0,05
Лейкоциты, $\times 10^9/л$ Leukocytes, $\times 10^9/l$	7,4 \pm 0,2	9,2 \pm 0,3	< 0,01
Нейтрофилы, $\times 10^9/л$ Neutrophils, $\times 10^9/l$	4,9 \pm 0,1	5,6 \pm 0,2	< 0,01
Сегментоядерные нейтрофилы, % Segmented neutrophils, %	55,8 \pm 2,1	62,4 \pm 1,8	< 0,01
Палочкоядерные, % Band neutrophils, %	3,4 \pm 0,2	3,5 \pm 0,1	> 0,05
Эозинофилы, % Eosinophils, %	2,0 \pm 0,2	2,1 \pm 0,3	> 0,05
Моноциты, % Monocytes, %	6,7 \pm 0,1	6,4 \pm 0,2	> 0,05
Лимфоциты, % Lymphocytes, %	32,1 \pm 0,9	25,6 \pm 0,7	< 0,01
СОЭ, мм/ч ESR, mm/h	10,2 \pm 0,3	13,6 \pm 0,4	< 0,01

У пожилых пациентов с ИБС, перенесших новую коронавирусную инфекцию средней степени тяжести, через 3–4 недели отмечался также повышенный относительно группы сравнения уровень лейкоцитов, нейтрофилов, сегментоядерных нейтрофилов и СОЭ. Все это подчеркивает сохраняющийся в реконвалесцентном периоде незначительный воспалительный процесс. Вместе с тем в периферической крови обследованных основной группы с ИБС и после перенесенной новой коронавирусной инфекции зарегистрированы статистически значимо сниженные уровни лимфоцитов, причем указанное снижение относится как к абсолютному, так и к относительному количеству лимфоцитов.

При этом пониженные уровни абсолютно и относительного количества лимфоцитов среди представителей с ИБС пожилого возраста в раннем реконвалесцентном периоде, помимо статистически репрезентативных различий в обоих случаях по отношению к пациентам с ИБС зрелого возраста с новой коронавирусной инфекцией, имели приблизительно равное уменьшение — в среднем в 1,2–1,3 раза.

Следует обратить внимание, что в раннем периоде реконвалесценции пациентов с ИБС пожилого возраста с перенесенной новой коронавирусной инфекцией была статистически значимо повышена величина СОЭ, что подтверждает ранее указанный вывод о сохраняющемся воспалительном процессе.

Определение соотношения абсолютного числа нейтрофилов к абсолютному количеству лимфоцитов у пациентов с ИБС в пожилом возрасте через 3–4 недели после выздоровления от новой коронавирусной инфекции не выявило статистически значимых различий относительно представителей контрольной группы (рис.).

Полученные результаты свидетельствуют о быстром приближении к границам нормы данного индекса у обследованных пациентов после перенесенного COVID-19 средней степени тяжести.

Проведя оценку информативности по рассчитанным показателям Кульбака исследованных параметров общего анализа крови, установлена наибольшая информативность для тромбоцитов и СОЭ. При этом величина информативности Кульбака, установленная для СОЭ у пациентов с ИБС в пожилом возрасте в раннем периоде реконвалесценции после перенесенной новой коронавирусной инфекции, существенно ниже, чем для уровня тромбоцитов. Существенной является величина информативности Кульбака для содержания лейкоцитов в периферической крови, которая незначительно ниже такого параметра, установленного для СОЭ среди рассматриваемой когорты обследованных (табл. 2).

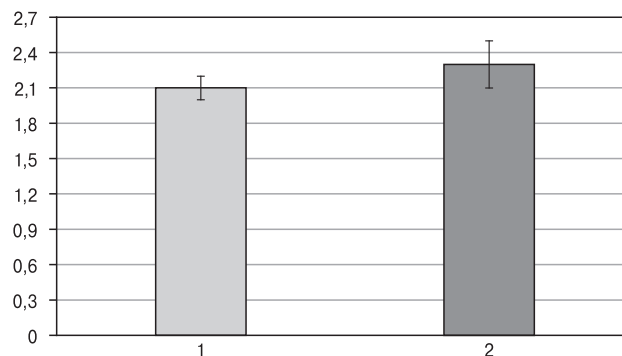


Рисунок. Соотношение количества нейтрофилов к количеству лимфоцитов крови у пациентов с ИБС после 3–4 недель заболевания новой коронавирусной инфекцией

Figure. Peripheral blood neutrophil/lymphocyte ratio in patients with coronary heart disease 3–4 weeks after a new coronavirus infection

Примечание. На оси абсцисс представлены сравниваемые когорты пациентов, на оси ординат — величина соотношения количества нейтрофилов к количеству лимфоцитов; 1 — пациенты контрольной группы, 2 — пациенты основной группы.

Note. X-axis: the compared patient cohorts, Y-axis: the neutrophil/lymphocyte ratio; 1 — patients from control group, 2 — patients from main group.

Далее в порядке уменьшения информативности среди параметров общего анализа крови следует информативность относительного содержания лимфоцитов и абсолютного числа нейтрофилов. Информативными для оценки протекания раннего реконвалесцентного периода пациентов с ИБС в пожилом возрасте после новой коронавирусной инфекции являются также показатели красной крови — эритроцитов, уровня гемоглобина и гематокрита. Неинформативными же среди полученных показателей общего анализа крови следует считать относительное количество эозинофилов, моноцитов и палочкоядерных нейтрофилов в крови обследованных.

Данные показатели периферической крови (эозинофилы, моноциты и палочкоядерные нейтрофилы) у пациентов с ИБС пожилого возраста после перенесенной новой коронавирусной инфекции обладали не только низкой информативностью, но и низкой прогностической значимостью, которая варьировала от $-0,2$ для палочкоядерных нейтрофилов до $-0,9$ — для моноцитов (табл. 3).

Однако полученные результаты прогностических коэффициентов свидетельствуют о том, что для прогнозирования протекания раннего реконвалесцентного периода наибольшее и практическое значение имеют такие показатели общего анализа крови как уровень тромбоцитов, лейкоцитов, СОЭ и гемоглобина, по-

скольку их высокие отрицательные значения, отражающие выявленные отклонения (различия) относительно пациентов с ИБС в возрастной группе 45–59 лет, переболевших новой коронавирусной инфекцией, указывают на их негативный вклад в восстановление данных показателей крови и выздоровление обсуждаемой категории пациентов спустя 3–4 недели после COVID-19.

Таблица 2. Показатели информативности Кульбака для параметров общего анализа крови у пациентов с ИБС в возрасте 60–74 лет через 3–4 недели после выздоровления от новой коронавирусной инфекции

Table 2. Parameters of Kulback informativeness assessment for general blood test parameters in patients with coronary heart disease aged 60–74 years 3–4 weeks after recovery from a new coronavirus infection

Показатели общего анализа крови, единица измерения General blood test parameters, unit of measurement	Информативность Кульбака Kulback informativeness assessment	Ранговое место Rank position
Эритроциты, $\times 10^{12}/л$ Red blood cells, $\times 10^{12}/l$	1,9	7
Уровень гемоглобина, г/л Hemoglobin level, g/l	2,3	6
Гематокрит, % Hematocrit, %	1,7	9
Тромбоциты, $\times 10^9/л$ Platelets, $\times 10^9/l$	4,2	1
Лимфоциты, $\times 10^9/л$ Lymphocytes, $\times 10^9/l$	1,6	10
Лейкоциты, $\times 10^9/л$ Leukocytes, $\times 10^9/l$	3,1	3
Нейтрофилы, $\times 10^9/л$ Neutrophils, $\times 10^9/l$	2,4	5
Сегментоядерные нейтрофилы, % Segmented neutrophils, %	1,8	8
Палочкоядерные, % Band neutrophils, %	0,3	12
Эозинофилы, % Eosinophils, %	0,2	13
Моноциты, % Monocytes, %	0,4	11
Лимфоциты, % Lymphocytes, %	2,7	4
СОЭ, мм/ч ESR, mm/h	3,4	2
Всего Total	26,0	–

Вклад других показателей общего анализа крови, согласно рассчитанных величин прогностических коэффициентов, в процесс ранней реконвалесценции пациентов с ИБС в возрасте 60–74 лет существенно ниже, чем рассмотренных ранее, но также существенен. Сказанное относится к содержанию эритроцитов в крови, относительно количеству лимфоцитов, абсолютному числу нейтрофилов.

Таблица 3. Показатели прогностических коэффициентов изученных параметров общего анализа крови у обследованных пациентов с ИБС пожилого возраста в раннем реконвалесцентном периоде после выздоровления от новой коронавирусной инфекции

Table 3. Indicators of prognostic coefficients for the studied general blood test parameters in elderly patients with coronary heart disease in early convalescence period after recovery from a new coronavirus infection

Показатели общего анализа крови, единица измерения General blood test parameters, unit of measurement	Величина прогностического коэффициента Value of predictive coefficient	Ранговое место Rank position
Эритроциты, $\times 10^{12}/л$ Red blood cells, $\times 10^{12}/l$	–2,4	5
Уровень гемоглобина, г/л Hemoglobin level, g/l	–3,1	4
Гематокрит, % Hematocrit, %	–1,3	8
Тромбоциты, $\times 10^9/л$ Platelets, $\times 10^9/l$	–3,9	1
Лимфоциты, $\times 10^9/л$ Lymphocytes, $\times 10^9/l$	–1,1	9
Лейкоциты, $\times 10^9/л$ Leukocytes, $\times 10^9/l$	–3,6	2
Нейтрофилы, $\times 10^9/л$ Neutrophils, $\times 10^9/l$	–1,8	7
Сегментоядерные нейтрофилы, % Segmented neutrophils, %	–1,0	10
Палочкоядерные, % Band neutrophils, %	–0,2	13
Эозинофилы, % Eosinophils, %	+0,3	12
Моноциты, % Monocytes, %	+0,9	11
Лимфоциты, % Lymphocytes, %	–2,0	6
СОЭ, мм/ч ESR, mm/h	–3,2	3
Всего Total	–22,4	–

Обсуждение

Клинические и лабораторные маркеры тяжести COVID-19 интенсивно изучаются учеными по всему миру. Базовым исследованием, доступным как в клиниках, так и на скорой помощи, является общий анализ крови, поэтому его можно использовать в качестве частого и полезного биомаркера. Одним из потенциальных маркеров является лимфопения, которая упоминается чаще всего [9]. Ghahramani S. и соавт. [4] в широком метаанализе, включавшем 17 публикаций, показали значительное снижение количества лимфоцитов, а также моноцитов и эозинофилов, гемоглобина, тромбоцитов, увеличение количества нейтрофилов у пациентов с тяжелым течением заболевания. Не было обнаружено существенных различий в уровне эритроцитов, что согласуется с нашими полученными результатами, так как у пациентов пожилого возраста с ИБС через 3–4 недели после выздоровления сохранялись значимые изменения показателей красной крови — снижение содержания в периферической крови эритроцитов, гемоглобина и гематокрита. Однако у пожилых пациентов с ИБС, перенесших новую коронавирусную инфекцию средней степени тяжести, через 3–4 недели отмечался также повышенный относительно группы сравнения уровень лейкоцитов, нейтрофилов, сегментоядерных нейтрофилов и СОЭ.

Результаты общего анализа крови у пациентов с COVID-19 в исследовании Djakro D.K. и соавт. [3] свидетельствуют о низком уровне гемоглобина ($124,84 \pm 15,877$), сниженном уровне гематокрита ($37,45 \pm 4,685$) и низких уровнях эритроцитов ($3,19 \pm 0,577$) у пациентов с сопутствующими заболеваниями, в том числе ИБС. Кроме того, была выявлена значительная разница в уровнях эритроцитов, гемоглобина, гематокрита, среднего объема эритроцитов между двумя группами с сопутствующими заболеваниями (артериальная гипертензия, ишемическая болезнь сердца, сахарный диабет) и здоровыми людьми.

Zhang J.J. и соавт. [10] сообщали, что в тяжелых случаях обычно наблюдалось повышение лейкоцитов ($P = 0,003$). В нашем исследовании у пожилых пациентов с ИБС, перенесших новую коронавирусную инфекцию средней тяжести, также был повышен уровень лейкоцитов. Анализ лабораторных данных 452 пациентов, проведенный Qin C. и соавт. показал, что у пациентов с COVID-19 в крови более высокое количество лейкоцитов и более низкий процент моноцитов, базофилов и эозинофилов, а также лимфоцитопению в более тяжелых случаях, чем у здоровых пациентов [5].

Выводы

Пациенты пожилого возраста с ИБС, перенесшие новую коронавирусную инфекцию, статистически значимо отличаются от пациентов зрелого возраста с ишемической болезнью сердца, перенесших новую коронавирусную инфекцию, по содержанию тромбоцитов ($259,3 \pm 3,8 \times 10^9/\text{л}$ против $177,8 \pm 3,4 \times 10^9/\text{л}$ соответственно), лейкоцитов ($9,2 \pm 0,3 \times 10^9/\text{л}$ против $7,4 \pm 0,2 \times 10^9/\text{л}$) и скорости оседания эритроцитов ($13,6 \pm 0,4$ мм/ч против $10,2 \pm 0,3$ мм/ч соответственно) в раннем реконвалесцентном периоде с высокой информативностью (4,2; 3,1 и 3,4 соответственно) и прогностической значимостью (–3,9; –3,6 и –3,2 соответственно).

Таким образом, среди проанализированных показателей общего анализа крови наибольшей информативностью и прогностической значимостью в отношении протекания раннего реконвалесцентного периода пациентов с ИБС пожилого возраста, переболевших новой коронавирусной инфекцией, обладают тромбоциты, СОЭ и лейкоциты, которые предлагается использовать в качестве биомаркеров раннего реконвалесцентного периода.

Достоинством данных биомаркеров раннего периода выздоровления пациентов, переболевших новой коронавирусной инфекцией, является возможность их определения в любом лечебно-профилактическом учреждении и средним медицинским персоналом.

Список литературы/References

1. Стабильная ишемическая болезнь сердца: клинические рекомендации М.: Российское кардиологическое общество, 2020. 114 с. [Stable ischemic heart disease: Clinical recommendations. Moscow: Russian Society of Cardiology, 2020. 114 p. (In Russ.)] URL: https://cardioweb.ru/files/glavny-kardiolog/rekomendation/Klin_rekomendacii_IBS_2020.pdf
2. Беляева В.А. Патогенетические механизмы повреждения миокарда при COVID-19 // Современные проблемы науки и образования. 2021. № 6. [Belyaeva V.A. Pathogenetic mechanisms of myocardial damage in COVID-19. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya* = *Modern Problems of Science and Education*, 2021, no. 6. (In Russ.)] doi: 10.17513/spno.31299
3. Djakro D.K., Wang Z., Zhang R., Chen X., Chen P., Antoine M.M. Blood routine test in mild and common 2019 coronavirus (COVID-19) patients. *Biosci. Rep.*, 2020, vol. 40, no. 8: BSR20200817. doi: 10.1042/bsr20200817
4. Ghahramani S., Tabrizi R., Lankarani K.B., Kashani S.M., Rezaei S., Zeidi N., Akbari M., Heydari S.T., Akbari H., Nowrouzi-Sohrabi P., Ahmadizar F. Laboratory features of severe vs non-severe COVID-19 patients in Asian populations: a systematic review and meta-analysis. *Eur. J. Med. Res.*, 2020, vol. 25, no. 1: 30. doi: 10.1186/s40001-020-00432-3

5. Qin C., Zhou L., Hu Z., Zhang S., Yang S., Tao Y., Xie C., Ma K., Shang K., Wang W., Tian D.S. Dysregulation of Immune Response in Patients With Coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. *Clin. Infect. Dis.*, 2020, vol. 71, no. 15, pp. 762–768. doi: 10.1093/cid/ciaa248
6. Ruan Q., Yang K., Wang W., Jiang L., Song J. Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China. *Intensive Care Med.*, 2020, vol. 46, no. 5, pp. 846–848. doi: 10.1007/s00134-020-05991-x
7. Silambanan S., Koshy T., Mahesh K.K., Jasmine Ch.A., Bhaskar E., Moorthy S. Correlation of biochemical abnormalities with the severity of hospitalized COVID-19 patients. *Research Results in Biomedicine*, 2022, vol. 8, no. 2, pp. 221–233. doi: 10.18413/2658-6533-2022-8-2-0-7
8. Wang J.J., Su Y.J., Wang Q., Cao Y., Wang A.B., Ding R., Xie W. Sex differences in clinical characteristics and risk factors for disease severity of hospitalized patients with COVID-19. *MedComm. (2020)*, 2021, vol. 2, no. 2, pp. 247–255. doi: 10.1002/mco2.66
9. Yan S., Wu G. Is lymphopenia different between SARS and COVID-19 patients? *FASEB J.*, 2021, vol. 35, no. 2: e21245. doi: 10.1096/fj.202002512
10. Zhang J.J., Dong X., Cao Y.Y., Yuan Y.D., Yang Y.B., Yan Y.Q., Akdis C.A., Gao Y.D. Clinical characteristics of 140 patients infected with SARS-CoV-2 in Wuhan, China. *Allergy*, 2020, vol. 75, no. 7, pp. 1730–1741. doi: 10.1111/all.14238

Авторы:

Агарков Н.М., д.м.н., профессор, профессор кафедры биомедицинской инженерии ФГБОУ ВО Юго-Западный государственный университет, г. Курск, Россия; старший научный сотрудник лаборатории «Проблемы старения» ФГАОУ ВО Белгородский государственный национальный исследовательский университет, г. Белгород, Россия;
Якунченко Т.И., д.м.н., профессор, зав. кафедрой пропедевтики внутренних болезней и клинических информационных технологий ФГАОУ ВО Белгородский государственный национальный исследовательский университет, г. Белгород, Россия;
Охотников О.И., д.м.н., профессор, профессор кафедры лучевой диагностики и терапии ФГБОУ ВО Курский государственный медицинский университет, г. Курск, Россия;
Макконен К.Ф., д.м.н., доцент, профессор кафедры факультетской терапии ФГАОУ ВО Белгородский государственный национальный исследовательский университет, г. Белгород, Россия;
Алымова М.В., студент кафедры биомедицинской инженерии ФГБОУ ВО Юго-Западный государственный университет, г. Курск, Россия.

Authors:

Agarkov N.M., DSc (Medicine), Professor, Professor of the Department of Biomedical Engineering, South-West State University, Kursk, Russian Federation; Senior Researcher, “Problems of Aging” Laboratory, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russian Federation;
Yakunchenko T.I., DSc (Medicine), Professor, Head of the Department of Propaedeutics of Internal Diseases and Clinical Information Technologies, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russian Federation;
Okhotnikov O.I., DSc (Medicine), Professor, Professor of the Department of Radiology and Radiotherapy, Kursk State Medical University, Kursk, Russian Federation;
Makkonen K.F., DSc (Medicine), Associate Professor, Professor of the Department of Faculty Therapy, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russian Federation;
Alyмова M.V., Student, Department of Biomedical Engineering, South-West State University, Kursk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 31.01.2024
Принята к печати 08.08.2024

Received 31.01.2024
Accepted 08.08.2024

ДИНАМИКА РЕЗИСТЕНТНОСТИ ОРГАНИЗМА В ПОСТКОВИДНОМ ПЕРИОДЕ

Е.В. Жданова¹, Е.В. Рубцова², Е.Г. Костоломова¹

¹ ФГБОУ ВО Тюменский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Тюмень, Россия

² ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии имени академика Г.А. Илизарова Минздрава России, г. Курган, Россия

Резюме. Несмотря на официальное окончание пандемии новой коронавирусной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2, вопрос о состоянии специфической и неспецифической резистентности в постковидном периоде и возможных последствий перенесенного COVID-19 остается не до конца изученным. Проведено клинико-лабораторное обследование 124 пациентов в различные сроки после перенесенной COVID-19-инфекции. 62 пациента полностью выздоровели и 62 имели признаки постковидного синдрома. У всех пациентов оценивали общее количество лейкоцитов и лейкоцитарную формулу, а при наличии постковидного синдрома определяли общее содержание IgA, IgM, IgG и IgE в сыворотке крови, а также количество лимфоцитов CD3, CD4, CD8 и CD19. Результаты показали, что вне зависимости от наличия постковидного синдрома у всех пациентов в течение полугода после перенесенной COVID-19-инфекции содержание лейкоцитов в периферической крови ниже, чем у не болевших. При этом восстановление абсолютного количества нейтрофилов происходит только спустя 12 месяцев. При наличии постковидного синдрома абсолютное количество CD3⁺, CD4⁺ и CD19⁺ лимфоцитов было более низким, чем у здоровых. При этом в период от 3 до 15 месяцев титр IgA у пациентов с ПКС был достоверно ниже, а общее содержание IgM и IgG выше, что не сопровождалось какими-либо клиническими или лабораторными признаками воспаления. Содержание общего IgE в крови было достоверно выше и нарастало к концу периода наблюдения. Снижение активности неспецифической защиты, а также показателей клеточного и гуморального иммунитета у пациентов с постковидным синдромом сопровождается увеличением у них частоты вирусных и бактериальных инфекций различной локализации. Если в течение первого полугодия увеличение общего IgE в крови не сопровождается клиническими признаками атопии, то спустя 6 месяцев частота аллергических проявлений нарастает. В этот же период учащаются случаи суставного синдрома в виде артралгий или прогрессирующей деструкции суставов. Атопические проявления часто сочетаются с суставным синдромом. Таким образом, после перенесенной COVID-19-инфекции в организме длительное время сохраняется низкий уровень неспецифической защиты. У пациентов с постковидным синдромом низкая неспецифическая и специфическая резистентность организма проявляется вирусными и бактериальными инфекциями слизистых оболочек и кожи. Дисбаланс в иммунной системе способствует формированию аллергических и аутоиммунных процессов.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, постковидный период, постковидный синдром, лейкоциты, лейкоформула, лимфоциты, иммуноглобулины.

Адрес для переписки:

Жданова Екатерина Васильевна
625023, Россия, г. Тюмень, ул. Одесская, 54,
ФГБОУ ВО Тюменский государственный медицинский
университет МЗ РФ.
Тел.: 8 919 957-84-63.
E-mail: zhdanova.e.v@bk.ru

Contacts:

Ekaterina V. Zhdanova
625023, Russian Federation, Tyumen, Odesskaya str., 54,
Tyumen State Medical University.
Phone: +7 919 957-84-63.
E-mail: zhdanova.e.v@bk.ru

Для цитирования:

Жданова Е.В., Рубцова Е.В., Костоломова Е.Г. Динамика резистентности организма в постковидном периоде // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 4. С. 747–755. doi: 10.15789/2220-7619-HBR-17659

Citation:

Zhdanova E.V., Rubtsova E.V., Kostolomova E.G. Human body resistance dynamics in the post-COVID period // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 4, pp. 747–755. doi: 10.15789/2220-7619-HBR-17659

HUMAN BODY RESISTANCE DYNAMICS IN THE POST-COVID PERIOD

Zhdanova E.V.^a, Rubtsova E.V.^b, Kostolomova E.G.^a

^a Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

^b National Medical Research Center of Traumatology and Orthopedics named after academician G.A. Ilizarov, Kurgan, Russian Federation

Abstract. The issue of the state of specific and nonspecific resistance in the post-COVID period and the possible consequences of COVID-19 remains poorly understood. A clinical and laboratory examination of 124 patients was conducted at various time points after COVID-19 infection. 62 patients recovered completely and 62 had post-COVID syndrome. The leukocyte count and leukogram were evaluated in all patients. Immunogram parameters were additionally evaluated in patients with post-COVID syndrome. The results showed that, regardless of post-COVID syndrome, leukocyte count is lower in all patients within six months after COVID-19 infection than in unaffected subjects. The absolute neutrophil count is restored only 12 months later. In the presence of post-COVID syndrome, the absolute number of CD3⁺, CD4⁺ and CD19⁺ lymphocytes was lower than in healthy people. At the same time, 3 to 15 months after that, IgA titer in patients with PCS was significantly lower and that of for total IgM and IgG was higher without any clinical or laboratory signs of inflammation. The total blood IgE level was significantly higher and increased by the end of the observation period. A decreased activity of nonspecific protection, as well as indicators of cellular and humoral immunity in patients with post-COVID syndrome is accompanied by higher rate of viral and bacterial infections of various localization. Whereas during the first period an increase in total blood ID is not accompanied by clinical signs of atopy, then 6 months later the frequency of allergy increases. During the same period, cases of a joint syndrome revealed as arthralgia or progressive joint destruction become more frequent. Atopic manifestations are often combined with joint syndrome. Thus, after a COVID-19 infection, a low long-term level of nonspecific protection remains in vivo. In patients with post-COVID syndrome, low nonspecific and specific body resistance is manifested by viral and bacterial infections of the mucous membranes and skin. An imbalance in the immune system contributes to developing allergic and autoimmune processes.

Key words: SARS-CoV-2, post-COVID period, post-COVID syndrome, leukocytes, leukogram, lymphocytes, immunoglobulins.

Введение

РНК-вирус SARS-CoV-2, вызвавший пандемию, довольно контагиозен, может вызывать тяжелые формы заболевания с неблагоприятным исходом. Кроме того, часть пациентов, перенесших инфекцию, длительное время не может вернуться к обычной жизнедеятельности в связи с развитием постковидного синдрома (ПКС) [1]. ПКС характеризуется прежде всего наличием астении (слабость, утомляемость, постнагрузочное недомогание, когнитивная дисфункция), на фоне которой часто формируются поражения различных органов и систем. При этом роль иммунной системы в формировании постковидных нарушений остается малоизученной. Имеющиеся публикации, посвященные состоянию иммунной системы в остром периоде COVID-19 однозначно свидетельствуют о ее гиперфункции [9, 11, 12, 16], однако сведения о динамике восстановления специфической и неспецифической защиты организма в постковидном периоде у выздоровевших и при наличии ПКС весьма ограничены и неоднозначны [4, 15]. Чаще они посвящены изучению динамики иммунного ответа против SARS-CoV-2 [3, 12]. При этом выявлено несколько фенотипов нарушений иммунной системы, которые характеризуются разной степенью повреждения врожденного или адаптивного иммунитета [2, 8].

Цель работы: оценить динамику изменений неспецифической и специфической резистентности организма у пациентов с постковидным синдромом.

Материалы и методы

Исследование проведено на базе амбулаторно-поликлинического отделения одного из ЛПУ г. Тюмени с мая 2022 г. по декабрь 2023 г. В исследовании приняли участие 124 человека (38 мужчин, 86 женщин), перенесшие COVID-19-инфекцию. Пациенты не имели прививки от SARS-CoV-2 и перенесли заболевание естественным путем. Из числа обследованных 62 (19 мужчин и 43 женщины) имели признаки постковидного синдрома (ПКС) спустя 1–15 месяцев после перенесенной COVID-19-инфекции. Поствоспалительная астения проявлялась сохраняющейся выраженной общей слабостью на протяжении длительного времени после купирования острого COVID-19. У 60% из обследуемых диагностированы признаки поражения центральной нервной системы в виде стойкой головной боли разлитого характера, когнитивных нарушений и нарушений сна. Пациенты с ПКС не имели соматических заболеваний, которые могли спровоцировать или усугубить общую астенизацию. Другие 62 пациента в постковидном периоде не предъявляли жалоб и прошли обследование в рамках периодического медицинского обследования (табл. 1).

Таблица 1. Возрастные и половые характеристики клинических групп, Ме [Q₂₅; Q₇₅]Table 1. Age and sex characteristics in clinical groups, Me [Q₂₅; Q₇₅]

Продолжительность, месяцы Duration, months	ПКС PCS				Без ПКС Without PCS			
	Мужчины Men		Женщины Women		Мужчины Men		Женщины Women	
	п	Возраст, лет Age, years	п	Возраст, лет Age, years	п	Возраст, лет Age, years	п	Возраст, лет Age, years
1–3	4	66,75 [46,0; 74,0]	11	44,81 [27,0; 54,0]	3	50,0 [38,0; 56,0]	9	53,88 [34,0; 70,0]
3–6	4	54,5 [39,0; 70,0]	13	46,38 [23,0; 63,0]	6	47,5 [47,0; 62,0]	16	46,75 [21,0; 73,0]
6–12	7	48,14 [37,0; 61,0]	9	40,88 [24,0; 58,0]	7	39,71 [27,0; 70,0]	9	50,44 [36,0; 72,0]
12–15	4	31 [24,0; 43,0]	10	40,2 [28,0; 64,0]	3	33,0 [29,0; 38,0]	9	37,0 [27,0; 56,0]

Примечание. ПКС/Без ПКС — с наличием постковидного синдрома/без постковидного синдрома.

Note. PCS/Without PCS — with/without post-COVID syndrome.

У всех обследованных был лабораторно подтвержденный факт перенесенной COVID-19-инфекции (положительный результат ПЦР РНК SARS-CoV-2 в анамнезе или положительный титр антител класса IgG к SARS-CoV-2 после купирования острого периода и при бессимптомном течении инфекции). Тяжесть перенесенной COVID-19 инфекции в остром периоде оценена согласно Временным методическим рекомендациям профилактики, диагностики и лечения новой коронавирусной инфекции (COVID-19) (Минздрав России. Версия 17 (09.12.2022)). Развитие ПКС не зависело от возраста, пола и тяжести перенесенного заболевания. Большинство пациентов с ПКС (66%) перенесли острый период COVID-19 в легкой или бессимптомной форме. У 25% пациентов острый период протекал в средней степени тяжести и только в 9% случаях тяжело, с развитием интерстициальной пневмонии. Все пациенты с ПКС продолжали свою трудовую деятельность, несмотря на имеющиеся признаки снижения адаптационной функции организма к полноценной жизнедеятельности после перенесенного острого COVID-19.

Содержание лейкоцитов и лейкоцитарную формулу в общем анализе крови определяли с помощью гематологического 3-частного анализатора Mindray BC-2800 (Hemalight 1270, США). Общее содержание IgA, IgM и IgG в сыворотке крови определяли с использованием стандартного набора реактивов ООО «Протеиновый контур» (Россия). Анализ проводили согласно инструкции, прилагаемой к наборам фирмой изготовителем. Регистрацию результатов проводили на фотометре Multiskan (Labsystems, Финляндия). Определение суммарного иммуноглобулина класса E (общего IgE) в сыворотке крови проведена с помощью ELISA-анализа с фиксацией результата на ридере Multiskan SkyHigh (Thermo FS, Финляндия).

Имунофенотипирование клеток крови на экспрессию маркеров CD3, CD4, CD8 и CD19 проводили с помощью многоцветной проточной цитометрии с использованием проточного цитометра CytoFlex S (Beckman Coulter, Индианаполис, Индиана, США). Данные проточной цитометрии анализировали с использованием программного обеспечения Kaluza v2.1 (Beckman Coulter, Индианаполис, Индиана, США). Общий анализ крови и иммунологические показатели у пациентов определяли вне обострения воспалительных процессов. В качестве контрольных величин для иммунологических тестов использовали показатели, полученные при исследовании образцов крови здоровых не болевших COVID-19-инфекцией лиц (n = 25).

Клиническое исследование проводилось в соответствии с принципами, изложенными в Хельсинкской декларации, и одобрено локальным этическим комитетом НМИЦ ТО имени академика Г.А. Илизарова. Всеми пациентами подписано добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Статистические методы. Статистическая обработка результатов осуществлена с помощью компьютерной программы Statistica 9 (StatSoft, США). Соответствие нормальности распределения оценивали с помощью критерия Шапиро–Уилка. При нормальном распределении признаков результаты представлены в виде средних значений (M) и стандартной ошибки среднего (m).

Описательная статистика количественных признаков представлена в виде медианы и интерквартильного размаха Me [Q₂₅; Q₇₅]. Сравнение групп проводили с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни. Во всех процедурах статистического анализа различия считали статистически значимыми при достигнутом уровне значимости p < 0,05.

Таблица 2. Динамика показателей лейкограммы в постковидном периоде у пациентов без ПКС, Ме [25; 75]
 Table 2. Dynamics of leukogram indices in post-COVID period in PCS-free patients, Me [25; 75]

Показатель Indicator	Группа I Group I n = 15	Группа II Group II n = 17	Группа III Group III n = 16	Группа IV Group IV n = 14	Группа V Group V n = 25	P-level			
	1–3 месяца 1–3 months	3–6 месяцев 3–6 months	6–12 месяцев 6–12 months	12–15 месяцев 12–15 months	Контрольная группа Control group	Группы I–V Groups I–V	Группы II–V Groups II–V	Группы III–V Groups III–V	Группы IV–V Groups IV–V
Лейкоциты, × 10 ⁹ /л Leukocytes, × 10 ⁹ /l	5,02 [4,29; 8,83]	5,59 [3,17; 9,53]	5,95 [3,63; 9,7]	6,37 [4,5; 8,09]	5,911 [4,8; 7,8]	0,005	0,001	0,08	0,096
Нейтрофилы, × 10 ⁹ /л Neutrophils, × 10 ⁹ /l	2,6 [2,56; 5,70]	3,02 [1,52; 4,68]	3,3 [1,52; 4,95]	3,83 [2,33; 4,6]	3,5 [3,09; 4,6]	0,000	0,000	0,005	0,164
Лимфоциты, × 10 ⁹ /л Lymphocytes, × 10 ⁹ /l	1,97 [1,61; 2,99]	2,04 [1,93; 3,99]	2,09 [1,04; 3,29]	1,97 [1,01; 3,98]	1,89 [0,98; 2,59]	0,3	0,233	0,303	0,141
Моноциты, × 10 ⁹ /л Monocytes, × 10 ⁹ /l	0,28 [0,12; 0,86]	0,3 [0,11; 0,68]	0,3 [0,09; 0,77]	0,35 [0,15; 0,86]	0,33 [0,08; 0,72]	0,07	0,044	0,008	0,671

Примечание. P — достоверность различий между показателями контрольной и исследуемыми группами по U-критерию Манна–Уитни.
 Note. P — significant differences between indicators in control and study groups assessed by Mann–Whitney U-criterion.

Результаты

У пациентов без ПКС в период 1–6 месяца после перенесенного COVID-19 содержание лейкоцитов в периферической крови было достоверно ниже, чем у здоровых доноров крови (p = 0,001). Уменьшение общего количества лейкоцитов было связано с сокращением абсолютного содержания нейтрофилов, а в период 3–6 месяцев еще и моноцитов (табл. 2). Восстановление общего количества лейкоцитов происходит спустя полгода, а нейтрофилов только через год.

У пациентов с ПКС абсолютные значения общего количества и различных видов лейкоцитов достоверно не отличались от таковых у пациентов без ПКС, однако нетяжелые лейкопении встречались гораздо чаще. Динамика восстановления лейкограммы также не зависела от наличия ПКС (табл. 3).

У пациентов с ПКС дополнительно оценены показатели иммунограммы (табл. 4). В периферической крови у обследованных в период от 3 до 12 месяцев было более низкое абсолютное содержание CD3⁺ клеток. При этом в течение всего года было сниженным количество CD4⁺ лимфоцитов, а в период 3–6 месяцев и CD8⁺ клеток. Абсолютные значения содержания CD19⁺ лимфоцитов были более низкими, чем у доноров крови, в течение всего периода наблюдения, Концентрации IgM и IgG в периферической крови в течение всего года превышали контрольные значения и нормализовались только спустя 12–15 месяцев после инфекции. Повышение уровней IgM и IgG не сопровождалось клиническими симптомами воспаления, а также лейкоцитозами либо увеличением каких-либо острофазовых показателей в биохимическом анализе крови. При этом в период от 3 до 15 месяцев титр IgA у пациентов с ПКС был достоверно ниже, чем у доноров крови. Напротив, содержание общего IgE в крови было достоверно выше и нарастало к концу периода наблюдения.

Динамика лейкограммы и иммунограммы сопровождается изменением клинической картины ПКС (табл. 5). Наряду с симптомами астенического синдрома — ведущего проявления ПКС — наблюдается снижение резистентности к инфекционным агентам. В 49% случаев острая инфекция COVID-19 фиксировалась более двух раз в течение последних 2-х лет, В течение года после перенесенной острой инфекции 52% (n = 32) пациентов с ПКС отмечали у себя повторные респираторные заболевания до 6–10 раз в год, что не было характерно для них в доковидном периоде. Однако эпизоды ОРВИ преимущественно переносились в легкой форме без обращения за помощью к врачу.

В первые 3 месяца 8 из 15 пациентов с ПКС обращались по поводу гнойно-воспалительных

заболеваний ЛОР-органов ($n = 3$), кожи ($n = 3$) и глаз ($n = 2$).

В период 3–6 месяцев у 4 пациентов, обратившихся с жалобами на нарушение зрения в виде снижения его остроты, появлении «тумана», «чувства песка», сухости глаз, диагностированы вирусно-бактериальный конъюнктивит ($n = 2$) и блефарит ($n = 2$), один из которых завершился развитием острого дакриоцистита. Гнойно-воспалительные заболевания ЛОР-органов и кожи были выявлены у 8 пациентов, герпес у 3. У 4 пациентов присутствовал «синдром раздраженного кишечника». В этот же период зарегистрировано 5 случаев гнойного риносинусита.

В течение второй половины года после выздоровления от COVID-19 9 пациентов обращались за медицинской помощью по поводу диспепсии с преобладанием жидкого или водянистого стула (IBS-D). Причинами диспепсии были норовирус ($n = 2$), аденовирус ($n = 2$) и ротавирус ($n = 1$), а также дисбиоз кишечника ($n = 4$). Дисбиоз кишечника характеризовался преобладанием условно-патогенной микрофлоры: золотистого стафилококка (*S. aureus*) от 10^3 до 10^6 КОЕ/мл, реже клебсиелл (*Klebsiella pneumoniae*), эшерихий (*E. coli*), энтеробактера (*Enterobacter*), псевдомонад (*Pseudomonas*), дрожжеподобных грибов (*Candida*) и других возбудителей на фоне резкого снижения уровня лактобактерий ($< 10^6$ КОЕ/мл) и бифидумбактерий ($< 10^{10}$ КОЕ/мл).

У 7 пациентов зарегистрированы воспалительные заболевания слизистых носоглотки в виде обострений хронического тонзиллита, развития паратонзиллярного абсцесса, остро и длительно протекающего или часто рецидивирующего хронического фарингита, среднего отита и синусита. При посеве патологического материала на питательные среды с последующим выделением возбудителя во все случаях верифицирован *S. aureus* в концентрации 10^4 и выше КОЕ/мл. У 3 пациентов в материале также выделена *Klebsiella pneumoniae*. Воспалительные поражения придаточных пазух носа чаще носили гнойный характер, а при катаральных синуситах период реабилитации затягивался и составлял более 14 дней.

У 3 пациентов были обильные гнойничковые высыпания на коже, а в 2 случаях фурункулы. В 4 случаях зафиксирована герпетическая инфекция (от простого герпеса губ до генитального и Herpes zoster). Причем герпес был купирован лишь при помощи приема максимальных доз противовирусных препаратов.

Если в первые 6 месяцев после выздоровления от COVID-19 случаи аллергии были единичными, то спустя полгода они значительно участились. 5 пациентов предъявляли жалобы на кож-

Таблица 3. Динамика показателей лейкограммы в постковидном периоде у пациентов с ПКС, Ме [25; 75]
Table 3. Dynamics of leukogram parameters in the post-COVID period in PCS patients, Me [25; 75]

Показатель Indicator	Группа I Group I n = 15	Группа II Group II n = 17	Группа III Group III n = 16	Группа IV Group IV n = 14	Группа V Group V n = 25	P-level			
						Группы I–V Groups I–V	Группы II–V Groups II–V	Группы III–V Groups III–V	Группы IV–V Groups IV–V
Лейкоциты, $\times 10^9$ /л Leukocytes, $\times 10^9$ /l	4,86 [2,76; 8,34]	5,01 [3,17; 9,53]	6,15 [3,63; 7,7]	5,92 [4,5; 8,09]	5,911 [4,8; 9,8]	0,002	0,011	0,504	0,092
Нейтрофилы, $\times 10^9$ /л Neutrophils, $\times 10^9$ /l	2,12 [2,33; 4,60]	2,12 [1,52; 4,68]	3,29 [1,52; 4,95]	3,06 [2,33; 4,6]	3,5 [3,09; 4,6]	0,001	0,003	0,009	0,280
Лимфоциты, $\times 10^9$ /л Lymphocytes, $\times 10^9$ /l	2,32 [2,01; 2,98]	2,34 [1,93; 3,99]	2,17 [1,04; 3,29]	2,26 [1,01; 3,98]	1,89 [0,98; 2,59]	0,151	0,632	0,016	0,171
Моноциты, $\times 10^9$ /л Monocytes, $\times 10^9$ /l	0,25 [0,15; 0,81]	0,28 [0,11; 0,68]	0,37 [0,09; 0,77]	0,35 [0,15; 0,86]	0,33 [0,08; 0,72]	0,001	0,006	0,094	0,662

Примечание. P — достоверность различий между показателями контрольной и исследуемыми группами по U-критерию Манна–Уитни.
Note. P — significant differences between indicators in control and study groups assessed by Mann–Whitney U-criterion.

Таблица 4. Динамика показателей иммунограммы у пациентов с ПКС, Ме [25; 75]
 Table 4. Dynamics of immune indicators in PCS patients, Me [25; 75]

Показатель Indicator	Группа I Group I n = 15	Группа II Group II n = 17	Группа III Group III n = 16	Группа IV Group IV n = 14	Группа V Group V n = 25	P-level			
	1–3 месяца 1–3 months	3–6 месяцев 3–6 months	6–12 месяцев 6–12 months	12–15 месяцев 12–15 months	Контрольная группа Control group	Группы I–V Groups I–V	Группы II–V Groups II–V	Группы III–V Groups III–V	Группы IV–V Groups IV–V
CD3 ⁺ , × 10 ⁹ /л	1,55 [0,42; 3,64]	1,19 [0,6; 2,22]	1,39 [0,83; 2,3]	1,65 [0,69; 2,75]	1,89 [0,55; 2,2]	0,117	0,001	0,029	0,420
CD4 ⁺ , × 10 ⁹ /л	0,98 [0,26; 2,31]	0,74 [0,43; 1,38]	0,87 [0,5; 1,52]	1,03 [0,29; 1,83]	1,25 [0,25; 1,51]	0,047	0,0001	0,003	0,117
CD8 ⁺ , × 10 ⁹ /л	0,49 [0,098; 1,27]	0,37 [0,13; 1,02]	0,42 [0,24; 0,66]	0,55 [0,28; 0,84]	0,58 [0,00; 0,07]	0,275	0,007	0,105	0,883
CD3 ⁺ CD19 ⁺ , × 10 ⁹ /л	0,20 [0,09; 0,4]	0,22 [0,06; 0,37]	0,23 [0,1; 0,3]	0,24 [0,01; 0,3]	0,26 [0,03; 0,4]	0,05	0,04	0,04	0,05
CD3 ⁺ CD19 ⁺ , × 10 ⁹ /л	1,04 [0,5; 1,6]	0,625 [0,3; 1,2]	0,08 [0,2; 1,3]	1,13 [0,8; 1,7]	1,29 [0,9; 1,8]	0,13	0,01	0,04	0,02
IgA, г/л	2,27 [1,5; 3,4]	2,625 [1,9; 2,9]	2,6 [1,6; 3,4]	1,13 [0,9; 2,0]	1,39 [0,99; 1,5]	0,008	0,001	0,04	0,01
IgM, г/л	14,46 [11,5; 16,0]	12,27 [7,5; 22,9]	13,28 [11,7; 20]	12,44 [5,5; 12,5]	11,03 [10,2; 13,6]	0,008	0,04	0,07	0,05
Общий IgE, МЕ/мл Total IgE, IU/ml	66,66 [3,0; 183,0]	85,65 [5,0; 172,0]	98 [12,0; 322,0]	87,7 [16,0; 256,0]	36,12 [0,4; 38,0]	0,001	0,002	0,007	0,003

Примечание. P — достоверность различий между показателями контрольной и исследуемыми группами по U-критерию Манна–Уитни.
 Note. P — significant differences between indicators in control and study groups assessed by Mann–Whitney U-criterion.

ный зуд, крапивницу (n = 2), папулы (n = 1), петехии, а также изменения цвета кожи в виде пятен розового, красного и фиолетового цвета.

В период 12–15 месяцев у 5 пациентов впервые проявился бронхообструктивный синдром. При этом в 3 случаях диагностирована атопическая бронхиальная астма с изменением спирограммы в виде снижения ОФВ1/ФЖЕЛ < 70%, ОФВ1 < 80% и положительной пробой с бронхолитиком (прирост на фоне приема сальбутамола составил 12–17%).

Спустя полгода значительно учащаются случаи суставного синдрома в виде синовита, артралгии и полиартралгии. У 7 пациентов изолированная артралгия или полиартралгия не сопровождалась поражением суставов по результатам их рентгенографии и УЗИ. В 8 случаях выявлены деформация хрящевой ткани, артрозо-артрит с присоединением признаков синовита. У двоих пациентов на фоне получаемого полного курса НПВС, хондропротекторов, внутрисуставного введения глюкокортикостероидов (ГКС) и физиотерапевтического лечения, разрушение хрящевой ткани коленных суставов прогрессировало, завершилось деструкцией хряща и развитием асептического некроза, что явилось показанием для проведения эндопротезирования. Довольно часто (n = 7) суставной синдром сочетался с атопическими проявлениями.

Обсуждение

В течение первых 6 месяцев после перенесенной инфекции COVID-19 в периферической крови всех пациентов отмечено сокращение абсолютного количества всех лейкоцитов в периферической крови. Более низкие значения абсолютного содержания нейтрофилов сохраняются в течение года после выздоровления. Отмечено, что в периферической крови у пациентов, перенесших COVID-19, уменьшается не только количество лейкоцитов, но и тромбоцитов [7]. С низким количеством тромбоцитов авторы связывают нарушение обычного течения послеоперационного периода после амбулаторных вмешательств [5]. При этом выявлена закономерность: чем раньше в ПКП проведено вмешательство, тем больше сроки нетрудоспособности вне зависимости от объема операции. Учитывая динамику лейкограммы, можно утверждать, что не только недостаточный уровень тромбоцитов неблагоприятно влияет на репаративные процессы в области послеоперационной раны, но также и меньшее содержание микро- и макрофагов. Если у пациентов без ПКС снижение резистентности проявляется при каком-либо экстремальном воздействии, то при наличии ПКС оно уже имеет клиническую симптоматику.

Таблица 5. Частота воспалительных, аллергических и аутоиммунных проявлений у пациентов с ПКС
 Table 5. Frequency of inflammatory, allergic and autoimmune manifestations in PCS patients

	1–3 месяцев 1–3 months	3–6 месяцев 3–6 months	6–12 месяцев 6–12 months	12–15 месяцев 12–15 months
Частые РВИ Frequent respiratory viral infections	2	9	12	9
Гнойно-воспалительные поражения кожи Purulent-inflammatory skin lesions	3	4	5	4
Гнойно-воспалительные заболевания глаз Purulent-inflammatory eye diseases	2	4	3	2
Гнойно-воспалительные заболевания ЛОР-органов Purulent-inflammatory diseases of the ETN organs	3	4	7	5
Кишечные инфекции и дисбиоз Intestinal infections and dysbiosis	0	4	9	4
Герпес Herpes	0	2	3	1
Аллергия Allergy	1	1	5	5
Суставной синдром Joint syndrome	0	2	10	5
Всего исследуемых в группе Total subjects in the group	15	17	16	14

В исследованиях Ивановой И.А. и соавт. установлено, что относительное и абсолютное количество основных популяций и субпопуляций лимфоцитов у переболевших COVID-19, зависят от тяжести перенесенного заболевания [3]. При этом у переболевших в бессимптомной форме отличий лимфоцитарного профиля от контрольных величин выявлено не было, а восстановление популяционного и субпопуляционного состава лимфоцитов у переболевших в тяжелой форме происходит только через 7–8 месяцев. У обследованных нами пациентов с ПКС вне зависимости от тяжести перенесенной инфекции более низкое абсолютное количество $CD3^+$, $CD4^+$ и $CD3-CD19^+$ сохранялось в течение 12 месяцев после выздоровления, а в период 3–6 месяцев было меньшее количество и $CD8^+$. То есть при наличии ПКС недостаточность специфической защиты и дисбаланс в иммунной системе сохраняется более длительное время.

При ПКС наряду с уменьшением количества фагоцитов и различных популяций лимфоцитов нами выявлено уменьшение титров IgA, что является еще одним фактором снижения бактерицидных свойств слизистых оболочек и кожи. Учитывая важную роль IgA в иммунном ответе против SARS-CoV-2 [10, 14], можно объяснить высокую частоту повторного инфицирования этим вирусом у обследованных пациентов. Изменение микробиоты кишечника с преобладанием условно патогенных микроорганизмов лежит в основе формирования «синдрома раздраженного кишечника» и способствует развитию кишечных инфекций.

Кроме количественных изменений в иммунной системе после клинического выздоровления от COVID-19 также описаны нарушения функции лимфоцитов [18], причем их степень коррелирует с тяжестью инфекционного процесса [13, 17]. Вероятно, именно дисфункция иммуноцитов способствует формированию иммунопатологических процессов, которые манифестируют спустя полгода после выздоровления от COVID-19. О нарастающем изменении специфической реактивности свидетельствует прогрессирующее нарастание содержания общего IgE в течение года у пациентов с ПКС, что сопровождается учащением аллергических проявлений. Высокий титр IgE способствует активации тучных клеток [6]. Высвобождение из тучных клеток предсуществующих медиаторов и синтез новых, а также цитокинов способствует формированию кожных проявлений аллергии, диспепсии, артралгий. Формирование суставного синдрома и прогрессирование дегенеративных изменений суставов происходит на фоне повышенных титров IgM и IgG без изменения острофазовых показателей, что, вероятнее всего, является результатом IgE-независимого иммунного повреждения.

Таким образом, после перенесенной COVID-19-инфекции длительное время сохраняется низкий уровень неспецифической защиты. У пациентов с постковидным синдромом низкая неспецифическая и специфическая резистентность проявляется вирусными и бактериальными инфекциями слизистых оболочек и кожи. Дисбаланс в иммунной системе способствует формированию аллергических и аутоиммунных процессов.

Список литературы/References

1. Вельков В.В. Постковидный синдром — длинный COVID. Патофизиология, риски, биомаркеры, диагноз, прогноз. Пушино: АО «ДИАКОН», 2022. 22 с. [Velkov V.V. Postcovid syndrome — long COVID. Pathophysiology, risks, biomarkers, diagnosis, prognosis. *Pushchino: JSC "DEACON", 2022. 22 p. (In Russ.)*]
2. 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 immunopatology 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
3. Иванова И.А., Труфанова А.А., Филиппенко А.В., Омельченко Н.Д., Носков А.К., Чемисова О.С. Количественный и качественный состав популяций и субпопуляций лимфоцитов у перенесших новую коронавирусную инфекцию разной степени тяжести // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 3. С. 505–510. [Ivanova I.A., Trufanova A.A., Filippenko A.V., Omelchenko N.D., Noskov A.K., Chemisova O.S. Quantitative and qualitative composition of lymphocyte populations and subpopulations in patients with varying severity of a new coronavirus infection. *Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 3, pp. 505–510. (In Russ.)*] doi: 10.15789/2220-7619-QAQ-1818
4. Коробова З.Р., Тотолян А.А. Снижение MDC/CCCL22 при COVID-19 и в постковидном синдроме // Медицинская иммунология. 2023. Т. 25, № 4. С. 773–778. [Korobova Z.R., Totolian A.A. Reduction of MDC/CCCL22 in COVID-19 and postcovid syndrome. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia), 2023, vol. 25, no. 4, pp. 773–778. (In Russ.)*] doi: 10.15789/1563-0625-MCD-2804
5. Кусанов М.А., Эргемлидзе А.Т. Нетрудоспособность после амбулаторных операций у лиц, переболевших и не болевших коронавирусной инфекцией // Медицинская наука и образование Урала. 2023. Т. 24, № 2. С. 41–43. [Kusanov M.A., Ergemlidze A.T. Disability after outpatient surgeries in people who have been ill and have not been ill with coronavirus infection. *Meditsinskaya nauka i obrazovanie Urala = Medical Science and Education of the Urals, 2023, vol. 24, no. 2, pp. 41–43. (In Russ.)*] doi: 10.36361/18148999_2023_24_2_41
6. Микрюкова Н.В., Калинина Н.М. Синдром активации тучных клеток: новое мировоззрение // Медицинская иммунология. 2023. Т. 25, № 6. С. 1289–1298. [Mikryukova N.V., Kalinina N.M. Mast cell activation syndrome: a new worldview. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia), 2023, vol. 25, no. 6, pp. 1289–1298. (In Russ.)*] doi: 10.15789/1563-0625-MCA-2662
7. Низамов Ф.Х., Кусанов М.А., Эргемлидзе А.Т. Динамика содержания тромбоцитов в периферической крови в разные сроки постковидного периода // Медицинская наука и образование Урала. 2023. Т. 24, № 3. С. 72–74. [Nizamov F.H., Kusanov M.A., Ergemlidze A.T. Dynamics of platelet content in peripheral blood at different periods of the postcovid period. *Meditsinskaya nauka i obrazovanie Urala = Medical Science and Education of the Urals, 2023, vol. 24, no. 3, pp. 72–74. (In Russ.)*] doi: 10.36361/18148999_2023_24_3_72
8. Семенова Е.В., Павлюк В.В., Уварова М.А., Иванов А.В. Особенности гуморального иммунитета после перенесенного COVID-19 // Медицинская иммунология. 2022. Т. 24, № 2. С. 337–350. [Semenova E.V., Pavlyuk V.V., Uvarova M.A., Ivanov A.V. Features of humoral immunity after COVID-19. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia), 2022, vol. 24, no. 2, pp. 337–350. (In Russ.)*] doi: 10.15789/1563-0625-FOH-2452
9. Свирищевская Е.В., Коновалова М.В., Садыков В.Ф., Пырегов А.В., Полтавцева Р.А. Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови при COVID-19 // Медицинская иммунология. 2023, Т. 25, № 1. С. 155–166. [Svirshchevskaya E.V., Konovalova M.V., Sadykov V.F., Pyregov A.V., Poltavtseva R.A. Subpopulation composition of peripheral blood lymphocytes in COVID-19. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia), 2023, vol. 25, no. 1, pp. 155–166. (In Russ.)*] doi: 10.15789/1563-0625-SCO-2552
10. Ejemel M., Li Q., Hou S., Schiller Z.A., Tree J.A., Wallace A., Amcheslavsky A., Kurt Yilmaz N., Buttigieg K.R., Elmore M.J., Godwin K., Coombes N., Toomey J.R., Schneider R., Ramchetty A.S., Close B.J., Chen D.-Y., Conway H.L., Saeed M., Ganesa C., Carroll M.W., Cavacini L.A., Klempner M.S., Schiffer C.A., Wang Y. A cross-reactive human IgA monoclonal antibody blocks SARS-CoV-2 spike-ACE2 interaction. *Nat. Commun., 2020, vol. 11, no. 1: 4198. doi: 10.1038/s41467-020-18058-8.*
11. Golovkin A., Kalinina O., Bezrukikh V., Aquino A., Zaikova E., Karonova T., Melnik O., Vasilieva E., Kudryavtsev I. Imbalanced immune response of T-cell and B-cell subsets in patients with moderate and severe COVID-19. *Viruses, 2021, vol. 13, no. 10: 1966. doi: 10.3390/v13101966.*
12. Kuri-Cervantes L., Pampena M., Meng W., Rosenfeld A., Ittner C., Weisman A., Agyekum R., Mathew D., Baxter A., Vella L., Kuthuru O., Apostolidis S., Bershaw L., Dougherty J., Greenplate A., Pattekar A., Kim J., Han N., Gouma S., Weirick M., Arevalo C., Bolton M., Goodwin E., Anderson E., Hensley S., Jones T., Mangalmurti N., Lun-Ing Prak E., Wherry E., Meyer N., Betts M. Comprehensive mapping of immune perturbations associated with severe COVID-19. *Sci. Immunol., 2020, vol. 5, no. 49: eabd7114. doi: 10.1126/sciimmunol.abd711457*
13. Liu J., Li S., Liu J., Liang B., Wang X., Wang H., Li W., Tong Q., Yi J., L. Zhao, Xiong L., Guo C., Tian J., Luo J., Yao J., Pang R., Shen H., Peng C., Liu T., Zhang Q., Wu J., Xu L., Lu S., Wang B., Weng Z., Han C., Zhu H., Zhou R., Zhou H., Chen X., Ye P., Zhu B., Wang L., Zhou W., He S., He Y., Jie S., Wei P., Zhang J., Lu Y., Wang W., Zhang L., Li L., Zhou F., Wang J., Dittmer U., Lu M., Hu Y., Yang D., Zheng X. Longitudinal characteristics of lymphocyte responses and cytokine profiles in the peripheral blood of SARS-CoV-2 infected patients. *EBioMedicine, 2020, vol. 55: 102763. doi: 10.1016/j.ebiom.2020.1027639*
14. Mai H.K., Trieu N.B., Long T.H., Thanh H.T., Luong N.D., Huy L.X., Nguyet L.A., Man D.N.H., Anderson D.E., Thanh T.T., Chau N.V.V., Thwaites G., Wang L.-F., Tan L.V., Hung D.T. Long-term humoral immune response in persons with asymptomatic or mild SARS-CoV-2 infection, Vietnam. *Emerg. Infect. Dis., 2021, vol. 27, no. 2, pp. 663–666.*

15. Phetsouphanh C., Darley D.R., Wilson D.B., Howe A., Munier C.M.L., Patel S.K., Juno J.A., Burrell L.M., Kent S.J., Dore G.J., Kelleher A.D., Matthews G.V. Immunological dys-function persists for 8 months following initial mild-to-moderate SARS-CoV-2 infection. *Nat. Immunol.*, 2022, vol. 23, no. 2, pp. 210–216. doi: 10.1038/s41590-021-01113-x
16. Qin C., Zhou L., Hu Z., Zhang S., Yang S., Tao Y., Xie C., Ma K., Shang K., Wang W., Tian D.S. Dysregulation of immune response in patients with Coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. *Clin. Infect. Dis.*, 2020, vol. 71, no. 15, pp. 762–768. doi: 10.1093/cid/ciaa248
17. Wan S., Yi Q., Fan S., Lv J., Zhang X., Guo L., Lang C., Xiao Q., Xiao K., Yi Z., Qiang M., Xiang J., Zhang B., Chen Y., Gao C. Relationships among lymphocyte subsets, cytokines, and the pulmonary inflammation index in coronavirus (COVID-19) infected patients. *Br. J. Haematol.*, 2020, vol. 189, no. 3, pp. 428–437. doi: 10.1111/bjh.16659
18. Yang J., Zhong M., Zhang E., Hong K., Yang Q., Zhou D., Xia J., Chen Y.-Q., Sun M., Zhao B., Xiang J., Liu Y., Han Y., Zhou X., Huang C., Shang Y., Yan H. Broad phenotypic alterations and potential dysfunctions of lymphocytes in COVID-19 recovered individuals. *J. Mol. Cell Biol.*, 2021, vol. 13, no. 3, pp. 197–209. doi: 10.1093/jmcb/mjab014

Авторы:

Жданова Е.В., д.м.н, профессор, зав. кафедрой патологической физиологии ФГБОУ ВО Тюменский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Тюмень, Россия;
Рубцова Е.В., аспирант ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии имени академика Г.А. Илизарова Минздрава России, г. Курган, Россия;
Костоломова Е.Г., к.б.н., доцент кафедры микробиологии ФГБОУ ВО Тюменский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Тюмень, Россия.

Authors:

Zhdanova E.V., DSc (Medicine), Professor, Head of Pathological Physiology Department, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation;
Rubtsova E.V., PhD Student, National Medical Research Center of Traumatology and Orthopedics named after academician G.A. Ilizarov, Kurgan, Russian Federation;
Kostolomova E.G., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Microbiology, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation.

Поступила в редакцию 07.05.2024
Принята к печати 13.08.2024

Received 07.05.2024
Accepted 13.08.2024

НАРУШЕНИЯ Т-КЛЕТОЧНОГО ЗВЕНА ИММУНИТЕТА ЧЕРЕЗ 6–12 МЕСЯЦЕВ ПОСЛЕ ОСТРОЙ ФАЗЫ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ: СКРИНИНГОВОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

А.В. Зурочка^{1,2}, М.А. Добрынина^{1,2,3}, Э.А. Сафронова^{3,4}, В.А. Зурочка^{1,2}, А.А. Зуйкова²,
Г.П. Сарапульцев⁵, О.И. Забков², А.А. Мосунов^{2,6}, М.Д. Верховская^{2,6}, В.В. Дукардт²,
Л.О. Фомина², Е.Г. Костоломова⁷, Ю.В. Останкова⁸, И.В. Кудрявцев⁹, А.А. Тотолян⁸

¹ ФГБУН Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

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

³ ФГБУ Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр
им. А.И. Бурназяна Федерального научно-биологического агентства Российской Федерации, Москва, Россия

⁴ ФГБОУ ВО Южно-Уральский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Челябинск, Россия

⁵ ФГКУ 354-й Военный клинический госпиталь ЦВО, г. Екатеринбург, Россия

⁶ ФГБОУ ВО Челябинский государственный университет, г. Челябинск, Россия

⁷ ФГБОУ ВО Тюменский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Тюмень, Россия

⁸ ФБун НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

⁹ ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. При острой вирусной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2, отмечается снижение уровня Т-лимфоцитов в периферической крови пациентов, что, по-видимому, тесно связано с нарушениями функционирования тимуса, которые могут сохраняться длительное время после перенесенного заболевания. Поэтому целями данного исследования явились изучение уровня Т-клеточных эксцизионных колец (TREC, от англ. «T-cell receptor excision circles»), а также оценка состояния иммунной системы пациентов на основе скрининга по основным субпопуляциям лимфоцитов периферической крови человека после перенесенного COVID-19. Были сформированы следующие группы пациентов: пациенты, которые были обследованы через 6–12 месяцев после перенесенного острого COVID-19 с нормальным содержанием TREC (TRECn, n = 109); пациенты, которые также были обследованы

Адрес для переписки:

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

Contacts:

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

Для цитирования:

Зурочка А.В., Добрынина М.А., Сафронова Э.А., Зурочка В.А., Зуйкова А.А.,
Сарапульцев Г.П., Забков О.И., Мосунов А.А., Верховская М.Д.,
Дукардт В.В., Фомина Л.О., Костоломова Е.Г., Останкова Ю.В.,
Кудрявцев И.В., Тотолян А.А. Нарушения Т-клеточного звена иммунитета
через 6–12 месяцев после острой фазы коронавирусной инфекции:
скрининговое исследование // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 4.
С. 756–768. doi: 10.15789/2220-7619-AIT-17646

Citation:

Zurochka A.V., Dobrynina M.A., Safronova E.A., Zurochka V.A., Zuykova A.A.,
Sarapultsev G.P., Zabkov O.I., Mosunov A.A., Verkhovskaya M.D., Ducardt V.V.,
Fomina L.O., Kostolomova E.G., Ostanokova Yu.V., Kudryavtsev I.V., Totolian A.A.
Alterations in T cell immunity over 6–12 months post COVID-19 infection
in convalescent individuals: a screening study // Russian Journal of Infection
and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 4, pp. 756–768.
doi: 10.15789/2220-7619-AIT-17646

Работа выполнена по теме госзаданий ИИФ УрО РАН: «Имунофизиологические и патофизиологические механизмы регуляции и коррекции функций организма», № госрегистрации 122020900136-4; НИИВИ «ВИРОМ»: «Изучение механизмов формирования хронической вирусной инфекции у пациентов с постковидным синдромом и нарушением функций иммунной системы. Разработка патогенетических подходов к эффективной профилактике и иммунокоррекции выявленных нарушений у пациентов с «постковидным синдромом», № госрегистрации 124031800093-5; ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»: «Исследование механизмов дифференцировки Т-лимфоцитов и молекулярно-клеточных основ регуляции иммунного ответа для разработки новых технологий клеточной иммунотерапии онкологических, инфекционных и аутоиммунных заболеваний», № госрегистрации 122020300186-5; ФБун «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»: «Изучение механизмов формирования иммунного ответа на новую коронавирусную инфекцию, вызванную SARS-CoV-2 у населения Северо-Западного федерального округа», № госрегистрации 121030200299-3.

The work was carried out on the theme of state orders of the Institute of Immunology and Physiology (Ural Branch of the RAS): "Immunophysiological and pathophysiological mechanisms of regulation and correction of body functions", No. of state registration 122020900136-4; Federal Research Institute of Viral Infections "ViroM": "Study of mechanisms of formation of chronic viral infection in patients with post-covid syndrome and immune system dysfunction. Development of pathogenetic approaches to effective prophylaxis and immunocorrection of the revealed disorders in patients with post-covid syndrome", No. of state registration 124031800093-5; Institute of Experimental Medicine: "Study of mechanisms of T-lymphocyte differentiation and molecular and cellular bases of immune response regulation for the development of new technologies for cellular immunotherapy of oncological, infectious and autoimmune diseases", No. of state registration 122020300186-5, St. Petersburg Pasteur Institute: "Study of mechanisms of immune response formation to a new coronavirus infection caused by SARS-CoV-2 in the population of the North-Western Federal District", No. of state registration 121030200299-3.

дованы через 6–12 месяцев после перенесенного острого COVID-19, но обладавшие сниженным содержанием ТREC в периферической крови (TREC_{low}, n = 29); условно здоровые добровольцы (HC, n = 18). Для оценки уровней ТREC применяли набор реагентов «TREC/KREC-AMP PS», для выявления основных субпопуляций лимфоцитов использовали многоцветную проточную цитометрию. Обследованные группы достоверно не различались по уровню CD3⁺ клеток. Однако в случае CD4⁺ Т-клеток было обнаружено, что обе группы пациентов TREC_{low} и TREC_n длительное время сохраняют сниженное относительное содержание этих клеток в циркулирующей крови по сравнению с контрольными значениями (40,8% (31,6; 50,1) и 46,4% (40,0; 53,0) против 53,5% (47,36; 56,9) при p < 0,001 и p = 0,004 соответственно). Абсолютное содержание CD4⁺ Т-лимфоцитов у TREC_{low} пациентов было снижено как HC, так и TREC_n (701 кл/1 мкл (478; 807) против 1005 кл/1 мкл (700; 1419) при p = 0,020 и 876 кл/1 мкл (661; 1046) при p = 0,008 соответственно). Содержания CD8⁺ Т-лимфоцитов было достоверное увеличено в обеих группах пациентов после острого COVID-19 — 29,4% (20,7; 39,7) в группе TREC_{low}, 26,5% (21,1; 32,7) в группе TREC_n против 21,3% (17,1; 26,0) в группе сравнения при p = 0,024 и p = 0,026 соответственно. Кроме того, в группе TREC_n абсолютное содержание CD8⁺ Т-клеток достоверно превосходило значения контроля (508 кл/1 мкл (372; 622) против 356 кл/1 мкл (247; 531) при p = 0,044). Полученные нами результаты указывают факт нарушения функционирования Т-клеточного звена приобретенного иммунитета у пациентов после перенесенной коронавирусной инфекции, которые могут быть тесно связаны с процессами созревания и дифференцировки Т-клеток в тимусе. Длительное снижение уровня ТREC в циркуляции может оказывать существенные влияния на состояние иммунной системы пациентов и нуждается в проведении иммунокорректирующей терапии.

Ключевые слова: проточная цитометрия, уровень ТREC, Т-лимфоциты, Т-хелперы, цитотоксические Т-лимфоциты, пост-COVID-19.

ALTERATIONS IN T CELL IMMUNITY OVER 6–12 MONTHS POST-COVID-19 INFECTION IN CONVALESCENT INDIVIDUALS: A SCREENING STUDY

Zurochka A.V.^{a,b}, Dobrynina M.A.^{a,b,c}, Safronova E.A.^{c,d}, Zurochka V.A.^{a,b}, Zuikova A.A.^b, Sarapultsev G.P.^e, Zabkov O.I.^b, Mosunov A.A.^{b,f}, Verkhovskaya M.D.^{b,f}, Ducardt V.V.^b, Fomina L.O.^b, Kostolomova E.G.^g, Ostankova Yu.V.^h, Kudryavtsev I.V.ⁱ, Totolian A.A.^h

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

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

^c 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

^d South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

^e 354 Military Clinical Hospital of the Russian Ministry of Defense, Ekaterinburg, Russian Federation

^f Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

^g Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

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

ⁱ Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Acute COVID-19 is a viral infection caused by a severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) that results in dramatically decreased peripheral blood CD3⁺ T cell count apparently due to alterations of thymic T cell maturation, that can persist long term afterwards. Therefore, we analyzed the levels of peripheral blood TRECs (T-cell receptor excision circles), and investigated the main alterations in peripheral blood T cell subsets in COVID-19 convalescents. We performed molecular quantification of TRECs with “TREC/KREC-AMP PS” kit and flow cytometric analysis of peripheral blood lymphocytes from three groups of patients. The first group contained 109 samples from COVID-19 convalescents (6–12 month post-acute COVID-19) with normal levels of TRECs (TREC_n); the second was formed from COVID-19 convalescents (6–12 month post-acute COVID-19) with decreased levels of TRECs (TREC_{low}, n = 29), and healthy control group (HC, n = 18). We noticed no significant differences between all three groups in CD3⁺ T cell relative and absolute numbers. However, CD4⁺ T cell frequencies were decreased in TREC_{low} and TREC_n groups compared to HC (40.8% (31.6; 50.1) and 46.4% (40.0; 53.0) vs 53.5% (47.36; 56.9), p < 0.001 and p = 0.004, respectively). Furthermore, Th cell levels were decreased in TREC_{low} patients vs HC and TREC_n groups (701 cell/1 μL (478; 807) vs 1005 cell/1 μL (700; 1419), p = 0.020, and 876 cell/ 1 μL (661; 1046), p = 0.008, respectively). Finally, both groups of COVID-19 convalescents had increased frequencies of circulating CD8⁺ T cells — 29.4% (20.7; 39.7) in TREC_{low} group, 26.5% (21.1; 32.7) in TREC_n group vs 21.3% (17.1; 26.0) in healthy controls (p = 0.024 and p = 0.026, respectively). In TREC_n group, CD8⁺ T cell count was elevated vs control range (508 cell/1 μL (372; 622) vs 356 cell/1 μL (247; 531), p = 0.044). Thus, COVID-19 convalescents (6–12 month post-acute COVID-19) showed an imbalance in CD4⁺ and CD8⁺ T cell level even at 6–12 months post-acute SARS-CoV-2 infection, and the observed changes in peripheral blood T cells could be closely related to the alterations in thymic T cell maturation and differentiation. Such a long-term decline in TREC levels in the circulation may have a profound impact on immune system functions and requires immunocorrection therapy.

Key words: flow cytometry, TRECs level, T cells, Th cells, CD8⁺ T cells, post-COVID-19.

Введение

Одной из отличительных характеристик острой вирусной инфекции, вызванной инвазией вируса SARS-CoV-2, является выраженное снижение уровня лимфоцитов в периферической крови пациентов, что уже отмечалось в самых первых исследованиях. Так, в рамках общего пула лейкоцитов периферической крови у больных COVID-19 отмечалось снижение Т-лимфоцитов по мере увеличения тяжести заболевания, тогда как повышение доли этих клеток могло рассматриваться в качестве благоприятного признака [23]. Более того, содержание Т-лимфоцитов в периферической крови находилось в обратной зависимости от концентраций IL-6 и IL-10, уровень которых при инфицировании SARS-CoV-2 возрастал по мере увеличения тяжести течения заболевания [11]. Пониженный уровень Т-лимфоцитов в динамике наблюдений, равно как и CD3⁺CD4⁺ и CD3⁺CD8⁺ клеток, был характерен для больных тяжелой формой течения заболевания при сравнении со среднетяжелыми случаями [22]. Кроме того, была обнаружена зависимость между уровнем Т-клеток в циркуляции и тяжестью течения COVID-19, выраженной в баллах шкалы APACHE III [21]. Столь же важные результаты были получены при оценке степени зрелости CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов, циркулирующих в периферической крови пациентов в острой фазе заболевания, выявившие, в первую очередь, снижение уровня «наивных» Т-клеток обеих популяций [9, 20, 24, 25].

Снижение уровня «наивных» Т-клеток, обладающих широким спектром уникальных специфичностей Т-клеточных рецепторов, характерно для различных вирусных и бактериальных инфекций, которые негативно влияют на функцию тимуса за счет прямого воздействия на клетки микроокружения тимуса, как это было показано для SARS-CoV-2 [31], или за счет системных эффектов растворимых факторов, высвобождаемых в кровотоке, таких как глюкокортикоиды и провоспалительные цитокины [13, 16]. Именно поэтому анализ содержания «наивных» Т-клеток, прошедших антигензависимую дифференцировку в тимусе и вышедших в периферическую кровь, может быть важнейшим методом для оценки эффективности тимопоэза. Для этих целей традиционно применяют несколько методических подходов, включая анализ экспрессии CD31, позволяющих выявить циркулирующие «ранние тимические мигранты» с фенотипом CD31⁺CD45R0⁻CD62L⁺ [18] при помощи проточной цитометрии или определение уровня Т-клеточных эксцизионных колец (TREC, от англ. «T-cell receptor excision circles») [5]. TREC — это внехро-

мосомные продукты кругового вырезания молекул ДНК при перестройке генов Т-клеточных рецепторов (TCR) в ходе соматической рекомбинации ДНК, которые образуются при созревании Т-клеток в тимусе. Кольцевые молекулы TREC образуются в дважды-негативных тимоцитах (DN4 тимоциты) на этапе перестройки α -цепи TCR при рекомбинации элементов δ Rec и ψ J α с последующей делецией локуса TCR δ . TREC обнаруживаются в тимоцитах и «наивных» Т-лимфоцитах при помощи методов молекулярной биологии, что делает данный подход к анализу эффективности функционирования тимуса удобным для использования в клинической лабораторной диагностике [1]. При оценке уровней молекул TREC у больных COVID-19 обнаружено их достоверное снижение по сравнению со здоровыми людьми [6]. При этом не только показана прямая корреляция уровней TREC с количеством CD3⁺ клеток, но и достоверное снижение количества молекул TREC у больных с тяжелым течением заболевания по сравнению со среднетяжелым в группе лиц в возрасте 30–49 лет [5].

Именно поэтому целью данного исследования явилось изучение уровня TREC, а также состояние иммунной системы пациентов на основе скрининга по основным субпопуляциям лимфоцитов периферической крови человека в норме и после перенесенной COVID-19 инфекции.

Материалы и методы

Характеристика пациентов. В основной части исследования нами были обследованы три группы пациентов, в том числе группа контроля, в которую вошли условно здоровые добровольцы на момент обследования, не имевшие острых или обострения хронических воспалительных заболеваний (НС, n = 18); группа пациентов, которые были обследованы через 6–12 месяцев после перенесенного острого COVID-19 с нормальным содержанием TREC (TREC_n, n = 109); а также группа пациентов, которые также были обследованы через 6–12 месяцев после перенесенного острого COVID-19, но обладавшие сниженным содержанием TREC в периферической крови (TREC_{low}, n = 29). Все три группы были в возрасте 45–65 лет и достоверно не отличались друг от друга по половому составу.

Во второй части исследования анализировали 25 образцов периферической крови, полученных от 25 пациентов, имевших в анамнезе перенесенный ранее COVID-19 с не менее чем 25%-м поражением легких, а также обострение хронических воспалительных заболеваний.

Все пациенты были предварительно обследованы врачом терапевтом и иммунологом-ал-

лергологом для выявления сопутствующих заболеваний. Все обследованные пациенты подписывали информированное согласие на обследование. Все исследования были одобрены независимым локальным этическим комитетом при ГАУЗ ОТКЗ «Городская клиническая больница № 1» г. Челябинска, протокол № 8 от 11.04.2022 на базе которой проводились данные исследования.

Определение уровней TREC в периферической крови. Взятие крови осуществляли в пробирку с антикоагулянтом ЭДТА. Экстракцию тотальной ДНК из лейкоцитарной фракции венозной периферической крови проводили с использованием набора «РИБО-преп» (ЦНИИЭ, Москва, Россия). Для оценки уровней молекул TREC со всеми образцами тотальной ДНК проводили количественную мультиплексную Real-time ПЦР с одновременной амплификацией целевого фрагмента ДНК TREC и фрагментов двух нормировочных генов HPRT и RPP30 с использованием набора реагентов «TREC/KREC-AMP PS» (ФБУН НИИ Пастера, Санкт-Петербург), согласно инструкции производителя. Количественную оценку содержания молекул TREC проводили с помощью метода построения стандартных кривых [7]. Анализ полученных данных осуществляли в сравнении со значениями нормы, установленными ранее для взрослых людей разных возрастных групп [4].

Проточная цитометрия. Объектом исследования служила периферическая кровь, собранная в вакуумные пробирки с содержанием К₃ЭДТА в качестве антикоагулянта. Подготовку образцов для проведения проточной цитометрии осуществляли в день получения образцов (не более 6 часов после пункции локтевой вены). В рамках первой части исследования для выявления основных субпопуляций лимфоцитов периферической крови применяли реактивы компании Beckman Coulter (США) под коммерческим названием TetraChrome. Так, для определения абсолютного и относительного содержания Т-лимфоцитов (фенотип CD3⁺CD19⁻), В-лимфоцитов (фенотип CD3⁻CD19⁺), NK-клеток (фенотип CD3⁻CD56⁺CD16⁺) и Т-NK лимфоцитов (фенотип CD3⁺CD56⁺CD16⁺) использовали следующую комбинацию флуорохром-меченных моноклональных антител: CD45-FITC, CD56-RD1+CD16-PE, CD19-ECD и CD3-PC5. Для выявления основных субпопуляций Т-клеток — Т-хелперов с фенотипом CD3⁺CD4⁺ и цитотоксических Т-лимфоцитов с фенотипом CD3⁺CD8⁺ — использовали смесь антител, включавшую CD45-FITC, CD4-RD1, CD8-ECD и CD3-PC5. Удаление эритроцитов из образцов проводили с использованием лизирующего раствора VersaLyse (Beckman Coulter,

США). Абсолютные значения указанных выше популяций лимфоцитов были получены в одноплатформенной системе с использованием флуоресцентных частиц FlowCount™ (Beckman Coulter, США). Анализ образцов проводили на проточном цитофлуориметре Navios™ (Beckman Coulter, США), оснащенный 488 и 638 нм лазерами. В каждом образце анализировали не менее 10 000 лимфоцитов.

Во второй части исследований проводили сравнение результатов анализа основных субпопуляций лимфоцитов периферической крови, полученных при использовании набора реагентов TetraChrome компании Beckman Coulter (США), а также наборов реагентов «Статус Флоу-1 тетра BR» и «Статус Флоу-2 тетра BR» производства компании «Алкор Био» (Россия). При помощи реагентов «Статус Флоу-1 тетра BR», состоявших их антител против CD3-FITC/CD8-PE/CD45-PerCP-Cy5.5/CD4-APC, определяли основные субпопуляции Т-клеток. Тогда как с использованием набора «Статус Флоу-2 тетра BR», включавшего антитела против CD45-PerCP-Cy5.5/CD3-FITC/CD56⁺16-PE/CD19-APC определяли В- и NK-клетки. Удаление эритроцитов из образцов проводили с использованием лизирующего раствора «ВерсаФлоу» производства компании «Алкор Био» (Россия). Анализ образцов проводили на проточном цитофлуориметре Navios™ (Beckman Coulter, США), оснащенный 488 и 638 нм лазерами. В каждом образце анализировали не менее 10 000 лимфоцитов.

Статистическая обработка полученных результатов. Обработку данных проточной цитометрии проводили при помощи программ Navios Software v.1.2 и Kaluza™ v.2.0 (Beckman Coulter, США). Статистическую обработку проводили при помощи программного обеспечения Statistica 8.0 (StatSoft, США) и R version 4.3.2 (2023-10-31 ucrt) Eye Holes RStudio version 2023.09.1+494 Desert Sunflower (The R Foundation, США). Результаты, полученные в ходе исследования абсолютного и относительного содержания лимфоцитов в периферической крови, выражали в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (Q₂₅ и Q₇₅). Корреляционный анализ проводили с использованием критерия Спирмена. Проверку данных на соответствие типа распределения нормальному проводили при помощи критерия Шапиро–Уилка в каждой группе отдельно. Гомогенность дисперсий в группах проверяли при помощи критерия Фишера. Для сравнения трех групп пациентов применяли непараметрический критерий Краскела–Уоллиса. При сравнении результатов по относительному и абсолютному содержанию лимфоцитов, полученных при помощи реагентов компаний Beckman Coulter и Алкор Био,

в двух связанных группах при соблюдении условий нормальности распределения значений и отсутствия в них значимых выбросов проводили при помощи парного теста Стьюдента. В случае нарушения условия нормальности распределения исследуемых параметров в группах или равенства дисперсий группы сравнивали при помощи критерия Вилкоксона для связанных наблюдений.

Результаты

При анализе относительного и абсолютного содержания CD3⁺ Т-лимфоцитов периферической крови у пациентов сравниваемых групп и условно здоровых добровольцев нами не было отмечено достоверных различий по сравниваемым параметрам (рис. 1). Так, у пациентов с низким уровнем TREC в периферической крови эти значения составили 72,4% (69,4; 79,2) и 1251 кл/1 мкл (1001; 1611), для группы с нормальным содержанием TREC — 76,1% (71,1; 80,7) и 1501 кл/1 мкл (1180; 1765), а в группе контроля — 77,5% (74,1; 80,0) и 1666 кл/1 мкл (1033; 1926). Кроме того, в случае пациентов с нормальным содержанием TREC в периферической крови нами были выявлены положительные корреляции между относительным и абсолютным содержанием CD3⁺ Т-лимфоцитов и уровнем TREC ($r = 0,258$ при $p = 0,007$ и $r = 0,215$ при $p = 0,025$ соответственно).

Анализ отдельных субпопуляций Т-лимфоцитов, выявленных в случае Т-хелперов на ос-

новании коэкспрессии CD3 и CD4, а в случае цитотоксических Т-лимфоцитов — на основании наличия CD3 и CD8 на поверхностной мембране клеток, показал существенные различия между анализируемыми группами. Так, в случае CD4⁺ Т-клеток было обнаружено (рис. 2), что обе группы пациентов, переболевших COVID-19, длительное время сохраняют сниженное относительное содержание этих клеток в циркулирующей крови по сравнению с контрольными значениями (40,8% (31,6; 50,1) в группе TREC^{low} и 46,4% (40,0; 53,0) в группе с нормальным уровнем TREC против 53,5% (47,36; 56,9) в группе сравнения при $p < 0,001$ и $p = 0,004$ соответственно). Более того, сниженная концентрация TREC в крови была связана с более низким содержанием CD4⁺ Т-клеток в циркуляции ($p = 0,027$) у пациентов, успешно перенесших COVID-19. Абсолютное содержание CD4⁺ Т-лимфоцитов в периферической крови пациентов с низким уровнем TREC было снижено по сравнению как с группой контроля, так и пациентами с нормальным содержанием TREC (701 кл/1 мкл (478; 807) против 1005 кл/1 мкл (700; 1419) при $p = 0,020$ и 876 кл/1 мкл (661; 1046) при $p = 0,008$ соответственно). Кроме того, у пациентов со сниженным содержанием TREC была выявлена обратная зависимость между концентрацией CD4⁺ Т-клеток и уровнем TREC в циркуляции ($r = -0,422$ при $p = 0,022$).

Вместе с тем при анализе содержания CD8⁺ Т-лимфоцитов периферической крови нами

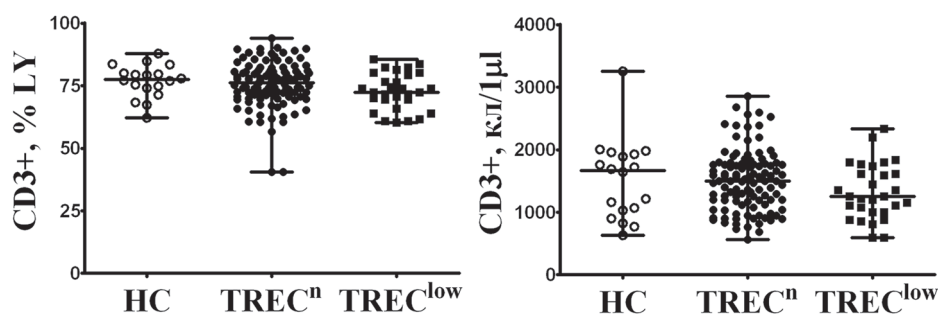


Рисунок 1. Содержание CD3⁺ клеток периферической крови у пациентов после острого COVID-19 с разными уровнями TREC

Figure 1. Peripheral blood T cell frequencies in COVID-19 convalescents with varying TRECs levels

Примечание. Результаты приведены в виде процента от общего числа лимфоцитов и абсолютных значений (кол-во клеток в 1 μl цельной крови) и представлены в виде медианы и интерквартильного размаха [Med (Q₂₅; Q₇₅)]. Для сравнения полученных выборок использовали непараметрический критерий Краскела–Уоллиса. Здесь и далее: белые круги — группа контроля (HC, n = 18); черные круги — пациенты, перенесшие COVID-19, с нормальным содержанием TREC (TRECn, n = 109); черные квадраты — пациенты, перенесшие COVID-19, со сниженным содержанием TREC (TREC^{low}, n = 29).

Note. The obtained data are presented as percent of cells within total lymphocyte subset (%), as well as absolute numbers (the number of cells in 1 μL of whole peripheral blood, right). Each dot represents individual subjects, and horizontal bars depict the group medians and quartile ranges [Med (Q₂₅; Q₇₅)]. The statistical analysis was performed with the Mann–Whitney U test. Here and on the Fig. 2 and 3: white circles denote healthy control group (HC, n = 18); black circles — convalescent COVID-19 individuals with normal levels of TRECs (TRECn, n = 109); black squares — convalescent COVID-19 individuals with low levels of TRECs (TREC^{low}, n = 29).

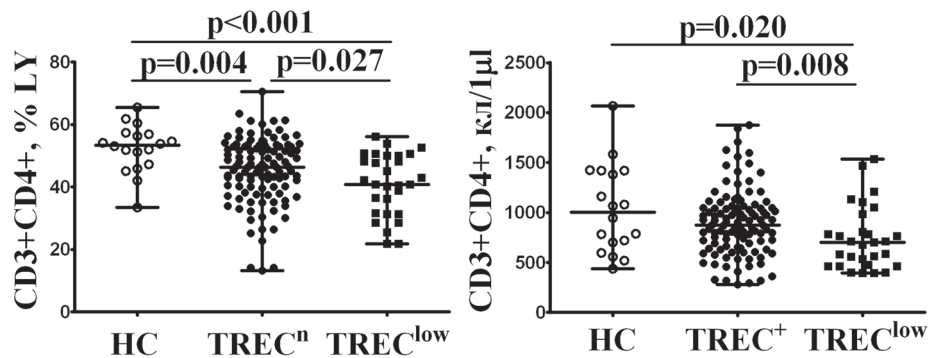


Рисунок 2. Содержание CD3⁺CD4⁺ клеток периферической крови у пациентов после острого COVID-19 с разными уровнями TREC

Figure 2. CD4⁺ T cells frequencies in peripheral blood samples from COVID-19 convalescents with different levels of TRECs

Примечание. Результаты приведены в виде процента от общего числа лимфоцитов и абсолютных значений (кол-во клеток в 1 μ л цельной крови), и представлены в виде медианы и интерквартильного размаха [Med (Q₂₅; Q₇₅)]. Для сравнения полученных выборок использовали непараметрический критерий Краскела–Уоллиса.

Note. The obtained data are presented as percent of cells within total lymphocyte subset (%), as well as absolute numbers (the number of cells in 1 μ L of whole peripheral blood, right). Each dot represents individual subjects, and horizontal bars depict the group medians and quartile ranges [Med (Q₂₅; Q₇₅)]. The statistical analysis was performed with the Mann–Whitney U test.

было показано (рис. 3) достоверное увеличение процентного содержания этих клеток в обеих группах пациентов после острого COVID-19 (29,4% (20,7; 39,7) в группе TREC^{low} и 26,5% (21,1; 32,7) в группе с нормальным уровнем TREC против 21,3% (17,1; 26,0) в группе сравнения при $p = 0,024$ и $p = 0,026$ соответственно). Кроме того, в группе с нормальным уровнем TREC в циркулирующей крови абсолютное содержание CD8⁺ Т-клеток достоверно превосходило значения контроля (508 кл/1 мкл (372; 622) против 356 кл/1 мкл (247; 531) при $p = 0,044$). Более того, нарушение содержания CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток

оказывали существенное влияние на соотношение CD4/CD8 в периферической крови пациентов, перенесших COVID-19, по сравнению со значениями, полученными для группы контроля. В обеих группах пациентов нами было отмечено достоверное снижение данного индекса (1,70 (0,90; 2,50) в группе TREC^{low} и 1,80 (1,30; 2,40) в группе с нормальным уровнем TREC против 2,40 (2,00; 3,20) в группе сравнения при $p = 0,004$ и $p = 0,005$ соответственно).

Кроме того, при исследовании лимфоцитов периферической крови пациентов, перенесших COVID-19, нами была проведена оценка CD19⁺

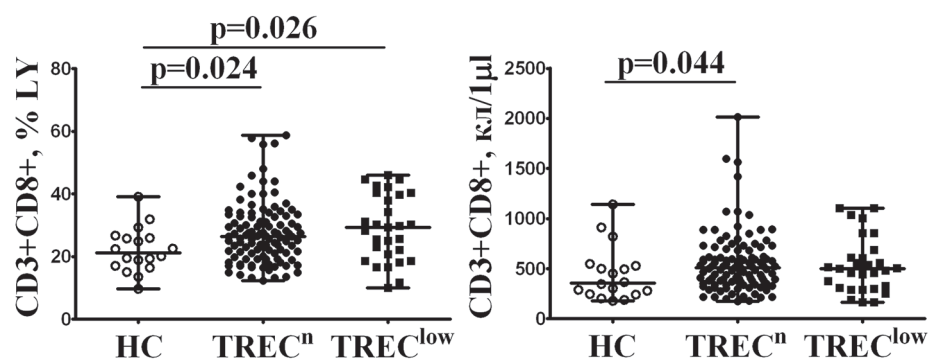


Рисунок 3. Содержание CD3⁺CD8⁺ клеток периферической крови у пациентов после острого COVID-19 с разными уровнями TREC

Figure 3. CD8⁺ T cells frequencies in peripheral blood samples from COVID-19 convalescents with different levels of TRECs

Примечание. Результаты приведены в виде процента от общего числа лимфоцитов и абсолютных значений (кол-во клеток в 1 μ л цельной крови) и представлены в виде медианы и интерквартильного размаха [Med (Q₂₅; Q₇₅)]. Для сравнения полученных выборок использовали непараметрический критерий Краскела–Уоллиса.

Note. The obtained data are presented as percent of cells within total lymphocyte subset (%), as well as absolute numbers (the number of cells in 1 μ L of whole peripheral blood, right). Each dot represents individual subjects, and horizontal bars depict the group medians and quartile ranges [Med (Q₂₅; Q₇₅)]. The statistical analysis was performed with the Mann–Whitney U test.

В-лимфоцитов и CD3-CD56⁺ натуральных киллеров. В случае В-клеток у пациентов с нормальным уровнем ТREC в крови отмечено достоверное увеличение доли клеток данной популяции (11,8% (8,6; 16,2) против 9,3% (6,5; 13,5) при $p = 0,032$), тогда как по другим показателям достоверных отличий показано не было. Более того, как относительное, так и абсолютное содержание CD3-CD56⁺ НК-клеток у пациентов вне зависимости от уровней ТREC в крови находилось в пределах значений контрольной группы (данные не приведены).

В рамках проведенного анализа пациентов ($n = 25$), перенесших COVID-19, нами была предпринята попытка сравнения моноклональных антител, полученных от разных фирм-производителей. Как показано в таблице, применение антител производства компании «Beckman Coulter» (США) и компании ООО «Алкор Био» (Россия) позволяло получить результаты, достоверных различий между которыми отмечено не было с использованием двух независимых критериев оценки. Сравнение непрерывных данных в двух связанных группах при соблюдении условий нормальности распределения значений и отсутствия в них значимых выбросов проводили при помощи парного теста Стьюдента (p_1). В случае нарушения условия нормальности распределения исследуемых параметров в группах или равенства дисперсий группы сравнивали при помощи критерия Вилкоксона

для связанных наблюдений (p_2). Проведенный анализ выявил отсутствие достоверных различий между сравниваемыми моноклональными антителами для проточной цитометрии, что позволило получить воспроизводимые результаты в рамках проведенного нами исследования.

Также нами была проведена оценка взаимосвязи результатов показателей клеточного иммунитета пациентов, перенесших COVID-19, полученных при использовании антител, произведенных компанией «Алкор Био» (Россия) и компанией «Beckman Coulter» (США). С помощью корреляционного анализа установлено наличие достоверных высоких положительных взаимосвязей между результатами, полученными при помощи антител двух разных фирм-производителей, по всем ключевым субпопуляциям лимфоцитов периферической крови (рис. 4).

Обсуждение

Полученные нами результаты указывают на факт нарушения функционирования Т-клеточного звена приобретенного иммунитета у пациентов после перенесенной коронавирусной инфекции, которые могут быть тесно связаны с процессами созревания и дифференцировки Т-клеток в тимусе. Длительное снижение уровня ТREC в циркуляции может оказывать существенные влияния на состоя-

Таблица. Анализ субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови пациентов, перенесших COVID-19 ($n = 25$), при помощи моноклональных антител производства компаний «Алкор Био» и «Beckman Coulter»

Table. Flow cytometric analysis of peripheral blood lymphocytes from COVID-19 convalescents based on monoclonal antibodies, manufactured by "Alkor Bio" and "Beckman Coulter Inc."

Популяция лимфоцитов Lymphocytes subsets		Антитела производства «Алкор Био» Antibodies, manufactured by "Alkor Bio"	Антитела производства «Beckman Coulter» Antibodies, manufactured by "Beckman Coulter Inc."	
Т-лимфоциты (CD3⁺CD19⁻) T cells (CD3 ⁺ CD19 ⁻)	%	76,8 (70,3; 79,2)	75,3 (68,8; 79,6)	$p_1 = 0,845$
	#	1270 (922; 1817)	1173 (1019; 1755)	$p_1 = 0,934$
В-лимфоциты (CD3⁻CD19⁺) B cells (CD3 ⁻ CD19 ⁺)	%	9,0 (6,7; 10,9)	9,3 (8,0; 11,5)	$p_2 = 0,938$
	#	152 (101; 214)	150 (104; 220)	$p_1 = 0,772$
НК-клетки (CD3⁻CD16⁺CD56⁺) NK-cells (CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺)	%	11,8 (9,1; 18,1)	10,7 (6,6; 15,2)	$p_1 = 0,576$
	#	228 (150; 327)	196 (121; 2730)	$p_2 = 0,594$
Т-хелперы (CD3⁺CD4⁺) Th cells (CD3 ⁺ CD4 ⁺)	%	51,4 (47,2; 57,5)	51,9 (45,3; 56,9)	$p_1 = 0,691$
	#	790 (679; 1234)	790 (648; 1162)	$p_1 = 0,859$
Цитотоксические Т-клетки (CD3⁺CD8⁺) CD8 ⁺ T cells (CD3 ⁺ CD8 ⁺)	%	24,0 (19,7; 27,5)	21,8 (17,1; 26,5)	$p_1 = 0,930$
	#	351 (250; 580)	347 (251; 531)	$p_1 = 0,983$
Соотношение CD4/CD8 CD4/CD8 ratio		2,3 (1,7; 2,7)	2,4 (2,0; 3,0)	$p_2 = 0,846$

Примечание. Результаты приведены в виде процентов в рамках общей популяции Т-лимфоцитов, а также в виде абсолютного (#) содержания клеток в 1 μ л цельной крови, результаты представлены в виде медианы и интерквартильного размаха [Med (Q_{25} ; Q_{75})]. Для сравнения полученных выборок использовали парный теста Стьюдента (p_1) или критерий Вилкоксона для связанных наблюдений (p_2).

Note. The obtained data are presented as percent of cells within total lymphocyte subset (%), as well as absolute numbers (#, the number of cells per 1 μ L of whole peripheral blood), and are shown as median and quartile ranges [Med (Q_{25} ; Q_{75})]. The statistical analysis was performed with the Student's t-test (p_1) or Wilcoxon test (p_2).

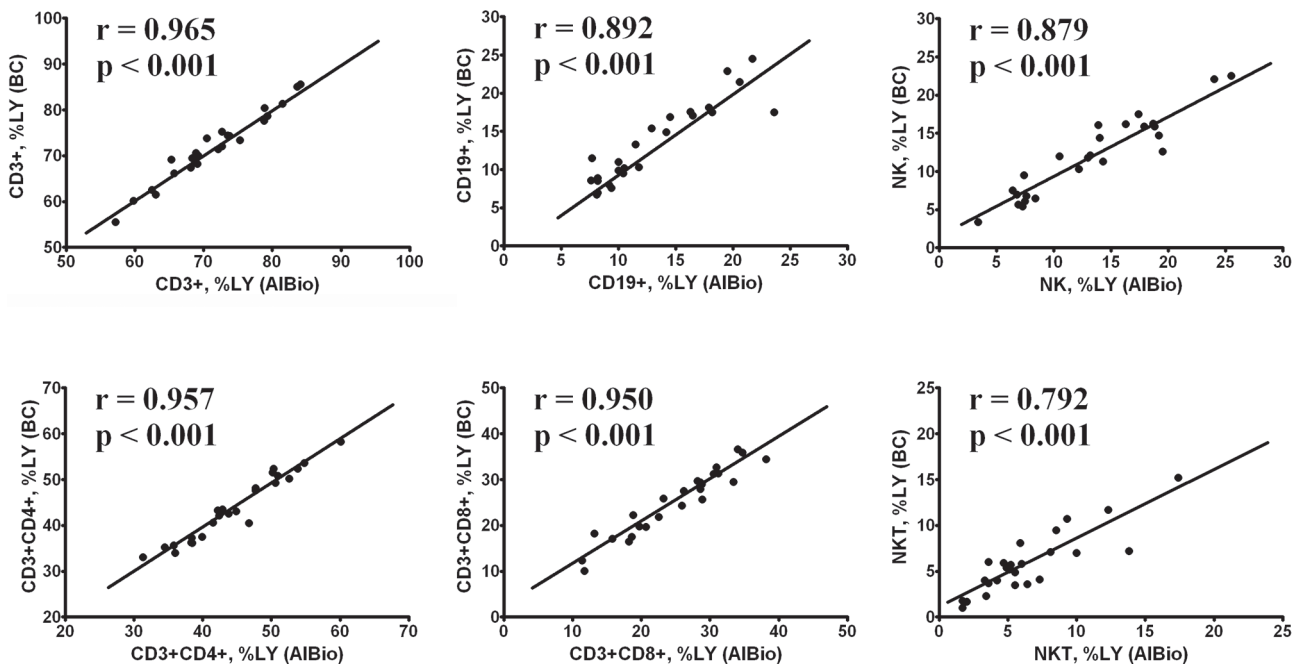


Рисунок 4. Сравнение относительного содержания основных субпопуляций лимфоцитов периферической крови пациентов, перенесших COVID-19, выявленных при помощи моноклональных антител производства компаний «Алкор Био» (Россия) и «Beckman Coulter» (США)

Figure 4. Significant correlations between flow cytometric data based on monoclonal antibodies, manufactured by "Alkor Bio" (Russia) and "Beckman Coulter Inc." (USA)

Примечание. Для исследования силы взаимосвязей показателей вычислялся коэффициент ранговой корреляции по Спирмену.

Note. Correlation analysis was performed using Spearman's correlation coefficient.

ние иммунной системы пациентов и нуждается в проведении иммунокорригирующей терапии.

При остром COVID-19 наблюдается нарушения как с субпопуляционным составе, так и в функциональной активности широчайшего спектра клеток организма человека, включая клетки иммунной системы и, в особенности, Т-лимфоциты [19, 34, 38]. Снижение функции тимуса и, как следствие, снижение выхода «наивных» Т-клеток может усугубить лимфопению у пациентов с острым заболеванием COVID-19 и увеличить время, необходимое для восстановления количества и функции циркулирующих Т-клеток после выздоровления. Так, при острой инфекции, вызванной SARS-CoV-2, низкой содержание TREC или их полное отсутствие в циркуляции служит одним из показателей неблагоприятного исхода заболевания, что было показано в целой серии независимых исследований. Так, в исследовании Khadzhieva M.B. и соавт. (2021) было показано, что при развитии респираторного дистресс-синдрома у больных COVID-19 уровни концентраций TREC и KREC значительно ниже, чем у больных без респираторного дистресс-синдрома [17]. Низкий уровень TREC у больных COVID-19 в острый период заболевания является критерием неблагоприятного исхода, тогда как повышение

концентрации TREC и KREC определяется благоприятным исходом данного инфекционного заболевания [33]. Сравнительно недавно было показано, что тимус человека является мишенью для вируса SARS-CoV-2, а функция тимуса существенно нарушается после заражения, поэтому мониторинг активности тимуса может быть важным маркером для прогнозирования тяжести и прогрессирования заболевания [31]. Наши собственные результаты также указывают на тот факт, что нарушения в работе тимуса сохраняются и после успешно перенесенного острого периода данного заболевания, что указывает на важности анализа функциональной активности тимуса после острой фазы инфекции. Более того, «замедленное» или «отсроченное» восстановление функции тимуса может способствовать развитию вторичных инфекций, которые могут усугубить тяжесть заболевания как в острой фазе [10], а также способствовать сохранению симптомов, связанных, например, с реактивацией герпесвируса в период реконвалесценции [14]. Все это приводит к тому, что у пациентов после острой коронавирусной инфекции отмечаются различные нарушения в работе иммунной системы, которые можно разделить на несколько подтипов [3], что нуждается в проведении иммунокоррекции [2].

Следует также отметить и тот факт, что нарушение процесса развития Т-клеток в тимусе может сказаться не только на снижении возможностей организма в распознавании инфекционных агентов, но и влиять на формирование центральной толерантности к собственным антигенам организма, вызывая выход в кровоток аутореактивных клонов Т-лимфоцитов в следствие нарушения механизмов селекции. Взаимосвязь между вирусными инфекциями и развитием аутоиммунных патологических процессов, включая ревматоидный артрит, рассеянный склероз, диабет 1 типа и системную красную волчанку, в настоящее время хорошо описана [36, 37]. Более того, уже сообщалось о случаях развитии псориатического артрита на фоне перенесенного COVID-19 [12, 27], системной красной волчанки [26, 29], а также других органно-специфических и системных аутоиммунных заболеваний [8, 30, 32].

В настоящее время все чаще появляются работы, описывающие существенные изменения в составе циркулирующих иммунных клеток у пациентов после перенесенного COVID-19, которые сохраняются длительное время (как минимум от 3 до 7–9 месяцев, а то и 12 месяцев после острой фазы заболевания). В первую очередь следует остановиться на Т-лимфоцитах, отвечающих за все многообразие клеточных реакций специфического иммунитета. Нами было показано снижение уровня CD4⁺ Т-клеток на фоне повышение содержания CD8⁺ Т-лимфоцитов в циркулирующей крови в период после острой инфекции, вызванной SARS-CoV-2, причем выявленные изменения сохранялись у обследованных пациентов в интервале 6–12 месяцев после выздоровления. Так, относительное содержание CD4⁺ Т-клеток в периферической крови у переболевших COVID-19 (как в легкой, так и в тяжелой форме и выработавших вирус-специфические антител) было достоверно снижено относительно контрольных значений, тогда как уровень CD8⁺ Т-лимфоцитов был достоверно повышен [28]. Анализ пациентов спустя 6 месяцев после острой инфекции SARS-CoV-2 показал, что у больных, которые длительное время находились в условиях стационара и которым потребовалось около 4 месяцев для выздоровления (группа LCR, от англ. long-time clinically recovered), в циркуляции повышался уровень CD4⁺ Т-лимфоцитов как по сравнению с контролем, так и пациентами, время выздоровления которых составляло 1–2 месяца (группа SCR, от англ. short-time clinically recovered) [39]. При анализе уровня дифференцировки Th клеток было показано, что в группе SCR содержание Th центральной памяти с фенотипом CD45RO⁺CD27⁺ было снижено относительно значений контроля и па-

циентов группы LCR. Тогда как в случае CD8⁺ Т-лимфоцитов у SCR было показано снижение уровня «наивных» CD45RO⁻CD27⁺ клеток и прирост CD45RO⁺CD27⁻ клеток эффекторной памяти в циркулирующие крови относительно значений, полученных для двух других групп сравнения. В рамках другого исследования было отмечено увеличение доли зрелых эффекторных клеток с фенотипом CD45RA⁺CCR7⁺ в периферической крови у выздоравливающих пациентов [35], причем в случае CD8⁺ цитотоксических Т-клеток это еще было связано с увеличением доли зрелых перфорин- и гранзим-экспрессирующих лимфоцитов. В рамках другого исследования было показано, что уровень «наивных» CD45RA⁺CCR7⁺ Th достоверно не различался между группой переболевших пациентов и контролем. Тогда как Th центральной памяти с фенотипом CD45RA⁻CCR7⁺ у переболевших COVID-19 были снижены почти в 2 раза, а уровень CD45RA⁻CCR7⁻ Th эффекторной памяти был достоверно повышен по сравнению с контролем [15]. Важно отметить, что минимальные значения «наивных» Th в циркуляции, которые были достоверно ниже значений контроля, были характерны для пациентов, переболевших COVID-19 в тяжелой форме. Более того, именно у тяжелых больных отмечались минимальные значения CD45RA⁻CCR7⁺ Th в циркуляции, тогда как CD45RA⁻CCR7⁻ Th были представлены на высоком уровне. Тогда как относительное содержание указанных популяций клеток у пациентов, перенесших COVID-19 в легкой и средней форме, достоверно от контроля не отличались.

Заключение

Собственные результаты, а также анализ данных литературы свидетельствуют о наличии существенных изменений в функционировании Т-клеточного звена системы приобретенного иммунитета после острой фазы COVID-19. В настоящее время идет первичное накопление фактологического материала по изменениям в иммунной системе человека, вызванным SARS-CoV-2, а также определение тех промежутков времени, на которых указанные изменения могут влиять на эффективность функционирования иммунной системы на уровне всего организма. По-видимому, анализ функционирования тимуса как центрального органа иммунной системы, отвечающего за формирования различных субпопуляций Т-лимфоцитов, при помощи нескольких независимых методов исследования поможет выявить пациентов, находящихся в группах риска и требующих проведения специфической иммунотерапии, целью которой должно являться полное восстановление системы иммунитета.

Список литературы/References

1. Гордукова М.А., Корсунский И.А., Чурсинова Ю.В., Бяхова М.М., Оскорбин И.П., Продеус А.П., Филипенко М.Л. Определение референсных интервалов TREC и KREC для скрининга новорожденных с иммунодефицитными состояниями в РФ // Медицинская иммунология. 2019. Т. 21, № 3. С. 527–538. [Gordukova M.A., Korsunsky I.A., Chursinova Yu.V., Byakhova M.M., Oskorbin I.P., Prodeus A.P., Filipenko M.L. Determining reference ranges for TREC and KREC assays in immune deficiency screening of newborns in Russian Federation. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2019, vol. 21, no. 3, pp. 527–538. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-527-538
2. Добрынина М.А., Зурочка А.В., Зурочка В.А., Рябова Л.В., Сарапульцев А.П. Формирование подходов к иммунокоррекции нарушений иммунной системы у постковидных пациентов // Российский иммунологический журнал. 2023. Т. 26, № 4. С. 641–646. [Dobrynina M.A., Zurochka A.V., Zurochka V.A., Ryabova L.V., Sarapultsev A.P. Approaches to correction of immune system disturbances in post-COVID patients. *Rossiiskii immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2023, vol. 26, no. 4, pp. 641–646. (In Russ.)] doi: 10.46235/1028-7221-13492-ATC
3. 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 immunopatology 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
4. Сайтгалина М.А., Любимова Н.Е., Останкова Ю.В., Кузнецова Р.Н., Тотолян Арег А. Определение референтных интервалов циркулирующих в крови эксцизионных колец TREC и KREC у лиц старше 18 лет // Медицинская иммунология. 2022. Т. 24, № 6. С. 1227–1236. [Saitgalina M.A., Liubimova N.E., Ostankova Yu.V., Kuznetzova R.N., Totolian A.A. Determination of reference values for TREC and KREC in circulating blood of the persons over 18 years. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2022, vol. 24, no. 6, pp. 1227–1236. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-DOR-2587
5. Сайтгалина М.А., Останкова Ю.В., Арсентьева Н.А., Коробова З.Р., Любимова Н.Е., Кашченко В.А., Куликов А.Н., Певцов Д.Э., Станевич О.В., Черных Е.И., Тотолян А.А. Оценка уровней молекул TREC и KREC у больных COVID-19 с разной степенью тяжести течения заболевания // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 5. С. 873–884. [Saitgalina M.A., Ostankova Y.V., Arsentieva N.A., Korobova Z.R., Liubimova N.E., Kashchenko V.A., Kulikov A.N., Pevtsov D.E., Stanevich O.V., Chernykh E.I., Totolian A.A. Assessment of trec and krec levels in COVID-19 patients with varying disease severity. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2023, vol. 13, no. 5, pp. 873–884. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-AOT-16937
6. Сайтгалина М.А., Останкова Ю.В., Арсентьева Н.А., Коробова З.Р., Любимова Н.Е., Кашченко В.А., Куликов А.Н., Певцов Д.Э., Станевич О.В., Черных Е.И., Тотолян А.А. Значимость определения уровней молекул TREC и KREC в периферической крови для прогноза исхода заболевания COVID-19 в острый период // Российский иммунологический журнал. 2023. Т. 26, № 4. С. 611–618. [Saitgalina M.A., Ostankova Y.V., Arsentieva N.A., Korobova Z.R., Liubimova N.E., Kashchenko V.A., Kulikov A.N., Pevtsov D.E., Stanevich O.V., Chernykh E.I., Totolian A.A. Levels of TREC and KREC molecules significance determining in peripheral blood for predicting the outcome of COVID-19 disease in the acute period. *Rossiiskii immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2023, vol. 26, no. 4, pp. 611–618 (In Russ.)] doi: 10.46235/1028-7221-14714-LOT
7. Сайтгалина М.А., Останкова Ю.В., Любимова Н.Е., Семенов А.В., Кузнецова Р.Н., Тотолян А.А. Модифицированный метод количественного определения уровней TREC и KREC в периферической крови у больных с иммунодефицитными состояниями // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 5. С. 981–996 [Saitgalina M.A., Ostankova Y.V., Liubimova N.E., Semenov A.V., Kuznetsova R.N., Totolian A.A. Modified quantitative approach for assessing peripheral blood TREC and KREC levels in immunodeficient patients. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2022, vol. 12, no. 5, pp. 981–996. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-MMF-2039
8. Ahmed S., Zimba O., Gasparyan A.Y. COVID-19 and the clinical course of rheumatic manifestations. *Clin. Rheumatol.*, 2021, vol. 40, no. 7, pp. 2611–2619. doi: 10.1007/s10067-021-05691-x
9. De Biasi S., Meschiari M., Gibellini L., Bellinazzi C., Borella R., Fidanza L., Gozzi L., Iannone A., Lo Tartaro D., Mattioli M., Paolini A., Menozzi M., Milić J., Franceschi G., Fantini R., Tonelli R., Sita M., Sarti M., Trenti T., Brugioni L., Cicchetti L., Facchinetti F., Pietrangelo A., Clini E., Girardis M., Guaraldi G., Mussini C., Cossarizza A. Marked T cell activation, senescence, exhaustion and skewing towards TH17 in patients with COVID-19 pneumonia. *Nat. Commun.*, 2020, vol. 11, no. 1: 3434. doi: 10.1038/s41467-020-17292-4
10. De Bruyn A., Verellen S., Bruckers L., Geebelen L., Callebaut I., De Pauw I., Stessel B., Dubois J. Secondary infection in COVID-19 critically ill patients: a retrospective single-center evaluation. *BMC Infect. Dis.*, 2022, vol. 22, no. 1: 207. doi: 10.1186/s12879-022-07192-x
11. Diao B., Wang C., Tan Y., Chen X., Liu Y., Ning L., Chen L., Li M., Liu Y., Wang G., Yuan Z., Feng Z., Zhang Y., Wu Y., Chen Y. Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Front. Immunol.*, 2020, vol. 11: 827. doi: 10.3389/fimmu.2020.00827
12. Essien F., Chastant L., McNulty C., Hubbard M., Lynette L., Carroll M. COVID-19-induced psoriatic arthritis: a case report. *Ther. Adv. Chronic Dis.*, 2022, vol. 13: 20406223221099333. doi: 10.1177/20406223221099333
13. Ferrando-Martinez S., De Pablo-Bernal R.S., De Luna-Romero M., De Ory S.J., Genebat M., Pacheco Y.M., Parras F.J., Montero M., Blanco J.R., Gutierrez F., Santos J., Vidal F., Koup R.A., Muñoz-Fernández M.Á., Leal M., Ruiz-Mateos E.

- Thymic function failure is associated with human immunodeficiency virus disease progression. *Clin. Infect. Dis.*, 2017, vol. 64, no. 9, pp. 1191–1197. doi: 10.1093/cid/cix095.
14. Gold J.E., Okyay R.A., Licht W.E., Hurley D.J. Investigation of long COVID prevalence and its relationship to Epstein–Barr virus reactivation. *Pathogens*, 2021, vol. 10, no. 6: 763. doi: 10.3390/pathogens10060763
 15. 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
 16. Hartling H.J., Gaardbo J.C., Ronit A., Salem M., Laye M., Clausen M.R., Skogstrand K., Gerstoft J., Ullum H., Nielsen S.D. Impaired thymic output in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Scand. J. Immunol.*, 2013, vol. 78, no. 4, pp. 378–386. doi: 10.1111/sji.12096
 17. Khadzhieva M.B., Kalinina E.V., Larin S.S., Sviridova D.A., Gracheva A.S., Chursinova J.V., Stepanov V.A., Redkin I.V., Avdeikina L.S., Rummyantsev A.G., Kuzovlev A.N., Salnikova L.E. TREC/KREC Levels in Young COVID-19 Patients. *Diagnostics (Basel)*, 2021, vol. 11, no. 8: 1486. doi: 10.3390/diagnostics11081486
 18. Kohler S., Thiel A. Life after the thymus: CD31+ and CD31– human naive CD4+ T-cell subsets. *Blood*, 2009, vol. 113, no. 4, pp. 769–774. doi: 10.1182/blood-2008-02-139154
 19. 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
 20. 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
 21. Kuri-Cervantes L., Pampena M.B., Meng W., Rosenfeld A.M., Ittner C.A.G., Weisman A.R., Agyekum R.S., Mathew D., Baxter A.E., Vella L.A., Kuthuru O., Apostolidis S.A., Bershaw L., Dougherty J., Greenplate A.R., Pattekar A., Kim J., Han N., Gouma S., Weirick M.E., Arevalo C.P., Bolton M.J., Goodwin E.C., Anderson E.M., Hensley S.E., Jones T.K., Mangalmurti N.S., Luning Prak E.T., Wherry E.J., Meyer N.J., Betts M.R. Comprehensive mapping of immune perturbations associated with severe COVID-19. *Sci. Immunol.*, 2020, vol. 5, no. 49: eabd7114 doi:10.1126/sciimmunol.abd7114
 22. Liu J., Li S., Liu J., Liang B., Wang X., Wang H., Li W., Tong Q., Yi J., Zhao L., Xiong L., Guo C., Tian J., Luo J., Yao J., Pang R., Shen H., Peng C., Liu T., Zhang Q., Wu J., Xu L., Lu S., Wang B., Weng Z., Han C., Zhu H., Zhou R., Zhou H., Chen X., Ye P., Zhu B., Wang L., Zhou W., He S., He Y., Jie S., Wei P., Zhang J., Lu Y., Wang W., Zhang L., Li L., Zhou F., Wang J., Dittmer U., Lu M., Hu Y., Yang D., Zheng X. Longitudinal characteristics of lymphocyte responses and cytokine profiles in the peripheral blood of SARS-CoV-2 infected patients. *EBioMedicine*, 2020, vol. 55: 102763. doi:10.1016/j.ebiom.2020.102763.
 23. Mann E.R., Menon M., Knight S.B., Konkel J.E., Jagger C., Shaw T.N., Krishnan S., Rattray M., Ustianowski A., Bakerly N.D., Dark P., Lord G., Simpson A., Felton T., Ho L.P., NIHR Respiratory TRC, Feldmann M., CIRCO, Grainger J.R., Hussell T. Longitudinal immune profiling reveals key myeloid signatures associated with COVID-19. *Sci. Immunol.*, 2020, vol. 5, no. 51: eabd6197. doi: 10.1126/sciimmunol.abd6197
 24. Martín-Sánchez E., Garcés J.J., Maia C., Inogés S., López-Díaz de Cerio A., Carmona-Torre F., Marin-Oto M., Alegre F., Molano E., Fernandez-Alonso M., Perez C., Botta C., Zabaleta A., Alcaide A.B., Landecho M.F., Rua M., Pérez-Warnisher T., Blanco L., Sarvide S., Vilas-Zornoza A., Alignani D., Moreno C., Pineda I., Sogbe M., Argemi J., Paiva B., Yuste J.R. Immunological biomarkers of fatal COVID-19: a study of 868 patients. *Front. Immunol.*, 2021, vol. 12: 659018. doi: 10.3389/fimmu.2021.659018
 25. Mathew D., Giles J.R., Baxter A.E., Oldridge D.A., Greenplate A.R., Wu J.E., Alanio C., Kuri-Cervantes L., Pampena M.B., D’Andrea K., Manne S., Chen Z., Huang Y.J., Reilly J.P., Weisman A.R., Ittner C.A.G., Kuthuru O., Dougherty J., Nzingha K., Han N., Kim J., Pattekar A., Goodwin E.C., Anderson E.M., Weirick M.E., Gouma S., Arevalo C.P., Bolton M.J., Chen F., Lacey S.F., Ramage H., Cherry S., Hensley S.E., Apostolidis S.A., Huang A.C., Vella L.A., UPenn COVID Processing Unit, Betts M.R., Meyer N.J., Wherry E.J. Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications. *Science*, 2020, vol. 369, no. 6508: eabc8511. doi: 10.1126/science.abc8511
 26. Mok C.C., Chu C.S., Tse S.M. De novo lupus nephritis after SARS-CoV-2 infection. *Lupus*, 2023: 9612033231175280. doi: 10.1177/09612033231175280
 27. Novelli L., Motta F., Ceribelli A., Guidelli G.M., Luciano N., Isailovic N., Vecellio M., Caprioli M., Clementi N., Clementi M., Mancini N., Selmi C., De Santis M. A case of psoriatic arthritis triggered by SARS-CoV-2 infection. *Rheumatology (Oxford)*, 2021, vol. 60, no. 1, pp. e21–e23. doi: 10.1093/rheumatology/keaa691
 28. Orogas-Stavrou N., Politou M., Rousakis P., Kostopoulos I.V., Ntanasis-Stathopoulos I., Jahaj E., Tsiligeridou E., Gavriatopoulou M., Kastritis E., Kotanidou A., Dimopoulos M.A., Tsitsilonis O.E., Terpos E. Peripheral blood immune profiling of convalescent plasma donors reveals alterations in specific immune subpopulations even at 2 months post SARS-CoV-2 infection. *Viruses*, 2020, vol. 13, no. 1: 26. doi: 10.3390/v13010026
 29. Ramachandran L., Dontaraju V.S., Troyer J., Sahota J. New onset systemic lupus erythematosus after COVID-19 infection: a case report. *AME Case Rep.*, 2022, vol. 6: 14. doi: 10.21037/acr-21-55
 30. Ramos-Casals M., Brito-Zerón P., Mariette X. Systemic and organ-specific immune-related manifestations of COVID-19. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2021, vol. 17, no. 6, pp. 315–332. doi: 10.1038/s41584-021-00608-z
 31. Rosichini M., Bordoni V., Silvestris D.A., Mariotti D., Matusali G., Cardinale A., Zambruno G., Condorelli A.G., Flamini S., Genah S., Catanoso M., Del Nonno F., Trezzi M., Galletti L., De Stefanis C., Cicolani N., Petrini S., Quintarelli C., Agrati C., Locatelli F., Velardi E. SARS-CoV-2 infection of thymus induces loss of function that correlates with disease severity. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2023, vol. 151, pp. 911–921. doi: 10.1016/j.jaci.2023.01.022
 32. Rubinstein A., Kudryavtsev I., Malkova A., Mammedova J., Isakov D., Isakova-Sivak I., Kudlay D., Starshinova A. Sarcoidosis-related autoimmune inflammation in COVID-19 convalescent patients. *Front. Med.*, 2023, vol. 10: 1271198. doi: 10.3389/fmed.2023.1271198

33. Savchenko A.A., Tikhonova E., Kudryavtsev I., Kudlay D., Korsunsky I., Beleniuk V., Borisov A. TREC/KREC Levels and T and B Lymphocyte Subpopulations in COVID-19 Patients at Different Stages of the Disease. *Viruses*, 2022, vol. 14, no. 3: 646. doi: 10.3390/v14030646
34. Sette A., Crotty S. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell*, 2021, vol. 184, no. 4, pp. 861–880. doi: 10.1016/j.cell.2021.01.007
35. Shuwa H.A., Shaw T.N., Knight S.B., Wemyss K., McClure F.A., Pearmain L., Prise I., Jagger C., Morgan D.J., Khan S., Brand O., Mann E.R., Ustianowski A., Bakerly N.D., Dark P., Brightling C.E., Brij S., CIRCO, Felton T., Simpson A., Grainger J.R., Hussell T., Konkel J.E., Menon M. Alterations in T and B cell function persist in convalescent COVID-19 patients. *Med (N Y)*, 2021, vol. 2, no. 6, pp. 720–735.e4. doi: 10.1016/j.medj.2021.03.013
36. Smatti M.K., Cyprian F.S., Nasrallah G.K., Al Thani A.A., Almishal R.O., Yassine H.M. Viruses and autoimmunity: a review on the potential interaction and molecular mechanisms. *Viruses*, 2019, vol. 11, no. 8, pp. 762 doi: 10.3390/v11080762
37. Sundaresan B., Shirafkan F., Ripperger K., Rattay K. The role of viral infections in the onset of autoimmune diseases. *Viruses*, 2023, vol. 15, no. 3: 782. doi: 10.3390/v15030782
38. Yuki K., Fujiogi M., Koutsogiannaki S. COVID-19 pathophysiology: a review. *Clin. Immunol.*, 2020, vol. 215: 108427. doi: 10.1016/j.clim.2020.108427
39. Zhao B., Zhong M., Yang Q., Hong K., Xia J., Li X., Liu Y., Chen Y.Q., Yang J., Huang C., Yan H. Alterations in phenotypes and responses of T cells within 6 months of recovery from COVID-19: a cohort study. *Virol. Sin.*, 2021, vol. 9, pp. 1–10. doi: 10.1007/s12250-021-00348-0

Авторы:

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 «Вирум» Роспотребнадзора, г. Екатеринбург, Россия;

Authors:

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;

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» Роспотребнадзора, 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;

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;

Зурочка В.А., д.м.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления Института иммунологии и физиологии УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия; старший научный сотрудник лаборатории биотехнологий Научно-образовательного Российско-Китайского Центра системной патологии Южно-Уральского государственного университета (Научного исследовательского университета), г. Челябинск, Россия;

Зуйкова А.А., стажер лаборатории трансмиссивных вирусных инфекций ФБУН Федеральный научно-исследовательский институт вирусных инфекций «Виром» Роспотребнадзора, г. Екатеринбург, Россия;

Сарапульцев Г.П., зав. эндоскопическим отделением 354-й Военный клинический госпиталь ЦВО, г. Екатеринбург, Россия;

Забков О.И., научный сотрудник лаборатории трансмиссивных вирусных инфекций ФБУН Федеральный научно-исследовательский институт вирусных инфекций «Виром» Роспотребнадзора, г. Екатеринбург, Россия;

Мосунов А.А., студент ФГБОУ ВО Челябинский государственный университет, г. Челябинск, Россия; стажер лаборатории трансмиссивных вирусных инфекций ФБУН Федеральный научно-исследовательский институт вирусных инфекций «Виром» Роспотребнадзора, г. Екатеринбург, Россия;

Верховская М.Д., студент ФГБОУ ВО Челябинский государственный университет, г. Челябинск, Россия; стажер лаборатории трансмиссивных вирусных инфекций ФБУН Федеральный научно-исследовательский институт вирусных инфекций «Виром» Роспотребнадзора, г. Екатеринбург, Россия;

Дукардт В.В., старший научный сотрудник лаборатории трансмиссивных вирусных инфекций ФБУН Федеральный научно-исследовательский институт вирусных инфекций «Виром» Роспотребнадзора, г. Екатеринбург, Россия;

Фомина Л.О., научный сотрудник лаборатории трансмиссивных вирусных инфекций ФБУН Федеральный научно-исследовательский институт вирусных инфекций «Виром» Роспотребнадзора, г. Екатеринбург, Россия;

Костоломова Е.Г., к.б.н., доцент кафедры микробиологии ФГБОУ ВО Тюменский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Тюмень, Россия;

Останкова Ю.В., к.б.н., зав. лабораторией иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

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

Тотolian А.А., академик РАН, д.м.н., профессор, зав. лабораторией молекулярной иммунологии, директор ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия.

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 Costumer 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;

Safronova E.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Associate Professor of the Department of Polyclinic Therapy and Clinical Pharmacology, outh 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;

Zurochka V.A., DSc (Medicine), Senior Researcher, Institute of Immunology and Physiology, Ural Regional Branch of the RAS, Yekaterinburg, Russian Federation; Senior Researcher, Biotechnology Laboratory, Russian-Chinese Center, South Ural State University (National Research University), Chelyabinsk, Russian Federation;

Zuikova A.A., Intern of the Laboratory of Transmissible Viral Diseases, Federal Scientific Research Institute of Viral Infections "Virome" Federal Service for Surveillance on Costumer Rights Protection and Human Wellbeing, Yekaterinburg, Russian Federation;

Sarapultsev G.P., Head of Endoscopy Department, 354 Military Clinical Hospital of the Russian Ministry of Defense, Ekaterinburg, Russian Federation;

Zabkov O.I., Researcher, Laboratory of Transmissible Viral Diseases, Federal Scientific Research Institute of Viral Infections "Virome" Federal Service for Surveillance on Costumer Rights Protection and Human Wellbeing, Yekaterinburg, Russian Federation;

Mosunov A.A., Student, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation; Intern of the Laboratory of Transmissible Viral Diseases, Federal Scientific Research Institute of Viral Infections "Virome" Federal Service for Surveillance on Costumer Rights Protection and Human Wellbeing, Yekaterinburg, Russian Federation;

Verkhovskaya M.D., Student, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation; Intern of the Laboratory of Transmissible Viral Diseases, Federal Scientific Research Institute of Viral Infections "Virome" Federal Service for Surveillance on Costumer Rights Protection and Human Wellbeing, Yekaterinburg, Russian Federation;

Ducardt V.V., Senior Researcher, Laboratory of Transmissible Viral Diseases, Federal Scientific Research Institute of Viral Infections "Virome" Federal Service for Surveillance on Costumer Rights Protection and Human Wellbeing, Yekaterinburg, Russian Federation;

Fomina L.O., Researcher, Laboratory of Transmissible Viral Diseases, Federal Scientific Research Institute of Viral Infections "Virome" Federal Service for Surveillance on Costumer Rights Protection and Human Wellbeing, Yekaterinburg, Russian Federation;

Kostolomova E.G., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Microbiology, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

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;

Kudryavtsev I.V., PhD (Biology), Head of the Cell Immunology Laboratory, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, 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.

ПОСТВАКЦИНАЛЬНЫЙ ИММУНИТЕТ И ЧАСТОТА ПНЕВМОНИЙ У МЕДИЦИНСКИХ РАБОТНИКОВ ПОСЛЕ ПРИМЕНЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ СХЕМ ВАКЦИНАЦИИ ПРОТИВ ГРИППА МЕЖДУ 1 И 2 ПИКАМИ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ COVID-19

М.П. Костинов^{1,2}, Н.Ю. Настаева³, Н.Ф. Никитюк^{1,2}, К.В. Машилов¹, А.А. Хасанова⁴, И.Л. Соловьева⁴, Н.П. Андреева^{5,7}, Ю.А. Ли⁶, В.Б. Полищук¹, А.В. Линок^{1,2}, М.Н. Локтионова², А.М. Костинова², И.А. Храпунова²

¹ ФГБНУ Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

² ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени им. И.М. Сеченова Минздрава РФ (Сеченовский Университет), Москва, Россия

³ ФГБУЗ Новороссийский клинический центр Федерального медико-биологического агентства РФ, г. Новороссийск, Россия

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

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

⁶ ФГБОУ ВО Тихоокеанский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Владивосток, Россия

⁷ БУ Городская детская клиническая больница Минздрава Чувашии, г. Чебоксары, Россия

Резюме. Введение. В отсутствие вакцины против SARS-CoV-2 сезонная вакцинация против гриппа в период пандемии способствовала снижению восприимчивости и тяжести течения COVID-19. Цель — оценить состояние поствакцинального иммунитета к гриппу, частоту и тяжесть пневмоний у медицинских работников после применения различных схем вакцинации против гриппа, между 1 и 2 пиками эпидемического подъема COVID-19. **Материалы и методы.** Проведен сравнительный анализ результатов уровней антител к штаммам вируса гриппа и частоты развития пневмонии у 487 медицинских работников: I группа — непривитые в 2020–2021 (n = 281), II группа — вакцинированные против гриппа (Совигрипп) (n = 98), III группа — получившие сочетанную вакцинацию против гриппа и пневмококка (Превенар 13) (n = 108). **Результаты.** Через 6 месяцев после вакцинации наиболее высокие показатели выявлены к вирусу гриппа А(Н3N2), уровень серопротекции ($\geq 1:40$) от 49,0% у непривитых (I группа) до 53,4–53,2% у получивших сочетанную вакцинацию (III группа), а также вакцинированных только от гриппа (II группа), $p > 0,05$; к штамму А(Н1N1) уровень серопротекции в I группе — 24,5%, ниже ($p < 0,04$), чем у II группы — 32,7%, но не различается от уровня 40,4% в III груп-

Адрес для переписки:

Линок Андрей Викторович
105064, Россия, Москва, Малый Казенный пер., 5а,
Первый Московский государственный медицинский
университет им. И.М. Сеченова.
Тел.: 8 926 157-97-07 (моб.).
E-mail: linok_a_v@staff.sechenov.ru

Contacts:

Andrey V. Linok
105064, Russian Federation, Moscow, Malyy Kazennyi lane, 5A,
I.M. Sechenov First Moscow State Medical University.
Phone: +7 926 157-97-07 (mobile).
E-mail: linok_a_v@staff.sechenov.ru

Для цитирования:

Костинов М.П., Настаева Н.Ю., Никитюк Н.Ф., Машилов К.В., Хасанова А.А., Соловьева И.Л., Андреева Н.П., Ли Ю.А., Полищук В.Б., Линок А.В., Локтионова М.Н., Костинова А.М., Храпунова И.А. Поствакцинальный иммунитет и частота пневмоний у медицинских работников после применения различных схем вакцинации против гриппа между 1 и 2 пиками заболеваемости COVID-19 // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 4. С. 769–780. doi: 10.15789/2220-7619-PIA-17621

Citation:

Kostinov M.P., Nastaeva N.Yu., Nikityuk N.F., Mashilov K.V., Khasanova A.A., Soloveva I.L., Andreeva N.P., Li Yu.A., Polishchuk V.B., Linok A.V., Loktionova M.N., Kostinova A.M., Khrapunova I.A. Post-vaccination immunity and pneumonia incidence in medical workers in response to various flu vaccination regimens between the 1st and 2nd peaks of COVID-19 morbidity // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 4, pp. 769–780. doi: 10.15789/2220-7619-PIA-17621

пе; к штамму В уровень серопротекции самый низкий: от 19,4% в группе непривитых до 22,4% во II группе и 23,4% в III группе. Частота развития пневмоний в I (3,9%), II (3,1%) и III группах (4,6%) не различались, однако среди всех вакцинированных пневмонии по тяжести клинического течения были легкими, тогда как у непривитых сотрудников кроме легкого течения (45,4%, у 5 из 11 человек) пневмонии в 36,4% (4 из 11 человек) случаев оценивались как средней тяжести и в 18,2% (2 из 11 человек) случаев как тяжелые, с летальными исходами. **Выводы.** Проведенное исследование показало, что через 6 месяцев после проведения сезонной иммунизации против гриппа между 1 и 2 пиками эпидемического подъема COVID-19 иммуногенность вакцины соответствует критерием СРМР по штамму А(Н3N2). У всех вакцинированных (100%) отмечено легкое течение пневмоний с клиникой COVID-19, у непривитых в 36,4% случаев имело место среднетяжелое течение и в 18,2% — тяжелое течение с летальным исходом.

Ключевые слова: COVID-19, вакцина против гриппа, сочетанная вакцинация, антитела к гриппу, пневмонии, эпидемический подъем.

POST-VACCINATION IMMUNITY AND PNEUMONIA INCIDENCE IN MEDICAL WORKERS IN RESPONSE TO VARIOUS FLU VACCINATION REGIMENS BETWEEN THE 1st AND 2nd PEAKS OF COVID-19 MORBIDITY

Kostinov M.P.^{a,b}, Nastaeva N.Yu.^c, Nikityuk N.F.^{a,b}, Mashilov K.V.^a, Khasanova A.A.^d, Soloveva I.L.^d, Andreeva N.P.^{e,g}, Li Yu.A.^f, Polishchuk V.B.^a, Linok A.V.^{a,b}, Loktionova M.N.^b, Kostinova A.M.^b, Khrapunova I.A.^b

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

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

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

^d Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russian Federation

^e I.N. Ulyanov Chuvash State University, Cheboksary, Russian Federation

^f Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

^g City Children's Clinical Hospital of Cheboksary, Cheboksary, Russian Federation

Abstract. Background. In the absence of a vaccine against SARS-CoV-2, seasonal influenza vaccination during the pandemic contributed to lowered COVID-19 susceptibility and severity. The study was aimed to assess the state of post-influenza vaccination immunity, pneumonia frequency and severity in medical workers after using various flu vaccination regimens, between the 1st and 2nd peaks of COVID-19 epidemic rise. **Materials and methods.** Comparatively analyzed data on the levels of antibodies against influenza virus strains and pneumonia incidence in 487 medical workers was carried out: 1st group — unvaccinated in 2020–2021 (n = 281), 2nd group — vaccinated against influenza (Sovigripp), (n = 98), 3rd group — received combined vaccination against influenza and pneumococcus (Prevenar 13), (n = 108). **Results.** 6 months after vaccination, the highest rates of influenza virus were detected in the A(H3N2), the level of seroprotection ($\geq 1:40$) ranged from 49.0% in unvaccinated (1st group) to 53.4–53.2% in those who received combined vaccination (group III), as well as influenza alone (2nd group), $p > 0.05$; for strain A(H1N1) the level of seroprotection in 1st group is 24.5%, lower ($p < 0.04$) than in 2nd group — 32.7%, but does not differ from the levels of 40.4% in group III; for strain B the level of seroprotection is the lowest ranging from 19.4% in the group of unvaccinated subjects up to 22.4% in 2nd group and 23.4% in 3rd group. The pneumonia incidence in 1st group (3.9%), 2nd group (3.1%), 3rd group (4.6%) did not differ, however, among all vaccinated subjects severity of pneumonia clinical course was mild, whereas in unvaccinated employees, except for mild course (45.4%, 5 out of 11 people) pneumonia in 36.4% (4 out of 11 people) cases was assessed as moderate and in 18.2% (2 out of 11 people) cases — severe with fatal outcomes. **Conclusion.** The study showed that 6 months after seasonal influenza immunization between the 1st and 2nd peaks of COVID-19 epidemic rise, the immunogenicity of the vaccine meets the CPMP criterion for the A(H3N2) strain. In vaccinated patients, the proportion of pneumonia with COVID-19 clinical picture was mild in 100% of cases, and in unvaccinated patients in 36.4% of cases — of moderate severity and in 18.2% — severe with fatal outcome.

Key words: COVID-19, influenza vaccine, combined vaccination, antibodies to influenza, pneumonia, epidemic rise.

Введение

На протяжении десятилетий основным элементом профилактики гриппа является вакцинация. В последние годы стала очевидной информация о возможной связи между вакцинацией против гриппа и уровнем заболеваемости COVID-19 [16, 18, 22, 26, 27]. Некоторые исследования показывают, что грипп и COVID-19

вызываемые разными вирусами, тем не менее дают феномен интерференции, который обусловлен способностью клетки, пораженной одним вирусным агентом, ограничивать проникновение другого, что, вполне вероятно, и произошло с вирусами гриппа вследствие обширного распространения SARS-CoV-2 [21]. Выдвигаются предположения, что антитела против разных вирусов могут давать перекрест-

ную защитную реакцию между различными вирусами (кросс-протекция) [14].

Кроме того, люди, вакцинированные от гриппа, имеют не только меньший риск заболеть COVID-19, но и развить тяжелую форму заболевания [17, 18, 20, 30, 32]. Отмечается возможная роль стимуляции вакциной против гриппа неспецифического иммунитета на уровне Т-лимфоцитов, что, по мнению исследователей, способствует формированию защиты от COVID-19 за счет синтеза интерферонов активированными Т-лимфоцитами [18, 19].

Следовательно, можно предположить возможное существование прямой зависимости между напряженностью поствакцинального иммунитета к вирусу гриппа и его неспецифическим эффектом по отношению к SARS-CoV-2. Однако в большинстве исследований этот факт недостаточно изучен.

Цель исследования — оценить состояние поствакцинального иммунитета к гриппу, частоту и тяжесть пневмоний у медицинских работников после применения различных схем вакцинации против гриппа, между 1 и 2 пиками эпидемического подъема COVID-19.

Материалы и методы

Дизайн исследования. В исследовании участвовали 487 медицинских работников старше 18 лет. Участники были распределены на 3 группы: I группа — не имеющие в анамнезе вакцинаций против гриппа в сезоне 2020–2021 гг. и против пневмококковой инфекции ($n = 281$), II группа — вакцинированы против гриппа ($n = 98$), III группа — получившие сочетанную вакцинацию против гриппа и пневмококка ($n = 108$).

При отборе участников ориентировались на требования к проведению клинических исследований с учетом критериев включения и критериев исключения.

Этапы исследования:

— первый этап исследования (с августа 2020 г. по январь 2021 г.) включал: вакцинацию медицинских работников против гриппа и пневмококка; регистрацию заболеваемости острыми респираторными инфекциями (ОРИ) по данным первичной медицинской документации в период эпидемического подъема COVID-19 в РФ и в Краснодарском крае; проведение эпидемиологического и статистического анализа. Все участники исследования не были вакцинированы против SARS-CoV-2, поскольку вакцина проходила клинические исследования; — второй этап исследования (с февраля по март 2021 г.), через 6 месяцев после вакцинации от гриппа и пневмококковой ин-

фекции. Проводилось исследование напряженности иммунитета к гриппу среди участников исследования; определение среднего геометрического титра (СГТ) антител и количества серопротекций и анализ присоединения респираторных инфекций.

Сбор проспективных данных выполнен по статистическим отчетным формам: № 060у «Карта профилактических прививок»; № 058у «Экстренное извещение об инфекционном заболевании, пищевом, остром профессиональном отравлении, необычной реакции на прививку»; № 060у «Журнал учета инфекционных заболеваний».

Для проведения исследования получено одобрение Локального этического комитета ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» № 3 от 14.02.2022 и оформлено письменное информированное согласие от респондентов (медицинских работников организации).

Критерии соответствия. Исследование было проведено с соблюдением этических норм в соответствии с Хельсинкской декларацией ВОЗ «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266.

Условия проведения. Исследование проводилось на базах ФГБУЗ «Новороссийский клинический центр» Федерального медико-биологического агентства» (г. Новороссийск, Россия), ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» (Сеченовский университет) Министерства здравоохранения Российской Федерации (Москва, Россия) и ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» (Москва, Россия) в соответствии с протоколом исследования от 12.02.22 г. утвержденной на ученом совете ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» темы НИР.

Вакцинные препараты, применяемые в исследовании, и правила их введения:

— Совигрипп, вакцина гриппозная инактивированная субъединичная (АО «Национальная иммунобиологическая компания», Россия). Вакцина с консервантом доступна для вакцинации лиц от 18 до 60 лет и включает штаммы, соответствующие рекомендациям ВОЗ для сезона гриппа в северном полушарии 2020–2021 гг. для трехвалентных вакцин: A(H1N1)pdm09 Гуандонг-Маонань/SWL1536/19-подобный штамм; A(H3N2)/Гонконг/2671/19-подобный штамм; В/Вашингтон/02/19-подобный штамм, выделенные из вирусосодержащей аллантоисной жидкости куриных эмбрионов,

связанные с иммуноадьювантом — сополимер N-винилпирролидона и 2-метил-5-винилпиридина (Совидон). При электронномикроскопическом исследовании была показана способность препарата кооперативно связываться с гемагглютиниными вируса гриппа, сохраняя их нативную структуру [8]. Научно доказано, что такие конъюгаты способствуют развитию Т-независимого иммунитета, а также позволяют максимально снизить количество антигена в вакцине, а значит, и возможность побочных явлений [9, 12].

— Превенар 13 (ПКВ13), вакцина пневмококковая конъюгированная адсорбированная, тринадцативалентная (Пфайзер Инк., США, первичная упаковка — ООО «НПО Петровакс Фарм», Россия) представляет собой капсулярные полисахариды 13 серотипов пневмококка: 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 9V, 14, 18С, 19А, 19F и 23F, индивидуально конъюгированные с дифтерийным белком CRM197 и адсорбированные на алюминия фосфате. Введение вакцины ПКВ13 вызывает выработку антител к капсулярным полисахаридам *Streptococcus pneumoniae*, обеспечивая тем самым специфическую защиту от инфекций, вызываемых включенными в вакцину 13 серотипами пневмококка.

Вакцинацию против гриппа и пневмококковой инфекции проводили после осмотра терапевта в кабинете иммунопрофилактики. Одна доза вакцины составляет 0,5 мл. Вакцина вводилась в/м (против гриппа и пневмококковой инфекции) — однократно.

Статистические методы. В результате тестирования на соответствие нормальному распределению количественных показателей (табл. 1) гипотеза о том, что данные являются выборкой из нормально распределенной совокупности, была отвергнута, согласно критериям

Колмогорова—Смирнова (с коррекцией значимости Лилефорса) и Шапиро—Уилка, $p < 0,001$.

Статистический анализ представлен расчетом частот и долей для категориальных переменных, проверки на нормальность количественных переменных с помощью критериев Колмогорова—Смирнова (с коррекцией значимости Лилефорса) и Шапиро—Уилка. Для сравнения долей использован критерий хи-квадрат, для сравнения количественных показателей — непараметрический критерий Манна—Уитни. При проверке гипотез использованы уровни значимости 0,01 (1%) и 0,05 (5%). Визуализация результатов выполнена в табличной и графической форме. Для расчетов использованы электронные таблицы Excel 2010 и статистический пакет SPSS v.26.

Результаты

Для оценки гуморального иммунитета после вакцинации против гриппа выборочно исследовано 246 образцов сыворотки крови, среди которых: 61,2% (60 из 98 человек) привитых только против гриппа (II группа); 41,7% (45 из 108 человек) — вакцинированных против гриппа и пневмококковой инфекции (III группа). В качестве контроля была выделена группа непривитых (I группа), которая составила 50,2% (141 из 281 человека) обследованных.

Результаты иммуногенности вакцины оценивали в соответствии с критериями, определенными Европейским медицинским агентством (Committee for Proprietary Medicinal Products [CPMP]).

Сравнительный анализ оценки иммуногенности вакцины с определением уровня серопротекций к штаммам вируса гриппа через 6 месяцев после вакцинации по группам участников выявил наиболее высокие показатели у штамма А(Н3N2) (табл. 1). Уровень серопро-

Таблица 1. Уровень серопротекций к штаммам вируса гриппа через 6 месяцев после вакцинации по группам участников

Table 1. Intergroup level of seroprotection to influenza virus strains 6 months after vaccination

Группа Group	Всего (абс.) Total (abs.)	А(Н1N1)		А(Н3N2)		В	
		Абс. Abs.	%	Абс. Abs.	%	Абс. Abs.	%
I группа (непривитые) 1st group (unvaccinated)	281	34	24,5	68	49,0	27	19,4
II группа (V грипп) 2nd group (V flu)	98	19	32,7*	31	53,4	13	22,4
III группа (V сочетанная) 3rd group (V combined)	108	19	40,4	25	53,2	11	23,4

Примечание. Показаны результаты с титром $\geq 1:40$; V — вакцинация; статистически значимые различия между показателями штаммов вируса гриппа: * — $p < 0,04$ у штамма А(Н1N1) между I и II группами.

Note. Results with a titer $\geq 1:40$ are shown; V — vaccination; statistically significant differences between influenza virus strains: * — $p < 0.04$ in the A(H1N1) strain between 1st group and 2nd group.

Таблица 2. Расчетное количество серопротекций к штаммам гриппа через 21 день после вакцинации

Table 2. The estimated anti-influenza strain seroprotection 21 days after vaccination

Группа Group	Всего (абс.) Total (abs.)	H1N1		H3N2		B	
		Абс. Abs.	%	Абс. Abs.	%	Абс. Abs.	%
I группа (непривитые) 1st group (unvaccinated)	281	34	74,5	68	89,0	27	69,4
II группа (V грипп) 2nd group (V flu)	98	19	82,7	31	93,4	13	72,4
III группа (V сочетанная) 3rd group (V combined)	108	19	90,4	25	93,2	11	73,4

Примечание. показаны результаты с титром $\geq 1:40$.Note. The results are shown with a titer $\geq 1:40$.

текции к данному штамму колебался от 49,0% у непривитых медицинских работников (I группа) до 53,4–53,2% — у получивших сочетанную вакцинацию (III группа) и грипп (II группа).

Исследованиями сывороток крови к штамму гриппа А(H1N1), проведенными в аналогичный период, установлено, что уровень серопротекции (I группа) у непривитых медицинских работников (24,5%), достоверно ниже ($p < 0,04$) чем у привитых против гриппа (II группа) (32,7%).

Необходимо отметить, что через 6 месяцев у всех медицинских работников регистрировались минимальные титры антител к вирусу гриппа штамма В от 19,4% в группе непривитых до 22,4% (II группа) и 23,4% (III группа) иммунизированных вакциной против гриппа и сочетанной схемой с использованием вакцин против гриппа и пневмококка соответственно.

Следует принимать во внимание, что нами не проводилось исследование уровня антител через 3 недели после введения вакцины. Однако нами построена табл. 2 с моделированием показателей исходя из расчетных данных о ежемесячном снижении скорости и степени поствакцинальных антител [29]. Анализ позволяет предположить, что процент лиц с серопротекцией к указанным

штаммам перед началом сезона распространения гриппа и других респираторных заболеваний был достаточно высоким и иммуногенность вакцины соответствовала критериям, указанным Комитетом патентованных медицинских продуктов (СРМРЕМЕА, СРМР/ЕWР/1045/01), где уровень серопротекций после вакцинации для штаммов вируса гриппа определен $> 70\%$.

Другим показателем оценки иммуногенности вакцин против гриппа является определение уровней среднегеометрических титров (СГТ) антител к штаммам вируса. Полученные нами результаты через 6 месяцев в зависимости от вакцинации по группам обследованных отражены в табл. 3.

Защитный уровень СГТ антител ($\geq 1:40$) определялся только к штамму гриппа H3N2 в III группе 1:42, где медицинские работники были привиты сочетанной вакциной против гриппа и пневмококковой инфекции. Что касается значений СГТ у непривитых (I группа) и вакцинированных против гриппа (II группа), то данный показатель к этому же штамму гриппа находится в пределах 1:29 и 1:27 соответственно и определяется ниже протективного. В остальных группах ко всем штаммам вируса

Таблица 3. Значения среднегеометрических титров антител к штаммам вируса гриппа через 6 месяцев после вакцинации по группам участников

Table 3. Magnitude of inter-group mean geometric anti-influenza virus strain antibody titers 6 months after vaccination

Группы Groups	Всего человек Total people	Обследовано Examined	H1N1	H3N2	B
I группа (непривитые) 1st group (unvaccinated)	281	141	1:12	1:29	1:10
II группа (V грипп) 2nd group (V flu)	98	60	1:17	1:27	1:13
III группа (V сочетанная) 3rd group (V combined)	108	45	1:19	1:42	1:14

Примечание. V — вакцинация.

Note. V — vaccination.

Таблица 4. Распределение значений СГТ антител к штаммам вируса гриппа через 6 месяцев в группе лиц, вакцинированных против гриппа (II группа)

Table 4. Distribution of anti-influenza virus strain antibody GMT magnitude 6 months after influenza vaccination (2nd group)

	Уровни антител Antibody levels	Штаммы вируса гриппа Influenza virus strains					
		A(H1N1)		A(H3N2)		B	
		человек people	%	человек people	%	человек people	%
II группа (V грипп) 2nd group (V flu)	1:5	23	38,3	14	23,3	28	46,6
	1:10	10	16,6	7	11,6	6	10,0
	1:20	8	13,3	8	13,3	13	21,6
	1:40	7	11,6	13	21,6	7	11,6
	1:80	4	6,6	8	13,3	2	3,3
	1:160	6	10,0	7	11,6	0	0
	1:320	2	3,3	0	0	2	3,3
	1:640	0		2	3,3	2	3,3
	1:1280	0		1	1,6	0	
Всего Total	60		60		60		
СГТ GMT	1:17		1:27		1:13		

Примечание. V — вакцинация.

Note. V — vaccination.

гриппа СГТ антител определялся значительно ниже уровня защитного.

Анализируя индивидуальные показатели уровня антител через 6 месяцев в группе сотрудников, вакцинированных против гриппа (II группа), установлено, что лица с низким СГТ антител ($< 1:40$) к штамму H1N1 составили большую половину обследованных — 68,4% (41 из 60) и лишь 11,7% сотрудников (7 из 60 человек) имели защитный уровень антител 1:40 (табл. 4). В структуре значений были выявлены результаты с высокими СГТ антител к штамму гриппа H1N1 ($> 1:160$) — 13,3% (8 из 60 человек), причем максимальный уровень антител в значении 1:320 к данному штамму гриппа определялся в 2 (3,3%) случаях.

К штамму гриппа A(H3N2) количество лиц не имеющих протективных уровней антител составило 48,3% (29 из 60 человек), защитные АТ регистрировались у 51,7% (31 из 60 человек). В сравнении со значениями к штамму гриппа H1N1 количество лиц с защитным уровнем антител к штамму гриппа A(H3N2) было выше, чем к штамму гриппа H1N1 ($p = 0,0001$). Причем доля лиц с высокими значениями ($> 1:160$) к гриппу A(H3N2) составили 16,7% (10 из 60 человек), что несколько выше, чем к гриппу H1N1 — 13,3%. Следует отметить, что у 78,3% (47 из 60 человек) обследованных сотрудников не выявлялись защитные уровни антител к штамму гриппа B и лишь у 21,7% (13 из 60 человек) они соответствовали протективным значениям.

Анализируя уровень СГТ антител к гриппу через 6 месяцев в группе получивших сочетанную вакцинацию против гриппа и пневмококковой инфекции (III группа), выявлена аналогичная тенденция как при анализе, проведенном в предыдущей группы сравнения (табл. 5). Так, значения СГТ антител к штамму гриппа A(H3N2) были выше в сравнении с таковыми к штаммам гриппа H1N1 и B ($p = 0,006$).

Достаточно высокий процент лиц с низким титром антител ($< 1:40$) не достигнувших протективного уровня определялся к штамму гриппа H1N1 — 58,0% (26 из 45), в то время как низкий уровень АТ к штамму гриппа A(H3N2) зарегистрирован у 44,4% (20 из 45 человек). Сравнивая защитный уровень антител к штамму гриппа H1N1 и штамму гриппа A(H3N2), также выявлено превалирование показателя к гриппу A(H3N2), который составил 55,6% (25 из 45 человек) против 42,0% (19 из 45 человек). Следует также отметить, что участники с высокими значениями (1:160 и выше) выявлялись к штамму гриппа A(H3N2) у 18,0% (8 из 45 человек) сотрудников против 8,9% (4 из 45) к штамму гриппа H1N1.

Наиболее низкие показатели, регистрируемые ниже защитного уровня, определялись к гриппу штамму B в 75,6% случаев (34 из 45 человек) и только у 24,4% (11 из 45 человек) АТ обнаружены в протективных значениях, при этом высокие уровни ($> 1:160$) выявлены лишь у 6,7% (3 из 45 человек) (табл. 5).

Таблица 5. Распределение значений СГТ антител к штаммам вируса гриппа через 6 месяцев в группе лиц, вакцинированных против гриппа и пневмококка (III группа)

Table 5. Distribution of anti-influenza virus strain antibody GMT magnitude 6 months after influenza + pneumococcus vaccination (3rd group)

	Уровни антител Antibody levels	Штаммы вируса гриппа Influenza virus strains					
		А(Н1N1)		А(Н3N2)		В	
		человек people	%	человек people	%	человек people	%
III группа (V сочетанная) 3rd group (V flu)	1:5	16	35,5	7	15,5	20	44,4
	1:10	4	8,8	5	11,1	6	13,3
	1:20	6	13,3	8	17,7	8	17,7
	1:40	9	20,0	7	15,5	3	6,6
	1:80	6	13,3	6	13,3	5	11,1
	1:160	2	4,4	4	8,8	2	4,4
	1:320	2	4,4	4	8,8	1	2,2
	1:640	0	0	3	6,6	0	
	1:1280	0	0	1	2,2	0	
Всего Total	45		45		45		
СГТ GMT	1:19		1:42		1:14		

Представляют научно-практический интерес результаты исследований, проведенных в группе медицинских работников, не получивших вакцинацию против гриппа и пневмококковой инфекции (I группа, непривитые) (табл. 6).

Наблюдениями в динамике за сотрудниками, не вакцинированными против гриппа

и пневмококка, с определением уровней антител через 6 месяцев от начала исследования выявлено, что в данной группе лиц защитный уровень антител ко всем изучаемым штаммам гриппа — А(Н1N1), А(Н3N2) и В определялся в 24,8%, 48,9% и 19,1% соответственно.

Несомненный интерес вызвал анализ клинического наблюдения за медицинским персо-

Таблица 6. Распределение значений СГТ антител к штаммам вируса гриппа через 6 месяцев в группе лиц, не вакцинированных против гриппа и пневмококка (I группа)

Table 6. Distribution of anti-influenza virus strain antibody GMT magnitude 6 months without influenza + pneumococcus vaccination (1st group)

	Уровни антител Antibody levels	Штаммы вируса гриппа Influenza virus strains					
		А(Н1N1)		А(Н3N2)		В	
		человек people	%	человек people	%	человек people	%
I группа (непривитые) 1st group (unvaccinated)	1:5	77	54,6	32	22,6	92	65,2
	1:10	12	8,5	13	9,2	7	4,9
	1:20	17	12,1	27	19,1	15	10,6
	1:40	17	12,1	25	17,1	8	5,6
	1:80	10	7,1	19	13,4	12	8,5
	1:160	4	2,8	14	9,9	5	3,5
	1:320	1	0,7	8	5,6	2	1,4
	1:640	2	1,4	2	1,4	0	
	1:1280	1	0,7	1	0,7	0	
Всего Total	141		141		141		
СГТ GMT	1:12		1:29		1:10		

Таблица 7. Доля пневмоний с клиникой COVID-19, но без подтверждения диагноза в течение 6 месяцев по группам участников

Table 7. Inter-group proportion of COVID-19-related pneumonia without verified diagnosis within 6 months

Группы Groups	Всего человек Total people	Всего пневмоний, абс./% Total pneumonia, abs./%	Легкое течение Mild course		Средней тяжести Moderate severity		Тяжелое Severe	
			Абс. Abs.	%	Абс. Abs.	%	Абс. Abs.	%
II группа (V грипп) 2nd group (V flu)	98	3/3,1	3	100	0	0	0	0
III группа (V сочетанная) 3rd group (V flu)	108	5/4,6	5	100	0	0	0	0
I группа (непривитые) 1st group (unvaccinated)	281	11/3,9	–	45,4	4	36,4	2 летальных исхода 2 deaths	18,2

Примечание. V — вакцинация.

Note. V — vaccination.

налом в течение 6 месяцев, то есть между 1 и 2 пиками эпидемического подъема COVID-19. Оказалось, что частота развития пневмоний, подтвержденных данными компьютерной томографии, среди иммунизированных (3,9%, у 8 из 206 человек) и непривитых (3,9%, у 11 из 281 человека) лиц против гриппа и пневмококка не отличалась (табл. 7). В то же время среди вакцинированных все пневмонии по тяжести клинического течения были легкими, тогда как у непривитых сотрудников — в 45,4% (у 5 из 11 человек), у 36,4% (4 из 11 человек) пациентов они оценивались как среднетяжелые и в 18,2% (2 из 11 человек) случаев как тяжелые. Несмотря на госпитализацию, в этих случаях был зарегистрирован летальный исход заболевания.

Обсуждение

При анализе полученных результатов по исследованию иммуногенности вакцины против гриппа, а также в ее сочетании с пневмококковой, проведенные между первым и вторым пиком заболеваемости COVID-19 в Краснодарском крае у медицинских работников, на первый взгляд кажется, что все изучаемые показатели регистрируются в низких значениях. Однако, принимая во внимание результаты исследований по оценке поствакцинального иммунитета, где показано, что эффективность вакцинации против гриппа зависит от времени, при котором происходит ежемесячное снижение уровня антител в среднем на 7% для штамма H3N2 и штаммов линии В и на 6–11% — для H1N1, прошедшего с момента введения препарата и штамма вируса, то полученные нами данные согласуются с аналогичными показателями других исследователей [29]. Таким об-

разом, можно предположить, что за 6 месяцев, прошедших с момента вакцинации защитный уровень антител для штаммов А(H1N1) и В снизился на 50%, а для А(H3N2) — на 40% [1]. Несмотря на то что скорость и степень уменьшения антител могут различаться, считается, что эпидемиологическая эффективность сохраняется в течение года.

В проведенном исследовании обнаружены высокие уровни антител к штамму А(H3N2) через 6 месяцев после вакцинации против гриппа во всех группах привитых сотрудников, при этом наибольшее количество — среди лиц, получивших сочетанную вакцинацию (26,7%). Также в группе привитых от гриппа ко всем трем штаммам выявлена доля лиц от 4 (6,7%) до 10 (16,7%), имевших высокие уровни антител, достигающих максимальных значений (1:1280). Такое распределение подтверждает эффективность проведенной вакцинации. Однако нельзя исключить и роль циркулирующих сезонных вирусов гриппа. Так, анализ изменений уровня популяционного иммунитета трудоспособного взрослого населения России к циркулирующим вирусам гриппа А(H1N1)pdm09, А(H3N2) и В показал, что в 2014 и 2017 гг. преобладал сезонный вирус гриппа серотипа А(H3N2), в 2016 г. — пандемический вариант вируса гриппа серотипа А(H1N1)pdm09, а в 2015 и 2018 гг. — вирус гриппа серотипа В [2].

Согласно данным Национального центра по гриппу при НИИ гриппа, в эпидемическом сезоне 2019–2020 гг. в России циркулировали вирусы, генетически близкие вирусу А/Гонконг/2671/2019 (генетическая подгруппа 3С.2a1b+Т135К-В). Начало эпидемического сезона 2021–2022 гг. в Краснодарском крае характеризовалось подъемом заболеваемости

гриппом А(Н3N2) [11]. Полученные результаты убедительно свидетельствуют о существовании причинно-следственной связи между уровнем популяционного иммунитета и этиологией эпидемий. Как правило, по их прошествии отчетливо увеличивается уровень антител к доминирующему агенту, следствием чего является как увеличение прослойки лиц с протективными антителами, так и увеличение СГТ антител к основному возбудителю эпидемии [3].

Оценка уровня популяционного иммунитета показала, что у привитых моновакциной против гриппа доля (32,7%) лиц с протективными значениями антител к штамму А(Н1N1) выше ($p < 0,04$), чем у невакцинированных (24,5%). Если принимать во внимание вышеуказанное предположение о возможном снижении уровня антител на 50% через 6 месяцев после вакцинации, то полученные данные являются ожидаемыми.

В проведенном нами исследовании зарегистрированный уровень антител, а также СГТ антител к гриппу В был наименьшим среди всех штаммов гриппа в исследуемых группах несмотря на циркуляцию возбудителя в 2017–2018 гг. на территории Краснодарского края. Недостаточная иммуногенность вакцинного компонента вирусов гриппа В отмечается и в других публикациях [7].

Известно, что поствакцинальный иммунитет после иммунизации адъювантной вакциной сохраняется не менее года у большинства пациентов. Однако ежегодная вакцинация необходима для обновления гуморальных антител к циркулирующим в данном сезоне штаммам гриппа и для поддержания СГТ антител на защитных уровнях у серонегативных лиц [6, 15].

В то же время нельзя исключить, что преобладание протективных уровней антител к гриппу среди привитых взаи мосвязано и с формированием длительной иммунологической памяти, особенно при введение адъювантной вакцины, среди которых и используемая для иммунизации в данном исследовании [4]. Адъюванты полиоксидоний (азоксимера бромид) и Совидон (поливинилпирролидон), входящие в состав отечественных вакцин против гриппа, способствуют не только формированию гуморального иммунитета, но оказывают и иммуномодулирующее действие, которое проявляется в активации функции клеток врожденного и адаптивного иммунитета, необходимых для распознавания вирусов, в том числе и SARS-CoV-2, индукции синтеза про- и противовоспалительных медиаторов [5, 10, 13, 23, 24].

В дальнейшем на протяжении 6 месяцев в наблюдаемых группах медицинских работников была проведена оценка влияния вак-

цинации на тяжесть течения острых респираторных инфекций, в том числе осложненными пневмониями с клиникой COVID-19. Следует напомнить, что вакцинация против гриппа или ее сочетание с пневмококковой вакциной проводилась данному контингенту в отсутствие специфической профилактики против SARS-CoV-2. Важно отметить, что у медицинских сотрудников, вне зависимости от схемы вакцинации против гриппа или сочетанной вакцинации против гриппа и пневмококковой инфекции, развившиеся впоследствии пневмонии протекали в легкой форме. У непривитых сотрудников пневмонии, осложнившие течение респираторных инфекций, в 54,6% случаев (6 из 11 человек) имели среднетяжелое течение, а в 18,2% (2 из 11 человек) закончились летально.

Еще следует подчеркнуть, что сравнительный анализ оценки уровня поствакцинальных антител показал, что наибольшее число серопротекций ко всем штаммам гриппа выявлено в группе привитых против гриппа и пневмококковой инфекции. Не исключено, что вакцинация против пневмококковой инфекции сопровождается стимуляцией не только специфических антител к гриппу, но и к SARS-CoV-2, транзиторно способствуя снижению восприимчивости к COVID-19 [25, 28, 31].

Заключение

Детальный анализ по исследованию уровней антител к вирусу гриппа, проведенный по группам медицинских сотрудников в зависимости от полученной вакцинации между первым и вторым пиком заболеваемости COVID-19, позволил определить, что спустя 6 месяцев доля серопротекций и СГТ антител среди вакцинированных выше, чем у лиц неиммунизированных в конкретном наблюдаемом сезоне. Однако только показатели штамма А(Н3N2) по уровню СГТ антител соответствовали критериям иммуногенности СРМР. Выявленная среди непривитых сотрудников вариабельность значений антител от минимальных до максимальных свидетельствует о возможном сохранении как поствакцинальных антител с предыдущего сезона иммунизации, так и о циркуляции штаммов вируса гриппа на данной территории. Несмотря на отсутствие различий в профилактике респираторных инфекций, предшествующая вакцинация оказывает влияние на тяжесть течения пневмоний с клиникой COVID-19: у 100% вакцинированных отмечено легкое их течение, у непривитых — в 36,4% случаев имело место среднетяжелое течение и в 18,2% — тяжелое, с летальным исходом.

Список литературы/References

1. Евдокимова О.В., Афанасьев С.В., Антонова О.А., Коноплева В.И., Горелов И.С., Круглова А.П., Бирюков В.В. Изучение основных параметров иммуногенности вакцины «Ультрикс» // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. 2020. Т. 28, № 1. С. 21–29. [Evdokimova O.V., Afanasiev S.V., Antonova O.A., Konopleva V.I., Gorelov I.S., Kruglova A.P., Biryukov V.V. A study of the main parameters of immunogenicity of ultrix vaccine. *Rossiiskij mediko-biologicheskij vestnik imeni akademika I.P. Pavlova* = *I.P. Pavlov Russian Medical Biological Herald*, 2020, vol. 28, no. 1, pp. 21–29. (In Russ.)] doi: 10.23888/PAVLOVJ202028121-29
2. Жукова Л.И., Рафеенко Г.К., Городин В.Н., Ковалевская О.И. Клинико-эпидемиологическая характеристика гриппа в Краснодарском крае: пятилетний мониторинг // Кубанский научный медицинский вестник. 2019. Т. 26, № 3. С. 41–47. [Zhukova L.I., Rafeenko G.K., Gorodin V.N., Kovalevskaya O.I. Clinical and epidemiological characterization of influenza in the krasnodar krai: five-year monitoring. *Kubanskij nauchnyj medicinskij vestnik* = *Kuban Scientific Medical Bulletin*, 2019, vol. 26, no. 3, pp. 41–47. (In Russ.)] doi: 10.25207/1608-6228-2019-26-3-41-47
3. Коншина О.С., Соминина А.А., Смородинцева Е.А., Столяров К.А., Никоноров И.Ю. Результаты многолетнего изучения популяционного иммунитета к вирусам гриппа А(Н1N1)pdm09, А(Н3N2) и В у взрослого населения России // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 1. С. 27–33. [Konshina O.S., Somina A.A., Smorodintseva E.A., Stolyarov K.A., Nikonorov I.Yu. Results of long-term research of population immunity to influenza virus A(H1N1) pdm09, A(H3N2) and B in the adult population of the Russian Federation. *Infektsiya i immunitet* = *Russian Journal of Infection and Immunity*, 2017, vol. 7, no. 1, pp. 27–33. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2017-1-27-33
4. Костинов М.П., Тюкавкина С.Ю., Харсеева Г.Г., Настаева Н.Ю. Эффективность вакцинации против гриппа в условиях пандемии COVID-19 (материал для подготовки лекции) // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2023. Т. 12, № 4. С. 90–99. [Kostinov M.P., Tyukavkina S.Yu., Kharseeva G.G., Nastaeva N.Yu. Effectiveness of influenza vaccination in the context of the COVID-19 pandemic (material for preparing the lecture). *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie* = *Infectious Diseases: News, Opinions, Training*, 2023, vol. 12, no. 4, pp. 90–99. (In Russ.)] doi: 10.33029/2305-3496-2023-12-4-90-99.
5. Костинов М.П., Хромова Е.А., Костинова А.М. Может ли вакцинация против гриппа быть неспецифической профилактикой SARS-CoV-2 и других респираторных инфекций? // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2020. Т. 9, № 3. С. 36–40. [Kostinov M.P., Khromova E.A., Kostinova A.M. Can influenza vaccination be a nonspecific prevention of SARS-CoV-2 and other respiratory infections? *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie* = *Infectious Diseases: News, Opinions, Training*, 2020, vol. 9, no. 3, pp. 36–40. (In Russ.)] doi: 10.33029/2305-3496-2020-9-3-36-40
6. Костинов М.П., Чучалин А.Г., Чебыкина А.В. Поствакцинальный иммунитет к гриппу у впервые и повторно вакцинированных больных с бронхолегочной патологией // Иммунология. 2011. Т. 32, № 6. С. 306–310. [Kostinov M.P., Chuchalin A.G., Chebykina A.V. Post-vaccination anti-influenza immunity in newly and repeatedly vaccinated patients presenting with bronchopulmonary pathology. *Immunologiya* = *Immunologiya*, 2011, vol. 32, no. 6, pp. 306–310. (In Russ.)]
7. Кривицкая В.З., Кузнецова Е.В., Майорова В.Г., Петрова Е.Р., Соминина А.А., Даниленко Д.М. Влияние вакцинации против гриппа на уровень специфического гуморального иммунитета здоровых лиц // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 1. С. 127–141. [Krivitskaya V.Z., Kuznetsova E.V., Maiorova V.G., Petrova E.R., Somina A.A., Danilenko D.M. Influenza vaccination influencing level of specific humoral immunity in healthy individuals. *Infektsiya i immunitet* = *Russian Journal of Infection and Immunity*, 2022, vol. 12, no. 1, pp. 127–141. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-IVI-1750
8. Никифорова А.Н., Миронов А.Н., Бушменков Д.С., Меркулов В.А., Степанов Н.Н. Безопасность и иммуногенность инактивированной гриппозной вакцины с адъювантом совидон производства ФГУП «НПО «Микроген» Минздравсоцразвития России // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2011. Т. 2, № 57. С. 30–34. [Nikiforova A.N., Mironov A.N., Bushmenkov D.S., Merkulov V.A., Stepanov N.N. Safety and immunogenicity of inactivated influenza vaccine associated with Sovidon, developing by «Microgen». *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika* = *Epidemiology and Vaccine Prevention*, 2011, vol. 2, no. 57, pp. 30–34. (In Russ.)]
9. Петров Р.В., Хаитов Р.М. Конъюгированные полимер-субъединичные иммуногены и вакцины // Вестник Российской академии медицинских наук. 2003. № 1. С. 10–14. [Petrov R.V., Khaitov R.M. Conjugated polymer-subunit immunogens and vaccines. *Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk* = *Herald of the Russian Academy of Sciences*, 2003, no. 1, pp. 10–14. (In Russ.)]
10. Соколова Т.М., Шувалов А.Н., Полосков В.В., Шаповал И.М., Костинов М.П. Вакцины «Гриппол», «Ваксигрип» и «Инфлювак» — индукторы генов факторов врожденного и адаптивного иммунитета в клетках крови человека // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2014. № 5. С. 37–43. [Sokolova T.M., Shuvalov A.N., Poloskov V.V., Sharoval I.M., Kostinov M.P. Vaccines “Grippol”, “Vaxigrip” and “Influvac” — gene inducers of factors of innate and adaptive immunity in human blood cells. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii* = *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2014, no. 5, pp. 37–43. (In Russ.)]
11. Тхакушинова Н.Х., Бевзенко О.В. Клинико-эпидемиологическая характеристика гриппа у детей в Краснодарском крае в эпидемическом сезоне 2021–2022 гг. // Российский педиатрический журнал. 2022. Т. 3, № 1: 310. [Tkhakushinova N.H., Bevzenko O.V. Clinical and epidemiological characteristics of influenza in children in Krasnodar krai during epidemic season of 2021–2022. *Rossiiskii pediatricheskii zhurnal* = *Russian Pediatric Journal*, 2022, vol. 3, no. 1: 310. (In Russ.)]
12. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Современные иммуномодуляторы: основные принципы их применения // Иммунология. 2000. № 5. С. 4–8. [Khaitov R.M., Pinegin B.V. Modern immunomodulators: the basic principles of their application. *Immunologiya* = *Immunologiya*, 2000, no. 5, pp. 4–8. (In Russ.)]
13. Хромова Е.Е., Семочкин И.А., Ахматова Э.А., Столпникова В.Н., Сходова С.А., Сорокина Е.В., Ахматова Н.К., Костинови М.П. Сравнительная активность вакцин против гриппа: влияние на субпопуляционную структуру лимфоцитов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2016. № 6. С. 61–65. [Khromova E.A.,

- Semochkin L.A., Akhmatova E.A., Stolpnikova V.N., Skhodova S.A., Sorokina E.V., Akhmatova N.K., Kostinov M.P. Comparative activity of influenza vaccines: effect on lymphocyte subpopulation structure. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2016, no. 6, pp. 61–65. (In Russ.) doi: 10.36233/0372-9311-2016-6-61-65
14. Цыбалова Л.М., Степанова Л.А., Шуклина М.А. Ковалева А.А., Потапчук М.В., Шалджян А.А., Забродская Я.А., Егоров В.В. Кросс-протективные свойства противогриппозной вакцины на основе рекомбинантного белка НВс4М2е // Вопросы вирусологии. 2018. Т. 63, № 2. С. 68–76. [Tsybalova L.M., Stepanova L.A., Shuklina M.A., Petrov S.V., Kovaleva A.A., Potapchuk M.V., Shaldzhan A.A., Zabrodskaia Y.A., Egorov V.V. Cross-protective properties of an influenza vaccine based on hbc4m2e recombinant protein. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2018, vol. 63, no. 2, pp. 68–76. (In Russ.)] doi: 10.18821/0507-4088-2018-63-2-68-76
 15. Чебыкина А.В., Костинов М.П. Поствакцинальный иммунитет против гриппа у пациентов с хронической бронхолегочной патологией // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2011. № 4. С. 76–80. [Chebykina A.V., Kostinov M.P. Postvaccination immunity against influenza in patients with chronic broncho-pulmonary pathology. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2011, no. 4, pp. 76–80. (In Russ.)]
 16. Bozek A., Kozłowska R., Galuszka B., Grzanka A. Impact of influenza vaccination on the risk of SARS-CoV-2 infection in a middle-aged group of people. *Hum. Vaccin. Immunother.*, 2021, vol. 17, no. 9, pp. 3126–3130. doi: 10.1080/21645515.2021.1913961
 17. Candelli M., Pignataro G., Torelli E., Gull A., Nista E.C., Petrucci M., Saviano A., Marchesini D., Covino M., Ojetti V., Antonelli M., Gasbarrini A., Franceschi F. Effect of influenza vaccine on COVID-19 mortality: a retrospective study. *Intern. Emerg. Med.*, 2021, vol. 16, no. 7, pp. 1849–1855. doi: 10.1007/s11739-021-02702-2
 18. Conlon A., Ashur C., Washer L., Eagle K.A., Hofmann Bowman M.A. Impact of the influenza vaccine on COVID-19 infection rates and severity. *Am. J. Infect. Control.*, 2021, vol. 49, no. 6, pp. 694–700. doi: 10.1016/j.ajic.2021.02.012
 19. Debisarun P.A., Gössling K.L., Bulut O., Kilic G., Zoodsma M., Liu Z., Oldenburg M., Rüchel N., Zhang B., Xu C.J., Struycken P., Koeken V.A.C.M., Domínguez-Andrés J., Moorlag S.J.C.F.M., Taks E., Ostermann P.N., Müller L., Schaal H., Adams O., Borkhardt A., Ten Oever J., van Crevel R., Li Y., Netea M.G. Induction of trained immunity by influenza vaccination — impact on COVID-19. *PLoS Pathog.*, 2021, vol. 17, no. 10: e1009928. doi: 10.1371/journal.ppat.1009928
 20. Huang K., Lin S.W., Sheng W.H., Wang C.C. Influenza vaccination and the risk of COVID-19 infection and severe illness in older adults in the United States. *Sci. Rep.*, 2021, vol. 11, no. 1: 11025. doi: 10.1038/s41598-021-90068-y
 21. Influenza virus characterisation. Summary Europe, December 2020. European Centre for Disease Prevention and Control. ECDC: Stockholm, 2020. URL: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Influenza-characterisation-report-December-2020.pdf>
 22. Jehi L., Ji X., Milinovich A., Erzurum S., Rubin B.P., Gordon S., Young J.B., Kattan M.W. Individualizing risk prediction for positive coronavirus disease 2019 testing: results from 11,672 patients. *Chest*, 2020, vol. 158, no. 4, pp. 1364–1375. doi: 10.1016/j.chest.2020.05.580
 23. Kostinov M.P., Akhmatova N.K., Khromova E.A., Skhdova S.A., Stolpnikova V.N., Cherdantsev A.P., Vlasenko A.E. The impact of adjuvanted and non-adjuvanted influenza vaccines on the innate and adaptive immunity effectors. *IntechOpen Book Series. Infectious Diseases, vol. 1. Influenza. Therapeutics and challenges. Ed. Saxena S.K., 2018, ch. 5, pp. 83–109. doi: 10.5772/intechopen.77006*
 24. Kostinov M., Akhmatova N., Khromova E., Kostinova A.M. Cytokine profile in human peripheral blood mononuclear leukocytes exposed to immunoadjuvant and adjuvant-free vaccines against influenza. *Front. Immunol.*, 2020, vol. 11: 1351. doi: 10.3389/fimmu.2020.0135143-49
 25. Lewnard J.A., Bruxvoort K.J., Fischer H., Hong V.X., Grant L.R., Jódar L., Gessner B.D., Tartof S.Y. Prevention of Coronavirus Disease 2019 among older adults receiving pneumococcal conjugate vaccine suggests interactions between Streptococcus pneumoniae and Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 in the respiratory tract. *J. Infect. Dis.*, 2022, vol. 225, no. 10, pp. 1710–1720. doi: 10.1093/infdis/jiab128
 26. Massari M., Spila-Alegiani S., Fabiani M., Belleudi V., Trifir G., Kirchmayer U., Poggi F.R., Mancuso P., Menniti-Ippolito F., Gini R., Bartolini C., Leoni O., Ercolanoni M., Da-Re F., Guzzinati S., Luxi N., Riccardo F., Giorgi-Rossi P. Association of influenza vaccination and prognosis in patients testing positive to SARS-CoV-2 swab test: a large-scale Italian multi-database cohort study. *Vaccines (Basel)*, 2021, vol. 9, no. 7: 716. doi: 10.3390/vaccines9070716
 27. Massoudi N., Mohit B. A case-control study of the 2019 influenza vaccine and incidence of COVID-19 among healthcare workers. *J. Clin. Immunol.*, 2021, vol. 41, no. 2, pp. 324–334. doi: 10.1007/s10875-020-00925-0
 28. Noale M., Trevisan C., Maggi S., Incalzi R.A., Pedone C., Di Bari M., Adorni F., Jesuthasan N., Sojic A., Galli M., Giacomelli A., Molinaro S., Bianchi F., Mastroianni C., Prinelli F., On Behalf Of The Epicovid Working Group. The association between influenza and pneumococcal vaccinations and SARS-CoV-2 infection: data from the EPICOVID19 Web-Based Survey. *Vaccines (Basel)*, 2020, vol. 8, no. 3: 471. doi: 10.3390/vaccines8030471
 29. Prevention and Control of Seasonal Influenza with Vaccines: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices — United States, 2017–18 Influenza Season. *MMWR Recomm. Rep.*, 2017, vol. 66, no. RR-2, pp. 1–20. doi: 10.15585/mmwr.rr6602a1
 30. Ragni P., Marino M., Formisano D., Bisaccia E., Scaltriti S., Bedeschi E., Grilli R. Association between exposure to influenza vaccination and COVID-19 diagnosis and outcomes. *Vaccines (Basel)* 2020, vol. 8, no. 4: 675. doi: 10.3390/vaccines8040675
 31. Su W., Wang H., Sun C., Li N., Guo X., Song Q., Liang Q., Liang M., Ding X., Sun Y. The association between previous influenza vaccination and COVID-19 infection risk and severity: a systematic review and meta-analysis. *Am. J. Prev. Med.*, 2022, vol. 63, no. 1, pp. 121–130. doi: 10.1016/j.amepre.2022.02.008
 32. Wilcox C.R., Islam N., Dambha-Miller H. Association between influenza vaccination and hospitalisation or all-cause mortality in people with COVID-19: a retrospective cohort study. *BMJ Open Respir. Res.*, 2021, vol. 8, no. 1: e000857. doi: 10.1136/bmjresp-2020-000857

Авторы:

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

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

Никитюк Н.Ф., д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории вакцинопрофилактики и иммунотерапии аллергических заболеваний ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия; преподаватель кафедры эпидемиологии и современных технологий вакцинации ИПО Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова МЗ РФ (Сеченовский Университет), Москва, Россия;

Машилов К.В., к.м.н., доцент, старший научный сотрудник лаборатории вакцинопрофилактики и иммунотерапии аллергических заболеваний ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;

Хасанова А.А., аспирант кафедры инфекционных болезней ФГБОУ ВПО Ульяновский государственный университет, г. Ульяновск, Россия;

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

Андреева Н.П., к.м.н., доцент кафедры организации здравоохранения и информационных технологий в медицине ФГБОУ ВО Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова, г. Чебоксары, Россия; врач аллерголог-иммунолог БУ Городская детская клиническая больница Минздрава Чувашии, г. Чебоксары, Россия;

Ли Ю.А., к.м.н., врач-инфекционист, майор медицинской службы, преподаватель военного-учебного центра ФГБОУ ВО Тихоокеанский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия;

Полищук В.Б., к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории вакцинопрофилактики и иммунотерапии аллергических заболеваний ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;

Линок А.В., к.м.н., доцент кафедры эпидемиологии и современных технологий вакцинации ИПО Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова МЗ РФ (Сеченовский Университет), Москва, Россия; научный сотрудник лаборатории эпидемиологического анализа и мониторинга инфекционных заболеваний ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;

Локтионова М.Н., к.м.н., доцент кафедры эпидемиологии и современных технологий вакцинации ИПО Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова МЗ РФ (Сеченовский Университет), Москва, Россия;

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

Храпунова И.А., д.м.н., профессор кафедры эпидемиологии и современных технологий вакцинации ИПО Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова МЗ РФ (Сеченовский Университет), Москва, Россия.

Authors:

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

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

Nikityuk N.F., DSc (Medicine), Professor, Leading Researcher, Laboratory for Vaccine Prevention and Immunotherapy of Allergic Diseases, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation; Lecturer, Department of Epidemiology and Modern Vaccination Technologies, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation;

Mashilov K.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Senior Researcher, Laboratory for Vaccine Prevention and Immunotherapy of Allergic Diseases, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;

Khasanova A.A., PhD Student, Department of Infectious Diseases, Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russian Federation;

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

Andreeva N.P., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Healthcare Organization and Information Technologies in Medicine, Chuvash State University, Cheboksary, Russian Federation; Allergologist-Immunologist, City Children's Clinical Hospital of Cheboksary, Cheboksary, Russian Federation;

Li Yu.A., PhD (Medicine), Infectious Diseases Doctor, Major of Medical Service, Lecturer of the Military Training Center of the Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation;

Polishchuk V.B., PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Vaccine Prophylaxis and Immunotherapy, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;

Linok A.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Epidemiology and Modern Vaccination Technologies, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation; Researcher, Laboratory for Epidemiological Analysis and Monitoring of Infectious Diseases, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;

Loktionova M.N., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Epidemiology and Modern Vaccination Technologies, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation;

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

Khrapunova I.A., DSc (Medicine), Professor of the Department of Epidemiology and Modern Vaccination Technologies, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation.

IMMUNOGENICITY AND SAFETY OF DTPW-HEPB-HIB (PRP-T) VACCINE (PENTAVAC) IN INFANTS AGED 2–7 MONTHS: A POST MARKETING PHASE 4 CLINICAL TRIAL STUDY

H. Masoumi-Asl^a, A. Nateghian^a, H.R. Baradaran^a, E. Jafari^b, R. Azizian^b, M. Faramarzi^a

^a Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

^b Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract. *Background.* Vaccines play a critical role in safeguarding public health, particularly for children. It is imperative to proactively address safety concerns to uphold trust in their effectiveness and safety. Skepticism surrounding vaccines can have significant adverse effects on the overall well-being of the entire population, potentially leading to individuals opting out of vital vaccinations, thereby posing risks to public health. Thus, ensuring confidence in vaccine safety remains paramount. *Materials and methods.* This phase four clinical trial was conducted as a post-marketing study (PMS) on 2 to 7 month old healthy infants (N = 539) to evaluate immunity and safety of Indian pentavalent vaccine containing Diphtheria, Tetanus, Pertussis, Hepatitis B and Haemophilus influenza type b [DTPW-HEP B-HIB (PRP-T)/PENTAVAC] in four different centers at Tehran province. Blood samples were collected from eligible infants before receiving the vaccine (2 months of age) and 1 month after the third dose (7 months of age) to determine antibodies against all antigens in the pentavalent vaccine using ELISA. *Results.* The results indicated that the immune responses demonstrated seroprotection and protective antibody levels after three doses of the vaccine for Haemophilus influenza b, diphtheria, tetanus, hepatitis B virus and *Bordetella pertussis* were 99.1%, 98.7%, 99.8%, 99.4% and 69.6%, respectively. Statistical analysis showed that the P-value for all vaccine components was similar (P < 0.001). The five most common side effects reported were mild fever (10%), erythema at the vaccination site (9.1%), inflammation (4.3%), pain at the vaccination site (3.3%), and restlessness (2.6%). *Conclusion.* This study's findings demonstrated a significant increase in antibody levels against all five vaccine components. In light of these results, it can be concluded that the Pentavalent vaccine is not only effective in enhancing immunity against multiple diseases but also presents minimal risk of side effects in the study population. These findings contribute to the body of evidence supporting the safety and efficacy of vaccines, underscoring their crucial role in protecting public health.

Key words: immunity, infants, pentavalent vaccine, antibody levels, side effects, children's health.

Адрес для переписки:

Махмуд Фарамарзи
1449614535, Иран, Тегеран, р-н Саттаркхен, ул. Нияеш, 3,
Общая больница Хазрат-э Расул.
Тел.: +98 (21) 64352136.
E-mail: faramarzimahmood@yahoo.com

Contacts:

Mahmoud Faramarzi
1449614535, Iran, Tehran, Niyayesh St. Satarkhan Ave, No. 3,
3rd floor, Hazrat-E Rasool General Hospital,
Phone: +98 (21) 64352136.
E-mail: faramarzimahmood@yahoo.com

Для цитирования:

Масуми-Асл Х., Натегян А., Барадаран Х.Р., Джафари Э., Азизян Р., Фарамарзи М. Иммуногенность и безопасность вакцины ДТПВ-НЕР В-НИБ (PRP-T) (Пентавак) у младенцев в возрасте 2–7 месяцев: клиническое испытательное постмаркетинговое исследование 4 фазы // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 4. С. 781–787. doi: 10.15789/2220-7619-IAS-17579

Citation:

Masoumi-Asl H., Nateghian A., Baradaran H.R., Jafari E., Azizian R., Faramarzi M. immunogenicity and safety of DTPW-HEPB-HIB (PRP-T) vaccine (Pentavac) in infants aged 2–7 months: a post marketing phase 4 clinical trial study // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 4, pp. 781–787. doi: 10.15789/2220-7619-IAS-17579

© Masoumi-Asl H. et al., 2024

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-IAS-17579>

ИММУНОГЕННОСТЬ И БЕЗОПАСНОСТЬ ВАКЦИНЫ DTPW-HEP В-НІВ (PRP-T) (ПЕНТАВАК) У МЛАДЕНЦЕВ В ВОЗРАСТЕ 2–7 МЕСЯЦЕВ: КЛИНИЧЕСКОЕ ИСПЫТАТЕЛЬНОЕ ПОСТМАРКЕТИНГОВОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ 4 ФАЗЫ

Масуми-Асл Х.¹, Натегян А.¹, Барадаран Х.Р.¹, Джафари Э.², Азизян Р.², Фарамарзи М.¹

¹ Университет медицинских наук Ирана, Тегеран, Иран

² Тегеранский университет медицинских наук, Тегеран, Иран

Резюме. Вакцины играют критически важную роль в охране общественного здоровья, особенно для детей. Крайне важно активно решать проблемы безопасности для поддержания доверия к вакцинации. Скептицизм вокруг вакцин может иметь существенные неблагоприятные последствия для общего благополучия всего населения, потенциально приводя к тому, что люди отказываются от жизненно важных прививок, тем самым создавая риски для общественного здравоохранения. Следовательно, обеспечение уверенности в безопасности вакцин остается первостепенной задачей. *Материалы и методы.* Настоящее клиническое испытание четвертой фазы было проведено в качестве постмаркетингового исследования (PMS) на здоровых младенцах 2–7 месяцев (N = 539) для оценки иммунитета и безопасности индийской пятивалентной вакцины против дифтерии, столбняка, коклюша, гепатита В и *Haemophilus influenzae* типа b [DTPW-HEPВ-НІВ (PRP-T)/PENTAVAC] в четырех различных центрах в провинции Тегеран. Образцы крови обследованных младенцев были собраны до введения вакцины (возраст 2 месяца) и через 1 месяц после третьей дозы (возраст 7 месяцев) для определения антител против всех антигенов пятивалентной вакцины методом ELISA. *Результаты.* Показано, что уровни серозащиты и защитных антител после трех доз вакцины против антигенов *Haemophilus influenzae* типа b, дифтерии, столбняка, вирус гепатита В и коклюша составили 99,1%, 98,7%, 99,8%, 99,4% и 69,6% соответственно. Статистический анализ показал, что величина P для всех компонентов вакцины была сопоставима (P < 0,001). Пять наиболее распространенных побочных эффектов применения вакцины были представлены в виде умеренной лихорадки (10%), эритемы в месте вакцинации (9,1%), воспаления (4,3%), боли в месте вакцинации (3,3%) и беспокойства (2,6%). *Выводы.* Результаты настоящего исследования продемонстрировали выраженное увеличение уровня антител против всех пяти компонентов вакцины. В свете полученных результатов можно заключить, что вакцина Пентавалент не только эффективна в повышении иммунитета против указанных заболеваний, но и несет минимальный риск побочных эффектов в исследуемой популяции. Приводимые результаты вносят вклад в совокупность доказательств, подтверждающих безопасность и эффективность вакцин, подчеркивая их решающую роль в защите общественного здравоохранения.

Ключевые слова: иммунитет, младенцы, пентавалентная вакцина, уровни антител, побочные эффекты, здоровье детей.

Introduction

Vaccines are usually used for the health of the general public, especially children. Any concerns about efficacy and safety of vaccines should be seriously investigated [3]. If Suspicion about a vaccine may increase, it could create dangerous consequences for everyone's health as some people will avoid vaccination of their children [20]. It is important to evaluate the safety of vaccines, especially in the case of vaccines that have been used in a more limited way and there are fewer reports of their side effects.

Pentavalent vaccine includes Diphtheria, Tetanus, Pertussis, Hepatitis B and *Haemophilus influenzae* type b. This vaccine has entered the national vaccination program for children in Iran since 2014 and is usually given at the ages of 2, 4, and 6 months [9].

Pentavalent vaccination aims to protect infants against five major life threatening diseases, including diphtheria, whooping cough, tetanus, hepatitis B, and *Haemophilus influenzae* [13]. To date, no vaccine has been 100% effective and safe for all individuals and because of the antigen or other substances in the

vaccine some show a reaction to it [22]. Equally in the case of neonatal vaccination, the health promotion of infants should also be considered; therefore it is important to evaluate the efficacy and safety in infants following pentavalent vaccination.

In this study we assessed the immunogenicity and safety of pentavalent vaccine administered at 2, 4, 6 months of age, as well as the possible complications after the injection of the pentavalent vaccine within the first 48 hours, one week and 2 months after injection.

Materials and methods

Study group. Participants for this study included healthy male and female infants aged 2–6 months who were referred to four Health Centers in two districts of Tehran, covered by Iran University of Medical Sciences, who were scheduled to receive routine pentavalent vaccine between July 2, 2018, and February 20, 2019.

Inclusion criteria included the infant's with arm-pit temperature of less than 38.5, and normal clinical

cal examination at the time of vaccination, who were born from a normal pregnancy with a gestational age of 38–42 weeks from a mother seronegative for HBsAg, and received the 2/4/6 months vaccination in the same clinic and were available up to two months after the last vaccination. Infants with the history of transfusion of blood or blood products or use of immunoglobulin since birth, with significant and chronic heart, respiratory, kidney, liver and blood disease, history of any type of allergic disease or any type of sensitivity that may be exacerbated by vaccine components, history of seizures or neurological disorders, congenital or genetic immunodeficiency were excluded. Moreover, the participants who used any type of vaccine or investigational drug except the study vaccine during the study, or received one of the other routine vaccines during the study except BCG and OPV, were also excluded.

Vaccine. The PENTAVAC vaccine [DTPW-HEPB-HIB (PRP-T)] used in this study is manufactured by the Serum Institute of India and contained a combination of: Diphtheria toxoid < 25 Lf (> 30IU), Tetanus toxoid > 2.5 Lf (> 40 IU), *Bordetella pertussis* (whole cell) < 16 OU (> 4.0 IU), HBsAg (rDNA) > 10 µg, Purified capsular Hib polysaccharide (PRP) conjugated to Tetanus Toxoid (carrier protein) 10 µg, < 0.01% Thiomersal as preservative and Al³⁺ content as aluminum phosphate < 1.25 mg.

The pentavalent vaccination was administrated based on the routine national protocol of vaccination and the infants were observed for 30 min after each vaccination for immediate effects and then for 48 hours, one week and 2 months after injection following the vaccination for any complications such as fever ≥ 38.3°C, drowsiness, restlessness, persistent crying, seizure, and anaphylaxis which were registered in the questionnaire form for possible complications by parents.

Serology. For determination of antibodies against all antigens in the pentavalent vaccine, blood samples were collected at 2 months of age (pre-first vaccination) and at 7 months of age (1-month after the third vaccination). The trial was registered with the Trial Registry of Iran (IRCT2016042027498N1), the sampling protocols were approved by the Ethics Committee of Iran University of Medical Sciences, and written consent was obtained from parents/guardians of patients prior to data collection.

Antibody titers were measured by ELISA kits from DeMeditec Diagnostics GmbH (Germany). The seroprotection was considered as immune if antibody concentration were defined as follows: Anti Diphtheria IgG antibody titer of ≥ 0.1 IU/ml, Anti Tetanus IgG antibody titer of ≥ 0.1 IU/ml, Anti Pertussis IgG titer of ≥ 16 IU/ml, Anti HepB IgG antibody titer of ≥ 10 IU/ml, and Anti PRP IgG titer of ≥ 0.15 µg/ml.

Data analysis. The categorical variables were expressed as frequencies, percentages and mean, and

differences in variables were assessed by Fisher's exact test. The data were analyzed using SPSS software version 22. Two-sided P values of less than 0.05 were considered statistically significant.

Results

In the first stage, a total of 658 participants entered the study and received the first dose of vaccination. As some of the parents refused to continue participating in the project due to traveling and changing their place of residence, in the second stage, the number of participants was reduced to 553. Fourteen other samples were discarded due to tube breakage, lack of volume and presence of clots, and eventually the blood samples of 539 infants including 261 girls (48.4%) and 278 boys (51.6%) who participated in both sampling times were included in results. The participant's flowchart is shown in Figure.

Tables 1 and 2 present the immunogenicity data for the pentavalent vaccine. The observed immune responses to each vaccine component considering the cut-off point of ELISA-IgG or the protective antibody showed that the average anti-Bordetella antibody titer in 2- and 7-month-old infants was 9.336±0.411 and 24.380±0.574, respectively, and 69.6% have been immunized against *Bordetella pertussis*. The average anti-*Haemophilus influenzae* antibody in 2-month-olds is 0.490±0.04 and in 7-month-olds it is 5.491±0.169 and 99.1% of 7-month-olds have been immunized against *Haemophilus influenzae* type b after 3 doses of the vaccine. The average anti-diphtheria antibody titer in 2- and 7-month-olds was 0.2420±0.014 and 0.919±0.016, respectively, and after 3 doses of the vaccine 98.7% of 7-month-olds have been immunized against diphtheria. The average level of anti-tetanus antibody in a 2-month-old infant before vaccine injection was 1.127±0.047 and after three doses of vaccine was 3.497±0.078, and 99.8% got immunized against tetanus. The average antibody titer against surface antigen of hepatitis B virus (HBs-Ag) was 40.15±5.137 and 544.67±12.183 in 2 and 7-month-olds, respectively, and 99.4% protection have been achieved against hepatitis B virus. Comparison of the level of the antibodies and side effects of 5 vaccine in boys and girls revealed no significant differences in all 4 medical centers. As indicated in Table 3, inspecting the side effects after receiving each dose of the vaccine, which were monitored 48 hours, one week and two months later in person or by phone, showed mild fever (38–38.9) with 10%, erythema at the vaccination site with 9.1%, inflammation with 4.3%, pain with 3.3% and restlessness with 2.6% were five common vaccine side effects. Complications such as abscess, lymphadenitis, encephalopathy and encephalitis, meningitis, convulsions, drowsiness, anaphylactic shock were not observed in any of the children.

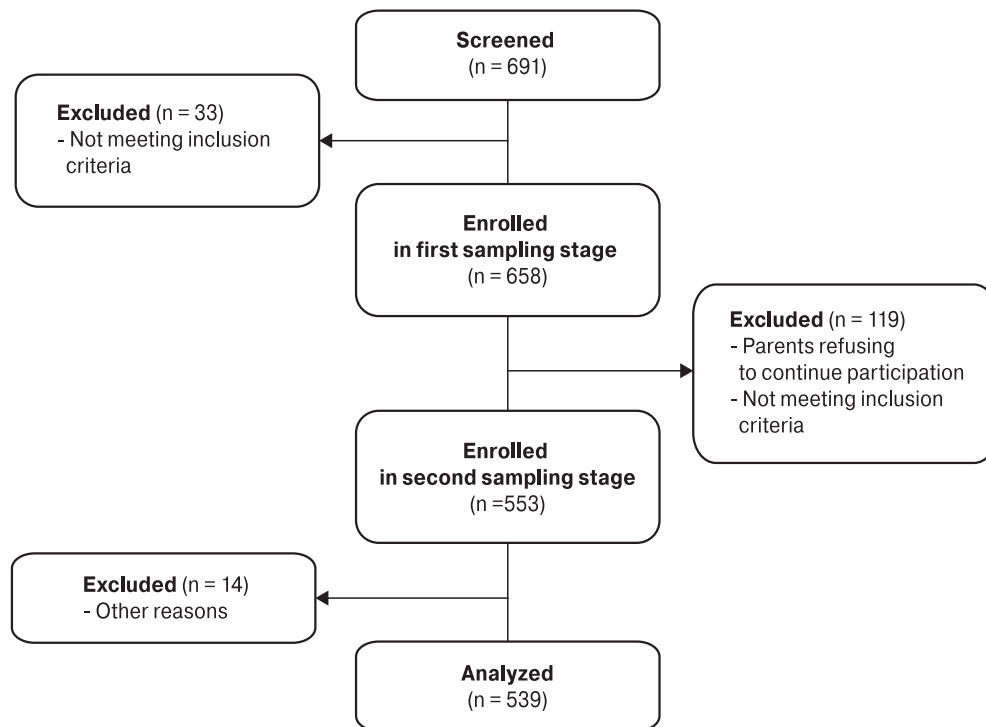


Figure. The participant’s flowchart

Table 1. Antibody titers before (2 months old) and after (7 months old) Immunization

Variables	Before Vaccination, No = 539		After Vaccination, No = 539		p
	Non-Immune N (%)	Immune N (%)	Non-Immune N (%)	Immune N (%)	
Tetanus IgG	< 0.1 IU/ml 36 (6.7)	≥ 0.1 IU/ml 503 (93.3)	< 0.1 IU/ml 1 (0.2)	≥ 0.1 IU/ml 538 (99.8)	< 0.001
HBs Ab IgG	< 10 IU/ml 251 (46.5)	≥ 10 IU/ml 288 (53.4)	< 10 IU/ml 3 (0.6)	≥ 10 IU/ml 536 (99.4)	0.053
Diphtheria IgG	< 0.1 IU/ml 272 (50.5)	≥ 0.1 IU/ml 267 (49.5)	< 0.1 IU/ml 7 (1.3)	≥ 0.1 IU/ml 532 (98.7)	0.008
Hib Anti PRP IgG	< 0.15 ug/ml 175 (32.5)	≥ 0.15 ug/ml 364(67.5)	< 0.15 ug/ml 5 (0.9)	≥ 0.15 ug/ml 534 (99.1)	0.028
Pertussis IgG	< 16 IU/ml 453 (84)	≥ 16 IU/ml 86 (16)	< 16 IU/ml 164 (30.4)	≥ 16 IU/ml 375 (69.6)	< 0.001

Note. HBs: hepatitis B surface antigen; Hib: *Haemophilus influenzae* type b; PRP: polyribosyl ribitol phosphate.

Table 2. Average antibody concentration before (2 months old) and after (7 months old) Immunization

Vaccine components	Immunization state	Mean	Std. Error Mean	p
Hib	Before	0.49027	0.040869	< 0.001
	After	5.49169	0.169185	
HBs	Before	40.15051	5.137379	< 0.001
	After	544.67656	12.183976	
Diphtheria	Before	0.24237	0.014602	< 0.001
	After	0.91907	0.016916	
Tetanus	Before	1.12727	0.047490	< 0.001
	After	3.49705	0.078262	
Bordetella	Before	9.33689	0.411791	< 0.001
	After	24.38097	0.574530	

Note. Hib: *Haemophilus influenzae* type b; HBs: hepatitis B surface antigen.

Table 3. Observed adverse effects associated with pentavalent vaccination

Symptoms	Primary	First Booster	Second Booster	p
Fever	54 (10)	55 (10.2)	37 (6.9)	0.043
Pain	12 (2.2)	18 (3.3)	17 (3.2)	0.461
Erythema	3 (0.6)	10 (9.1)	8 (1.5)	0.128
Inflammation	23 (4.3)	14 (2.6)	8 (1.5)	0.015
Restlessness	8 (1.5)	14 (2.6)	22 (2.4)	0.022
Anorexia	5 (0.9)	2 (0.4)	1 (0.2)	0.197
Allergic symptoms	0	3 (0.6)	0	–
Vomiting	0	0	5 (0.9)	–
Long-term crying	0	1 (0.2)	0	–

Note. Variables are represented by No. (%).

Discussion

There are many benefits for combination vaccines, such as reduced number of injections, patient's discomfort and costs. Whereas the complications

in this context are mainly pain, erythema, fever, restlessness, weakness, vomiting, irritability or sensitivity, diarrhea and unusual crying [23]. In recent years the pentavalent vaccination has been widely used for the prevention of DTP, hepatitis B and Hib [12], and different studies have been conducted to highlight its preventive effect.

Our results showed that one month after the third dose of the Pentavalent vaccine, immunogenicity levels increase significantly and the participants had no serious complications. In the study of Aspinall et al. which evaluated the immunogenicity and safety of Quinvaxem vaccine used in Switzerland, it was found that one month after the injection of the vaccine in 90% of the infants showed increased levels of immunity to all three antigens and the injection of the vaccine had not any complications [1]. Also, in another study in El Salvador, it was found that Quinvaxem vaccine was highly effective in terms of immunogenicity and safety [21].

In this study the protective antibody levels for *Haemophilus influenza* b, diphtheria, tetanus, hepatitis B virus and *Bordetella pertussis* was 99.1%, 98.7%, 99.8%, 99.4% and 69.6%, respectively. In a study conducted in India, which investigated two types of pentavalent vaccines (PENTAVAC and Eastfive), the immunogenicity of both vaccines was 100% for all vaccine components, except *Bordetella pertussis*, which was 95% and 96% for PENTAVAC and Eastfive, respectively [18].

In the study of Roa et al. which was conducted for three types of pentavalent vaccines common in India, the immunogenicity rate obtained for pertussis is 89.94%, 76.60% and 92.39% in Shan5, Easy five and TritanrixHB vaccines, respectively [4]. Although this study showed that the immunogenicity of the pertussis is less immunogenic than other antigens of the pentavalent vaccine, compared to this study, our results indicate lower amounts of anti-pertussis immunogenicity. Not only development of an-

tibody to pertussis is less than other vaccines but also antibody against pertussis wanes overtime. To combat this issue more researches is needed and additional booster doses of vaccine should be used [14, 16].

In this study, 67.5% of 2 months old infants showed protective antibodies against *Haemophilus influenzae* b before receiving the vaccine that has reached to nearly 100% after receiving three doses, which is similar to other studies [6, 10, 15, 19]. Increased levels of antibody before vaccination is due to mothers' immunogenicity levels, which indicates the high prevalence *Haemophilus influenzae* infection in the society, as the mothers had not have a history of receiving *Haemophilus influenzae* vaccine.

In this study, 93.3% of the infants due to maternal immunity were immune against tetanus before vaccination, which increased to 99.8% at the time of second evaluation 1 month after the third dose of the vaccine. Other studies also showed similar results [7, 11]. Our results also showed that 53.4%, 49.5% and 16% of the infants were immune against Hepatitis B virus, Diphtheria and Pertussis before vaccination, respectively, which is similar to the results of other studies [2, 5, 6].

The five most common complications of the vaccine were mild fever, erythema, inflammation, pain and restlessness, which is similar to observations documented in other studies [6, 11, 17]. No complications such as abscess, lymphadenitis, encephalopathy and encephalitis, meningitis, convulsions, drowsiness, anaphylactic shock were observed in any of the children who received the vaccine.

In another study conducted on 1119 children less than one year of age, the side effects of Pentavalent vaccine 48 hours after injection showed 15.8% inflammation, 10.9% erythema, 44.2% pain, 12.6% mild fever, 15.0% decreased appetite, 32.9% irritability, 4.6% nausea and 5.5% continuous crying, and none of the children showed complications such as seizures or encephalopathy [8].

Conclusion

According to the results, this study effectively evaluated the immunogenicity of the PENTAVAC vaccine in infants, demonstrating promising out-

comes. Despite preliminary participant deduction, the analysis became primarily based on samples from 539 cases, revealing significant immune responses to all five vaccine components (diphtheria, tetanus, pertussis, Hib and hepatitis B) with significant immunogenicity levels. Furthermore, the monitoring of vaccine side effects showed that slight fever, erythema, inflammation, pain, and restlessness have been the most commonplace, without any severe complications determined. These findings support the effectiveness and safety of the pentavalent vaccine in infants. Overall, this research offers precious insights for healthcare specialists and policymakers, highlighting the significance of successful vaccination programs for infant health.

Additional information

Ethical clearance. The sampling protocols were approved by the Ethics Committee of Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran (IR.IUMS.REC.1394.26616) and written consent was obtained from parents/guardians of patients prior to data collection.

Conflict of interest. The authors had no financial interest in the vaccine nor were related to the sponsor in any way and declare that there is no conflict of interest to publish the content of this article.

Funding. This work was supported by a research grant from Biosun Pharmed Pharmaceutical Company in Tehran, Iran.

Data availability. The datasets used and/or analyzed during the current study is available from the corresponding author on reasonable request.

Author contributions. HMA contributed to the conception of the work, MF and AN designed the study, MF and RA acquired the data, HRB and EJ analyzed the data, EJ wrote the first draft and prepared the figure, HMA and AN reviewed it critically and HRB edited the work. All authors approved the final version to be published.

Acknowledgements. The authors extend their gratitude to the study participants and staff of Iran University of Medical Sciences, as well as the health authorities and workers in the Ghods and Baharestan districts. Their invaluable contribution enabled the successful completion of this study.

Abbreviations. BCG: bacille Calmette–Guerin; DTP: diphtheria, tetanus toxoids and pertussis Vaccine; ELISA: enzyme-linked immunoassay; HBsAg: hepatitis B surface antigen; HepB: Hepatitis B; Hib: *Haemophilus influenzae* type b; IU: International Units; Lf: Limits of Flocculation; OPV: Oral poliovirus vaccines; OU: Opsonophagocytic Units; PRP: polyribosyl ribitol phosphate; rDNA: recombinant DNA.

References

1. Aspinall S., Traynor D., Bedford P., Hartmann K. Lot-to-lot consistency study of the fully liquid pentavalent DTWp-HepB-Hib vaccine Quinvaxem® demonstrating clinical equivalence, suitability of the vaccine as a booster and concomitant administration with measles vaccine. *Hum. Vaccin. Immunother.*, 2012, vol. 8, no. 8, pp. 1109–1118. doi: 10.4161/hv.21095
2. Bavdekar A., Malshe N., Ravichandran L., Sapru A., Kawade A., Lalwani S., Palkar S., Hanumante N., Gunale B., Kapse D., Chaudhari A. Clinical study of safety and immunogenicity of pentavalent DTP-HB-Hib vaccine administered by disposable-syringe jet injector in India. *Contemp. Clin. Trials Commun.*, 2019, vol. 14: 100321. doi: 10.1016/j.conctc.2019.100321
3. CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Guidelines for maintaining and managing the vaccine cold chain. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.*, 2003, vol. 52, no. 42, pp. 1023–1035.
4. Dutta A.K., Verghese V.P., Pemde H.K., Mathew L.G., Ortiz E. Immunogenicity and safety of a pentavalent diphtheria, tetanus, acellular pertussis, inactivated poliovirus, *Haemophilus influenzae* type B conjugate combination vaccine (Pentaxim) with hepatitis B vaccine. *Indian Pediatr.*, 2009, vol. 46, no. 11, pp. 975–982.
5. Hefele L., Syphan S., Xayavong D., Homsana A., Kleine D., Chanthavilay P., Nouanthong P., Xaydalasouk K., Phathamavong O., Billamay S., Xeuatvongsa A. Seroprotection at different levels of the healthcare system after routine vaccination with diphtheria-tetanus-pertussis whole cell-hepatitis B-haemophilus influenzae type B in Lao People's Democratic Republic. *Clin. Infect. Dis.*, 2019, vol. 69, no. 12, pp. 2136–2144. doi: 10.1093/cid/ciz143
6. Huu T.N., Phuong N.T., Toan N.T., Thang H.V. Immunogenicity and safety of quinvaxem (R)(diphtheria, tetanus, whole-cell pertussis, hepatitis B and haemophilus influenzae type B vaccine) given to vietnamese infants at 2 to 4 months of age. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.*, 2015, vol. 46, no. 4, pp. 753–763
7. Kang J.H., Lee H.J., Kim K.H., Oh S.H., Cha S.H., Lee J., Kim N.H., Eun B.W., Kim C.H., Hong Y.J., Kim H.H. The immunogenicity and safety of a combined DTaP-IPV//Hib vaccine compared with individual DTaP-IPV and Hib (PRP-T) vaccines: a randomized clinical trial in South Korean infants. *J. Korean Med. Sci.*, 2016, vol. 31, no. 9, pp. 1383–1391. doi: 10.3346/jkms.2016.31.9.1383
8. Karami M., Ameri P., Bathaei J., Berangi Z., Pashaei T., Zahiri A., Zahraei S.M., Erfani H., Ponnet K. Adverse events following immunization with pentavalent vaccine: experiences of newly introduced vaccine in Iran. *BMC Immunol.*, 2017, vol. 18, no. 1: 42 doi: 10.1186/s12865-017-0226-8
9. Khazaei Z., Moradi G., Zahraei S.M., Gouya M.M., Goodarzi E., Yaghini F., Roshani D. The comparison of the adverse events of pentavalent vaccine and DPT vaccine in 2–6 months infants in Iran: a national study. *Ann. Glob. Health.*, 2020, vol. 86, no. 1: 11. doi: 10.5334/aogh.2449
10. Kim K.H., Kim C.S., Kim H.M., Kim J.D., Ma S.H., Kim D.H., Hwang P.H., Han J.W., Lee T.J., Kim J.H., Karkada N. Immunogenicity and safety of a combined DTPa-IPV/Hib vaccine administered as a three-dose primary vaccination course in healthy Korean infants: phase III, randomized study. *Hum. Vaccin. Immunother.*, 2019, vol. 15, no. 2, pp. 317–326. doi: 10.1080/21645515.2018.1536588

11. Li Y., Li R.C., Ye Q., Li C., Liu Y.P., Ma X., Li Y., Zhao H., Chen X., Assudani D., Karkada N. Safety, immunogenicity and persistence of immune response to the combined diphtheria, tetanus, acellular pertussis, poliovirus and Haemophilus influenzae type b conjugate vaccine (DTPa-IPV/Hib) administered in Chinese infants. *Hum. Vaccin. Immunother.*, 2017, vol. 13, no. 3, pp. 588–598. doi: 10.1080/21645515.2016.1239670
12. Malik A. Pentavalent vaccine and adverse events following immunization — untangling the misinterpretations. *Indian. J. Pediatr.*, 2014, vol. 81, no. 12, pp. 1353–1357. doi: 10.1007/s12098-013-1322-2
13. Merchant N., Waldrop J. The safety advantages of pentavalent vaccines. *Nurse Pract.*, 2012, vol. 37, no. 4, pp. 48–53. doi: 10.1097/01.NPR.0000412895.12310.9d
14. Noel G., Badmasti F., Nikbin V.S., Zahraei S.M., Madec Y., Tavel D., Ait-Ahmed M., Guiso N., Shahcheraghi F., Taieb F. Transversal sero-epidemiological study of Bordetella pertussis in Tehran, Iran. *PLoS One*, 2020, vol. 15, no. 9: e0238398. doi: 10.1371/journal.pone.0238398
15. Procter S., Audrey S. Employers' views of promoting walking to work: a qualitative study. *Int. J. Behav. Nutr. Phys. Act.*, 2015, vol. 12, no. 12: 1. doi: 10.1186/s12966-015-0174-8
16. Sedighi I., Karimi A., Amanati A. Old disease and new challenges: major obstacles of current strategies in the prevention of pertussis. *Iran. J. Pediatr.*, 2016, vol. 26, no. 4: e5514. doi: 10.5812/ijp.5514
17. Sharafi R., Mortazavi J., Heidarzadeh A. Comparison of complications of pentavalent and DTP vaccination in infants aged 2–6 months in Anzali, Iran. *Iran J. Neonatol.*, 2016, vol. 7, no. 2, pp. 1–6. doi: 10.22038/IJN.2016.7105
18. Sharma H., Yadav S., Lalwani S., Gupta V., Kapre S., Jadhav S., Chakravarty A., Parekh S., Palkar S. A phase III randomized, controlled study to assess the immunogenicity and tolerability of DTPw-HBV-Hib, a liquid pentavalent vaccine in Indian infants. *Vaccine*, 2011, vol. 29, no. 13, pp. 2359–2364. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.01.054
19. Sharma H., Yadav S., Lalwani S., Kapre S., Jadhav S., Parekh S., Palkar S., Ravetkar S., Bahl S., Kumar R., Shewale S. Antibody persistence of two pentavalent DTWP-HB-Hib vaccines to the age of 15–18 months, and response to the booster dose of quadrivalent DTWP-Hib vaccine. *Vaccine*, 2013, vol. 31, no. 3, pp. 444–447. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.11.038
20. Smith P.J., Chu S.Y., Barker L.E. Children who have received no vaccines: who are they and where do they live? *Pediatrics*, 2004, vol. 114, no. 1, pp. 187–195. doi: 10.1542/peds.114.1.187
21. Suárez E., Asturias E.J., Hilbert A.K., Herzog C., Aeberhard U., Spyr C. A fully liquid DTPw-HepB-Hib combination vaccine for booster vaccination of toddlers in El Salvador. *Rev. Panam. Salud. Publica*, 2010, vol. 27, no. 2, pp. 117–124. doi: 10.1590/s1020-49892010000200005
22. WHO (World Health Organization). Vaccine efficacy, effectiveness and protection. 2021. URL: <https://www.who.int/news-room/feature-stories/detail/vaccine-efficacy-effectiveness-and-protection>
23. Zangwill K.M., Wenger J.D., Sutter R.W., Hadler S.C. Recommendations for use of Haemophilus b conjugate vaccines and a combined diphtheria, tetanus, pertussis, and Haemophilus b vaccine: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.*, 1993, vol. 42, no. RR-13, pp. 1–15.

Авторы:

Масуми-Асл Х., врач, магистр здравоохранения, профессор детской инфектологии, кафедра педиатрии, Университет медицинских наук Ирана, Тегеран, Иран;
Натегян А., профессор детской инфектологии, кафедра педиатрии, Университет медицинских наук Ирана, Тегеран, Иран;
Барадаран Х.Р., PhD, профессор кафедры клинической эпидемиологии факультета общественного здравоохранения, Университет медицинских наук Ирана, Тегеран, Иран;
Джафари Э., аспирант (медицинская микробиология), младший научный сотрудник, Центр исследований детских инфекционных заболеваний (PIDRC), Тегеранский университет медицинских наук, Тегеран, Иран;
Азизян Р., аспирант (медицинская микробиология), младший научный сотрудник, Центр исследований детских инфекционных заболеваний (PIDRC), Тегеранский университет медицинских наук, Тегеран, Иран;
Фарамарзи М., магистр медицинской иммунологии, лаборант-исследователь, Университет медицинских наук Ирана, Тегеран, Иран.

Authors:

Masoumi-Asl H., MD, MPH, Professor of Pediatric Infectious Disease, Department of Pediatrics, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran;
Nateghian A., Professor of Pediatric Infectious Disease, Department of Pediatrics, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran;
Baradaran H.R., MD, PhD, Professor of Clinical Epidemiology, Department of Epidemiology, School of Public Health, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran;
Jafari E., PhD Candidate of Medical Microbiology, Junior Researcher, Pediatric Infectious Disease Research Center (PIDRC), Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran;
Azizian R., PhD Candidate of Medical Microbiology, Junior Researcher, Pediatric Infectious Disease Research Center (PIDRC), Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran;
Faramarzi M., MSc of Medical Immunology, Research Assistant, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Поступила в редакцию 28.01.2024
 Отправлена на доработку 01.06.2024
 Принята к печати 13.07.2024

Received 28.01.2024
 Revision received 01.06.2024
 Accepted 13.07.2024

ANTIBODY TITER AFTER ANTI-IDIOTYPE RABIES VACCINATION WITH NANO-CHITOSAN ADJUVANT

S.P.Y. Paryati, S. Ramadhanti, K. Hasan

General Achmad Yani University, Cimahi, Indonesia

Abstract. *Background.* The rabies virus neutralizing antibodies titers is a public health problem in the world, including Indonesia. Rabies is zoonotic and causes death in humans with a case fatality rate of 100%. Anti-idiotypic antibody (Ab2) from chicken immunoglobulin (IgY) can be a substitute antigen for the rabies virus. This research aims to study the potential of rabies vaccine based on anti-idiotypic antibody (Ab2) with nano-chitosan as an adjuvant. *Materials and methods.* The production of Ab2 is derived from purified and characterized chicken immunoglobulins. Nano-chitosan is made from chitosan from shrimp shell waste. Vaccination tests were carried out on rats compared with commercial vaccines as a positive control and physiological solutions as a negative control. The characterization results of IgY Ab2 were IgY rabies with BM ~180 kDa, heavy chains (BM ~60 kDa), and light chains (BM ~30 kDa) of IgY. Nano-chitosan is less than 100 nm in size, can dissolve well, and does not cause side effects in experimental animals. *Results.* The vaccine formula uses a concentration of 0.5%, where the ratio of nano-chitosan and Ab2 is 1:1. The Ab2 concentration used was about 1000 units per mL of the Ab2 suspension. *Conclusion.* This study concludes that anti-idiotypic antibodies dissolved in nano-chitosan adjuvant can induce the formation of antibodies with titers that are not statistically different from the antibody titers induced by commercial rabies vaccines. Nano-chitosan has a potential vaccine adjuvant candidate, safe to use, and can enhance the immunogenicity of an antigen applied subcutaneously. According to the results of this study, it is recommended that post-vaccination antibody titers be measured regularly: for example, every one week for six weeks after vaccination. This measurement determines the time of the peak of the antibody titer so that the time for revaccination can be determined.

Key words: anti-idiotypic, antibody, chicken immunoglobulins, chitosan, rabies, vaccine.

ОЦЕНКА ТИТРА АНТИТЕЛ ПОСЛЕ АНТИИДИОТИПНОЙ ВАКЦИНАЦИИ ПРОТИВ БЕШЕНСТВА С АДЪЮВАНТОМ НАНОХИТОЗОНОМ

Парьяти С.П.Ю., Рамадханти Ш., Хасан Х.

Университет генерала Ахмада Яни, г. Чимахи, Индонезия

Резюме. *Введение.* Бешенство — зоонозная инфекция с летальностью 100%. Антиидиотипические антитела (Ab2) из куриного иммуноглобулина (IgY) могут использоваться в качестве замещающего антигена вируса бешенства. Целью настоящего исследования было изучение потенциала вакцины против бешенства на основе антиидиотипических антител (Ab2) с нанохитозаном в качестве адъюванта, с оценкой уровня титра антител, нейтрализующих вирус бешенства. *Материалы и методы.* Ab2 получают из очищенных куриных иммуноглобулинов. Нанохитозан производится из хитозана панциря креветок. Оценка вакцинации проводилась на крысах в сравнении с коммерческими вакцинами в качестве положительного контроля и физиологическим рас-

Адрес для переписки:

Саю Путу Юни Парьяти
Индонезия, г. Чимахи, Университет генерала Ахмада Яни.
Тел.: +62-22-6656190.
E-mail: yunisayu@yahoo.com

Contacts:

Sayu Putu Yuni Paryati
Indonesia, Cimahi, Universitas Jenderal Achmad Yani.
Phone: +62-22-6656190.
E-mail: yunisayu@yahoo.com

Для цитирования:

Парьяти С.П.Ю., Рамадханти Ш., Хасан Х. Оценка титра антител после антиидиотипной вакцинации против бешенства с адъювантом нанохитозаном // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 4. С. 788–794.
doi: 10.15789/2220-7619-ATA-17564

Citation:

Paryati S.P.Y., Ramadhanti S., Hasan K. Antibody titer after anti-idiotypic rabies vaccination with nano-chitosan adjuvant // Russian Journal of Infection and Immunity = Infeksiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 4, pp. 788–794.
doi: 10.15789/2220-7619-ATA-17564

твором в качестве отрицательного контроля. Характеристики использованной вакцины: IgY Ab2 IgY против антигена бешенства с Mr ~180 kDa, тяжелые цепи (Mr ~60 kDa) и легкие цепи (Mr ~30 kDa) IgY. Нанохитозан имеет размер менее 100 нм, хорошо растворяется и не вызывает побочных эффектов у экспериментальных животных. *Результаты.* Вакцина используется в концентрации 0,5%, где соотношение нанохитозана и Ab2 составляет 1:1, при концентрации Ab2 около 1000 единиц на мл суспензии Ab2. *Выводы.* Настоящее исследование позволяет заключить, что антиидиотипические антитела, растворенные в адъюванте нанохитозана, могут вызывать образование антител с титрами, которые статистически не отличаются от таковых, индуцированных коммерческими вакцинами против бешенства. Нанохитозан является потенциальным кандидатом в качестве адъюванта вакцины, безопасен в использовании и может усиливать иммуногенность антигена при подкожном введении. Согласно результатам данного исследования, титры антител после вакцинации рекомендуется измерять регулярно: например, каждую неделю в течение шести недель после вакцинации, что позволяет определить время пика титра антител для установления времени ревакцинации.

Ключевые слова: антиидиотип, антитело, куриные иммуноглобулины, хитозан, бешенство, вакцина.

Introduction

Rabies is a public health problem in the world, including Indonesia. Rabies causes the death of more than 59 000 people or nearly one death every 9 minutes worldwide. In Indonesia, in the last five years (2015–2019) cases of bites of rabies-transmitting animals were reported to be 404 306 cases with 544 deaths. The incidence of rabies in Indonesia from 2020 to April 2023 was reported to be at an average of 82 634 bite cases per year. However, from January to July 2023, Indonesia witnessed 74 cases of human rabies, which were associated with suspected rabid animals among a total of 66 170 bite cases reported [26].

There were five provinces with the highest fatalities: North Sulawesi, West Kalimantan, South Sulawesi, North Sumatra, and East Nusa Tenggara. The last rabies outbreak in 2019 was reported in West Nusa Tenggara. In 2023, it is worth noting that out of the 34 provinces in Indonesia, only 8 regions are currently free of rabies. Eight free rabies provinces are Riau Islands, Bangka Belitung Islands, DKI Jakarta, Central Java, DI Yogyakarta, East Java, Papua and West Papua [26]. Rabies is zoonotic, meaning that the disease can be transmitted from animals to humans and causes death in humans with a case fatality rate of 100% [5]. There is no effective drug to cure rabies, but rabies can be prevented by vaccination.

Louis Pasteur developed the first rabies vaccine in 1885, which was made using the dried spinal cord of rabbits infected with rabies [10]. However, the presence of nerve tissue in such vaccines can cause post-vaccination neurological reactions such as meningoencephalitis, meningoencephalomyelitis, myelitis, and paralysis [24]. Over time, vaccine production technology has improved, and most rabies vaccines produced worldwide are now cell-culture vaccines. These include human diploid cell vaccine (HDCV), purified Vero cell vaccine (PVRV), and purified chick embryo cell vaccine (PCECV), all of which have elements of animal origin and human serum albumin [23]. As a result, systemic allergic reactions such as swelling and redness can occur [24]. To over-

come this challenge, anti-idiotypic antibodies (Ab2) can be utilized as replacement antigens in making vaccines that are free from viruses and animal components, which can cause side effects [27].

Paryati et al. reported that anti-idiotypic antibodies derived from chicken immunoglobulins could be used as a substitute antigen for the rabies virus in the vaccination process. Furthermore, diagnostic kits have been successfully prepared using anti-idiotypic antibodies as a substitute for antigens; therefore, it is hoped that serological examinations can be carried out without harmful infectious substances [17].

Rabies vaccination trials using anti-idiotypic antibodies carried out on rabbits and dogs showed a protective immune response against rabies with an antibody titer higher than 0.5 IU/mL serum. Still, this titer was much lower when compared with the immune response that occurred in the viral vaccine [16]. This more inadequate immune response is probably due to the smaller antigen size; therefore, it is necessary to increase the size, such as adding adjuvants.

Adjuvants are immunostimulants in one or more compounds commonly added to vaccines to increase the immune response. At least 30 different adjuvant formulas are being developed commercially and some seem to show promise for wider clinical use [19]. Adjuvants are frequently utilized when the body quickly neutralizes the antigen or is incapable of responding to antibody production. The use of adjuvants can increase the titer two times higher than without adjuvant [6]. Adjuvant use can also reduce the dose of antigen required in response to antibodies. In addition, adjuvants can balance the response of humoral and cell-mediated antibodies [12].

Chitosan from shrimp shell waste can be a candidate for adjuvant. Chitosan is non-toxic, easy to synthesize, safe to use, and able to induce an immune response by activating macrophages [3]. The administration of chitosan by inhalation and orally has been carried out and produces good effects. To date, there have been no reports on the use of intravenous chitosan. Biologically, chitosan can form a protective layer and can be properly absorbed by the body. Chitosan has a structure similar to glu-

cosamine in the extracellular matrix [17]. Chitosan can be made in nanoparticles, which can be used for drug and vaccine delivery through inhalation, orally, intravenously, and as a vector for nonviral gene delivery.

Chitosan has unit characteristics as a polymer, which is mucoadhesive or can adhere to mucosal surfaces [14]. This mucoadhesive characteristic is due to the ionic interaction between the quaternary ammonium group of chitosan and the negatively charged mucus. When attached to the mucosal surface of chitosan, it can temporarily open tight junctions between glycoprotein epithelial cells, namely, anionic sialic acid. This temporary opening allows a longer time for drug interaction and transport into the cell [3]. The process of inserting nanoparticles into cells is through a mechanism called pinocytosis. The mechanism starts with the attachment of chitosan nanoparticles to the cell. Chitosan administration can be degraded *in vivo* by lysozyme and glucosaminidase in animal cells [8].

Chitosan can modulate the maturation of dendritic cells to induce interferon interactions and stimulate the increased activity of T lymphocytes and B lymphocytes. This process occurs due to cGAS-STING cytoplasmic DNA sensors, which cause activity in dendritic cells. This process depends on the presence or absence of cytoplasmic DNA [13]. If chitosan can cause an increase in the activity of T lymphocytes and B lymphocytes, it is hoped that it can increase the rabies virus neutralizing antibodies titers. To date, only aluminum hydroxide adjuvant has been widely used in rabies vaccines. Other types of adjuvants such as immunostimulating complexes and Freud's adjuvant also have disadvantages because they are quite expensive and cause an inflammatory response in experimental animals. Nano-chitosan has the potential as an adjuvant that can increase immune response at an economical price. This research aims to study the potential of rabies vaccine based on anti-idiotypic antibody (Ab2) with nano-chitosan as an adjuvant.

Materials and methods

Vaccine preparation. Before vaccination, pure anti-idiotypic antibodies (Ab2) with characteristics of Ab2 ~180 kDa molecular weight, ~60 kDa heavy chains, and ~30 kDa light chains [15] and chitosan nanoparticles measuring less than 100 nm were prepared. Anti-idiotypic antibodies with a concentration of 1000 mg/mL were mixed with a 0.5% concentration of nano-chitosan in a ratio of 1:1, made sufficiently.

Vaccination procedure in rats. A total of 27 rats were randomly divided into three groups, each group consisting of nine rats. Group 1, as a negative control group, was injected with 0.5 mL of physiological NaCl. Group 2 was injected with a mixture of 0.5 mL

of anti-idiotypic rabies antibody and 0.5 mL of nano-chitosan adjuvant. Group 3 was injected with 0.5 mL of commercial rabies vaccine (Nobivac rabies). The commercial vaccine used is an inactivated virus vaccine which is used to vaccinate dogs with a dose adjusted to the rat's body weight. All the groups of rats were injected three times on days 0, 7, and 14. Vaccination was carried out subcutaneously in areas of loose skin tissue: for example, at the nape [25].

The treatment procedure for experimental animals received ethical clearance from the Health Research Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Padjadjaran University, with ethical approval No. 1114/UN6.C.10/PN/2017.

The aspect of using experimental animals in this research is to pay attention to the welfare of experimental animals, based on the Declaration of Helsinki by the World Medical Association in 1964, revised in 1975 in Tokyo, and the International Guiding Principles of Biomedical Research Involving Animals by the Council for the International Organization of Medical Sciences and WHO in 1985 with the basic principles of 3R (Replacement, Reduction, and Refinement).

This research was carried out by determining the minimum sample limit using the Federer formula, so that the average in 1 group consisted of 9 animals. After an acclimatization period of 7 days before treatment, the rats were placed in cages measuring 30 × 50 × 30 cm at a room temperature of ±26°C, proper lighting and ventilation, and the cages were ensured to be cleaned so that the rats could still move and carry out their natural behavior and were given food and drink bottles. The rats were given rat food according to the rat's body weight, 20–25 grams/day, and given drinking water of 10 mL/100 grBB/day *ad libitum*. To reduce pain during blood collection, anesthetics, and analgesics are given to experimental animals according to the Formulary of Laboratory Animals guidelines. After the research is complete, the rats will be euthanized using the carbon monoxide gas inhalation technique following the American Veterinary Medical Association (AVMA) guidelines [2, 4, 9, 11].

Antibodies titer examination. Two weeks following the last dose of vaccine, rat blood was obtained. For four weeks, it was collected once a week. A micropipette was used to draw blood from the retro-orbital plexus. Serum was separated from other blood components to be tested for rabies virus neutralizing antibodies titers. This examination was performed using the agar gel precipitation test (AGPT) method. AGPT composition consists of 0.8 g of agarose, 2.4 g of PEG, 40 mL of aquadest, and 40 mL of phosphate-buffered saline with a pH of 7.4. The ingredients were mixed and heated to a boil and allowed to stand for 5–10 minutes. Then, the AGPT medium was poured as much as 3 mL into a 6-cm-diameter petri dish until it became solid. It was next placed in a refrigerator at

8°C. After chilling, a well was made for rabies virus antigen and six well for blood serum of rats surrounding the antigen, as seen in Figure (see cover III).

The determination of antibody titer is based on the formation of precipitation in the form of a white line (positive result) between the antigen and serum with a specific dilution. A log₂ serial dilution was carried out in this study starting from 2⁰, 2¹, 2², 2³, 2⁴, and 2⁵. If no precipitation line was formed on the AGPT test or a negative result, the antibody titer was considered zero or absent.

The limitation of this study is that the measurement of antibody titer is still using the semiquantitative method (AGPT). This test is less sensitive; hence, false-negative observations are possible.

Statistical analysis. The study commenced with data processing using the Shapiro–Wilk Test, which is generally employed for samples less than or equal to 50. The results of the normality test with the Shapiro–Wilk Test indicated that the data is abnormally distributed, as the obtained p-value was less than 0.05. Therefore, the Kruskal–Wallis Test, a non-parametric statistical test, was utilized. Additionally, the Mann–Whitney test was conducted to identify the group that had a more significant impact on increasing antibody titers. This test involved the comparison of serum rats antibody titers in a positive control group immunized with commercial rabies vaccine with a treatment group immunized with anti-idiotypic antibody vaccine and the addition of chitosan nano adjuvants.

Results

Vaccination in rats. Observations of the three groups of vaccinated rats showed that all the rats looked healthy. Their appetites did not change with normal behavior during the treatment period up to 6 weeks after vaccination. The rats' body weight increased normally. In group 2 vaccinated with anti-idiotypic antibodies with the addition of a nano-chitosan adjuvant, there was no change in the skin tissue of rats at the subcutaneous injection site.

Antibodies titer examination. The results of antibody examination in rat serum since the second week after vaccination using the AGPT method are shown in Figure (see cover III). A positive reaction indicates the presence of antibodies against rabies, demonstrated by the presence of a white precipitation line between the antigen and serum.

In Table 1, the antibody titer is shown based on the formation of a precipitation line in AGPT. Based on Table 1, there are differences in antibody titers in each treatment group. The highest antibody titer was obtained in the group of rats vaccinated with the commercial rabies vaccine, followed by the group of rats immunized with anti-idiotypic antibodies with nano-chitosan adjuvant and the negative control group.

Table 1. Rabies antibody levels based on AGPT examination

Sample (N = 9)	Positive control (log2)	Negative control (log2)	Ab2 + nano-chitosan (log2)
1	0	0	1
2	2	0	0
3	0	0	1
4	1	0	0
5	0	0	1
6	1	0	0
7	0	0	0
8	2	0	1
9	1	0	0
Mean	0.7778	0.0000	0.4444

Statistical analysis. The statistical tests carried out using the Kruskal–Wallis Test indicate that the use of anti-idiotypic rabies serum antibody vaccine along with nano chitosan adjuvant had a significant effect on raising rats serum antibody titers. The calculated p-value was found to be 0.032 (p ≤ 0.05), which indicates a statistically significant result. The relevant data regarding the Kruskal–Wallis Test results have been presented in Table 2.

Additionally, the Mann–Whitney test was used to determine the group that had the most significant impact on increasing antibody titers. The re-

Table 2. Kruskal–Wallis test for the variety of rabies virus neutralizing antibodies titers based on the AGPT method

Antibody titers	N	Mean Rank	Kruskal–Wallis H	df	Sig
Positive Control	9	17.44	6.912	2	
Negative Control	9	9.50			0.032*
Ab2+nano-chitosan	9	15.06			
Total	27				

Note. *p < 0.05: there is a significant difference between groups.

Table 3. The Mann–Whitney test of rabies virus neutralizing antibodies titers between groups

	Treatment group	N	Mean Rank	Sum of Rank	Sig.
Antibody titer	Positive Control	9	12.00	108.00	0.021*
	Negative Control	9	7.00	63.00	
Antibody titer	Positive Control	9	10.44	94.00	0.406
	Ab2+nano-chitosan	9	8,56	77.00	
Antibody titer	Ab2+nano-chitosan	9	11.50	103.50	0.0288*
	Negative Control	9	7.50	67.50	

Note. *p-value < 0.05: there were significant differences between groups.

sults of the Mann–Whitney Test have been presented in Table 3, which shows a significantly higher antibody titer ($p < 0.05$) in the commercial vaccine group than in the negative control group. The group of rats that received anti-idiotypic antibody vaccine (Ab2) with the addition of nano-chitosan adjuvant showed a higher antibody titer than the control group ($p < 0.05$). Although the commercial vaccine group obtained the highest antibody titer, it was not significantly different ($p > 0.05$) from the antibody titer of the group of rats given anti-idiotypic antibody vaccine (Ab2) with the addition of nano-chitosan adjuvant. The group of rats given anti-idiotypic antibody vaccine (Ab2) with the addition of nano-chitosan adjuvant showed a higher antibody titer than the control group ($p < 0.05$).

Discussion

Observations in the vaccinated rats showed no physical changes, and the rats gained normal body weight. This condition indicates that there is no treatment effect on the physical health and behavior of experimental animals. The skin area where the injection was given did not show any changes, and there was no inflammation or signs of allergy, indicating that the vaccine given was safe and had no adverse effects.

In accordance with Figure on the results of the AGPT test, it shows a homologous reaction between rat antibody and rabies virus antigen, which is indicated by the presence of a precipitation line. These figures indicate that anti-idiotypic (Ab2) antibodies can induce the formation of antibodies in rat that can recognize and bind homologously to the rabies virus. The AGPT test is a serological test with the appropriate antigen deposition technique for antibodies. The AGPT test is semiquantitative and less sensitive. A low antibody titer will be difficult to visually observed because it does not produce a clear line of precipitation.

Roitt and Delves stated that precipitation is a secondary reaction due to the primary interaction between specific antigens and antibodies [21]. Specific antigen-antibody interactions entail various noncovalent interactions between the antigen determinant, the antigen epitope, and the hypervariable regions of the antibody molecule [20].

The specific reaction between rats serum and anti-idiotypic antibodies indicates that the rats serum has formed antibodies similar to or similar to rabies antibodies and can bind specifically with the original antigen [22]. It suggested that the anti-idiotypic antibody contains an internal image that can induce a specific antibody against the original antigen. Anti-idiotypic antibody vaccines can mimic the structure of the antigen so that it can be used as an immunogen.

Macrophages will phagocytose the antigen, but the process of antigen destruction in the macrophag-

es is slowed down due to the addition of adjuvants. The antigen is gradually released to prolong exposure to antigens and the immune response and can intervene in selective immune systems: for example, T cells and B cells. Furthermore, antigens phagocytized by macrophages will be exposed to T lymphocytes via the major histocompatibility molecules complex class II [22]. The introduction of antigens by the presenter cells causes T lymphocytes to be activated, which triggers the process of active proliferation and differentiation from other T lymphocytes in lymphoid tissue [20].

Other T lymphocytes are activated and secrete protein mediators called cytokines. Cytokines act on other cells of the immune system. The cytokines secreted by T lymphocytes include IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, and other factors that play a role in the response of B lymphocytes. Activated B lymphocytes then proliferate and differentiate into mature plasma cells and produce antibodies that are rapidly secreted into lymph fluid and transported into the blood circulation [18, 19].

Table 1 shows that there are differences in antibody titers between treatment groups. The highest antibody titer was obtained from a group of rats vaccinated using an anti-idiotypic antibody vaccine mixed with a nano-chitosan adjuvant. Chitosan has unit characteristics as a polymer, which is mucoadhesive or can adhere to mucosal surfaces. The characteristic of this adhesive mucus is due to the ionic interaction between the quaternary ammonium group of chitosan and the negatively charged mucus. When attached to the mucosal surface, chitosan can temporarily open tight junctions between epithelial glycoprotein cells, namely, anionic sialic acid. This temporary opening allows a longer time for drug interaction and transport into the cell [1].

Chitosan can modulate dendritic cell maturation to induce interferon interactions and stimulate increased activity of T lymphocytes and B lymphocytes. This process occurs due to cGAS-STING cytoplasmic DNA sensors, which cause activity in dendritic cells. This process depends on the presence or absence of cytoplasmic DNA. Because chitosan can increase the activity of T lymphocytes and B lymphocytes, it is hoped that it can increase the rabies virus neutralizing antibodies titers [8]. The addition of nano-chitosan adjuvant can increase growth stimulation and antibody formation by B lymphocytes so that antibody levels can increase rapidly in the body.

Conclusion

This study concludes that anti-idiotypic antibodies dissolved in nano-chitosan adjuvant can induce the formation of antibodies with titers that are not statistically different from the antibody titers induced by commercial rabies vaccines. Nano-chitosan has a potential vaccine adjuvant candidate, safe to use,

and can enhance the immunogenicity of an antigen applied subcutaneously.

According to the results of this study, it is recommended that post-vaccination antibody titers be measured regularly: for example, every one week for six weeks after vaccination. This measurement determines the time of the peak of the antibody titer so that the time for revaccination can be determined. To enhance the precision of antibody titer measurements, it is advisable to employ more sensitive assays, such as the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

The use of nano chitosan as an adjuvant in the concept of rabies vaccination based on anti-idiotypic an-

tibodies is worth considering because it can increase antibody titers and is safe for humans. Nevertheless, additional research is necessary to fully understand the scope of its efficacy and safety.

Additional information

Availability of data and materials. The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Funding. This research was funded by Universitas Jenderal Achmad Yani competitive grant in 2020.

Conflict of interest. The authors declare that they have no competing nor financial interests.

References

1. Abbas A.K., Lichtman A.H., Pillai S. Basic immunology: functions and disorders of the immune system. *St. Louis, Missouri: Elsevier Science Pub Co*, 2016. URL: https://archive.org/details/basicimmunologyf0000abba_w9e9
2. American Veterinary Medical Association. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals. 2013. URL: <https://www.avma.org/resources-tools/avma-policies/avma-guidelines-euthanasia-animals>
3. Amri Y., Fajri R., Novitasari P., Zulfajri M. The effect of tripolyphosphate (tpp) volumes on the synthesis of chitosan nanoparticles using ionic gelation method. *Proceedings of the 2nd International Conference on Science, Technology, and Modern Society (ICSTMS 2020)*, 2021, vol. 576, pp. 213–216. doi: 10.2991/assehr.k.210909.048
4. National Research Council. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition. *Washington, DC: The National Academies Press*, 2011. doi: 10.17226/12910
5. Data and Information Center of the Ministry of Health of the Republic of Indonesia. Rabies situation and analysis in 2014. *Jakarta: Ministry of Health of the Republic of Indonesia*, 2014. URL: https://p2pm.kemkes.go.id/storage/publikasi/media/file_1619049298.pdf
6. De Jong J.C., Palache A.M., Beyer W.E.P., Rimmelzwaan G.F., Boon A.C.M., Osterhaus A.D.M.E. Haemagglutination-inhibiting antibody to influenza virus. *Dev. Biol. (Basel)*, 2003, vol. 115, pp. 63–73.
7. Doan C.T., Tran T.N., Nguyen V.B., Nguyen A.D., Wang S.-L. Production of a thermostable chitosanase from shrimp heads via *Paenibacillus mucilaginosus* TKU032 conversion and its application in the preparation of bioactive chitosan oligosaccharides chien. *Mar. Drugs*, 2019, vol. 17, no. 4: 217. doi: 10.3390/md17040217
8. Dzung N.A. Chitosan and chitosan derivatives as potential adjuvants for influenza vaccine. In: *Chitin and chitosan derivatives: Advances in drug discovery and developments*. Ed. Kim S.K. *Boca Raton: CRC Taylors & Francis*, 2014, pp. 481–492. doi: 10.1201/b15636
9. European Commission: Directorate-General for Environment. Caring for animals aiming for better science — Directive 2010/63/EU on protection of animals used for scientific purposes: Animal welfare bodies and national committees, 2018. URL: <https://data.europa.eu/doi/10.2779/059998>
10. Fisher C.R., Schnell M.J. New developments in rabies vaccination. *Rev. Sci. Tech.*, 2018, vol. 37, no. 2, pp. 657–672. doi: 10.20506/rst.37.2.2831
11. Holley T., Bowe G., Campia I., Belz S., Berggren E., Janusch Roi A., Wittwehr C., Whelan M. European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing: Dataset Collection, 2017. URL: https://joint-research-centre.ec.europa.eu/eu-reference-laboratory-alternatives-animal-testing-eurl-ecvam_en
12. Hunter R.L. Overview of vaccine adjuvants: present and future. *Vaccine*, 2002, vol. 20, no. 3, pp. 7–12. doi: 10.1016/s0264-410x(02)00164-0
13. Li X., Dong W., Nalin A.P., Wang Y., Pan P., Xu B. The natural product chitosan enhances the anti-tumor activity of natural killer cells by activating dendritic cells. *Oncoimmunology*, 2018, vol. 7, no. 6: e1431085. doi: 10.1080/2162402X.2018.1431085
14. Mursal I.L.P., Warsito A.M.P., Ariyanti D.K., Susanti E., Irma R. Use of chitosan nanoparticles as new drug delivery. *Journal of Pharmaceutical and Sciences*, 2023, vol. 6, no. 2, pp. 804–809. doi: 10.36490/journal-jps.com.v6i2.136
15. Paryati S.P.Y., Hasan K., Nawangsih E.N., Inayati I., Rakhmat. Purification and characterization of rabies anti-idiotypic antibodies isolated purification and characterization of rabies anti-idiotypic antibodies isolated from chicken egg yolks. *Int. J. Pharm. Res.*, 2020, vol. 12, no. 3, pp. 1629–1634. doi: 10.31838/ijpr/2020.12.03.223
16. Paryati S.P.Y., Nawangsih E.N., Inayati I., Rakhmat. Preparation of anti-idiotypic antibody as diagnostic kit in rabies serological test. *4th Syiah Kuala University Annual International Conference 2014; Banda Aceh, Indonesia*, 2014, pp. 138–143. URL: <https://www.neliti.com/publications/174146/preparation-of-anti-idiotypic-antibody-as-diagnostic-kit-in-rabies-serological-te>
17. Paryati S.P.Y., Wibawan I.W.T., Soejoedono R.D., Pasaribu F.H. Chicken immunoglobulin as an anti-idiotypic antibody against rabies (Imunoglobulin ayam sebagai antibodi anti-idiotipe terhadap rabies). *J. Vet.*, 2006, vol. 7, no. 3, pp. 92–103.
18. Pasquale A.D., Preiss S., Silva F.T.D., Garçon N. Vaccine adjuvants: from 1920 to 2015 and beyond. *Vaccines (Basel)*, 2015, vol. 3, no. 2, pp. 320–343. doi: 10.3390/vaccines3020320
19. Petrovsky N., Aguilar J.C. Vaccine adjuvants: current state and future trends. *Immunol. Cell. Biol.*, 2004, vol. 82, no. 5, pp. 488–496. doi: 10.1111/j.0818-9641.2004.01272.x
20. Roitt I.M., Brostoff J., Male D.K. Immunology 3rd ed. London: Mosby-Year Book Europe Ltd. 2003. URL: https://books.google.co.id/books/about/Immunology.html?id=a6tpAAAAMAAJ&redir_esc=y

21. Roitt I.M., Delves P.J. Roitt's essential immunology. UK: Blackwell Science Ltd. 2001. URL: [https://dl.mehrsys.ir/pdf-books/Roitt_s%20Essential%20Immunology%20Thirteenth%20Edition\(www.myuptodate.com\).pdf](https://dl.mehrsys.ir/pdf-books/Roitt_s%20Essential%20Immunology%20Thirteenth%20Edition(www.myuptodate.com).pdf)
22. Saha A., Chatterjee S.K., Foon K.A., Primus F.J., Sreedharan S., Mohanty K. Dendritic cells pulsed with an anti-idiotypic antibody mimicking Carcinoembryonic Antigen (CEA) can reverse immunological tolerance to CEA and induce antitumor immunity in CEA transgenic mice. *Cancer Res.*, 2004, vol. 64, no. 14, pp. 4995–5003. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0626
23. Toovey S. Preventing rabies with the Verorab vaccine: 1985–2005 Twenty years of clinical experience. *Travel Med. Infect. Dis.*, 2007, vol. 5, no. 6, pp. 327–348. doi: 10.1016/j.tmaid.2007.07.004.
24. WHO. Rabies vaccines. 2002. URL: <https://www.who.int/publications/i/item/who-wer7714>
25. WHO. Rabies. 2024. URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/rabies>
26. WHO. Rabies outbreak response: Accelerating a One Health approach in East Nusa Tenggara. 2023. URL: <https://www.who.int/indonesia/news/detail/18-10-2023-rabies-outbreak-response--accelerating-a-one-health-approach-in-east-nusa-tenggara>
27. Zhou E.M., Fischer M.M.D., Rector E.S., Schon A.H., Kasil F.T. A murine monoclonal anti-idiotypic antibody detects a common idiotope on human, mouse and rabbit antibodies to allergen lol p IV. *Scand. J. Immunol.*, 1991, vol. 34, pp. 307–316. doi: 10.1111/j.1365-3083.1991.tb01551.x

Авторы:

Парьяти С.П.Ю., доктор ветеринарной медицины, преподаватель медицинского факультета Университета генерала Ахмада Яни, г. Чимахи, Индонезия;

Рамадханти Ш., доктор медицины, выпускник медицинского факультета Университета генерала Ахмада Яни, г. Чимахи, Индонезия

Хасан Х., PhD по белковой инженерии, преподаватель кафедры биохимии медицинского факультета Университета генерала Ахмада Яни, Чимахи, Индонезия.

Authors:

Paryati S.P.Y., Doctor of Veterinary Medicine, Lecturer at the Faculty of Medicine, General Achmad Yani University, Cimahi, Indonesia;

Ramadhanti S., Doctor of Medicine, Graduate of the Faculty of Medicine, General Achmad Yani University, Cimahi, Indonesia;

Hasan K., PhD of Protein Engineering, Lecturer at the Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, General Achmad Yani University, Cimahi, Indonesia.

Поступила в редакцию 03.01.2024
Отправлена на доработку 13.04.2024
Принята к печати 16.05.2024

Received 03.01.2024
Revision received 13.04.2024
Accepted 16.05.2024

ХАРАКТЕРИСТИКА БЕЛКОВОГО ПРОФИЛЯ ВИЧ У ПАЦИЕНТОВ С ВПЕРВЫЕ ВЫЯВЛЕННОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

В.С. Давыденко¹, Ю.В. Останкова¹, А.Н. Щемелев¹, Е.Н. Серикова¹, 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 МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Эпидемия ВИЧ-инфекции остается одной из крупнейших в мире. Для диагностики данного заболевания разработан большой ряд методик, однако наиболее распространенным методом остается Вестерн-блот. Данный метод, основанный на определении специфических вирусных белков, позволяет оценить протекающие вирусные процессы. Несмотря на дискуссии относительно критериев положительного результата и выбора минимального набора вирусных белков для достоверной интерпретации полученных результатов, количество исследований белковых профилей ВИЧ-пациентов различных групп остается недостаточным, особенно в контексте Российской Федерации. Цель работы заключалась в оценке частот встречаемости вирусных белков ВИЧ у группы пациентов с впервые выявленной инфекцией. Материалом служили 2566 образцов сыворотки крови, поступивших от лиц с впервые выявленной инфекцией, для референсного анализа на ВИЧ. Осуществляли анализ методами ИФА и ИХЛА с последующим иммуноблоттингом. В дальнейшем для оценки жизненного цикла вируса и преобладания его отдельных стадий анализировали следующие вирусные белки: gp160, gp120, gp41, p55, p40, p24, p17, p66, p51, p31. Референсным белком для сравнения был выбран gp110/120 в связи с наименьшей частотой встречаемости среди группы продуктов гена *env* — 96,06%. Обнаружена достоверно сниженная частота встречаемости следующих белков различных групп: группы GAG — p55 (80,91%), p40 (72,14%), нуклеокапсида p18/17 (67,37%); группы POL — p68/66 (89,57%), p52/51 (81,91%), p34/31 (86,02%). Показаны достоверные отличия частот вирусных белков между возрастными группами, в том числе в зависимости от пола. Представлены гипотезы, интерпретирующие полученные данные. Сопоставление профиля антител к вирусным белкам с течением инфекционного процесса и состоянием пациента позволит обнаружить закономерности и принимать необходимые меры по оперативной диагностике с расширенными результатами, такими как срок инфицирования, вирусная нагрузка и тяжесть течения.

Ключевые слова: вирус иммунодефицита человека, вестерн-блот, белковый профиль, частоты встречаемости профиля, *env*, *pol*, *gag*.

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:

Давыденко В.С., Останкова Ю.В., Щемелев А.Н., Серикова Е.Н., Тотолян А.А. Характеристика белкового профиля ВИЧ у пациентов с впервые выявленной инфекцией // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 4. С. 795–808. doi: 10.15789/2220-7619-HPP-17668

Citation:

Davydenko V.S., Ostankova Yu.V., Shchemelev A.N., Serikova E.N., Totolian A.A. HIV protein profile characteristics in patients with first-time detected infection // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 4, pp. 795–808. doi: 10.15789/2220-7619-HPP-17668

HIV PROTEIN PROFILE CHARACTERISTICS IN PATIENTS WITH FIRST-TIME DETECTED INFECTIONDavydenko V.S.^a, Ostankova Yu.V.^a, Shchemelev A.N.^a, Serikova E.N.^a, Totolian A.A.^{a,b}^a St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation^b I. Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. The HIV-infection continues to be one of the most large-scale epidemics worldwide. Many techniques have been developed to detect this disease, but the Western blot based on the identification of specific viral proteins remains the most commonly used method that allows to monitor ongoing viral processes. Despite discussions regarding the criteria for a positive test assessment and selection of a minimum number of viral proteins to reliably interpret the data, a very few studies on the protein profiles in HIV-infected patients, particularly in the Russian Federation are available. The aim of this study was to assess the prevalence of HIV viral proteins in a group of people with newly diagnosed infections analyzing 2566 blood samples from individuals with newly diagnosed HIV infection for reference testing. The samples were assessed using ELISA and IHL techniques, followed by western blotting. Subsequently, the following viral proteins were analyzed to assess HIV life cycle and the predominance of its different stages: gp160, gp120, gp41, p55, p40, p24, p17, p66, p51, and p31. For comparison, gp110/120 was chosen as the reference protein due to its lowest prevalence frequency among all *env* gene products comprising 96.06%. A significantly reduced prevalence frequency was found for several protein groups: GAG — p55 (80.91%), p40 (72.14%), nucleocapsid p18/17 (67.37%); POL proteins — p68/66 (89.57%), p52/51 (81.91%), p34/31 (86.02%). Significant differences in frequency of viral proteins between age and sex groups are shown. Hypotheses explaining the obtained data are presented. By aligning anti-viral protein antibody profile with the course of the infection and patient's condition, it will be possible to identify patterns and take necessary measures for early diagnostics with extended results, such as duration of the infection, viral load, and disease severity.

Key words: Human immunodeficiency virus, Western blot, protein profile, profile frequencies, *env*, *pol*, *gag*.

Введение

Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), как и инфекция им вызываемая, остается важнейшей проблемой современного человечества, над поиском решения которой бьется множество людей в медицинских и биологических сферах. По данным на 2022 г. в мире насчитывалось от 33,1 млн до 45,7 млн человек с диагнозом ВИЧ-инфекция, среди которых число новых случаев заражения составило около 1,3 млн [17]. Распространенность инфекции в разных регионах мира неравномерна, наибольшая представленность наблюдается в странах Африки. При этом в высокоэндемичных регионах встречаемость ВИЧ в группах риска может оказаться ниже, чем среди условно здоровых лиц или в ключевых группах населения, что связано с социально-культурным взаимопроникновением этих групп. Так, например, в Гвинейской Республике РНК ВИЧ выявили у 4,05% медицинских работников [28] и у 11,11% условно здоровых беременных женщин [1].

По данным государственного доклада на 2022 г. в Российской Федерации показатель заболеваемости ВИЧ-инфекции составил 43,29 на 100 тыс. населения, но в отдельных регионах, таких как Красноярский край, данный показатель был вдвое выше [4]. Особенно высока распространенность ВИЧ в группах риска. Так, например, частота РНК вируса у лиц из пенитенциарных учреждений составляет 23,19% [1]. И хотя по статистике за последние 2 года показано сокращение новых случаев инфициро-

вания, исследователи связывают данное понижение с сократившимся объемом обследований со стороны медицинских работников и сниженной обращаемостью пациентов в период коронавирусной инфекции COVID-19 [6]. Оценка истинного числа инфицированных в Российской Федерации затруднена рядом причин, во многом взаимосвязанных. Среди них угроза распространения ВИЧ не рассматривается как непосредственная, в лучшем случае воспринимается как потенциальная; основным источником информации служат сведения, почерпнутые из СМИ, формирующие общественное мнение и не являющиеся четко сформулированными и устоявшимися; существующие программы, связанные с ВИЧ, носят спорадический и эпизодический характер: периодическая диспансеризация с необязательной сдачей тестов на ВИЧ [7]. В последнее время пристальное внимание уделяется проблеме лекарственной устойчивости ВИЧ к препаратам антиретровирусной терапии и растущей распространенности фармакорезистентных штаммов. У 72,05% лиц с ВИЧ-инфекцией, направленных для диагностического уточнения статуса лекарственной устойчивости из СЗФО, наблюдалась минимум одна значимая мутация лекарственной устойчивости [29].

ВИЧ представляет собой РНК-содержащий вирус, геном которого кодирует по крайней мере 15 белков, осуществляющих структурные, ферментативную и регуляторные функции [15]. Жизненный цикл ВИЧ можно разделить на 11 стадий с участием отдельных вирусных бел-

ков — проникновение вируса в клетку с непосредственным участием белков gp120 и gp41, кодируемых геном *env*, который также ответствен за тропизм ВИЧ [5]; этап обратной транскрипции, реализуемый вирусным ферментом обратной транскриптазой, сформированным белками p68/66 и p52/51; этапы вскрытия оболочки и проникновения в ядро с участием вирусного белка p24; интеграция провируса в ДНК клетки посредством интегразы, формируемой белком p31; транскрипция ДНК в РНК, в которой значительную роль играют продукты вирусного гена *tat*; экспорт РНК продуктами гена *rev*; трансляция; сборка вирусных частиц и их высвобождение из клетки продуктами гена *gag*; «созревание» вирусных частиц (p10, p6) [8,9]. Преобладание или отсутствие тех или иных белков дает информацию о протекании/преобладании отдельных стадий развития вируса. Отсутствие или дефект какого-либо вирусного белка существенно сказывается на формировании новых вирусных частиц. Так, например, последовательности GagPol, лишённые области, кодирующей белок p6, могут быть включены в нуклеотидные последовательности созревающих частиц ВИЧ, но в дальнейшем отсутствие белка p6 негативно влияет на димеризацию протеазы, таким образом нарушая созревание вирусных частиц [12].

В свою очередь, концентрации антител к некоторым вирусным белкам могут рассматриваться как маркеры протекания инфекции. MacManus с соавт. показали, что количественные уровни анти-gp41 и анти-gp160 способны служить быстрым и недорогим инструментом для скрининга низких уровней РНК ВИЧ в периферической крови у детей с вирусной супрессией, когда количество РНК ВИЧ оценивается менее 10 копий или менее 100 копий на мл [24, 32]. Оценка частот встречаемости вирусных белков в различных группах, в том числе среди лиц с впервые выявленной инфекцией, пациентов с вирусологической эффективностью и неэффективностью АРТ, с активно развивающимся заболеванием, позволит расширить понимание патогенеза ВИЧ-инфекции. К сожалению, наблюдение пациентов с момента заражения затруднено, что сужает возможности изучения динамики профиля вирусных белков и других показателей и существенно снижает прогресс исследований ВИЧ. Малочисленность публикаций, в которых анализировали частоты встречаемости вирусных белков в больших выборках с рассмотрением профиля антител к вирусным белкам, свидетельствует о недостаточной проработанности указанного направления.

Цель работы заключалась в оценке частот встречаемости вирусных белков ВИЧ у группы пациентов с впервые выявленной инфекцией.

Материалы и методы

В ходе работы была проанализирована выборка из 2566 образца сыворотки крови, поступивших для референсного анализа на ВИЧ-инфекцию в лабораторию иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции Федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. На проведение данного исследования было получено согласие локального Этического комитета ФБУН НИИЭМ имени Пастера. Все обследованные дали письменное информированное согласие на участие в исследовании. Критериями включения являлись: положительный/неопределённый результат при первичном выявлении Аг/Ат ВИЧ методами иммуноферментного (ИФА) и/или иммунохемилюминесцентного (ИХЛА) анализа, корректность анамнестических данных пациента. Дополнительно в работу включали образцы, в которых анкетные данные поданы анонимно, но имеют вышеуказанные параметры. Критерием исключения считался отрицательный результат при первичном выявлении Аг/Ат ВИЧ методами ИФА и/или ИХЛА.

В рамках исследования сыворотки крови определяли наличие Аг/Ат методами ИФА с использованием диагностических наборов «ДС-ИФА-ВИЧ-АГ+АТ» и «МилаЛаб-ИФА-ВИЧ-АГ+АТ» (Диагностические системы, Российская Федерация) и ИХЛА «HIV Ag/Ab Combo» (Abbott Laboratories, Германия). Таким образом, для оценки жизненного цикла вируса и преобладания его отдельных стадий, были выбраны следующие вирусные белки: gp160, gp120, gp41, p55, p40, p24, p17, p66, p51, p31. Выявление антител к индивидуальным белкам ВИЧ осуществляли методом Вестерн-блот, применяя набор реагентов «NEW BLOT BIORAD» (Bio-Rad Laboratories, США), согласно инструкции производителя. Дизайн эксперимента и отбора образцов представлен на рис. 1.

Статистический анализ осуществляли с использованием программного обеспечения Microsoft Excel и GraphPad Prism 10.2. При оценке статистической погрешности использовали «точный» интервал Клоппера-Пирсона. Оценку достоверности различий выборок проводили с использованием непараметрического критерия Колмогорова–Смирнова (крК-С) при $p < 0,05$. Результаты представлены с указанием 95% доверительного интервала (95% ДИ). Сравнение частот встречаемости вирусных белков проводили относительно белка группы *env* с наименьшей частотой встречаемости

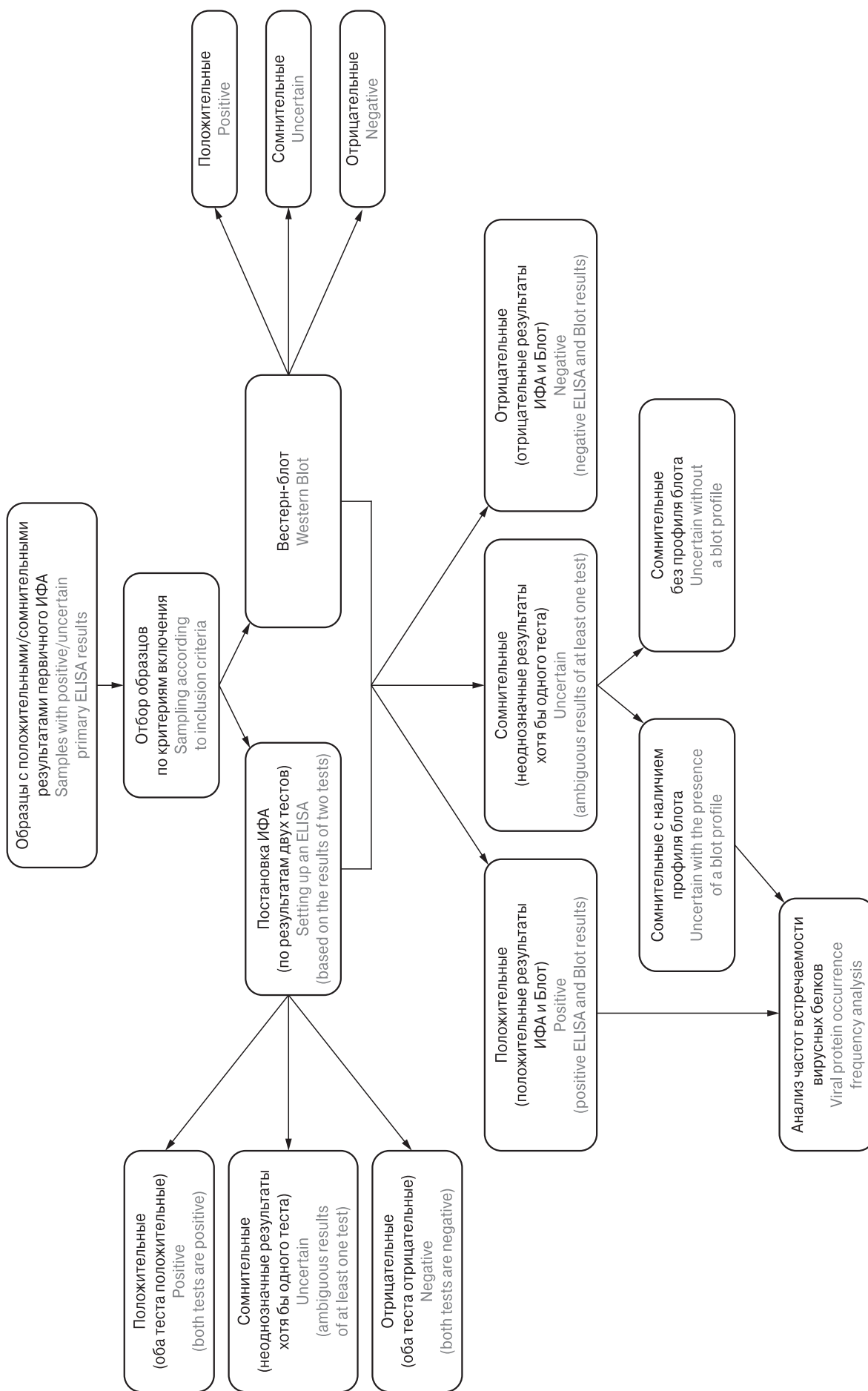


Рисунок 1. Дизайн эксперимента
Figure 1. Experimental design

для повышения достоверности определенных различий. Для оценки уровня достоверности различий между возрастными группами по параметру наличия/отсутствия специфичного конгломерата вирусных белков использовали z- и t-тесты с уровнем достоверности 95%. Выбор между двумя тестами зависел от размера выборки и проводился автоматически программным обеспечением GraphPad Prism 10.2 и веб-ресурсом «Z Score Calculator for 2 Population Proportions» (<https://www.socscistatistics.com/tests/ztest/default2.aspx>)

В ходе анализа выборки среди тех, у кого пол известен, доля мужчин составила 826 (54,77%), в то время как женщин — 682 (45,23%). Средний возраст обследуемой группы оценен в 36,14 года. Возраст пациентов в исследованной группе варьировал от 3-х месяцев до 92 лет.

Для анализа возможной взаимосвязи возраста и частоты встречаемости вирусных белков пациенты были разделены на следующие возрастные группы: первая возрастная группа (до 17 лет включительно) — 47 (1,86%), вторая возрастная группа (от 18 до 35 лет) — 1163 (45,93%), третья возрастная группа (от 36 до 45 лет) — 811 (32,03%), четвертая возрастная группа (от 46 и старше) — 511 (20,18%).

Результаты

В ходе работы было проанализировано 2566 образцов. Среди полученных образцов 2018 (79,70%, 95% ДИ: 78,08–81,25%) показали неопределенный результат (положительные и неопределенные) — при перекрестном анализе методами ИФА и ИХЛА. При анализе методом иммуноблоттинга выявлено позитивных лиц 1824 (72,04%, 95% ДИ: 70,25–73,78%) от всей выборки, неопределенных — 105 (4,15%, 95% ДИ: 3,40–5,00%). Положительный результат, согласно всем 3м тестам, был определен у 1802 образца (71,17%, 95% ДИ: 69,36–72,93%) из общей выборки. Указанные образцы были отобраны для дальнейшего анализа. Результаты представлены на рис. 2.

Среди мужчин положительный результат, согласно показателям Вестерн-блот, выявлен у 617 (74,70%, 95% ДИ: 71,59–77,63%), неопределенный у 40 (4,84%, 95% ДИ: 3,48–6,54%). Среди женщин положительный у 457 (67,01%, 95% ДИ: 63,34–70,53%), неопределенный — 34 (4,99%, 95% ДИ: 3,48–6,90%). Оценка относительного риска связанного с полом при $p < 0,05$ составила 1,124 (ДИ: 1,060–1,192), таким образом риск развиться ВИЧ у мужчин выше, чем у женщин.

При дальнейшем анализе учитывали функциональный вклад каждого вирусного белка в жизненный цикл вируса. Так, gp160 — белок, кодируемый геном *env*, прародитель белков

gp120 и gp41, также синтезируется на стадиях формирования новых вирионов [27]; gp120 и gp41 — белки, необходимые для проникновения вируса в клетку, а именно контакта с рецептором клетки и начала слияния [27]; p55 — белок, кодируемый геном *gag*, и является предшественником белков p41, p17, p15, p7, p6, p1 и капсидного белка p24 [10, 13]; p24 — основной структурный белок капсида, который участвует в поддержании структурной целостности вируса и облегчении различных стадий жизненного цикла вируса, включая проникновение вируса в клетки-хозяева и высвобождение новых вирусных частиц; p40 — белок нуклеокапсида, является компенсаторным белком для p55 и экспрессируется на гораздо более низких уровнях, чем p55 [10, 13]; p17 — капсидный белок, участвует на ранних стадиях репликации вируса, посредник связи с плазматической мембраной, процесс созревания вирусных частиц [16, 26]; p66 — белок, кодируемый геном *pol*, субъединица с каталитической функцией в обратной транскриптазе, одновременно являясь предшественником белка p51 [21, 22, 30]; p51 — субъединица обратной транскриптазы ВИЧ-1, в гетеродимере играет структурную роль [21, 22]; p31 — интегразы, фермент катализирующий включение ДНК вируса в генетический код хозяина [9]. Указанные белки в полной мере описывают жизненный цикл вируса и проявляют свою активность на определенных этапах инфекционного процесса в клетке. Поскольку для нормального функционирования вируса обязательным является наличие антигена оболочки вируса и/или белка, ассоциированного с проникновением в клетку, а антигены групп POL и GAG являются показателями протекания последующих стадий развития жизненного цикла патогена, критерием положительного результата для Вестерн-блот было определено наличие одного белка, кодируемого геном *env*, и одного белка, кодируемого генами *pol* или *gag*. Таким образом, данный критерий обусловлен минимальным количеством анализируемых маркеров, позволяя нивелировать взаимосвязи между вирусными белками и оценить их индивидуальный вклад. Оценку достоверности снижения частот проводили относительно белков группы *env*, что связано с их функциональной ролью, а именно прямым участием в процессе проникновения вируса в клетку [24].

На рис. 3 представлены результаты анализа частотных показателей белков ВИЧ у позитивных лиц.

Значимых различий в белковом профиле в зависимости от пола не обнаружено.

Оценку достоверности снижения частот анализируемых белков проводили с использованием критерия Колмогорова–Смирнова (крК-С).

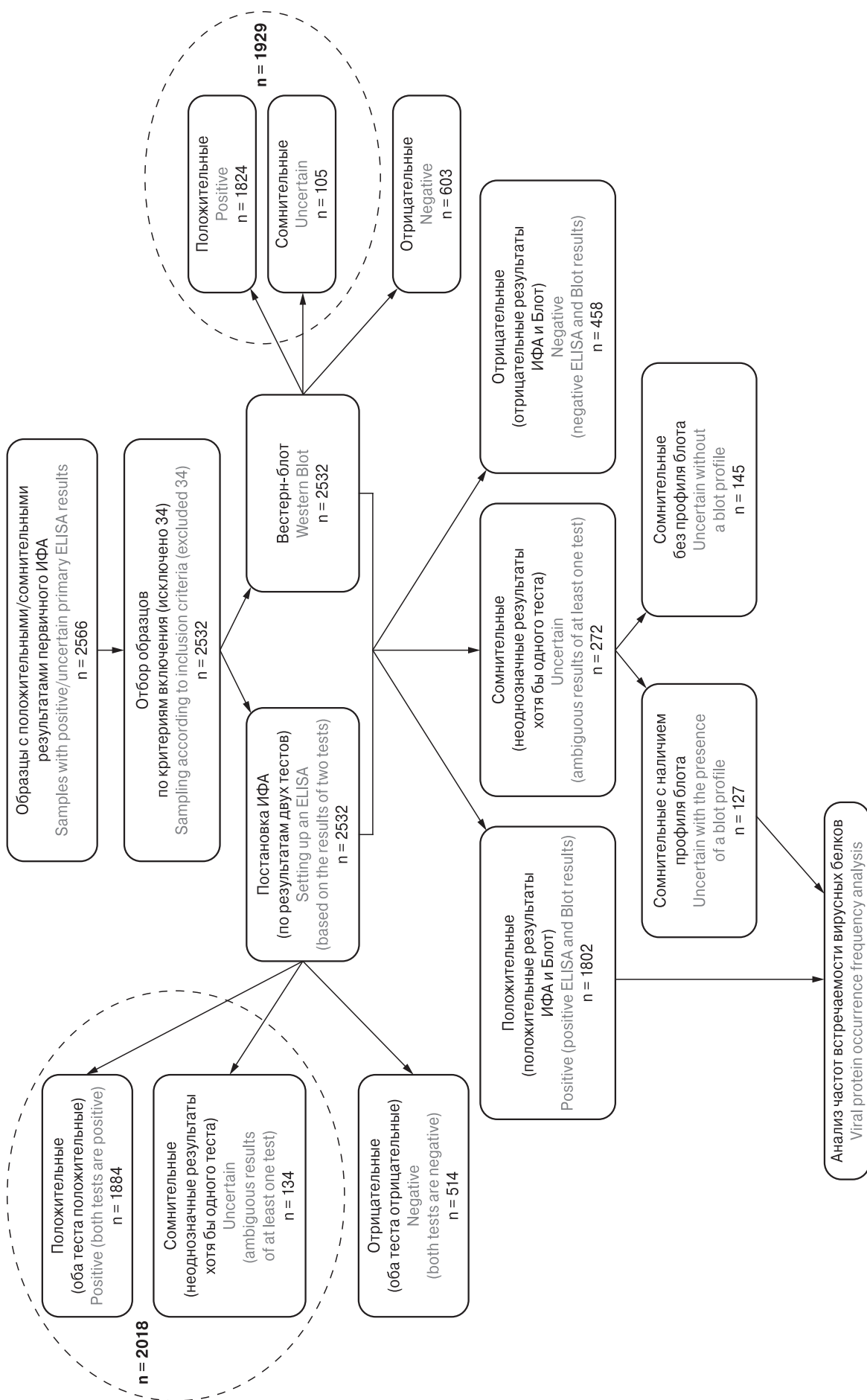


Рисунок 2. Результаты перекрестного анализа методами ИФА, ИХЛА и Вестерн-блот
 Figure 2. The results of the cross-analysis using ELISA, IHLAs, and Western blotting

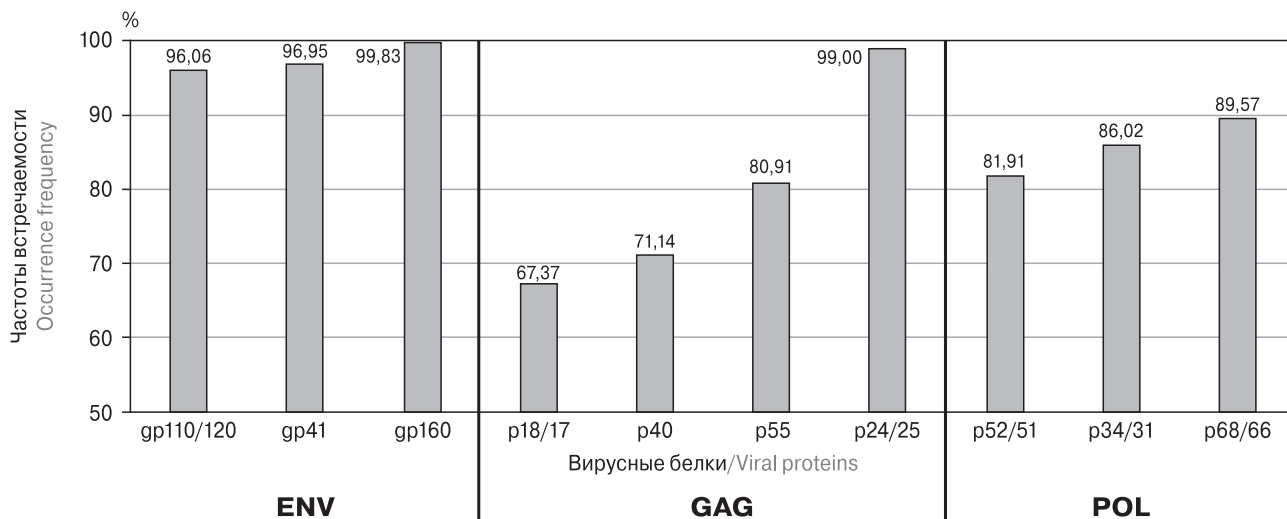


Рисунок 3. Частоты встречаемости белков ВИЧ в обследованной позитивной группе
 Figure 3. Prevalence frequency of HIV proteins in the examined positive test group

Референсным белком для сравнения был выбран gp110/120 в связи с наименьшей частотой встречаемости среди группы продуктов гена *env* — 96,06% ($p < 0,05$, 95% ДИ: 95,16–96,96%)

В ходе анализа обнаружена достоверно сниженная частота встречаемости белков группы GAG: белка нуклеокапсида p18/17 — 67,37% ($p < 0,05$, 95% ДИ: 65,2–69,54%, крК-С: 0,2869), изоформы белка GAG p40 — 72,14% ($p < 0,05$, 95% ДИ: 70,07–74,21%, крК-С: 0,2392) и белка p55 — 80,91% ($p < 0,05$, 95% ДИ: 79,09–82,73%, крК-С: 0,1515). Для белка p24/25 достоверных отличий относительно белка gp110/120 не обнаружено. Белки p55

и p40 являются предшественниками ряда белков GAG, таких как p24/25, формируясь из одной нуклеотидной последовательности, но экспрессирующиеся разными путями [13]. При оценке различий частот встречаемости белков p55 и p40 методом Колмогорова–Смирнова наблюдали достоверное различие двух белков с крК-С = 0,08768 при $p < 0,0001$.

Показано достоверное снижение частот встречаемости белков группы POL относительно gp110/120. Частоты встречаемости продуктов данного гена следующие: p52/51 — 81,91% ($p < 0,05$, 95% ДИ: 80,13–83,69%, крК-С: 0,1415),

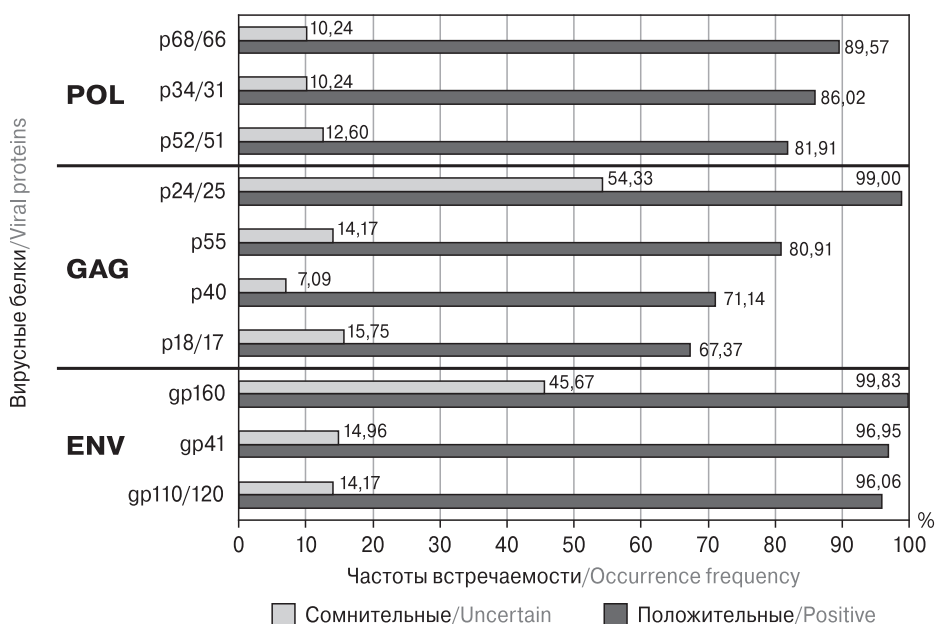


Рисунок 4. Сравнительный график частот встречаемости белков ВИЧ в позитивной и сомнительной группах
 Figure 4. A comparative analysis of HIV protein frequencies between positive and uncertain test groups

Таблица 1. Частоты встречаемости вирусных белков в группе с положительным результатом у разных возрастных групп и пола
 Table 1. Positive test-based frequency of viral proteins in different age and sex groups

Возрастные группы Age group	Белки гена <i>env</i> / <i>env</i> gene proteins			Белки гена <i>gag</i> / <i>gag</i> gene proteins				Белки гена <i>pol</i> / <i>pol</i> gene proteins				Наличие всех белков / All proteins are present	
	gp160	gp110/120	gp41	p55	p40	p24/25	p18/17	p68/66	p52/51	p34/31	Мужской/Male	Женский/Female	Все образцы/All samples
Первая/Group 1 n/n = 24, м/м = 4, ж/ж = 6	24 100,00% (85,75–100%)	23 95,83% (87,27–100%)	22 91,67% ³ (79,74–100%)	17 70,83% (51,23–90,44%)	14 58,33% (37,07–79,60%)	24 100,00% (85,75–100%)	12 50,00% (28,43–71,57%)	20 83,33% (67,26–99,41%)	19 79,17% (61,65–96,68%)	17 70,83% ³ (51,23–90,44%)	2 50,00% (6,76–93,24%)	3 50,00% (11,81–88,19%)	11 45,83% (25,55–67,18%)
Вторая/Group 2 n/n = 826, м/м = 263, ж/ж = 218	824 99,76% (99,42–100%)	787 95,28% ³ (93,83–96,73%)	800 96,85% (95,66–98,05%)	667 80,75% (78,06–83,44%)	602 72,88% (68,84–75,92%)	820 99,27% (98,69–99,85%)	558 67,55% (64,36–70,75%)	725 87,77% ³ (85,53–90,01%)	668 80,87% (78,18–83,56%)	701 84,87% (82,42–87,32%)	140 53,05% (46,81–59,22%)	130 59,63% (52,80–66,20%)	472 57,14% ⁴ (53,69–60,55%)
Третья/Group 3 n/n = 663, м/м = 252, ж/ж = 153	663 100,00% (99,44–100%)	646 97,44% ² (96,23–98,64%)	651 98,19% ⁴ (97,17–99,21%)	550 82,96% ⁴ (80,09–85,83%)	489 73,76% ⁴ (70,40–77,11%)	655 98,79% (97,96–99,63%)	454 68,48% (64,93–72,02%)	613 92,46% ² (90,44–94,47%)	549 82,81% (79,93–85,69%)	585 88,24% ¹ (85,78–90,69%)	140 55,56% (49,19–61,79%)	84 54,90% (46,66–62,95%)	380 57,32% ⁴ (53,45–61,12%)
Четвертая/Group 4 n/n = 289, м/м = 85, ж/ж = 75	288 99,65% (98,97–100%)	275 95,16% (92,67–97,65%)	274 94,81% ³ (92,24–97,38%)	224 77,51% ³ (72,67–82,35%)	195 67,47% ³ (62,03–72,91%)	285 98,62% (97,26–99,97%)	190 65,74% (60,24–71,25%)	256 88,58% (84,89–92,27%)	240 83,04% (78,69–87,40%)	247 85,47% (81,38–89,55%)	39 45,88% (35,02–57,04%)	43 57,33% (45,38–68,69%)	104 35,99% ^{2,3} (30,45–41,81%)

Примечание. Надстроеными цифрами показано с какой группой обнаружены достоверные различия по результатам z- и t-тестов: 1 — достоверное различие с первой группой, 2 — со второй, 3 — с третьей, 4 — с четвертой. В скобках указан доверительный интервал (ДИ:95%) при p < 0,05.
 Note. The superscript numbers indicate which groups significant differences were found based on the results of the z- and t-tests: 1–4 — digits denote significant difference compared with group 1, group 2, group 3, and group 4. The confidence interval (CI:95%) is indicated in parentheses at p < 0,05.

p34/31 — 86,02% (p < 0,05, 95% ДИ: 84,41–87,62%, крК-С: 0,1004), p68/66 — 89,57% (p < 0,05, 95% ДИ: 88,15–90,98%, крК-С: 0,06493). Белки p68/66 и p52/51 формируют зрелый гетеродимер обратной транскриптазы ВИЧ, при этом белок p51 (отвечает за структурный каркас гетеродимера) образуется из белка p66. При анализе достоверности различий частот указанных белков между собой было показано достоверное снижение частоты p51 относительно p66 при P value < 0,05 с крК-С = 0,07658.

При оценке частот встречаемости вирусных белков между возрастными группами были обнаружены достоверные различия: между первой и третьей возрастными группами в частотах встречаемости следующих вирусных белков gp41 (z = -2,2209, p = 0,02642) и p34/31 (z = -2,5451, p = 0,01078); между второй и третьей возрастными группами — gp110/120 (z = 2,1781, p = 0,02926) и p68/66 (z = -2,9795, p = 0,00288); между третьей и четвертой — по белкам gp41 (z = 2,8886, p = 0,00386), p55 (z = 1,9832, p = 0,0477), p40 (z = 1,9842, p = 0,0477). Также наблюдается тенденция к пониженной частоте встречаемости белка p18/17 в детской возрастной группе относительно второй возрастной группой (z = -1,3185, p = 0,09342). Рассмотрены встречаемости вирусных положительных профилей с отсутствием/присутствием отдельных белков и белковых групп генов *gag* и *pol*, и их взаимосвязь с полом и возрастом. Анализ отдельных профилей с отсутствием одиночных белков или целых групп, связанных с геном, проводился как с учетом присутствия/отсутствия других белков, так и с однозначным наличием других белков. Например, при рассмотрении профиля с отсутствием белка p55 гена *gag* (p55-), положительные профили с присутствием/отсутствием других белков (остальные белки «+/-»): «gp160+/-gp110/120+/-gp41+/-p55-p40+/-p24/25+/-p18/17+/-p68/66+/-p52/51+/-p34/31+/-»; профиль с однозначным наличием других белков (остальные белки «+»): «gp160+gp110/120+gp41+p55-p40+p24/25+p18/17+p68/66+p52/51+p34/31+».

Суммарный подсчет частот отсутствия одиночных белков отдельной группы генов в профилях «остальные белки+/-» не проводился, поскольку встречаются повторяющиеся профили для разных отсутствующих белков.

Профиль с наличием всех 10 вирусных белков представлен у 967 образцов (53,66%, p < 0,05, 95% ДИ: 51,33–55,98%). С отсутствием всех белков гена *gag* — 7 (0,39%, p < 0,05, 95% ДИ: 0,16–0,80%), при наличии только белка p24/25 — 234 (12,99%, p < 0,05, 95% ДИ: 11,47–14,63%), с отсутствием одного белка группы GAG — 268 (14,87%, p < 0,05, 95% ДИ: 13,26–16,60%). С отсутствием всех белков гена *pol* — 115 (6,38%, p < 0,05, 95%

Таблица 2. Частоты встречаемости профилей вирусных белков в положительной группе при отсутствии белка у разных возрастных групп и пола

Table 2. A positive test-based frequency of viral protein profiles in different age and sex groups result in the absence of specific protein

Возрастные группы Age group	Отсутствие всех белков гена <i>gag</i> кроме белка р24/25 Absence of all <i>gag</i> gene proteins, except the p24/25 protein		Отсутствие белка р55 Absence of p55 protein		Отсутствие белка р40 Absence of p40 protein		Отсутствие всех белков гена <i>pol</i> Absence of all <i>pol</i> gene proteins		Отсутствие белка р68/66 Absence of p68/66 protein		Отсутствие белка р34/31 Absence of p34/31 protein		Суммарные частоты отсутствия одного белка группы POI The total number of frequencies with the absence of one POI group protein
	Остальные белки «+/-» Other proteins «+/-»		Остальные белки «+/-» Other proteins «+/-»		Остальные белки «+/-» Other proteins «+/-»		Остальные белки «+/-» Other proteins «+/-»		Остальные белки «+/-» Other proteins «+/-»		Остальные белки «+/-» Other proteins «+/-»		
	Мужской Male	Все образцы All samples	Мужской Male	Все образцы All samples	Мужской Male	Все образцы All samples	Мужской Male	Все образцы All samples	Мужской Male	Все образцы All samples	Мужской Male	Все образцы All samples	
Первая Group 1 n/n = 24, m/m = 4, ж/л = 6	1 25,00% (0,63- 80,59%)	7 29,17% ^{2,3} (12,61- 51,09%)	1 25,00% (0,63- 80,59%)	7 29,17% (12,61- 51,09%)	1 25,00% (0,63- 80,59%)	10 41,67% (22,11- 63,36%)	1 25,00% (0,63- 80,59%)	3 12,5% ³ (2,66- 32,36%)	1 25,00% (0,63- 80,59%)	4 16,67% (4,74- 37,38%)	1 25,00% (0,63- 80,59%)	7 29,17% ³ (12,61- 51,09%)	0 (0,00%)
Вторая Group 2 n/n = 826, m/m = 263, ж/л = 218	39 14,89% (10,80- 19,78%)	110 13,32% ¹ (11,07- 15,83%)	57 21,76% (16,91- 27,25%)	159 19,25% (16,61- 22,11%)	16 6,11% (3,53- 9,73%)	32 12,21% ^{3,4} (8,51- 16,80%)	66 7,99% ³ (6,23- 10,05%)	66 7,99% ³ (6,23- 10,05%)	33 12,6% ³ (8,83- 17,23%)	101 12,23% ³ (10,07- 14,66%)	42 16,03% ³ (11,80- 21,04%)	125 15,13% ³ (12,76- 17,76%)	3 0,36% ⁴ (0,07- 1,06%)
Третья Group 3 n/n = 663, m/m = 252, ж/л = 153	24 9,52% ⁴ (6,20- 13,84%)	71 10,71% ⁴ (8,46- 13,32%)	42 16,67% ³ (12,28- 21,85%)	113 17,04% ⁴ (14,26- 20,13%)	7 2,78% ^{1,4} (1,12- 5,64%)	66 26,19% ^{2,4} (20,87- 32,08%)	26 3,92% ^{1,2,4} (2,58- 5,69%)	26 3,92% ^{1,2,4} (2,58- 5,69%)	18 7,14% ² (4,29- 11,05%)	50 7,54% ² (5,65- 9,82%)	25 9,92% ^{2,4} (6,52- 14,3%)	26 3,92% ^{2,4} (2,58- 5,69%)	5 0,75% (0,25- 1,75%)
Четвертая Group 4 n/n = 289, m/m = 65, ж/л = 75	16 18,82% ³ (11,16- 28,76%)	46 15,92% ³ (11,90- 20,65%)	23 27,06% ⁴ (17,99- 37,79%)	65 22,49% ³ (17,81- 27,75%)	7 8,24% ³ (3,38- 16,23%)	33 38,82% ^{3,3} (28,44- 50,01%)	20 6,92% ³ (4,28- 10,49%)	20 6,92% ³ (4,28- 10,49%)	12 14,12% (7,51- 23,36%)	33 11,42% (7,99- 15,66%)	17 20% ³ (12,10- 30,08%)	42 14,53% ³ (10,68- 19,13%)	5 1,73% ² (0,56- 3,99%)

Примечание. Надстроеными цифрами показано с какой группой обнаружены достоверные различия по результатам z- и t-тестов: 1 — достоверное различие с первой группой, 2 — со второй, 3 — с третьей, 4 — с четвертой. В скобках указан доверительный интервал (ДИ: 95%) при p < 0.05.
Note. The superscript numbers indicate which groups significant differences were found based on the results of the z- and t-tests: 1–4 — digits denote significant difference compared with group 1, group 2, group 3, and group 4. The confidence interval (CI: 95%) is indicated in parentheses at p < 0.05.

ДИ: 5,30–7,61%), с отсутствием одного белка данного гена — 13 (0,72%, $p < 0,05$, 95% ДИ: 0,39–1,23%).

Обнаруженные достоверные различия в ансамбле вирусных белков, связанные с полом и возрастом представлены в табл. 1 и 2.

Проанализировали частоты встречаемости вирусных белков в образцах, определенных как сомнительные (127 образцов — 5,02% 95% ДИ: 4,2–5,94%), в том числе: образцы с положительным ИФА/неопределенным блот; положительным блотом/неотрицательным ИФА.

При анализе комплекса белков в образцах с сомнительными результатами вестерн-блота не обнаружено достоверного снижения частот встречаемости вирусных белков относительно белка gp110, но наблюдается снижение относительно gp160 (за исключением p24/25). При сравнительном анализе обнаружено достоверное снижение частот ансамбля вирусных белков, за исключением gp160 и p18/17 ($p < 0,00001$), в группе с сомнительными результатами блота по сравнению с ВИЧ-положительными образцами (рис. 5).

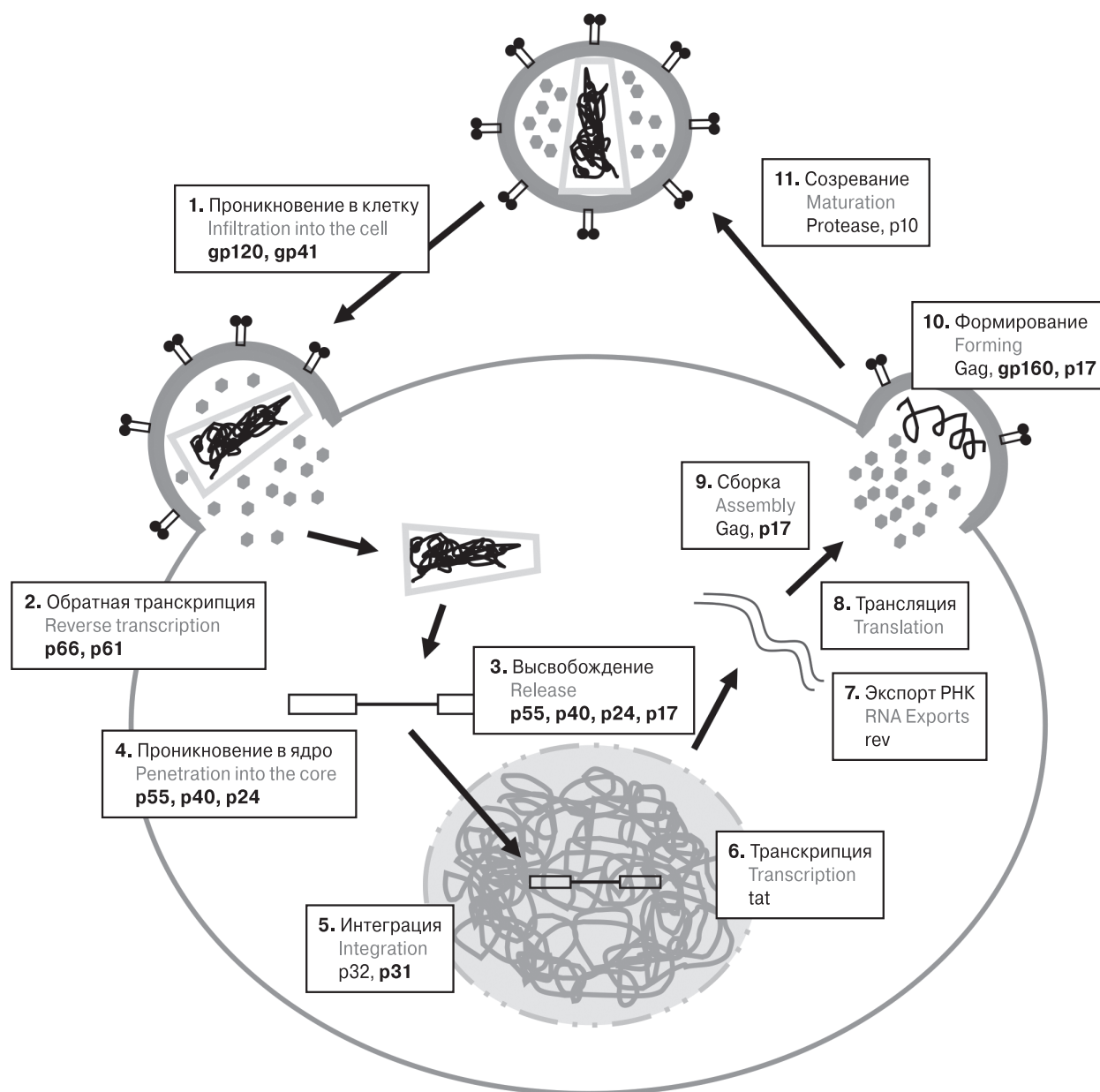


Рисунок 5. Жизненный цикл ВИЧ с указанием функциональных ролей некоторых белков

Figure 5. The HIV life cycle, denoting functional roles for some proteins

Примечание. Жирным начертанием выделены анализируемые в настоящей работе белки.

Note. The proteins analyzed in this study are marked in bold.

Обсуждение

Функциональная роль отдельных белков ВИЧ, как и их влияние на процесс развития инфекции, привлекает интерес исследователей, так как знания о механизмах работы вирусных белков и их взаимодействии с человеческим иммунитетом могут подсказать направления разработок методов анализа и унифицирования критериев положительного результата при ранней диагностике инфицирования. В последнее десятилетие идет активное обсуждение показателей ВИЧ-положительного результата, полагаясь на данные о наличии белков ВИЧ, а именно о важности каждого отдельного белка как критерия оценки той или иной стадии ВИЧ-инфекции. На текущий момент существует согласие относительно присутствия минимум одного белка группы *env* в связи с их ролью в проникновении вируса в клетку, поскольку данный белок встречается на всех клинических стадиях заболевания [14, 18, 22]. Наибольший спор происходит относительно роли белков группы *POL* и *GAG*. Часть исследователей считает, что достаточно наличия хотя бы одного белка из этих групп для положительного результата, считая протекания любой последующей стадии минимальным критерием [19]. В противовес оппоненты расценивают это недостаточным показателем развития вирусного процесса по причине возможной дефектности вируса или ошибки метода анализа [11]. Описанные противоречия объяснимы, поскольку показатели ВИЧ-положительного результата планируют использовать как для обследования людей с подозрением на ВИЧ-инфекцию и возможного предсказания хода инфекционного процесса, так и в ключевых группах, требующих повышенного внимания, например, доноров крови.

Несмотря на факт, что риск заражения ВИЧ у женщин выше [23] и преобладания женщин среди зараженных в мире [2], пожизненный риск заражения ВИЧ-инфекцией у мужчин выше [20]. В Российской Федерации ВИЧ-инфекция чаще была выявлена у впервые обследованных мужчин [4], что соотносится с полученными результатами. Мужской пол является фактором риска ВИЧ-инфекции, что можно объяснить рискованным сексуальным поведением у мужчин по сравнению с женщинами [3]. Стоит отметить достоверные различия частот встречаемости белковых профилей генов *gag* и *pol* у мужчин, но отсутствие таковых у женщин, что может говорить о большем разнообразии квазивидов ВИЧ именно в мужской популяции.

В общем анализе данных показаны сниженные частоты встречаемости белков p55, p40, p52/51, p18/17, p68/66 и p34/31, играющих роль в жизненном цикле вируса (рис. 5).

Снижение частот встречаемости белков p55 и p40 может быть объяснено тем, что фрагменты мРНК ВИЧ проявляют IRES активность, стимулируя продукцию как белка-предшественника GAG, p55gag, так и изоформы GAG с N-концом, укороченной на 40 kDa (p40). Таким образом, мы наблюдаем конкурентный путь образования указанных белков [10]. Показанная сниженная частота встречаемости белка p40 относительно p55 согласуется с данным, полученными de Breune S. и соавт. относительно экспрессии указанных белков [13]. В своей работе они рассмотрели экспрессию кодонов, ответственных за указанные вирусные белки. Экспрессия в кодоне *AUG1*, в результате чего образуется белок p55, регулируется 5'-UTR концом и происходит как по кЭП-зависимому механизму, наблюдаемому другой группой исследователей [31], так и благодаря расположенному в 5'-UTR элементу IRES, регулирующему клеточный цикл. Напротив, трансляция, инициируемая кодоном *AUG2*, ответственная за белок p40, строго зависит от IRES, что естественно подразумевает меньшее количество получаемого продукта, по сравнению с *AUG1* [13].

Одной из вероятных причин сниженной частоты встречаемости белка p52/51 может быть особенность работы ее активной формы. Обратная транскриптаза ВИЧ активна в виде гомодимера p66p66 (предшественника), либо в виде гетеродимера p66p51. Гетеродимер, как предполагают, более процессивен за счет благоприятной конформации каталитической субъединицы для полимеризации ДНК [22]. Гетеродимер формируется в результате расщепления протеазой домена рибонуклеазы одной из молекул p66 гомодимера [30]. Таким образом, белок p66 превалирует в количественном показателе относительно p51, что согласуется с полученными нами данными и достоверно сниженной частоте встречаемости p51 относительно p66.

Белок p18/17 — белок с самой низкой частотой встречаемости среди анализируемых. Наименьшая частота указанного белка определена в первой возрастной группе, наблюдается тенденция к его снижению относительно остальных групп, однако достоверных различий нет. Данный белок участвует на ранних стадиях репликации вируса, а также в нацеливании РНК на плазматическую мембрану, включении оболочки в вирионы и сборке частиц [16]. Антитела к p17 снижаются по мере прогрессирования заболевания, причем снижение становится более резким по мере того, как пациенты переходят от бессимптомного состояния к поздним стадиям, связанным со СПИД [25]. В детской группе не наблюдалось СПИД-ассоциированных случаев, и исследуемая группа может быть пред-

ставлена как случаями ранней инфекции, так и вертикально инфицированными лицами с запоздавшим обследованием, но не достигшим поздних стадий. Сниженная частота встречаемости белка p17 у первой группы, возможно, ассоциирована с особенностями развития детского иммунитета, а именно постепенным формированием иммунитета у детей, в связи с чем взаимодействие вируса с организмом протекает иначе — вирус не включает ряд компенсаторных механизмов, необходимых для работы во взрослом организме, что оказывает влияние на репликацию РНК ВИЧ. У детей старше года уровни антител к p31 и p17 пропорционально связаны с уровнями РНК ВИЧ [24]. Таким образом, достоверно сниженная частота встречаемости p18/17 связана с ранней стадией инфекции — у лиц с отсутствующим p18/17 белок не достигает уровня обнаружения диагностической системой. Аналогичным образом можно объяснить достоверное снижение частоты встречаемости белка p31.

При анализе литературных данных не удалось обнаружить работ, посвященных встречаемости определенного профиля антител к ВИЧ, однако активно ведутся исследования, целью которых является изучение функций каждого отдельного вирусного белка и его роли в жизненном цикле патогена. Тем не менее, объяснение механизма формирования белков и динамики их концентраций чаще встречается в работах, рассматривающих вирус и организм как систему. В случае исследования обратной транскриптазы вируса, кроме исследуемого белка p51, изучали и белок p66 [22, 30]. Аналогичный случай и с исследованиями белков группы гена *gag* [10, 13, 31]. Данный подход ближе к комплексному пониманию взаимодействия вируса и человеческого иммунитета.

Проведенное исследование профилей вирусных белков у лиц с впервые выявленной инфекцией привносит новые данные, способствующие пониманию актуальности определения критериев оценки положительного результата и их внедрения в рутинную лабораторную диагностику.

Тем не менее затруднительно выбрать один из белков, кодируемых генами *gag* и *pol*, как однозначный критерий положительного ре-

зультата. Образцы с наличием всех исследуемых вирусных белков были обнаружены в половине случаев, в то время как встречаемость профилей с отсутствием одного любого белка из кодируемых *gag* и *pol* генами варьирует от 0,55% до 18,77%. Исключение представляет белок p24/25, поскольку его полное отсутствие совместно с другими белками, кодируемыми геном *gag*, составляет 0,38% и не представлено профилей, в которых при наличии других белков группы GAG отсутствовал бы p24/25. Таким образом, можно было бы заявлять белок p24/25 как критерий положительного результата. Однако и использовать его как самый главный критерий нельзя, так как при ограничении выборки лишь неопределенными результатами с «положительным блотом», снижение частот наблюдается для всех белков, включая p24/25, но исключая белки gp160 и p18/17. Причем частота p18/17 может быть снижена относительно других белков в образцах с позитивными результатами, но не в образцах с неопределенным результатом.

Очевидна необходимость и значимость дальнейших исследований по этому направлению с целью как более четкого выделения критериев ВИЧ-позитивности при иммуноблоттинге, так и фундаментального понимания взаимодействия ВИЧ с организмом хозяина.

Заключение

Показаны относительно сниженные частоты встречаемости ряда вирусных белков ВИЧ среди лиц с впервые выявленной инфекцией. Полученные результаты позволяют представить картину формирования вирусных белков и причины их возникновения/отсутствия у групп пациентов, таким образом рассматривая взаимодействие вируса с организмом как единую систему.

Сопоставление профиля антител к вирусным белкам с протеканием инфекционного процесса и состоянием пациента, позволит обнаружить закономерности и принимать необходимые меры по оперативной диагностике с расширенными результатами, такими как срок инфицирования, вирусная нагрузка и тяжесть течения.

Список литературы/References

1. Ануфриева Е.В., Серикова Е.Н., Останкова Ю.В., Шемелев А.Н., Давыденко В.С., Рейнгардт Д.Э., Зуева Е.Б., Тотолян А.А. Структура распределения маркеров некоторых гемоконтактных инфекций среди лиц из пенитенциарных учреждений // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2023. Т. 15, № 3. С. 95–104. [Anufrieva E.V., Serikova E.N., Ostantkova Yu.V., Shchemelev A.N., Davydenko V.S., Reingardt D.E., Zueva E.B., Totolian A.A. The structure of some blood-borne infections distribution among persons from penitentiary institutions the markers. *VICH-infektsiya i immunosupressii = HIV Infection and Immunosuppressive Disorders*, 2023, vol. 15, no. 3, pp. 95–104. (In Russ.) doi: 10.22328/2077-9828-2023-15-3-95-104]
2. Балде А.Л., Шемелев А.Н., Останкова Ю.В., Бумбали С., Валутите Д.Э., Давыденко В.С., Серикова Е.Н., Зуева Е.Б., Ануфриева Е.В., Скворода В.В., Васильева Д.А., Эсауленко Е.В., Семенов А.В., Тотолян А.А. ВИЧ у беременных жен-

- щин Гвинеяской Республики: частота встречаемости и молекулярно-генетические особенности // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2023. Т. 15, № 2. С. 59–69. [Balde T., Shchemelev A.N., Ostankova Yu.V., Boumbaly S., Valutite D.E., Davydenko V.S., Serikova E.N., Zueva E.B., Anufrieva E.V., Skvoroda V.V., Vasileva D.A., Esaulenko E.V., Semenov A.V., Totolian A.A. HIV in pregnant women group in the Republic of Guinea: frequency and genetic characteristics. *VICH-infektsiya i immunosupressii = HIV Infection and Immunosuppressive Disorders*, 2023, vol. 15, no. 2, pp. 48–58. (In Russ.)] doi: 10.22328/2077-9828-2023-15-2-48-58
3. Мулик А.Б., Улесикова И.В., Мулик И.Г., Назаров Н.О., Попов С.Ф., Шатыр Ю.А. Гендерная специфика поведенческого риска ВИЧ-инфицирования // Экология человека. 2020. Т. 27, № 1. С. 50–58. [Mulik A.B., Ulesikova I.V., Mulik I.G., Nazarov N.O., Popov S.F., Shatyr Yu.A. Gender peculiarities of behavioral risk of hiv infection. *Ekologiya cheloveka = Human Ecology*, 2020, vol. 27, no. 1, pp. 50–58. (In Russ.)] 10.33396/1728-0869-2020-1-50-58
 4. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2022 году: Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2023. 386 с. [On the state of sanitary and epidemiological welfare of the population in the Russian Federation in 2022: State report. Moscow: Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 2023. 386 p. (In Russ.)] URL: <https://rosпотребнадзор.ru/upload/iblock/b50/t4kqksh4b12a2iwinha29922vu7naki5/GD-SEB.pdf>
 5. Останкова Ю.В., Давыденко В.С., Шемелев А.Н., Зуева Е.Б., Виролайнен П.А., Тотолян Арег А. Определение тропизма ВИЧ у лиц с вирусологической неэффективностью антиретровирусной терапии в Архангельской области // Проблемы особо опасных инфекций. 2022. № 3. С. 120–128. [Ostankova Yu.V., Davydenko V.S., Shchemelev A.N., Zueva E.B., Virolainen P.A., Totolian A.A. Determination of HIV Tropism in Patients with Antiretroviral Therapy Failure in Arkhangelsk Region. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2022, no. 3, pp. 120–128. (In Russ.)] doi: 10.21055/0370-1069-2022-3-120-128
 6. Справка «ВИЧ-инфекция в Российской Федерации на 31 декабря 2020 г.». ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Федеральный научно-методический центр по профилактике и борьбе со СПИДом, 2020. [Reference “HIV infection in the Russian Federation as of 31 December 2020”. *Central Research Institute of Epidemiology of Rosпотребнадzor, Federal Scientific and Methodological Centre for AIDS Prevention and Control*, 2020. (In Russ.)]
 7. Угроза ВИЧ/СПИД: оценка уровня информированности и готовности работодателей (объединений и руководителей предприятий) противостоять данной угрозе: Социологическое исследование (1 этап). Женева: Международное бюро труда, 2007. [The HIV/AIDS Threat: Assessing the Awareness and Willingness of Employers (Associations and Managers) to Address the Threat: A Sociological Study (Phase 1). *Geneva: International Labour Office*, 2007. (In Russ.)]
 8. Черешнев В.А., Бажан С.И., Бахметьев Б.А., Гайнова И.А., Бочаров Г.А. Системный анализ патогенеза ВИЧ-инфекции // Успехи современной биологии. 2012. Т. 132, № 2. С. 115–140. [Chereshnev V.A., Bazhan S.I., Bakmeteyev B.A., Gainova I.A., Bocharov G.A. Systems analysis of HIV pathogenesis. *Uspehi sovremennoy biologii = Advances in Modern Biology*, 2012, vol. 132, no. 2, pp. 115–140. (In Russ.)]
 9. Arhel N., Kirchoff F. Host proteins involved in HIV infection: new therapeutic targets. *Biochim. Biophys. Acta*, 2010, vol. 1802, no. 3, pp. 313–321. doi: 10.1016/j.bbdis.2009.12.003
 10. Buck C.B., Shen X., Egan M.A., Pierson T.C., Walker C.M., Siliciano R.F. The human immunodeficiency virus type 1 gag gene encodes an internal ribosome entry site. *J. Virol.*, 2001, vol. 75, no. 1, pp. 181–191. doi: 10.1128/JVI.75.1.181-191.2001
 11. Centers for Disease Control (CDC). Interpretation and use of the western blot assay for serodiagnosis of human immunodeficiency virus type 1 infections. *MMWR Suppl.*, 1989, vol. 38, no. 7, pp. 1–7
 12. Chiu H.C., Wang F.D., Chen Y.A., Wang C.T. Effects of human immunodeficiency virus type 1 transframe protein p6* mutations on viral protease-mediated Gag processing. *J. Gen. Virol.*, 2006, vol. 87, pt. 7, pp. 2041–2046. doi: 10.1099/vir.0.81601-0
 13. De Breyne S., Chamond N., Décimo D., Trabaud M.A., André P., Sargueil B., Ohlmann T. In vitro studies reveal that different modes of initiation on HIV-1 mRNA have different levels of requirement for eukaryotic initiation factor 4F. *FEBS J.*, 2012, vol. 279, no. 17, pp. 3098–3111. doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08689.x
 14. Esteban J.I., Shih J.W., Tai C.C., Bodner A.J., Kay J.W., Alter H.J. Importance of western blot analysis in predicting infectivity of anti-HTLV-III/LAV positive blood. *Lancet*, 1985, vol. 2, no. 8464, pp. 1083–1086. doi: 10.1016/s0140-6736(85)90683-x
 15. Fauci A.S. HIV and AIDS: 20 years of science. *Nat. Med.*, 2003, vol. 9, no. 7, pp. 839–843. doi: 10.1038/nm0703-839
 16. Fiorentini S., Marini E., Caracciolo S., Caruso A. Functions of the HIV-1 matrix protein p17. *New Microbiol.*, 2006, vol. 29, no. 1, pp. 1–10.
 17. Global HIV & AIDS statistics — Fact sheet / UNAIDS 2023 epidemiological estimates. URL: <https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet> (08.05.2024)
 18. Goudsmit J., Lange J.M., Paul D.A., Dawson G.J. Antigenemia and antibody titers to core and envelope antigens in AIDS, AIDS-related complex, and subclinical human immunodeficiency virus infection. *J. Infect. Dis.*, 1987, vol. 155, no. 3, pp. 558–560. doi: 10.1093/infdis/155.3.558
 19. Hausler W.J. Jr., Getchell J.P. Report of the Fourth Consensus Conference on HIV Testing sponsored by the Association of State and Territorial Public Health Laboratory Directors (ASTPHLD). *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, 1989, vol. 10, no. 8, pp. 354–367. doi: 10.1086/646045
 20. Hess K.L., Hu X., Lansky A., Mermin J., Hall H.I. Lifetime risk of a diagnosis of HIV infection in the United States. *Ann. Epidemiol.*, 2017, vol. 27, no. 4, pp. 238–243. doi: 10.1016/j.annepidem.2017.02.003
 21. Huang S.C., Smith J.R., Moen L.K. Contribution of the p51 subunit of HIV-1 reverse transcriptase to enzyme processivity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1992, vol. 184, no. 2, pp. 986–992. doi: 10.1016/0006-291x(92)90688-h
 22. Lange J.M., Paul D.A., Huisman H.G., de Wolf F., van den Berg H., Coutinho R.A., Danner S.A., van der Noordaa J., Goudsmit J. Persistent HIV antigenaemia and decline of HIV core antibodies associated with transition to AIDS. *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.)*, 1986, vol. 293, no. 6560, pp. 1459–1462. doi: 10.1136/bmj.293.6560.1459
 23. Mahathir M. Women at greater risk of HIV infection. *Arrows Change*, 1997, vol. 3, no. 1, pp. 1–2.

24. McManus M., Henderson J., Gautam A., Brody R., Weiss E.R., Persaud D., Mick E., Luzuriaga K.; PACTG 356 Investigators. Quantitative Human Immunodeficiency Virus (HIV)-1 Antibodies Correlate With Plasma HIV-1 RNA and Cell-associated DNA Levels in Children on Antiretroviral Therapy. *Clin. Infect. Dis.*, 2019, vol. 68, no. 10, pp. 1725–1732. doi: 10.1093/cid/ciy753
25. McManus M., Karalius B., Patel K., Persaud D., Luzuriaga K.; Pediatric HIV/AIDS Cohort Study. Quantitative HIV-1-specific antibodies as predictors of peripheral blood cell-associated HIV-1 DNA concentrations. *AIDS*, 2020, vol. 34, no. 8, pp. 1117–1126. doi: 10.1097/QAD.0000000000002525
26. Mehta S.U., Rupprecht K.R., Hunt J.C., Kramer D.E., McRae B.J., Allen R.G., Dawson G.J., Devare S.G. Prevalence of antibodies to the core protein P17, a serological marker during HIV-1 infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 1990, vol. 6, no. 4, pp. 443–454. doi: 10.1089/aid.1990.6.443
27. Miyauchi K., Curran A.R., Long Y., Kondo N., Iwamoto A., Engelman D.M., Matsuda Z. The membrane-spanning domain of gp41 plays a critical role in intracellular trafficking of the HIV envelope protein. *Retrovirology*, 2010, vol. 7: 95. doi: 10.1186/1742-4690-7-95
28. Ostankova Y.V., Shchemelev A.N., Boumbaly S., Balde T.A.L., Zueva E.B., Valutite D.E., Serikova E.N., Davydenko V.S., Skvoroda V.V., Vasileva D.A., Semenov A.V., Esaulenko E.V., Totolian A.A. Prevalence of HIV and Viral Hepatitis Markers among Healthcare Workers in the Republic of Guinea. *Diagnostics (Basel)*, 2023, vol. 13, no. 3: 378. doi: 10.3390/diagnostics13030378
29. Shchemelev A.N., Ostankova Y.V., Zueva E.B., Semenov A.V., Totolian A.A. Detection of patient HIV-1 drug resistance mutations in Russia's Northwestern Federal District in patients with treatment failure. *Diagnostics (Basel)*, 2022, vol. 12, no. 8: 1821. doi: 10.3390/diagnostics12081821
30. Schmidt T., Schwieters C.D., Clore G.M. Spatial domain organization in the HIV-1 reverse transcriptase p66 homodimer precursor probed by double electron-electron resonance EPR. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2019, vol. 116, no. 36, pp. 17809–17816. doi: 10.1073/pnas.1911086116
31. Soto-Rifo R., Limousin T., Rubilar P.S., Ricci E.P., Décimo D., Moncorgé O., Trabaud M.A., André P., Cimarelli A., Ohlmann T. Different effects of the TAR structure on HIV-1 and HIV-2 genomic RNA translation. *Nucleic Acids Res.*, 2012, vol. 40, no. 6, pp. 2653–2667. doi: 10.1093/nar/gkr1093
32. Zaongo S.D., Sun F., Chen Y. Are HIV-1-specific antibody levels potentially useful laboratory markers to estimate HIV reservoir size? A Review. *Front. Immunol.*, 2021, vol. 12: 786341. doi: 10.3389/fimmu.2021.786341

Авторы:

Давыденко В.С., младший научный сотрудник лаборатории иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции, аспирант ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Останкова Ю.В., к.б.н., зав. лабораторией иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции; старший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Щемелев А.Н., младший научный сотрудник лаборатории иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Серикова Е.Н., научный сотрудник лаборатории иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Тотolian А.А., академик РАН, д.м.н., профессор, зав. лабораторией молекулярной иммунологии, директор ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; зав. кафедрой иммунологии Первого Санкт-Петербургского медицинского университета имени академика И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Davydenko V.S., Junior Researcher, Laboratory of Immunology and Virology of HIV Infection, PhD Student, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Ostankova Yu.V., PhD (Biology), Head of the Laboratory of Immunology and Virology HIV-Infection; Senior Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Schemelev A.N., Junior Researcher, Laboratory of Immunology and Virology of HIV Infection, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Serikova E.N., Researcher, Laboratory of Immunology and Virology of HIV Infection, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

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

PREVALENCE AND ANTIBIOTICS SUSCEPTIBILITY OF THERMOTOLERANT *CAMPYLOBACTER* spp. ISOLATED FROM HUMANS AND CHICKENS IN THE REPUBLIC OF GUINEA

R. Balde^a, Z.N. Matveeva^b, L.A. Kaftyreva^{b,c}, M.A. Makarova^{b,c}

^a Research Institute of Applied Biology of Guinea, Kindia, Republic of Guinea

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

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

Abstract. *Background.* The issue of diarrheal diseases remains relevant for modern health care in all countries. Campylobacteriosis is the most common infectious disease with foodborne transmission and poultry meat is a transmission factor. *Materials and methods.* 724 items of faeces sampled from patients with diarrheal syndrome and 283 samples of faeces of chickens raised on private farms and five poultry farms in the province were studied. For bacteriological method were used selective media. Traditional routine tests (cell morphology, cytochrome oxidase, catalase, hydrolysis of sodium hippurate and indoxyl acetate) and MALDI-ToF mass spectrometry was performed for identification. The susceptibility of strains to antibiotics was analysed using the disc-diffusion method. Results were interpreted according to the EUCAST criteria, versions 2019–2022. *Results.* *Campylobacter* spp. was cultured in 65 out of 724 faecal samples from patients with acute diarrhoea, of them 83.08% were identified as *C. jejuni*, and 16.92% as *C. coli*. Of the 237 *Campylobacter* strains from chicken were identified as *C. jejuni* (54.0%), as *C. coli* (46.0%). *Campylobacter* spp. strains from humans were resistant to tetracycline (40.0%), to erythromycin (6.15%), to ciprofloxacin (12.31%). The strains from chickens kept on farms, were resistant to tetracycline in 42.55%, to ciprofloxacin — in 22.70% and to erythromycin — in 11.35%. The strains from chickens kept on private farms were resistant to tetracycline in 4.17%, to ciprofloxacin — in 1.04%, all strains were sensitive to erythromycin. *Conclusion.* Thus, due to the widespread prevalence of *Campylobacter* spp., infectious diseases they cause remain a topical issue. Studying the resistance to antibiotics in *Campylobacter* spp. among poultry could allow to develop new approaches to confirming the significance of their foodborne nature and to improve the national disease prevention system.

Key words: *Campylobacter* spp., *Campylobacter* infection, Africa, foodborne infections, poultry farms, antibiotic resistance.

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ ТЕРМОТОЛЕРАНТНЫХ *CAMPYLOBACTER* spp., ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ЛЮДЕЙ И ПТИЦ В РЕСПУБЛИКЕ ГВИНЕЯ

Балдэ Р.¹, Матвеева З.Н.², Кафтырева Л.А.^{2,3}, Макарова М.А.^{2,3}

¹ Институт прикладной биологии, г. Киндия, Гвинейская Республика

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

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

Резюме. *Введение.* Проблема диарейных заболеваний остается актуальной для современного здравоохранения всех стран. Кампилобактериоз является наиболее распространенным инфекционным заболеванием,

Адрес для переписки:

Макарова Мария Александровна
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.
Тел.: 8 921 631-31-83. E-mail: makmaria@mail.ru

Contacts:

Maria A. Makarova
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 921 631-31-83. E-mail: makmaria@mail.ru

Для цитирования:

Балдэ Р., Матвеева З.Н., Кафтырева Л.А., Макарова М.А.
Распространенность и чувствительность к антибиотикам
термотолерантных *Campylobacter* spp., выделенных от людей и птиц
в Республике Гвинея // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 4.
С. 809–815. doi: 10.15789/2220-7619-PAA-17673

Citation:

Balde R., Matveeva Z.N., Kaftyreva L.A., Makarova M.A. Prevalence and
antibiotics susceptibility of thermotolerant *Campylobacter* spp. isolated
from humans and chickens in the Republic of Guinea // Russian Journal
of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 4,
pp. 809–815. doi: 10.15789/2220-7619-PAA-17673

передающимся через пищевые продукты, а мясо птицы — общепризнанный фактор передачи. Цель исследования: оценка распространенности термотолерантных *Campylobacter* spp. в Гвинейской Республике у пациентов с диарейным синдромом и кур при различных типах содержания. **Материалы и методы.** Изучено 724 пробы испражнений пациентов с диарейным синдромом и 283 пробы помета кур, содержащихся в личных хозяйствах и птицефермах. Для бактериологического метода использовали селективные питательные среды. Идентификацию штаммов *Campylobacter* spp. проводили традиционными рутинными тестами (морфология клеток, оксидазный и каталазный тесты, гидролиз гиппурата натрия и индоксилатацетата) и методом MALDI-ToF масс-спектрометрией. Чувствительность штаммов к антибиотикам определяли диско-диффузионным методом. Результаты интерпретировали в соответствии с критериями EUCAST версий 2019–2022 гг. **Результаты.** *Campylobacter* spp. был выявлен в 65 из 724 пробах испражнений пациентов с острой диареей, из них 83,08% были идентифицированы как *C. jejuni* и 16,92% — как *C. coli*. Из 237 штаммов *Campylobacter* spp., выделенных из помета кур были идентифицированы *C. jejuni* 54,0% и *C. coli* 46,0%. Кампилобактерии, выделенные от людей были устойчивы к тетрациклину 40,0%, к эритромицину 6,15%, к ципрофлоксацину 12,31%. Штаммы, выделенные от промышленной птицы, были устойчивы к тетрациклину 42,55%, к ципрофлоксацину 22,70% и эритромицину 11,35%. Штаммы, выделенные от домашних кур, характеризовались резистентностью к тетрациклину — 4,17%, к ципрофлоксацину — 1,04%, все штаммы были чувствительны к эритромицину. **Выводы.** В связи с широкой распространенностью *Campylobacter* spp., вызываемые ими инфекционные заболевания остаются актуальной проблемой. Изучение устойчивости к антибиотикам *Campylobacter* spp. среди домашней птицы может позволить разработать новые подходы к подтверждению значимости их как фактора передачи и усовершенствовать национальную систему профилактики кампилобактериоза.

Ключевые слова: *Campylobacter*, кампилобактериоз, Африка, инфекции, передающиеся с пищевыми продуктами, птицефабрики, устойчивость к антибиотикам.

Introduction

The issue of diarrheal diseases remains relevant for modern health care in all countries. This is due to the wide range of diverse pathogens that cause diarrheal diseases, their wide distribution, as well as significant socio-economic impact. According to the World Health Organization (WHO) Expert Committee, they occupy the fourth place on the “importance scale” of the Global Burden of Disease and are included in the list of emergent foodborne infections affecting over 500 million people every year, of which 220 million are children under 5 years old [13].

Campylobacter is among the main causes of gastroenteritis worldwide and has increased in both developed and developing countries over the last 10 years. It accounts for 8.5% of the total number of diarrheal diseases reported [8, 12, 14].

The genus *Campylobacter* was first reported in 1886 by Theodor Escherich who discovered these microorganisms in a deceased child during an outbreak of “children’s cholera” and described them as uncultivated spiral-shaped bacteria. At the beginning of the 20th century, in humans learned of a widespread *Campylobacter* distribution among animals and their significance in reproductive system pathologies. In 1906, veterinarians McFadyean and Stockman found *Campylobacter* in smears from the uterine mucosa of a pregnant sheep as “a large number of unusual microorganisms”; in 1913, similar microorganisms were sampled from an aborted cow foetus and thus named *Vibrio fetus*. In 1927, Smith and Orcutt named a group of bacteria sampled from cattle faeces in diarrhoea *Vibrio jejuni*. Seventeen years later, in 1944, Doyle sampled bacteria from the faeces of pigs with diarrhoea

that differed in biochemical properties from previously isolated *Vibrio jejuni* and classified them as *Vibrio coli*. *Campylobacter* (*V. fetus*) were first sampled from human blood in 1947 [8]. Initially, all the above bacteria were assigned to the genus *Vibrio* and, despite having significant differences in biological properties from the “true” *Vibrio* spp., they were classified as an independent genus *Campylobacter* only in 1963. In 1969, Dekeyser first sampled *Campylobacter* from the faeces of patients with diarrhoea by direct membrane filtration on a selective agar medium. The development and increased use of selective media for the sampling of *Campylobacter* in the late 1970s and early 1980s led, on the one hand, to the recognition of the significance of said microorganisms as those causing acute intestinal conditions in humans, and, on the other hand, to the improvement of laboratory diagnostic methods and discovery of new species [5].

As of December 2022, the genus *Campylobacter* includes 43 species, and almost half of them may cause various human diseases, including gastroenteritis. In countries with developed laboratory diagnostics of campylobacteriosis, thermotolerant *Campylobacter* species *C. jejuni* and *C. coli* are considered the most significant causative agents of gastroenteritis. Other species of this *Campylobacter* group, *C. lary*, *C. concisus*, *C. ureolyticus* and *C. upsaliensis*, may cause diarrhoea too, but less often [8, 17].

Campylobacter infection is characterised by its impact on the gastrointestinal tract. It may manifest as enteritis, enterocolitis, colitis or gastroenterocolitis and result in serious gastrointestinal or extraintestinal complications [5, 27]. Immunocompromised humans (patients with AIDS, cancer, etc.), as well as infants are most vulnerable to complications. An acute infec-

tion can have serious long-term consequence, including the peripheral neuropathies, Guillain–Barré syndrome (GBS) and Miller–Fisher syndrome (MFS), and functional bowel diseases, such as irritable bowel syndrome (IBS). GBS occurs in one in 1000 cases in people who have had campylobacteriosis. Older males get sick more often than females [3].

Campylobacteriosis is diagnosed based on the results of faeces examination using laboratory diagnostic methods, that is, bacteriology, molecular and immunology tests aimed at identifying the pathogen or its antigens and genetic markers [2, 21]. In countries that established observation practices for foodborne infections, it was found that *C. jejuni* is the main cause of foodborne outbreaks and one of the most important zoonotic pathogens capable of causing human diseases [4, 13, 20].

Epidemiological features of campylobacteriosis are studied in detail in most industrialised countries, as they record large outbreaks with foodborne transmission type. In the European Union, including the European Economic Area (EU/EEA), 30 countries reported 129 960 confirmed cases of campylobacteriosis in 2021. The overall recording rate was 44.5 per 100 000 population [16]. Despite the decrease in the incidence of *Campylobacter* infection over the past 3 years in a range of countries in North, Central and South America, thermotolerant *Campylobacter* spp. are the leading causative agents of bacterial diarrhoea in Europe, as well as in Australia and New Zealand. The number of confirmed cases in the European Union in 2020 reached 121 000 cases, whereas the incidence was 40.4‰ [1, 26].

Epidemiological data from a number of countries of Africa, Asia and the Middle East is incomplete; however, it shows that *Campylobacter* infection is relevant for these regions as well [23]. The results of 10-year studies (1997–2007) conducted using the molecular method based on RT-PCR in Blantyre (Malawi, Africa) showed that *Campylobacter* are often causative agents of diarrheal diseases in children; *C. jejuni* and *C. coli* were detected in every fifth child hospitalised with diarrhoea and in 14% of the cases where examinations found no signs of an acute intestinal infection, while *C. jejuni* accounted for up to 85% of all cases of campylobacteriosis [18]. These results are confirmed by another study conducted in Moramanga (Madagascar), in which the proportion of *Campylobacter* spp. was 8.9% in faecal samples of children with diarrheal syndrome, and 9.4% in children without diarrhoea [22]. From 2005 to 2009, 5443 strains of *Campylobacter* spp. were sampled from the faeces of children with diarrhoea at the Red Cross Children’s Hospital in Cape Town (South Africa), of which 40% were *C. jejuni*; the second most common species were *C. concisus* (24.6%) [23]. In general, it can be concluded that *C. jejuni* and other species of the genus *Campylobacter* are significant for children in most regions of Africa.

Reducing disease risks and preventing campylobacteriosis in the population are primarily associated with the idea of reservoirs/factors of transmission of infectious agents [6]. The most important reservoir/factor of transmission of *C. jejuni* and *C. coli* pathogens for humans is industrial poultry: chickens, turkeys, ducks, geese, etc., among which the leading place is occupied by broiler chickens raised on poultry farms [9]. Numerous epidemiological studies have shown that *Campylobacter* infection caused by chicken meat consumption is more often recorded in urban residents than in rural residents [26]. However, there is evidence that other types of *Campylobacter* are often sampled from chickens in various regions. This is due to the high level of *Campylobacter* spp. among broiler chickens. On poultry farms *Campylobacter* are found in the environment including soil, water sources, dust, building surfaces and air [11]. International trade in broiler chickens, industrial poultry products and feed contributes to the overall burden of *Campylobacter* infection. In Switzerland 71% of campylobacteriosis cases were caused by poultry products [25, 26]. Given that *C. jejuni* strains survive in chicken faeces up to six days after isolation, they can be a potential source of environmental pollution, and the use of poultry manure as fertiliser is a factor in human infection. According to the Food Standards Agency in the UK, 72.9% of chicken carcasses were contaminated with *Campylobacter* spp. between 2014 and 2015, with 18.9% of them characterised by significant contamination (> 10 000 CFU/g) [16, 19].

Considering the above, the purpose of this study was to assess the prevalence of thermotolerant *Campylobacter* in the Republic of Guinea among patients of various ages with diarrheal syndrome and chickens with various types of livestock management.

Materials and methods

The study was conducted in the period from 2019 to 2022 in the province of Kindia (Republic of Guinea), in a laboratory of Guinea-Russian Research Centre of Epidemiology and Prevention of Infectious Diseases (Kindia, Republic of Guinea).

724 items of faeces sampled from patients with diarrheal syndrome were studied, among them 73 from children aged 0 to 5, 127 from children aged 6 to 17, and 524 from humans aged 18 and older, as well as 283 samples of faeces of chickens raised on private farms and five poultry farms in the province. The samples were delivered to the laboratory in a Cary–Blair Transport Medium in a refrigerated container in 4–8 hours.

For bacteriological method, the following media (Oxoid, UK) were used: 1. *Campylobacter* Blood-Free Selective Agar Base and CCDA Selective Supplement; 2. Selective medium carbon agar and a Selective Supplement (cefoperazone and teicoplanin); 3. Blood agar Muller–Hinton Agar, with 5% Defibrinated Horse Blood (E&O Laboratories

limited) and culture growth supplement to increase *Campylobacter* aerotolerance. Inoculation on the blood agar was performed using cellulose acetate filters (Sartorius Stedim Biotech) with a pore diameter of 0.45 μm . The cultures were incubated in a micro-aerobic atmosphere at 42°C for 48 hours.

Traditional routine tests based on the determination of key phenotypic features were used for primary identification: cell morphology and Gram staining, production of cytochrome oxidase and catalase, hydrolysis of sodium hippurate and indoxyl acetate. The second identification level was performed using MALDI-ToF mass spectrometry (Bruker Daltonik MALDI Biotyper).

The susceptibility of thermotolerant *Campylobacter* strains to antimicrobial agents was determined by disc-diffusion method using Muller-Hinton Agar (Oxoid), 5% Defibrinated Horse Blood (E&O Laboratories limited) and 20 mg/l of β -NAD. Results were interpreted according EUCAST criteria, versions 2019–2022 (https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/previous_versions_of_documents).

In parallel with the culture method, faeces samples from patients with diarrheal syndrome was examined by PCR method with fluorescence in situ hybridization using the Russian reagent kit AmpliSense® OKI screen-FL to identify and differentiate the DNA of *Campylobacter* microorganisms (thermophilic *Campylobacter* spp.).

Statistical processing of results. The obtained data were processed using the computer program Excel (Microsoft Office). Fisher's exact test was used to assess the statistical significance of differences in indicators (frequency, proportion). Differences were considered statistically significant at a 95% confidence interval ($p < 0.05$).

Results

Thermotolerant *Campylobacter* spp. was cultured in 65 out of 724 faecal samples from patients with acute diarrhoea (8.98%). In children under 5 years old, they were found three times more often than in adults (20.55% vs 7.06%, respectively), $p \leq 0.05$ (Table 1). Molecular markers of thermotolerant *Campylobacter* were detected in 72 samples (9.94%).

Thermotolerant *Campylobacter* were found in 237 out of 283 (83.75%) samples of chicken intestinal contents, regardless of the livestock management type (personal

farming or poultry farms). In chickens raised free-range on personal farming, *Campylobacter* spp. was found in 96 out of 132 samples studied (72.73%). In poultry farm broilers, thermotolerant *Campylobacter* was detected in 141 out of 151 samples, which was 93.38%. The use of membrane filters and non-selective media made it possible to identify three strains of closely related microorganisms (*Arcobacter cryaerophilus*) in the samples studied, which will not be discussed in this paper since they are not pathogenic to humans.

Of the 237 *Campylobacter* strains, 128 were identified as *C. jejuni* and 109 as *C. coli*, representing 54.0% and 46.0%, respectively. Identification using classical tests of six strains of *C. jejuni* showed questionable results after the hippurate hydrolysis test. The use of MALDI-ToF mass spectrometry and PCR with species-specific primers allowed for the correct culture identification.

To assess the prevalence of resistance strains of *Campylobacter* spp., were conducted a screening of sampled cultures for clinically significant drugs. Were studied 302 strains of thermotolerant *Campylobacter* spp. sampled from humans (65 strains), as well as from chicken intestinal contents (237 strains) of chickens kept in different livestock management types: 96 strains from personal farming and 141 strains from five poultry farms (Table 3). 212 strains (70.20%) of *Campylobacter* spp. were susceptible to all antibiotics whereas 90 (29.80%) were resistant to one or several agents.

When it comes to the general population of strains, *Campylobacter* spp. strains sampled from humans were resistant to tetracycline (40.0%), $p \leq 0.05$, significantly more often. The proportion of strains resistant to erythromycin and ciprofloxacin was 6.15% and 12.31%, respectively. At the same time, there were no significant differences in the levels of resistance to these drugs ($p \geq 0.05$).

Among the strains sampled from the intestinal contents of chickens kept on poultry farms, strains resistant to tetracycline were significantly more common as they accounted for (42.55%), $p \leq 0.05$. As for fluoroquinolones which had previously been widely used in veterinary medicine (enrofloxacin), 22.70% of strains were resistant; 11.35% were resistant to erythromycin. No significant differences were identified.

The proportion of strains sampled from the faeces of chickens kept on private farms resistant to tetracycline was 4.17%, whereas the proportion of strains resistant to ciprofloxacin amounted to 1.04%. At the same time, all strains remained susceptible to erythromycin.

The analysis of combined resistance showed that 18.46% of strains sampled from humans were characterized by resistance to two antibiotics: 8 to tetracycline and ciprofloxacin, 4 to erythromycin and tetracycline. Strains from livestock kept on poultry farms with phenotypes of combined resistance were sampled almost twice as often (1.84).

Table 1. Frequency of sampling *Campylobacter* spp. in patients of various ages

Age	Total samples	Frequency of findings, n (%)	95% CI
0–5	73	15 (20.55%)	12.87–31.18
6–17	127	13 (10.23%)	6.08–16.73
18 and older	524	37 (7.06%)	5.17–9.58
Total	724	65 (8.98%)	7.11–11.28

Table 2. Frequency of findings for *C. jejuni* and *C. coli* sampled from humans and intestinal contents of chickens kept on personal farming and poultry farms

Type of <i>Campylobacter</i>	Humans n (%)	95% CI	Chickens personal farming n (%)	95% CI	Chickens poultry farms n (%)	95% CI
<i>C. jejuni</i>	54 (7.46%)	5.76–9.61	46 (34.85%)	27.25–43.30	82 (54.31%)	46.35–62.04
<i>C. coli</i>	11 (1.52%)	0.85–2.70	50 (37.88%)	30.06–46.39	59 (39.07%)	31.65–47.03
Not found	659 (90.61%)	88.72–92.89	36 (27.27%)	20.40–35.43	10 (6.62%)	3.63–11.76
Total	724 (100%)	99.47–100	132 (100%)	67.79–82.27	151 (100%)	58.37–73.29

Table 3. Antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. strains sampled in Kindia, Republic of Guinea, 2019–2022

Antibiotic	Humans (n = 65) n (%)	Chickens personal farming (n = 96) n (%)	Chickens poultry farms (n = 141) n (%)	Total (n = 302) n (%)
Tetracycline	26 (40.00%)	4 (4.17%)	60 (42.55%)	90 (29.80%)
Erythromycin	4 (6.15%)	0 (0%)	16 (11.35%)	20 (6.62%)
Ciprofloxacin	8 (12.31%)	1 (1.04%)	32 (22.70%)	41 (13.58%)

Discussion

Bacteria of the genus *Campylobacter* are among the leading causative agents of acute intestinal infections of bacterial etiology in residents of developed countries, exceeding in some regions the frequency of registration of salmonellosis and escherichiosis. In a third of cases, they are the cause of “travelers’ diarrhea” among residents of economically developed countries visiting regions with a high degree of circulation of *Campylobacter* spp. among the population, animals and environmental objects [15]. According to the latest estimates of the World Health Organization, campylobacteriosis is one of the most common infectious diseases with foodborne transmission. Campylobacteriosis is registered in all age groups, most often among children aged from one year to 3–5 years; a relative increase in cases of disease is observed in older children and young people (compared to other age categories) [4, 11, 18, 23].

Our studies showed that the campylobacteriosis accounted for 8.98% in the etiological structure of diarrheal diseases in individuals residing in the Republic of Guinea in 2019–2022. Analysis of the age structure confirmed that thermotolerant *Campylobacter* are common pathogens among the child population: *C. jejuni* and *C. coli* were detected in one in five children under 5 ages. *C. jejuni* (83.08%) were significantly predominant in the *Campylobacter* infection structure compared to *C. coli* (16.92%), $p \leq 0.05$.

The incidence of *Campylobacter* colienteritis, as well as the frequency of detection of thermotolerant campylobacters in chickens in different countries varies very widely. Thus, in the countries of the European Union, where monitoring has been carried out for many years, the incidence is at the level of 61.4–66.5‰, varying from < 5.8‰ in Bulgaria, Latvia, Portugal to 230.0‰ in the Czech Republic. Poultry meat is a transmission factor in campylobacteriosis. The frequency of detecting *Campylobacter* spp.

in chickens in different countries varies in wide ranges [3, 16, 19, 25]. As our studies have shown, the level of *Campylobacter* spp. among chickens was high (82.57%) and ranged from 70.58% in chickens kept free-range on personal farming to 93.37% in broilers kept on poultry farms. There were no significant differences in the species structure: *C. jejuni* and *C. coli* were distinguished with almost the same frequency of 54.0% and 46.0% ($p \geq 0.05$). If we talk about the frequency of detection of *Campylobacter* in chickens, our data are consistent with the results of other authors [9, 11, 14], however, sometimes comparison is difficult due to differences in methodological approaches to research. In our work, we assessed the distribution of thermotolerant campylobacters in the chicken population, while most modern studies deal with the frequency and intensity of contamination of chicken meat, i.e. product prepared for shipment to the consumer [19].

In clinical practice, for the treatment of moderate and severe forms of campylobacteriosis, the prescription of broad-spectrum antibiotics is regulated, among which the drugs of choice are macrolides, and mainly azithromycin. Along with antibiotics of this group, aminoglycosides, quinolones, tetracyclines, chloramphenicol, nitrofurans and carbapenems are recognized as alternative and effective therapeutic drugs. Fluoroquinolones, previously widely used for the treatment of campylobacteriosis, contributed to the development of resistance to this group of antibiotics in 50–84% of circulating strains of *Campylobacter* spp., which made them unsuitable for therapeutic purposes. In recent years, the clinical ineffectiveness of ongoing antibacterial therapy has been accompanied by the emergence of a large number of resistant strains. A feature of the formation of resistance in *Campylobacter* is not only the rapid onset of the effect of insensitivity of strains to the action of antibiotics, but also the multiple nature of this phenomenon. In countries where surveillance of campylobacteriosis pathogens has been carried out in recent years, it has been noted that the population of *Campylobacter* spp.

is dominated by strains characterized by multidrug resistance [12, 24, 26]. In 2017, WHO published a list of 12 bacterial priority pathogens that pose the greatest threat to human health. *Campylobacter* spp. due to the need for the creation of new AMPs, those resistant to fluoroquinolones are classified as a group of microorganisms with a high level of priority (<https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>).

Thermophilic *Campylobacter* spp. are among the most difficult microorganisms to cultivate. In the laboratory diagnosis of campylobacteriosis, the most difficult task is to isolate a pure culture of the pathogen from stool samples due to their massive concomitant microbial contamination. In recent years, the use of molecular research methods has been considered not as an alternative, but as a mandatory addition to regulated diagnostic regimens for acute intestinal infections, allowing for the rapid and effective identification of pathogens of acute intestinal infections, including thermophilic *Campylobacter* spp. At the same time, it does not imply species identification and determination of sensitivity to antibiotics [2, 7, 10].

Conclusion

Thus, due to the widespread prevalence of thermotolerant *Campylobacter* spp., infectious diseases caused by them remain a topical issue. Successful use of molecular diagnostic methods along with traditional culture inoculation methods makes it possible to effectively assess the prevalence of *Campylobacter* in poultry and to enact effective control strategies to prevent campylobacteriosis in individuals resid-

ing in the Republic of Guinea. Studying the distribution and resistance to antibiotics in the population of *C. jejuni* and *C. coli* among poultry could make it possible to develop new approaches to confirming the significance of their foodborne nature and to improve the national disease prevention system to reduce the risk of contamination with *Campylobacter* pathogens through industrial poultry products as well as infection burden levels in the population.

Additional information

Author contributions. For research articles with several authors, a short paragraph specifying their individual contributions must be provided. The following statements should be used Conceptualization, L.K. and R.B.; methodology, M.M.; software, R.B. and M.M.; validation, Z.M., M.M. and L.K.; formal analysis, R.B.; investigation, M.M.; resources, R.B. and L.K.; data curation, M.M. and Z.M.; writing — original draft preparation, Z.M.; writing — review and editing, L.K.; visualization, Z.M.; supervision, M.M.; project administration, L.K.; funding acquisition, L.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding. This research received no external funding.

Conflicts of interest. The authors declare no conflicts of interest.

Disclaimer/publisher's note. The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

References

1. Bian X., Garber J.M., Cooper K.K., Huynh S., Jones J., Mills M.K., Rafala D., Nasrin D., Kotloff K.L., Parker C.T., Tennant S.M., Miller W.G., Szymanski C.M. Campylobacter Abundance in Breastfed Infants and Identification of a New Species in the Global Enterics Multicenter Study. *mSphere*, 2020, vol. 5, no. 1: e00735-19. doi: 10.1128/mSphere.00735-19
2. Buss J.E., Cresse M., Doyle S., Buchan B.W., Craft D.W., Young S. Campylobacter culture fails to correctly detect Campylobacter in 30% of positive patient stool specimens compared to non-cultural methods. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2019, vol. 38, no. 6, pp. 1087–1093. doi: 10.1007/s10096-019-03499-x
3. Centers for Disease Control and Prevention. Guillain-Barré Syndrome. 2022. URL: <https://cdc.gov/campylobacter/guillain-barre.html>
4. Chlebicz A., Śliżewska K. Campylobacteriosis, Salmonellosis, Yersiniosis, and Listeriosis as Zoonotic Foodborne Diseases: A Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2018, vol. 15, no. 5: 863. doi: 10.3390/ijerph15050863
5. Costa D., Iraola G. Pathogenomics of Emerging Campylobacter Species. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2019, vol. 32, no. 4: e00072-18. doi: 10.1128/CMR.00072-18
6. Dai L., Sahin O., Grover M., Zhang Q. New and alternative strategies for the prevention, control, and treatment of antibiotic-resistant Campylobacter. *Transl. Res.*, 2020, vol. 223, pp. 76–88. doi: 10.1016/j.trsl.2020.04.009
7. Dunn S.J., Pascoe B., Turton J., Fleming V., Diggle M., Sheppard S.K., McNally A., Manning G. Genomic epidemiology of clinical Campylobacter spp. at a single health trust site. *Microb. Genom.*, 2018, vol. 4, no. 10: e000227. doi: 10.1099/mgen.0.000227
8. Fitzgerald C. Campylobacter. *Clin. Lab. Med.*, 2015, vol. 35, pp. 289–298. doi: 10.1016/j.cll.2015.03.001
9. Garin B., Gouali M., Wouafo M., Perchec A.M., Pham M.T., Ravaonindrina N., Urbès F., Gay M., Diawara A., Leclercq A., Rocourt J., Pouillot R. Prevalence, quantification and antimicrobial resistance of Campylobacter spp. on chicken neck-skins at points of slaughter in 5 major cities located on 4 continents. *Int. J. Food Microbiol.*, 2012, vol. 157, no. 1, pp. 102–107. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.04.020
10. Gharbi M., Béjaoui A., Ben Hamda C., Ghedira K., Ghram A., Maaroufi A. Distribution of virulence and antibiotic resistance genes in Campylobacter jejuni and Campylobacter coli isolated from broiler chickens in Tunisia. *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, 2022, vol. 55, no. 6 (Pt 2), pp. 1273–1282. doi: 10.1016/j.jmii.2021.07.001

11. Higham L.E., Scott C., Akehurst K., Dring D., Parnham A., Waterman M., Bright A. Effects of financial incentives and cessation of thinning on prevalence of Campylobacter: a longitudinal monitoring study on commercial broiler farms in the UK. *Vet. Rec.*, 2018, vol. 183, no. 19: 595. doi: 10.1136/vr.104823
12. Hlashwayo D.F., Sigauque B., Noormahomed E.V., Afonso S.M.S., Mandomando I.M., Bila C.G. A systematic review and meta-analysis reveal that Campylobacter spp. and antibiotic resistance are widespread in humans in sub-Saharan Africa. *PLoS One*, 2021, vol. 16, no. 1: e0245951. doi: 10.1371/journal.pone.0245951
13. Igwaran A., Okoh A.I. Human campylobacteriosis: a public health concern of global importance. *Heliyon*, 2019, vol. 5, no. 11: e02814. doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e02814
14. Kaakoush N.O., Castaño-Rodríguez N., Mitchell H.M., Man S.M. Global Epidemiology of Campylobacter Infection. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2015, vol. 28, no. 3, pp. 687–720. doi: 10.1128/CMR.00006-15
15. Kreling V., Falcone F.H., Kehrenberg C., Hensel A. Campylobacter sp.: Pathogenicity factors and prevention methods-new molecular targets for innovative antivirulence drugs? *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2020, vol. 104, no. 24, pp. 10409–10436. doi: 10.1007/s00253-020-10974-5
16. Lake I.R., Colón-González F.J., Takkinen J., Rossi M., Sudre B., Dias J.G., Tavoschi L., Joshi A., Semenza J.C., Nichols G. Exploring Campylobacter seasonality across Europe using The European Surveillance System (TESSy), 2008 to 2016. *Euro Surveill.*, 2019, vol. 24, no. 13: 1800028. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.13.180028
17. Liu F., Ma R., Wang Y., Zhang L. The Clinical Importance of Campylobacter concisus and Other Human Hosted Campylobacter Species. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2018, no. 8: 243. doi: 10.3389/fcimb.2018.00243
18. Mason J., Iturriza-Gomara M., O'Brien S.J., Ngwira B.M., Dove W., Maiden M.C., Cunliffe N.A. Campylobacter infection in children in Malawi is common and is frequently associated with enteric virus co-infections. *PLoS One*, 2013, vol. 8, no. 3: e59663. doi: 10.1371/journal.pone.0059663
19. Osimani A., Aquilanti L., Pasquini M., Clementi F. Prevalence and risk factors for thermotolerant species of Campylobacter in poultry meat at retail in Europe. *Poult. Sci.*, 2017, vol. 96, no. 9, pp. 3382–3391. doi: 10.3382/ps/pex143
20. Paintsil E.K., Ofori L.A., Adobea S., Akenten C.W., Phillips R.O., Maiga-Ascofare O., Lamshöft M., May J., Obiri Danso K., Krumkamp R., Dekker D. Prevalence and antibiotic resistance in Campylobacter spp. isolated from humans and food-producing animals in West Africa: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Pathogens*, 2022, vol. 11, no. 2: 140. doi: 10.3390/pathogens11020140
21. Platts-Mills J.A., Liu J., Gratz J., Mduma E., Amour C., Swai N., Taniuchi M., Begum S., Peñataro Yori P., Tilley D.H., Lee G., Shen Z., Whary M.T., Fox J.G., McGrath M., Kosek M., Haque R., Hout E.R. Detection of Campylobacter in stool and determination of significance by culture, enzyme immunoassay, and PCR in developing countries. *J. Clin. Microbiol.*, 2014, vol. 52, no. 4, pp. 1074–80. doi: 10.1128/JCM.02935-13
22. Randremanana R.V., Randrianirina F., Sabatier P., Rakotonirina H.C., Randriamanantena A., Razanajatovo I.M., Ratovoson R., Richard V. Campylobacter infection in a cohort of rural children in Moramanga, Madagascar. *BMC Infect. Dis.*, 2014, no. 14: 372. doi: 10.1186/1471-2334-14-372
23. Samie A., Moropeng R.C., Tanih N.F., Dillingham R., Guerrant R., Bessong P.O. Epidemiology of Campylobacter infections among children of 0–24 months of age in South Africa. *Arch. Public Health*, 2022, vol. 80, no. 1: 107. doi: 10.1186/s13690-022-00850-1
24. Shen Z., Wang Y., Zhang Q., Shen J. Antimicrobial Resistance in Campylobacter spp. *Microbiol. Spectr.*, 2018, vol. 6, no. 2. doi: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0013-2017
25. Sasaki Y., Yonemitsu K., Momose Y., Uema M. [Quantitative Survey of Campylobacter on Chicken Livers in Japan]. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 2023, vol. 64, no. 6, pp. 214–217. (In Japanese). doi: 10.3358/shokueishi.64.214
26. Wallace R.L., Bulach D., McLure A., Varrone L., Jennison A.V., Valcanis M., Smith J.J., Polkinghorne B.G., Glass K., Kirk M.D. Antimicrobial resistance of Campylobacter spp. causing human infection in Australia: an international comparison. *Microb. Drug Resist.*, 2021, vol. 27, no. 4, pp. 518–528. doi: 10.1089/mdr.2020.0082
27. Yoo M., Chung S.H., Park Y.S., Oh I.H., Chae W.Y., Kim S.H., Lee K.Y., Song C.W., Son B.K., Kim S.H., Jo Y.K., Jung K.H., Lee H.Y., Chae J.D. Clinical characteristics of Campylobacter enterocolitis in Korean adults: a retrospective study at a single center. *Korean J. Gastroenterol.*, 2020, vol. 75, no. 4, pp. 188–197. doi: 10.4166/kjg.2020.75.4.188

Авторы:

Балдэ Р., научный сотрудник отдела бактериологии НИИ прикладной биологии Гвинеи, г. Киндия, Гвинейская Республика;

Матвеева З.Н., к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории кишечных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Кафтырева Л.А., д.м.н., ведущий научный сотрудник группы эпидемиологии брюшного тифа ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; профессор кафедры медицинской микробиологии ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия;

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

Authors:

Balde R., Researcher, Department of Bacteriology Research Institute of Applied Biology of Guinea, Kindia, Republic of Guinea;

Matveeva Z.N., PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Enteric Infections, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Kaftyreva L.A., DSc (Medicine), Leading Researcher, Typhoid Epidemiology Research Group, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation; Professor, Department of Medical Microbiology, I.I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;

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

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ОПИСТОРХОЗА

Ю.Н. Рябенко¹, Э.Б. Рябенко²

¹ ФГАОУ ВО Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

² ФГАОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия

Резюме. В статье проведен анализ статистических данных заболеваемости описторхозом на территории Российской Федерации и в зарубежных странах в 2020 г. по сравнению с 2019 годом, приведены абсолютные и интенсивные показатели заболеваемости в целом в стране и конкретно в субъектах Российской Федерации — республиках и областях, удельный вес гельминтозов в целом, и описторхоза, в частности, в общей структуре паразитарных заболеваний, а также удельный вес описторхоза в общей структуре био-гельминтозов, его динамика, распространенность возбудителя данного паразитоза. Проведен сравнительный анализ показателей заболеваемости в регионах, где был зарегистрирован данный гельминтоз, со среднестатистическими показателями страны. В результате проведенной работы были сделаны выводы о том, что несмотря на снижение общей паразитарной заболеваемости в стране, в ряде регионов отмечается превышение среднестатистических показателей, местами значительное. Так, в Республике Коми интенсивный показатель превысил показатель по стране в 4 раза, в Курганской, Вологодской, Архангельской областях и Ненецком автономном округе — в 3 раза. В статье приведен анализ возрастных групп населения и удельный вес городского, а также сельского населения, пораженного описторхозом. Описторхоз остается актуальной социально значимой проблемой практического здравоохранения, занимая одно из ведущих мест среди всех паразитарных инвазий, а среди биогельминтозов — первое, что не может не вызывать настороженности, и наносит немалый ущерб здоровью населения. В статье определена особая клиническая и эпидемиологическая значимость описторхоза, которая объясняется тяжестью течения заболевания, поражением различных систем и органов, формированием серьезных осложнений, ведущих к инвалидности, а в ряде случаев к летальным исходам, наличием природных очагов, основная часть которых находится в Российской Федерации. Неблагополучными по описторхозу являются практически все территории, примыкающие к бассейнам рек Обь, Иртыш, Томь и их притокам. Приведены данные удельного веса обнаружения личинок гельминтозов в рыбе в 2020 г. и 2019 г. — в динамике с 2010 г. Проведен анализ литературных источников и научных статей по изучению описторхоза, распространению его возбудителя и значение для практического здравоохранения. Исходя из выше изложенного, важное значение в снижении заболеваемости и недопущении распространения данного паразитоза играет строгое соблюдение профилактических мер.

Ключевые слова: описторхоз, *Opisthorchis felineus*, *Opisthorchis viverrini*, эпидемическая ситуация, заболеваемость, биогельминтозы.

Адрес для переписки:

Рябенко Элина Борисовна
117513, Россия, Москва, ул. Островитянова, 1,
ФГАОУ ВО Российский национальный исследовательский
медицинский университет им. Н.И. Пирогова
Минздрава России.
Тел.: 8 (918) 852-00-49.
E-mail: eryabenko@yandex.ru

Contacts:

Elina B. Ryabenko
117513, Russian Federation, Moskva, Ostrovityanova str., 1,
Pirogov Russian National Research Medical University.
Phone: +7 (918) 852-00-49.
E-mail: eryabenko@yandex.ru

Для цитирования:

Рябенко Ю.Н., Рябенко Э.Б. Актуальные вопросы описторхоза // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 4. С. 816–822. doi: 10.15789/2220-7619-OTI-8055

Citation:

Ryabenko Yu.N., Ryabenko E.B. Opisthorchiasis-related topical issues // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 4, pp. 816–822. doi: 10.15789/2220-7619-OTI-8055

© Рябенко Ю.Н., Рябенко Э.Б., 2024

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-OTI-8055>

OPISTHORCHIASIS-RELATED TOPICAL ISSUES

Ryabenko Yu.N.^a, Ryabenko E.B.^b

^a Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

^b Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Abstract. The article analyzes statistical data on the 2020 vs 2019 opisthorchiasis incidence rate on the territory of the Russian Federation and in foreign countries, provides absolute and intensive morbidity indicators across entire the Russian Federation and specifically in its subjects — republics and regions, general prevalence of helminthiasis, and opisthorchiasis particularly overall pattern of parasitic diseases, as well as contribution of opisthorchiasis to general pattern of biohelminthiasis, its dynamics, and prevalence of relevant causative agent. A comparative analysis for incidence rates in the regions where opisthorchiasis was recorded and mean country-wide statistical parameters was carried out. As a result, it was concluded that despite a decline in the Russia-wide overall parasitic morbidity, an excess of mean indicators, sometimes significant, was noted in some regions. Thus, compared to Russia-wide magnitude of intensive indicator, it was higher by 4-fold in the Komi Republic, whereas in the Kurgan, Vologda, Arkhangelsk Regions and the Nenets Autonomous Okrug — by 3-fold. The article provides an analysis of the population age groups as well as percentage of opisthorchiasis-affected urban and rural populations. In addition, the special clinical and epidemiological significance of opisthorchiasis remains urgent due to severity of its course, affected various body systems and organs, emergence of serious complications leading to disability, and in some cases to fatal outcomes, the presence of natural foci, most of which are located in the Russian Federation. Almost all territories adjacent to the basins of the Ob, Irtysh, Tom rivers and their tributaries pose special concern regarding opisthorchiasis. The data related to prevalence of helminthiasis larvae detected in fish in 2020 and 2019 since 2010 are presented. Based on the data shown above, strict adherence to preventive measures plays an important role in reducing opisthorchiasis incidence rate and preventing its spread.

Key words: *Opisthorchiasis, Opisthorchis felineus, Opisthorchis viverrini, epidemic situation, morbidity, biohelminthiasis.*

Введение

Несмотря на снижение заболеваемости описторхозом, которое можно объяснить снижением интенсивности миграции населения внутри страны и временным закрытием границ в связи с продолжающейся пандемией COVID-19, актуальность данного паразитарного заболевания сохраняется.

Цель работы — анализ заболеваемости описторхозом на территории Российской Федерации и в зарубежных странах в 2020 г. по сравнению с 2019 г., распространенность возбудителя данного паразитоза.

Материалы и методы

Нами проведен анализ статистических данных заболеваемости описторхозом в 2020 г. и литературных источников и научных статей по изучению описторхоза, распространению его возбудителя и значения для практического здравоохранения.

Результаты

Клиническая и эпидемиологическая значимость описторхоза определяется тяжестью течения заболевания, поражением различных систем и органов, формированием серьезных осложнений, ведущих к инвалидности, а в ряде случаев к летальным исходам, наличием природных очагов, основная часть которых находится в Российской Федерации.

В 2020 г. в стране зарегистрировано свыше 173 тыс. случаев паразитарных заболеваний, интенсивный показатель составил 118,2, что на 42,0% ниже показателя 2019 г., и колеблется от 18,4 до 56,6, и почти в 3 раза меньше показателя 2010 г. [8, 13, 15] (табл. 1).

Однако, несмотря на снижение общей паразитарной заболеваемости в стране, в ряде регионов отмечается превышение среднестатистических показателей, местами значительное. Так, в Республике Коми интенсивный показатель превысил показатель по стране в 4 раза, в Курганской, Вологодской, Архангельской областях и Ненецком автономном округе — в 3 раза [12, 13, 14, 15].

В общей структуре паразитарной заболеваемости доля гельминтозов составляет 88,0%, в 2019 г. — 87,6%, отмечается рост на 0,45%. В сравнении с показателями 2010 г. доля гельминтозов увеличилась на 10,3%, в 2019 г. — на 9,2% [8, 15] (табл. 2).

В структуре биогельминтозов в 2020 г. описторхоз занял первое место, его удельный вес составил 79,98% (рис. 1), в 2019 г. — 80,88% (рис. 2).

Описторхоз — наиболее распространенный паразитоз, передающийся через зараженную пресноводную рыбу.

В 2020 г. зарегистрировано около 10 тыс. случаев описторхоза, интенсивный показатель 6,77, что в 2 раза ниже показателя 2019 г. — 13,35, а по сравнению с 2010 г. — ниже в 3,3 раза [11, 15, 16].

Удельный вес городского населения составил 76,0% — 7,5 тыс. случаев заболевания, в 2019 г. — 78,3% — свыше 15 тыс. случаев. Сельское насе-

ление — 23,7% — 2353 случая, в 2019 г. — 22,3% — 4338 случаев [3, 6, 7].

Описторхоз регистрировался во всех возрастных группах населения. Восприимчивость высокая.

Показатель заболеваемости описторхозом в субъектах страны варьировал от 0,04 до 112,5 на 100 тыс. населения, в 2019 г. — от 0,03 до 252,74.

Неблагополучными по описторхозу являются практически все территории, примыкающие

к бассейнам рек Оби, Иртыша, Томи и их притокам [18, 19].

Удельный вес обнаружения личинок гельминтозов в рыбе в 2020 г. составил 0,8%, в 2019 г. — 1,6%, в 2010 — 3,5% [2].

Описторхоз остается актуальной социально-значимой проблемой практического здравоохранения, занимая 4–5 место среди всех паразитарных инвазий, и наносит немалый ущерб здоровью населения [15].

Таблица 1. Показатели паразитарной заболеваемости в субъектах РФ в 2019–2020 гг.

Table 1. 2020–2019 parasitic morbidity in the subjects of the Russian Federation

Субъекты РФ: республики, области Subjects of the Russian Federation: republics, regions	2020 г.	2019 г.	Динамика Dynamics
	Всего случаев Total cases (%)	Всего случаев Total cases (%)	
Российская Федерация Russian Federation	173 430	296 847	–42,00%
Республика Коми Komi Republic	4093 (2,36%)	5681 (1,91%)	–27,96%
Курганская область Kurgan Region	3492 (2,07%)	4279 (1,44%)	–18,40%
Вологодская область Vologda Region	4531 (2,67%)	6507 (2,19%)	–30,37%
Архангельская область Arkhangelsk Region	3871 (2,23%)	5505 (1,85%)	–29,69%
Ненецкий автономный округ Nenets Autonomous Okrug	153 (0,08%)	341 (0,11%)	–55,14%
Томская область Tomsk Region	3461 (1,99%)	6368 (2,74%)	–45,66%
Республика Саха Sakha Republic	2998 (1,72%)	5849 (1,97%)	–48,75%
Ханты-Мансийский автономный округ Khanty-Mansi Autonomous Okrug	4923 (2,83%)	8863 (2,98%)	–44,46%
Новосибирская область Novosibirsk Region	7997 (4,67%)	12414 (4,18%)	–35,59%
Республика Карелия Republic of Karelia	1690 (0,97%)	2956 (0,99%)	–42,83%
Кемеровская область Kemerovo Region	6823 (3,93%)	12203 (4,11%)	–44,09%
Пермский край Perm Region	6652 (3,83%)	9818 (3,30%)	–32,25%
Ямало-Ненецкий автономный округ Yamalo-Nenets Autonomous Okrug	1371 (0,79%)	2264 (0,76%)	–39,45%
Еврейская автономная область Jewish Autonomous Region	401 (0,23%)	798 (0,26%)	–49,75%
Тюменская область Tyumen Region	3807 (2,79%)	4673 (1,57%)	–18,54%
Республика Хакасия Republic of Khakassia	1265 (0,72%)	2911 (0,98%)	–56,55%
Удмуртская Республика Udmurt Republic	3401 (1,96%)	6824 (2,29%)	–50,17%
Чувашская Республика Chuvash Republic	2561 (1,47%)	3880 (1,30%)	–34,00%
Красноярский край Krasnoyarsk Territory	5806 (3,34%)	7416 (2,49%)	–21,71%
Республика Тыва Republic of Tyva	986 (0,56%)	1444 (0,48%)	–31,72%

Описторхоз — паразитоз, возбудителями которого являются гельминты *Opisthorchis felineus* и *Opisthorchis viverrini*. Заражение человека происходит при употреблении в пищу недостаточно термически обработанной, слабо соленой, вяленой или сырой рыбы семейства карповых, инвазированной личинками описторхисов [4, 10, 20, 21].

Основным ареалом распространения *O. viverrini* является Юго-Восточная Азия — Таиланд, Лаос, Вьетнам и Камбоджа, а *O. felineus* — Обь-

Иртышский, Волго-Камский, Донской, Днепровский и Енисейский бассейны рек [6, 21].

Механизм развития описторхоза включает в себя реакцию иммунной системы на чужеродный агент, а также механическое и токсическое повреждение органов и тканей [5, 9, 22].

Клиническая картина острого описторхоза складывается из токсико-аллергических проявлений. Хронические формы заболевания способствуют формированию желчнокамен-

Таблица 2. Интенсивные показатели заболеваемости

Table 2. Intensive morbidity rates

Субъекты РФ: республики, области Subjects of the Russian Federation: republics, regions	2020 г.	2019 г.	Динамика Dynamics
	ИП Intensive indicator	ИП Intensive indicator	
Российская Федерация Russian Federation	118,2	202,2	–
Республика Коми Komi Republic	496,0	680,0	+4,19
Курганская область Kurgan Region	420,3	510,0	+3,55
Вологодская область Vologda Region	390,0	555,0	+3,29
Архангельская область Arkhangelsk Region	353,0	498,0	+2,98
Ненецкий автономный округ Nenets Autonomous Okrug	348,0	776,5	+2,94
Томская область Tomsk Region	321,0	551,0	+2,71
Республика Саха Sakha Republic	310,0	606,0	+2,62
Ханты-Мансийский автономный округ Khanty-Mansi Autonomous Okrug	295,0	534,0	+2,49
Новосибирская область Novosibirsk Region	290,0	445,0	+2,45
Республика Карелия Republic of Karelia	274,0	477,0	+2,31
Кемеровская область Kemerovo Region	260,0	255,0	+2,19
Пермский край Perm Region	256,0	382,0	+2,16
Ямало-Ненецкий автономный округ Yamalo-Nenets Autonomous Okrug	255,0	420,0	+2,15
Еврейская автономная область Jewish Autonomous Region	254,0	500,2	+2,14
Тюменская область Tyumen Region	250,2	321,2	+2,11
Республика Хакасия Republic of Khakassia	240,4	541,2	+2,03
Удмуртская Республика Udmurt Republic	232,2	452,1	+1,96
Чувашская Республика Chuvash Republic	210,1	342,4	+1,77
Красноярский край Krasnoyarsk Territory	204,2	310,3	+1,72
Республика Тыва Republic of Tyva	323,3	450,1	+2,73

ной болезни, холангиокарциномы, приводят к развитию тяжелых панкреатитов и эрозивных гастродуоденитов. Исходя из выше сказанного, экспертами Всемирной организации здравоохранения описторхисы отнесены к биологическим канцерогенам. Описторхоз нарушает нормальную работу практически всех органов и систем. Помимо желудочно-кишечного тракта, поражаются сердечно-сосудистая, эндокринная и нервная системы [1, 7, 11, 17].

Профилактика описторхоза

Наибольшее эпидемическое значение имеют виды рыб семейства карповых: язь, елец, линь, плотва, лещ, зараженность которых личинками описторхид достигает 60–80%.

Метацеркарии довольно устойчивы во внешней среде, хорошо переносят сушку, высокие концентрации соли и низкие температуры, поэтому основной профилактической мерой против описторхоза является соблюдение технологии приготовления рыбы и рыбопродуктов перед употреблением в пищу. Рыба, потенциально содержащая жизнеспособные личинки опи-

сторхисов, подлежит обеззараживанию, которое осуществляется путем замораживания, посола и тепловой обработки в соответствии с методическими указаниями о профилактике описторхоза, разработанными и утвержденными Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека [3, 10, 18].

Заключение

Анализ литературных источников и отчетов показал, что эпидемическая ситуация по описторхозу остается напряженной, и описторхоз является серьезной проблемой практического здравоохранения не только в России, но и в мире. Несмотря на снижение общей паразитарной заболеваемости в стране, в ряде эндемичных регионов отмечается превышение среднестатистических показателей. Исходя из выше изложенного, важное значение в снижении заболеваемости и недопущении распространения данного паразитоза играет строгое соблюдение профилактических мер.

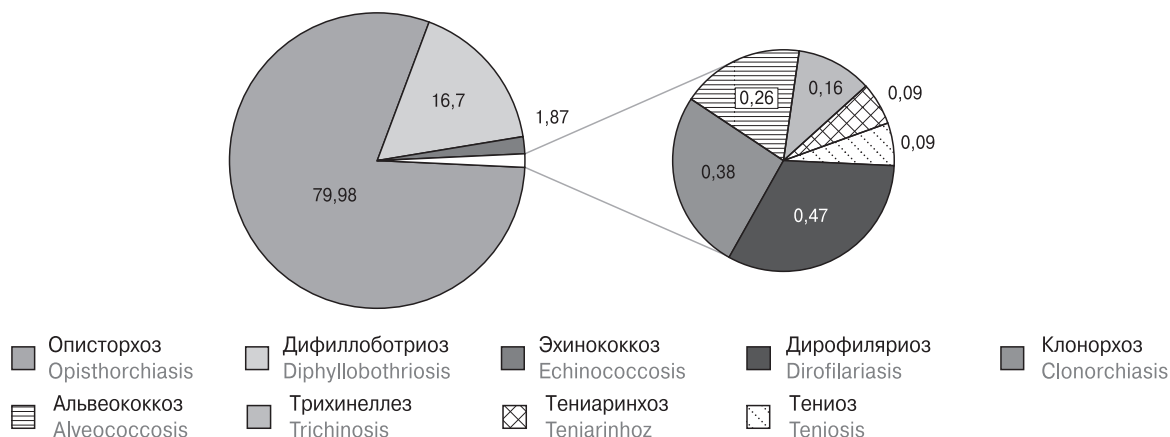


Рисунок 1. Структура биогельминтозов в 2020 г.

Figure 1. 2020 Pattern of biogelminthiasis

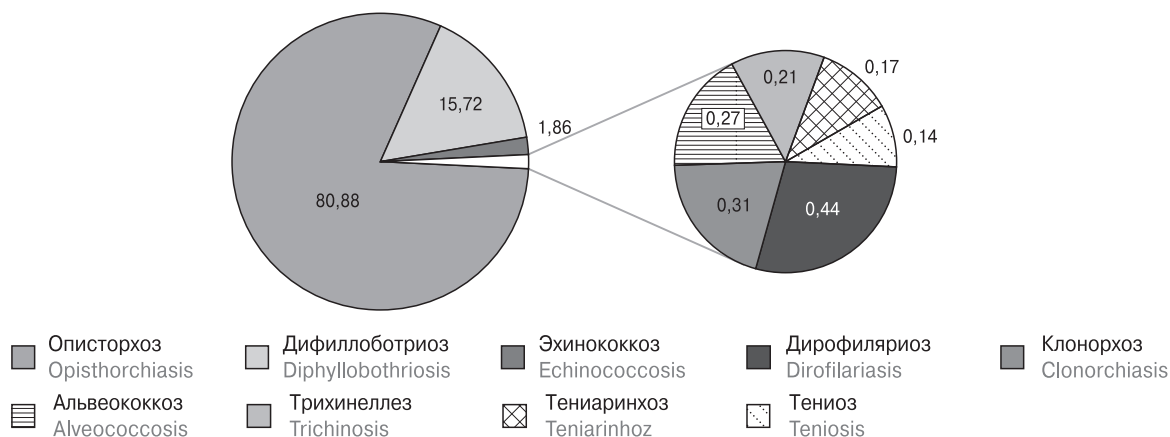


Рисунок 2. Структура биогельминтозов в 2019 г.

Figure 2. 2019 Pattern of biogelminthiasis

Список литературы/References

1. Байкова О.А., Николаева Н.Н., Грищенко Е.Г., Николаева Л.В. Трематодозы печени — описторхоз и клонорхоз: актуальность проблемы и принципы диагностики в современной клинической практике (обзор литературы) // *Acta Biomedica Scientifica*. 2016. Т. 1, № 6. С. 182–190. [Baykova O.A., Nikolaeva N.N., Grishchenko E.G., Nikolaeva L.V. Liver trematode infection — opisthorchiasis and clonorchiasis: actual problems and principles of diagnosis in modern clinical practice (review of literature). *Acta Biomedica Scientifica*, 2016, vol. 1, no. 6, pp. 182–190. (In Russ.)] doi: 10.12737/23825
2. Беэр С.А. Биология возбудителя описторхоза. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2005. 336 с. [Be'er S.A. Biology of the agent of opisthorchiasis. Moscow: KMK Scientific Press Ltd., 2005. 336 p. (In Russ.)]
3. Бибик О.И. Описторхоз — актуальная проблема здравоохранения (обзор и анализ проблемы) // Российский паразитологический журнал. 2020. Т. 14, №4. С. 38–49 [Bibik O.I. Opisthorchosis is a topical health problem (problem overview and analysis). *Rossiiskii parazitologicheskii zhurnal = Russian Journal of Parasitology*, 2020, vol. 14, no. 4, pp. 38–49. (In Russ.)] doi: 10.31016/1998-8435-2020-14-4-38-49
4. Бибик О.И., Кирсанова Д.В., Барсукова В.И. Гельминтозы встречаются гораздо чаще, чем принято об этом думать // Организм и среда жизни (к 205-летию со дня рождения Карла Францевича Рулье): сб. материалов II Межрег. науч.-практ. конф. Кемерово : КемГМУ, 2019. С. 9–17. [Bibik O.I., Kirsanova D.V., Barsukova V.I. Helminthiasis occur much more often than it is customary to think about it. *Organizm i sreda zhizni (k 205-letiyu so dnya rozhdeniya Karla Frantsevicha Rul'e): sbornik materialov II Mezhhreg. nauch.-prakt. konf = The organism and the environment of life (dedicated to the 205th anniversary of K.F. Roulier): materials of the 2nd interregional scientific and practical conference. Kemerovo: Kemerovo State Medical University, 2019. pp. 9–17. (In Russ.)]*
5. Богданов А.О., Прокудина Д.В., Байков А.Н., Салтыкова И.В. Молекулярные механизмы, опосредующие развитие холангиокарциномы в ходе хронической инвазии печеночными сосальщиками // Сибирский онкологический журнал. 2015. № 6. С. 83–90. [Bogdanov A.O., Prokudina D.V., Baykov A.N., Saltykova I.V. Molecular mechanisms that lead to cholangiocarcinoma, during chronic infection of liver flukes *Sibirskii onkologicheskii zhurnal = Siberian Journal of Oncology*, 2015, no. 6, pp. 83–90. (In Russ.)]
6. Бронштейн А.М., Токмалаев А.К. Паразитарные болезни человека: протозоозы и гельминтозы: учебное пособие. М.: Издательство РУДН, 2002. 207 с. [Bronshstein A.M., Tokmalaev A.K. Human parasitic diseases: protozooses and helminthiasis. Moscow: RUDN Publishing, 2002. 207 p. (In Russ.)]
7. Григорьева И.Н. Описторхоз: традиции и инновации // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2012. № 4. С. 54–59. [Grigorieva I.N. Opisthorchosis: traditions and innovations *Ekspierimental'naia i klinicheskaja gastroenterologiya = Experimental & Clinical Gastroenterology*, 2012, no. 4, pp. 54–59. (In Russ.)]
8. Гузеева Т.М. Состояние заболеваемости паразитарными болезнями в Российской Федерации и задачи в условиях реорганизации службы // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 2008. № 1. С. 3–10. [Guzeeva T.M. The incidence of parasitic diseases in the Russian Federation and tasks under service reorganization. *Meditsinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni = Medical Parasitology and Parasitic Diseases*, 2008, no. 1, pp. 3–10. (In Russ.)]
9. Зувевский В.П., Бычков В.Г., Целищева П.В., Хадиева Е.Д. Описторхоз как промотер гастроинтестинального канцерогенеза // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 2015. № 4. С. 7–10. [Zuevsky V.P., Bychkov V.G., Tselishcheva P.V., Khadieva E.D. Opisthorchiasis as a promoter of gastrocancerogenesis. *Meditsinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni = Medical Parasitology and Parasitic Diseases*, 2015, no. 4, pp. 7–10. (In Russ.)]
10. Козлова И.И., Остапенко Н.А., Сисин Е.И., Ежова О.А. Особенности эпидемиологии описторхоза в Ханты-Мансийском автономном округе — Югре на современном этапе // Здоровье югорчан — наш приоритет: материалы межрегиональной науч.-практ. конф. Ханты-Мансийск, 2017. С. 122–127. [Kozlova I.I., Ostapenko N.A., Sisin E.I., Ezhova O.A. Features of the epidemiology of opisthorchiasis in the Khanty-Mansi Autonomous Okrug — Yugra at the present stage & Zdorov'e yugorchan — nash prioritet: materialy mezhhregional'noi nauchno-prakticheskoi konferentsii = The health of Ugra residents is our priority: materials of the interregional scientific and practical conference, Khanty-Mansiysk, 2017, pp. 122–127. (In Russ.)]
11. Кузнецова В.Г., Краснова Е.И., Патурина Н.Г. Описторхоз в клинической практике врача-инфекциониста // Лечащий врач. 2013. № 6. С. 74–78. [Kuznetsova V.G., Krasnova E.I., Patrina N.G. Opisthorchiasis in the clinical practice of an infectious disease doctor. *Lechashchii vrach = The Attending Physician*, 2013, no. 6, pp. 74–78. (In Russ.)]
12. Мордвинов В.А., Фурман Д.П. «Обская болезнь» — недооцененная опасность // Наука в России. 2013. Т. 195, № 3. С. 15–24. [Mordvinov V.A., Furman D.P. "Ob disease" — an underestimated danger. *Nauka v Rossii = Science in Russia*, 2013, vol. 195, no. 3, pp. 15–24. (In Russ.)]
13. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2017 году: Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2018. 268 с. [On the state of sanitary and epidemiological welfare of the population in the Russian Federation in 2017: State Report. Moscow: Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Well-Being, 2018. 268 p. (In Russ.)] URL: https://www.rosпотребнадзор.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=10145
14. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2018 году: Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2019. 254 с. [On the state of sanitary and epidemiological welfare of the population in the Russian Federation in 2018: State Report. Moscow: Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Well-Being, 2019. 254 p. (In Russ.)] URL: https://www.rosпотребнадзор.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=12053
15. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2020 году: Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2021. 256 с. [On the state of sanitary and epidemiological welfare of the population in the Russian Federation in 2020: State Report. Moscow: Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Well-being, 2021. 256 p. (In Russ.)] URL: https://www.rosпотребнадзор.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=18266

16. Описторхоз у взрослых: клинические рекомендации. М.: НП «Национальное научное общество инфекционистов», 2014. 53 с. [Opisthorchiasis in adults: clinical recommendations. Moscow: National Scientific Society of Infectionists, 2014. 53 p. (In Russ.)]
17. Плотникова Е.Ю., Баранова Е.Н. Описторхоз: осложнения и проблемы лечения // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. 2018. № 3. С. 14–18. [Plotnikova E.Yu., Baranova E.N. Opisthorchiasis: complications and treatment problems *Gastroenterologiya Sankt-Peterburga = Gastroenterology of St. Petersburg*, 2018, pp. 14–18. (In Russ.)]
18. Сергиев В.П. Регистрируемая и истинная распространенность паразитарных болезней // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 1991. № 2. С. 3–5. [Sergiev V.P. The registered and true prevalence of parasitic diseases. *Meditsinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni = Medical Parasitology and Parasitic Diseases*, 1991, no. 2, pp. 3–5. (In Russ.)]
19. Шекина Е.Г. Гельминтозы: современный взгляд на проблему // Провизор. 2007. № 12. С. 30–34. [Shchekina E.G. Helminthiasis: a modern view of the problem. *Provizor = Pharmacist*, 2007, no. 12, pp. 30–34. (In Russ.)]
20. Andrews R.H., Sithithaworn P., Petney T.N. Opisthorchis viverrini: an underestimated parasite in world health. *Trends Parasitol.*, 2008, vol. 24, no. 11, pp. 497–501. doi: 10.1016/j.pt.2008.08.011
21. Elkins D.B., Mairiang E., Sithithaworn P., Mairiang P., Chaiyakum J., Chamadol N., Loapaiboon V., Haswell-Elkins M.R. Cross-sectional patterns of hepatobiliary abnormalities and possible precursor conditions of cholangiocarcinoma associated with *Opisthorchis viverrini* infection in humans. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1996, vol. 55, no. 3, pp. 295–301. doi: 10.4269/ajtmh.1996.55.295
22. European Society for Medical Oncology: official website. URL: <http://www.esmo.org> (27.06.2015)

Авторы:

Рябенко Ю.Н., ассистент кафедры биологии и общей генетики ФГАОУ ВО Российский университет дружбы народов, Москва, Россия;

Рябенко Э.Б., к.м.н., доцент кафедры анатомии человека ФГАОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия.

Authors:

Ryabenko Yu.N., Assistant Professor, Department of Biology and General Genetics, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation;

Ryabenko E.B., PhD (Medicine), Associate Professor of the Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 21.03.2023
Принята к печати 02.10.2023

Received 21.03.2023
Accepted 02.10.2023

СЕРОТОНИН И АДРЕНАЛИН КАК ИНГИБИТОРЫ ОБРАЗОВАНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛОВУШЕК НЕЙТРОФИЛОВ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

С.В. Скупневский, Р.В. Савельев

Институт биомедицинских исследований — филиал ФГБУН Федерального научного центра «Владикавказский научный центр Российской академии наук», РСО-Алания, г. Владикавказ, Россия

Резюме. Регуляция процесса нетоза нейтрофилов как провоцирующего фактора развития воспалительных и аутоиммунных заболеваний может составить основу высокоэффективной таргетной терапии. Цель — изучить модифицирующее действие серотонина и адреналина в отношении нетоза при фагоцитозе у крыс. **Материалы и методы.** Крысы линии Wistar, разделенные на контрольную (растворитель, 0,9% раствор NaCl) и опытные (серотонин и адреналин 1,43 и 0,143 мг/кг массы тела соответственно) группы. Внутривентриальное введение затравок — за 90 мин до забора крови, в которой определяли фагоцитарную активность (фагоцитарный индекс и фагоцитарное число) и степень суицидального нетоза нейтрофилов: с полной и частичной деконденсацией хроматина. Сравнение групп проводили с использованием парного критерия Стьюдента (для численных значений) и Мак-Немара (для дихотомических переменных). Степень линейной зависимости между выборками оценивали по критерию Пирсона (r_{xy}). **Результаты.** Введение адреналина способствовало ингибированию нетоза на 41,5% относительно контроля ($p < 0,001$), серотонина — на 27,6% ($p < 0,001$). Соотношение нейтрофилов с полной деконденсацией хроматина и частичной для контрольной группы составило 1,0:0,9; для серотонина оно изменилось до 1,0:1,7, а для адреналина равнялась 1,0:1,4. Фагоцитарный индекс после введения серотонина возрос относительно контрольной группы на 4,9%, в то время как на фоне адреналина он снизился на 12,4% ($p < 0,01$). Выявлена высокая положительная корреляционная связь между нетозом и фагоцитарным индексом для контрольной и опытной с адреналином: $r_{xy} = 0,823-0,997$. Для фагоцитарного числа и нетоза в тех же группах высокая отрицательная корреляция ($r_{xy} = -0,714-(-0,871)$) и заметная положительная — для серотонина ($r_{xy} = 0,638$). **Заключение.** Серотонин и адреналин в терапевтических дозировках способны оказывать выраженное ингибирующее действие в отношении нетоза, что может открывать перспективы к повышению эффективности терапии иммуновоспалительных и онкологических заболеваний. Использование серотонина является более предпочтительным, поскольку он обладает дополнительным иммуномодулирующим действием и не вызывает прямой стимуляции α - и β -адренорецепторов.

Ключевые слова: адреналин, внеклеточные ловушки нейтрофилов, модификация воспаления, нетоз, серотонин, фагоцитарная активность нейтрофилов.

Адрес для переписки:

Скупневский Сергей Валерьевич
363110, Россия, РСО-Алания, г. Владикавказ, ул. Вильямса, 1,
Институт биомедицинских исследований — филиал ФГБУН ФНЦ
Владикавказский научный центр РАН.
Тел.: 8 988 871-55-28.
E-mail: dreammas@yandex.ru

Contacts:

Sergey V. Skupnevskiy
363110, Russian Federation, RNO-Alania, Vladikavkaz,
Vil'yamsa str., 1, Institute of Biomedical Research,
Affiliate of Vladikavkaz Scientific Center of RAS.
Phone: +7 988 871-55-28.
E-mail: dreammas@yandex.ru

Для цитирования:

Скупневский С.В., Савельев Р.В. Серотонин и адреналин как ингибиторы образования внеклеточных ловушек нейтрофилов в эксперименте // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 4. С. 823–826. doi: 10.15789/2220-7619-SAA-17558

Citation:

Skupnevskii S.V., Saveljjev R.V. Serotonin and adrenaline as inhibitors of neutrophil extracellular traps formation (experimental study) // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 4, pp. 823–826. doi: 10.15789/2220-7619-SAA-17558

SEROTONIN AND ADRENALINE AS INHIBITORS OF NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS FORMATION (EXPERIMENTAL STUDY)

Skupnevskii S.V., Saveljev R.V.

Institute of Biomedical Investigations — the Affiliate of Vladikavkaz Scientific Centre of RAS, RNO-Alania, Vladikavkaz, Russian Federation

Abstract. Regulation of the NETosis can provoke cancer, inflammatory and autoimmune diseases and become a basis for effective targeted therapy. The aim: to study the modifying effects of serotonin and adrenaline on NETosis during phagocytosis in rats. *Materials and methods.* Wistar rats were divided into control (solvent, 0.9% NaCl solution) and experimental (serotonin and adrenaline 1.43 and 0.143 mg/kg body weight, respectively) groups. Intraperitoneal injection of test substances was carried out 90 minutes before blood sampling, in which phagocytic activity (PhA), phagocytic index (PhI) and degree of suicidal neutrophil NETosis were determined: with total and partial chromatin decondensation (TCD, PCD, accordingly). A paired Student's t test was used to compare groups with numerical values and McNemar's test (for dichotomous variables). Pearson's linear correlation coefficient (r_{xy}) was assessed to measure a linear relationship between time points. *Results.* The administration of adrenaline contributed to NETosis inhibition by 41.5% compared to control group ($p < 0.001$), serotonin — by 27.6% ($p < 0.001$). The ratio of neutrophils with total and partial chromatin decondensation for control group was 1.0:0.9; for serotonin and adrenaline it changed to 1.0:1.7 and 1.0:1.4, respectively. Relative to control group, phagocytic index after serotonin administration increased by 4.9%, in case of adrenaline, on the contrary, it decreased by 12.4% ($p < 0.01$). A high positive correlation was revealed between NETosis and phagocytic index for control group and experimental group with adrenaline: $r_{xy} = 0.823-0.997$. For phagocytic index and NETosis in these groups there was a high negative ($r_{xy} = -0.714-(-0.871)$) and a noticeable positive correlation for serotonin ($r_{xy} = 0.638$). *Conclusion.* Serotonin and adrenaline in therapeutic dosages have a pronounced inhibitory effect on NETosis, which may pave the avenue for increasing the effectiveness of therapy for immunoinflammatory and oncological diseases. The use of serotonin is preferable because it has additional immunomodulatory effects and cause no direct stimulation of α - and β -adrenergic receptors.

Key words: *adrenaline, extracellular traps of neutrophils, modification of inflammation, NETosis, phagocytic activity of neutrophils, serotonin.*

Введение

Важная роль формирования внеклеточных ловушек нейтрофилов (neutrophil extracellular traps, NET) при фагоцитозе микроорганизмов, а также в патогенезе аутоиммунных заболеваний (ревматоидный артрит, системная красная волчанка, псориаз и др. [1]) определяет высокий интерес исследователей к изучению механизмов данного феномена. В работе Волкова Д.В. и соавт. [2] отмечается, что внеклеточные ловушки нейтрофилов оказывают стимулирующее влияние на рост и метастазирование солидных опухолей и в то же время за счет пространственной преграды значительно снижают эффективность CAR-T-лимфоцитарной терапии (Chimeric Antigen Receptor T-Cell). И.И. Долгушин и Е.А. Мезенцева приводят результаты исследований нетоза, способствующего переходу *P. aeruginosa* от высокорепликативного планктонного существования к пленочному, что предотвращает проникновение возбудителя в головной мозг мышей при инокуляции бактерий на роговицу животных и выявляет один из эволюционно закрепленных защитных механизмов [4]. Изначальное представление о том, что нетоз — одна из новых форм клеточной гибели, в последнее время значительно расширилось, поскольку обосновано его непосредственное участие в воспалении и аутоиммунитете за счет индукции образования антител, иммунных комплексов, активных форм

кислорода (АФК), азота, а также выброса аларминов в виде ядерной, митохондриальной ДНК и другого внутриклеточного содержимого [3].

Определяется роль нетоза в таргетной терапии атерогенного воспаления, которая способна значительным образом снизить риски атеротромботических осложнений [10]. Все это определяет актуальность поиска эффективных и безопасных средств для управления процессами выброса хроматина и формирования NET.

Цель — изучить модифицирующее действие серотонина и адреналина в отношении нетоза при фагоцитозе у крыс.

Материалы и методы

Исследование провели на 9 крысах линии Wistar массой 270–290 г, разделенных на три равные группы. Первая группа — контроль (внутрибрюшинное (в/б) введение растворителя — физиологического раствора эквивалентно с опытными группами). Вторая группа (опытная) — в/б введение серотонина (серотонина адипинат, раствор для введения (ООО «ЛОПП+К», Россия) из расчета 1,43 мг/кг массы тела (м.т.). Третья группа (опытная) — в/б введение адреналина (эпинефрина гидрохлорид) (ФГУП «Московский эндокринный завод», Россия) из расчета 0,143 мг/кг м.т.

Через 90 мин после введения препаратов под общим рауш-наркозом у животных из сердца отбирали кровь, которую стабилизировали ге-

парином с конечной концентрацией антикоагулянта 50 МЕ/мл. Образцы крови, подогретые до 37°C, смешивали в соотношении 10:1 с суспензией туши, разведенной 1:1000 физиологическим раствором и инкубировали в термостате в течение 30 мин при 37°C для оценки индуцированного нетоза и при 38°C для оценки фагоцитарной активности [7]. После инкубации кровь тщательно перемешивали и делали мазки на аппарате «Vision» (Австрия). Микропрепараты высушивали при комнатной температуре и фиксировали 25 мин при 37°C в парах формалина. Окрашивали 0,5% раствором метиленового синего в течение 2–3 мин. Оценивали процент суицидального нетоза с частичной и полной деконденсацией хроматина (ЧДХ и ПДХ), анализируя по 150 нейтрофилов на крысу. Определяли фагоцитарную активность (100 клеток на крысу), рассчитывая фагоцитарный индекс (ФИ, количество клеток, вступивших в фагоцитоз) и фагоцитарное число (ФЧ, среднее количество частиц, поглощенных клетками) с помощью микроскопа «Минимед-2». Сравнение гипотез проводили для двух связанных групп (контроль/опыт) по парному критерию Стьюдента — для количественного признака с нормальным распределением — фагоцитарного числа; критерию Мак-Немара — для качественного дихотомического признака — нетоза (и его разновидностей: ПДХ/ЧДХ) и фагоцитарного индекса. Нормальность распределения выборки значений ФЧ проверяли по критерию Шапиро–Уилка (при уровне значимости $\alpha = 0,05$). Коэффициент корреляции рассчитывали по критерию Пирсона (r_{xy}). Данные обрабатывали в Excel, вычисляя среднее значение и стандартное отклонение $M \pm \sigma$ (для численного значения); достоверность различий проверяли с помощью онлайн калькулятора (<https://medstatistic.ru/calculators.html>).

В работе с лабораторными животными придерживались правил и этических норм содержания и ухода, описанных в руководстве National Research Council, 2011 г. и ГОСТ Р53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики» с разрешения этического комитета при Институте биомедицинских исследований РАН.

Результаты и обсуждение

В ходе исследования был установлен выраженный нетоз-ингибирующий и фагоцитоз-модулирующий эффекты адреналина и серотонина в условиях *in vivo* (табл.).

Из таблицы видно, что введение биогенных аминов приводит к общему снижению образования NET и изменению морфологии самих ловушек. Из двух сравниваемых препаратов адреналин оказал более выраженное ингибирование нетоза — на 41,5% (относительно контроля), серотонин — на 27,6%. Соотношение нейтрофилов с полной деконденсацией хроматина и частичной для контрольной группы составило 1,0:0,9, в то время как для серотонина оно изменилось до 1,0:1,7, а для адреналина равнялось 1,0:1,4.

Выгодным свойством, отличающим серотонин от адреналина, явилось стимулирование фагоцитоза, который превысил показатели контрольной группы на 4,9%, что сопровождалось дополнительно увеличением фагоцитарного числа. Для адреналина падение фагоцитарной активности составило 12,4% (относительно животных контрольной группы).

По шкале Чеддока для контрольной группы и опытной с адреналином, выявляется высокая положительная корреляционная связь между нетозом и фагоцитарным индексом. Для серотонина теснота связи — умеренная, а характер корреляции — обратный. Для фагоцитарного числа и нетоза выявлена аналогичная тенденция: отрицательная высокая корреляция для контрольной группы и эпинефрина и заметная положительная корреляция для серотонина.

Обнаруженные эффекты могут быть объяснены рядом общих биологических и химических свойств серотонина и адреналина. В первую очередь, обе молекулы являются активаторами тромбоцитов, которые, как известно, выступают одним из факторов врожденного иммунитета, образуя тромбоцитарно-лейкоцитарные комплексы [6]. В частности, благодаря наличию рецепторов к патогенам (например, TLR4 (Toll-like receptor) к бактериальным липополисахаридам) кровяные пластинки могут непосредственным

Таблица. Результаты исследования фагоцитарной активности и индуцированного нетоза у крыс

Table. Results of rat phagocytic activity and induced NETosis

Группа Group	NET, %	ПДХ, % TCD, %	ЧДХ, % PCD, %	ФИ, % PhA, %	ФЧ, $M \pm \sigma$ Phl	r_{xy} (ФИ/NET) (PhA/NET)	r_{xy} (ФЧ/NET) (Phl/NET)
Контроль/Control	21,7	11,3	10,4	47,7	1,8±0,4	0,997	-0,714
Серотонин/Serotonin	15,7***	5,9***	9,8***	52,6	2,0±0,3	-0,418	0,638
Адреналин/Adrenaline	12,7***	5,3***	7,4***	35,3**	1,5±0,2	0,823	-0,871

Примечание. *** — $p < 0,001$; ** — $p < 0,01$ относительно контрольной группы по критерию Мак-Немара; статистические различия ФЧ «контроль/опыт» незначимые по парному критерию Стьюдента.

Note. *** — $p < 0.001$; ** — $p < 0.01$ compared with control group assessed by McNemar criterion; statistical differences for Phl in control/experience parameter are insignificant according to Student's paired criterion.

образом изменять активность нейтрофилов, влияя на реактивность клеточного звена иммунитета [9]. Во-вторых, исследуемые биогенные амины проявляют выраженные антиоксидантные свойства и могут купировать образование АФК — пускового звена в механизме дегрануляции и выброса хроматина нейтрофилами.

Изменение фагоцитарной активности, изученное в ходе эксперимента, находится в полном соответствии с данными из научной литературы, где показано, что серотонин повышает общую фагоцитарную активность [8], а катехоламины, наоборот, ее снижают [5]. Результаты корреляционного анализа проявляют механизм образования ловушек нейтрофилов с серотонином, отличный от контрольной группы и опыт-

ной, подвергнутой воздействию адреналина. Отличительным признаком животных, получавших серотонин, является повышение фагоцитарной активности на фоне снижения NET.

Таким образом, серотонин и адреналин в терапевтических дозировках способны оказывать выраженное ингибирующее действие в отношении нетоза, что может открывать перспективы к повышению эффективности терапии иммуновоспалительных и онкологических заболеваний. Использование серотонина является более предпочтительным, поскольку он обладает дополнительным иммуномодулирующим действием, повышая фагоцитарную активность нейтрофилов, и не вызывает прямой стимуляции α - и β -адренорецепторов.

Список литературы/References

- Бедина С.А., Мозговая Е.Э., Трофименко А.С., Мамус М.А., Спицина С.С., Зборовская И.А. Внеклеточные ловушки нейтрофилов: динамика образования, ассоциированная с переходом от ремиссии к активному ревматоидному артриту // Сибирское медицинское обозрение. 2022. № 6. С. 86–92. [Bedina S.A., Mozgovaya E.E., Trofimenko A.S., Mamus M.A., Spitsyna S.S., Zborovskaya I.A. Neutrophil extracellular traps: formation dynamics associated with the transition from remission to active rheumatoid arthritis. *Sibirskoe meditsinskoe obozrenie = Siberian Medical Review*, 2022, no. 6, pp. 86–92. (In Russ.)] doi: 10.20333/25000136-2022-6-86-92
- Волков Д.В., Тец Г.В., Рубцов Ю.П., Степанов А.В., Габибов А.Г. Внеклеточные ловушки нейтрофилов (NET): перспективы таргетной терапии // Acta Naturae. 2021. № 3. С. 15–23. [Volkov D.V., Tets G.V., Rubtsov Yu.P., Stepanov A.V., Gabibov A.G. Extracellular neutrophil traps (NET): prospects for targeted therapy. *Acta Naturae*, 2021, no. 3, pp. 15–23. (In Russ.)]
- Воробьева Н.В. Нейтрофильные внеклеточные ловушки: новые аспекты // Вестник Московского университета. Серия 16. Биология. 2020. Т. 75, № 4. С. 210–225. [Vorob'eva N.V. Neutrophil extracellular traps: new aspects. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 16. Biologiya = Herald of Moscow University. Series 16. Biology*, 2020, vol. 75, no. 4, pp. 210–225. (In Russ.)]
- Долгушин И.И., Мезенцева Е.А. Нейтрофильные внеклеточные ловушки в борьбе с биофильнообразующими микроорганизмами: охотники или добыча? // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2020. Т. 97, № 5. С. 468–481. [Dolgushin I.I., Mezentseva E.A. Neutrophil extracellular traps in the fight against biofilm-forming microorganisms: hunters or prey? *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2020, vol. 97, no. 5, pp. 468–481. (In Russ.)] doi: 10.36233/0372-9311-2020-97-5-9
- Кривохижина Л.В., Осиков М.В. Современные представления о регуляции неспецифической защиты в организме // Человек. Спорт. Медицина. 2005. Т. 1, № 4 (44). С. 88–94. [Krivokhizhina L.V., Osikov M.V. Modern ideas about the regulation of nonspecific protection in the body. *Chelovek. Sport. Meditsina = Human. Sport. Medicine*, 2005, vol. 1, no. 4 (44), pp. 88–94. (In Russ.)]
- Павлов О.В., Чепанов С.В., Селютин А.В., Сельков С.А. Тромбоцитарно-лейкоцитарные взаимодействия: иммунорегуляторная роль и патофизиологическое значение // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 5. С. 871–888. [Pavlov O.V., Chepanov S.V., Selutin A.V., Selkov S.A. Platelet-leukocyte interactions: immunoregulatory role and pathophysiological relevance. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2022, vol. 24, no. 5, pp. 871–888. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-PLI-2511
- 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.)]
- Herr N., Bode C., Duerschmied D. The effects of serotonin in immune cells. *Front. Cardiovasc. Med.*, 2017, no. 4: 48. doi: 10.3389/fcvm.2017.00048
- Rai G. NETosis: Immunity, pathogenesis and therapeutics drug development. *Academic Press*, 2019. 200 p.
- Van A.K., Maegdefessel L., Soehnlein O. Therapeutic targeting of neutrophil extracellular traps in atherogenic inflammation. *Thromb. Haemost.*, 2019, vol. 119, no. 4, pp. 542–552. doi: 10.1055/s-0039-1678664

Авторы:

Скупневский С.В., д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории субклеточных структур отдела молекулярных и клеточных механизмов аутоиммунных заболеваний Института биомедицинских исследований — филиала ФГБУН ФНЦ Владикавказский научный центр РАН, г. Владикавказ, Россия;
Савельев Р.В., старший лаборант лаборатории субклеточных структур отдела молекулярных и клеточных механизмов аутоиммунных заболеваний Института биомедицинских исследований — филиала ФГБУН ФНЦ Владикавказский научный центр РАН, г. Владикавказ, Россия.

Authors:

Skupnevskiy S.V., DSc (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Subcellular Structures, Department of Molecular and Cellular Mechanisms of Autoimmune Diseases, Institute of Biomedical Research, Affiliate of Vladikavkaz Scientific Center of the RAS, Vladikavkaz, Russian Federation;
Saveljev R.V., Senior Laboratory Assistant, Laboratory of Subcellular Structures, Department of Molecular and Cellular Mechanisms of Autoimmune Diseases, Institute of Biomedical Research, Affiliate of Vladikavkaz Scientific Center of the RAS, Vladikavkaz, Russian Federation.

Поступила в редакцию 20.12.2023
 Принята к печати 08.08.2024

Received 20.12.2023
 Accepted 08.08.2024

ЛАБОРАТОРНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ СЕРОМОНИТОРИНГА ПОСТВАКЦИНАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА ПРОТИВ КОКЛЮША

М.В. Видманова^{1,2}

¹ ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава РФ, г. Самара, Россия

² ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в Самарской области, г. Самара, Россия

Резюме. Одним из направлений эпидемиологического надзора за коклюшем является наблюдение за формированием гуморального иммунитета в индикаторной группе детей 3–4 лет с завершённой вакцинацией против коклюша и оценка доли серонегативных лиц. Это является прогностическим показателем для комплексной оценки заболеваемости в регионе. Применяемая для этого ранее реакция агглютинации (РА) стала вымещаться иммуноферментным анализом (ИФА). При этом возник вопрос об адекватности применения ИФА у лиц, привитых цельноклеточными вакцинами, и вопрос корректности интерпретация массовых результатов без унифицированного референтного значения IgG. Цель исследования — оценить напряжённость гуморального противокклюшного популяционного иммунитета методом ИФА, определить особенности гуморальной защиты у привитых различными типами вакцин, выявить возрастные особенности, сформулировать рекомендации по оценке массовых результатов серомониторинга на основе сличительных исследований. За 2016–2020 гг. обследованы полностью привитые от коклюша дети ($n = 1729$) Самарской области; они распределены на 4 возрастные группы (< 3 , 3–4 года, 5–7 лет, $\geq 7,1$ лет) и на 3 группы по типу вакцинации: клеточные вакцины, бесклеточные вакцины, комбинированная. Биоматериал — сыворотка крови с выбраковкой несвоевременно отобранных и некачественных образцов. Для проведения ИФА использовано 2 набора, предназначенных для оценки поствакцинального иммунитета согласно инструкции производителя. Оба набора позволяют количественно определять IgG к *B. pertussis*, отличаются по единицам измерения и референтным значениям. Статистический анализ выполнен на программе StatTech v.2.6.2 (ООО «Статтех»). По результатам исследования наибольшая доля серонегативных детей находилась в группе привитых клеточными вакцинами, наименьшая среди привитых бесклеточными вакцинами. Установлено, что доля серонегативных привитых детей в «индикаторной группе» достигает 55,2%, что существенно выше допустимого уровня в 10,0%, и отличается в большую сторону от литературных данных (30–40%), полученных преимущественно при использовании РА. Это может указывать на некорректность интерпретации результатов оценки именно поствакцинального иммунитета строго по референтным критериям иностранных производителей ИФА-наборов, в частности у привитых цельноклеточными вакцинами. Предложен способ расчёта доли серонегативных лиц среди привитых от коклюша с использованием прогностической ценности отрицательных результатов применяемого набора в виде поправочного коэффициента. Необходимые значения прогностической ценности результатов были получены в ходе сличительных исследований случайной выборки сывороток крови от детей 3–4 лет ($n = 70$) с применением двух наборов для проведения ИФА («RIDASCREEN® Bordetella»

Адрес для переписки:

Видманова Мария Владимировна
440099, Россия, г. Самара, ул. Чапаевская, 89,
ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский
университет Минздрава РФ.
Тел.: 8 (927) 746-37-29.
E-mail: maria.vidmanova17@yandex.ru

Contacts:

Maria V. Vidmanova
440099, Russian Federation, Samara, Chapaevskaya str., 89,
Samara State Medical University of the Ministry of Health of Russia.
Phone: +7 (927) 746-37-29.
E-mail: maria.vidmanova17@yandex.ru

Для цитирования:

Видманова М.В. Лабораторное обеспечение серомониторинга поствакцинального иммунитета против коклюша // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 4. С. 827–832. doi: 10.15789/2220-7619-LSF-17536

Citation:

Vidmanova M.V. Laboratory support for seromonitoring of anti-pertussis post-vaccination immunity // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 4, pp. 827–832. doi: 10.15789/2220-7619-LSF-17536

© Видманова М.В., 2024

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-LSF-17536>

и «SeroPertussis™ IgG») и построением внутрилабораторной сличительной панели. Для достоверной оценки доли серонегативных лиц в популяции следует отдавать предпочтение наборам с большей прогностической ценностью негативных результатов.

Ключевые слова: коклюш, индикаторная группа, поствакцинальный иммунитет, гуморальный иммунитет, иммуноферментный анализ, прогностическая ценность результатов.

LABORATORY SUPPORT FOR SEROMONITORING OF ANTI-PERTUSSIS POST-VACCINATION IMMUNITY

Vidmanova M.V.^{a,b}

^a Samara State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Samara, Russian Federation

^b Hygienic and Epidemiological Centre in the Samara Region, Samara, Russian Federation

Abstract. Monitoring of humoral immunity in 3–4 year-old anti-pertussis vaccinated children is one of the approaches for pertussis epidemiological surveillance. It's a predictive indicator for comprehensive assessment of morbidity in the region. The agglutination reaction (RA) used earlier has been displaced with enzyme immunoassay (ELISA). So, two questions arose: regarding i) a relevance of using ELISA in whole-cell vaccinated individuals, and ii) correctness of large-scale data interpretation without applying a unified IgG reference value. Study aims were to assess humoral anti-pertussis population immunity by ELISA, to determine features of humoral protection in vaccinated subjects after using various vaccine types, to identify age features, to make recommendations for evaluating seromonitoring data. Blood serum samples from anti-pertussis vaccinated children in Samara region (n = 1729) were examined in 2016–2020; children were divided into 4 age groups (< 3, 3–4, 5–7, ≥ 7.1 years) and into 3 type vaccines groups: cellular, acellular and combined. We used two ELISA kits, which are designed to assess post-vaccination immunity, according to the manufacturer's instructions, quantifying IgG against *B. pertussis*, which differ in units and reference values. Statistical analysis was performed using StatTech program v.2.6.2. The largest and smallest percentage of seronegative children was in the cellular-vaccinated and acellular-vaccinated group, respectively. Seronegative percentage in the “indicator group” reaches 55.2% being significantly higher than acceptable 10.0%-level, and differs from the literature data (30–40%), which were obtained mainly with RA. This may suggest about an incorrect interpretation of post-vaccination immunity data evaluation strictly according to manufacturers' reference criteria, especially for whole-cell vaccinated subjects. A method for calculating the seronegative percentage is proposed that relies on the prognostic negative data level as a correction factor. The required values were obtained during comparison studies of random serum samples from 3–4-year-old children (n = 70) using two ELISA kits (“RIDASCREEN® Bordetella”, “SeroPertussis™ IgG”) and intra-laboratory comparison panel. It should be given preference for sets with a greater prognostic negative data level, if population seronegative percentage is assessed.

Key words: pertussis, indicator group, post-vaccination immunity, humoral immunity, enzyme immunoassay, prognostic value of results.

Введение

Коклюш — актуальная инфекция [3, 5]. Одним из направлений эпидемиологического надзора за коклюшем в России и других странах (МКБ-10: A37.0/A37.1/A37.8/A37.9) является наблюдение за формированием гуморального иммунитета у лиц с завершённой вакцинацией; в нашей стране — в индикаторной группе детей 3–4 лет [2, 6, 9, 13]. Доля серонегативных лиц в индикаторной группе является прогностическим показателем для комплексной оценки заболеваемости в регионе; приемлемой считается доля серонегативных лиц не более 10% [6, 9]. На усмотрение эпидемиолога серологическое обследование может быть проведено в дополнительных возрастных группах, а применяемая ранее реакция агглютинации (РА) может быть заменена иммуноферментным анализом (ИФА). Метод ИФА в зарубежных странах широко применяется для сероэпидеми-

ческих исследований поствакцинального и постинфекционного противокклюшного иммунитета, однако в России применение метода ИФА для этой цели вызывает ряд вопросов:

- адекватность применения ИФА для серомониторинга противокклюшного иммунитета у лиц, привитых цельноклеточными вакцинами;
- интерпретация массовых результатов без унифицированного референтного значения противокклюшных иммуноглобулинов G (IgG) (вариации у разных ИФА-наборов), в то время как для РА минимальный защитный титр (1:160) однозначно указан в действующих нормативных документах [6].

Цель исследования — оценить состояние противокклюшного популяционного иммунитета в индикаторной и в смежных возрастных группах, сформулировать рекомендации по его оценке.

Материалы и методы

За период 2016–2020 гг. обследованы полностью привитые от коклюша дети ($n = 1729$) Самарской области; они распределены на возрастные группы:

- < 3 лет, $n = 46$ (2,7%, ДИ: 2,0–3,5);
- 3–4 года, $n = 1427$ (82,5%, ДИ: 80,7–84,3);
- 5–7 лет, $n = 145$ (8,4%, ДИ: 7,1–9,8);
- $\geq 7,1$ лет, $n = 111$ (6,4%, ДИ: 5,3–7,7).

Также обследуемые распределены на 3 группы по типу вакцинации: клеточные вакцины — $n = 1657$ (95,8%, ДИ: 94,8–96,7); бесклеточные вакцины — $n = 44$ (2,5%, ДИ: 1,9–3,4); комбинация клеточных и бесклеточных вакцин — $n = 28$ (1,6%, ДИ: 1,1–2,3).

Биоматериал — сыворотка венозной крови (интервал между датой RV1 и датой обследования ≥ 3 месяца); исключены гемолизированные, мутные и хилезные образцы. Использованы наборы ИФА, пригодные для серомониторинга поствакцинального иммунитета, согласно инструкциям производителей:

«RIDASCREEN® Bordetella» (R-Biopharm AG, Германия) — количественное определение IgG к *B. pertussis* 4-параметрическим методом. Содержание IgG > 18 Ед/мл оценивалось как наличие иммунитета к *B. pertussis*. Набор использовался для массовых исследований.

«SeroPertussis™ IgG» (Savyondiagnosics, Израиль) — количественное определение IgG к *B. pertussis* по калибровочной кривой. Содержание IgG ≥ 10 СвЕд/мл считалось положительным. Набор использовался только для слитительных исследований.

Исследование одобрено комитетом по биоэтике при Самарском государственном медицинском университете, протокол № 212 от 11.11.2020 г. Для статистического анализа использована программа StatTech v.2.6.2 (ООО «Статтех», Россия). Категориальные данные описаны с указанием абсолютных значений и процентных долей. Сравнение процентных

долей при анализе многопольных таблиц сопряженности выполнено с помощью критерия Хи-квадрат Пирсона.

Результаты и обсуждение

В данном исследовании суммарная доля серонегативных привитых детей более 10%. При анализе зависимости гуморальной противококклюшной защиты, определяемой методом ИФА, от типа вакцинации установлены статистически значимые различия ($p < 0,001$): наибольшая доля обследуемых с отсутствием гуморальной защиты против коклюша отмечалась у привитых клеточными вакцинами, наименьшая — среди привитых бесклеточными вакцинами (табл. 1). Сравнительные исследования эффективности противокклюшных вакцин, проводимые в период применения разных типов вакцин в европейских странах, также отмечали низкую эффективность цельноклеточных вакцин по сравнению с бесклеточными при определении защитных антител методом ИФА [11].

Также был проведен анализ напряженности противокклюшного иммунитета у привитых детей в зависимости от принадлежности к одной из 4 возрастных групп (табл. 2).

Достоверно установлено: доля серонегативных привитых детей в возрасте < 3 лет 52,2%, она увеличивается до 55,2% в «индикаторной группе», что существенно выше допустимых 10,0%; и далее до 61,4% в группе старших дошкольников. Доля серонегативных детей в группе школьников снижается по сравнению с предшествующей группой до 40,5%, что свидетельствует о естественной иммунизации [4]. Полученная методом ИФА доля серонегативных детей в «индикаторной группе» (55,2%) отличается в большую сторону от литературных данных (30–40%), полученных преимущественно при использовании РА [2, 7]. Это может указывать на некорректность интерпретации

Таблица 1. Гуморальная защита от коклюша у детей, привитых разными типами вакцин

Table 1. Humoral protection against pertussis in various type vaccinated children

Интерпретация результатов ИФА Interpretation of ELISA data	Тип вакцинации Vaccine type		
	Клеточная Cellular	Бесклеточная Acellular	Смешанная Hybrid
Гуморальная защита отсутствует (IgG < 14 Ед/мл) No humoral protection (IgG < 14 U/ml)	926 (55,9%)	9 (20,5%)	11 (39,3%)
Гуморальная защита недостаточная (IgG ≥ 14 Ед/мл и IgG ≤ 18 Ед/мл) Insufficient humoral protection (IgG ≥ 14 U/ml and IgG ≤ 18 U/ml)	143 (8,6%)	5 (11,4%)	3 (10,7%)
Гуморальная защита достаточная (IgG > 18 Ед/мл) Humoral protection is sufficient (IgG > 18 U/ml)	588 (35,5%)	30 (68,2%)	14 (50,0%)

Таблица 2. Гуморальная защита от коклюша у детей различных возрастных групп

Table 2. Anti-pertussis humoral protection in different pediatric age groups

Интерпретация результатов ИФА Interpretation of ELISA data	Возраст обследуемых, годы Age of the subjects, years			
	< 3*	3–4*	5–7**	≥ 7,1**
Гуморальная защита отсутствует (IgG < 14 Ед/мл) No humoral protection (IgG < 14 U/ml)	24 (52,2%)	788 (55,2%)	89 (61,4%)	45 (40,5%)
Гуморальная защита недостаточная (IgG ≥ 14 Ед/мл и IgG ≤ 18 Ед/мл) Insufficient humoral protection (IgG ≥ 14 U/ml and IgG ≤ 18 U/ml)	2 (4,3%)	134 (9,4%)	9 (6,2%)	6 (5,4%)
Гуморальная защита достаточная (IgG > 18 Ед/мл) Sufficient humoral protection (IgG > 18 U/ml)	20 (43,5%)	505 (35,4%)	47 (32,4%)	60 (54,1%)

Примечание. Установлены статистически значимые различия *p = 0,002, **p = 0,011.

Note. Significant differences, *p = 0.002, **p = 0.011.

результатов серомониторинга противокклюшного иммунитета по референтным критериям иностранных ИФА наборов и на необходимость уточнения референтных уровней противокклюшных IgG для применения в отечественной эпидемиологии.

Низкий уровень гуморальной противокклюшной защиты, определяемый в реакции ИФА у привитых цельноклеточными вакцинами, однако, не является поводом для отказа от данного типа вакцин [1]. Согласно актуальным публикациям оптимальная защита от *B. pertussis* является многофакторной, требующей гуморальных и клеточных реакций. Бесклеточные противокклюшные вакцины индуцируют Th2-опосредованные иммунные реакции, которые не предотвращают колонизацию слизистых, что способствует распространению коклюшной инфекции в популяции. Цельноклеточные вакцины, напротив, индуцируют Th1- и Th17-опосредованные иммунные реакции, обеспечивающие выведение бактериального агента и долговременную защиту [12]. Другие авторы обосновывают эффективность цельноклеточных противокклюшных вакцин в рамках проспективных эпидемиологических наблюдений: так в группе, получавшей либо цельноклеточную вакцину, либо комбинацию обеих вакцин, заболеваемость коклюшем была ниже среди младенцев и детей дошкольного возраста, чем среди детей школьного возраста [14].

Таким образом, цельноклеточные противокклюшные вакцины на современном этапе вновь обрели статус наиболее эффективных и рекомендованы к широкому применению [10]. Однако серомониторинг их иммуногенности требует новых подходов к лабораторному обеспечению и к интерпретации результатов.

На современном этапе стандартизация оценки противокклюшного популяционного иммунитета представляет актуальную проблему не только в России, но и за рубежом; это обусловлено разнообразием применяемых вакцин

против коклюша, вариативностью их антигенного состава, а также разнообразием комбинаций коклюшных антигенов, единиц измерения и их референтных значений у зарегистрированных наборов ИФА [13]. В России эта ситуация осложняется отсутствием зарегистрированных отечественных наборов ИФА для оценки поствакцинального противокклюшного иммунитета, а выбор наиболее близкого по антигенному составу зарубежного набора не всегда возможен по коммерческим причинам.

В практическом здравоохранении для оценки массовых ИФА результатов серомониторинга противокклюшного поствакцинального иммунитета, а именно доли серонегативных лиц, возможен вариант применения поправочного коэффициента. В качестве него предлагается использовать расчетный показатель «прогностическая ценность отрицательных результатов», который возможно определить в сравнительных исследованиях с идентичным ИФА-набором или эталонным набором реагентов с известным референтным значением. Для оценки доли серонегативных лиц очевидным является выбор наборов с наибольшей специфичностью.

В рамках данного исследования для определения прогностической ценности результатов IgG к *B. pertussis* была исследована случайная выборка сывороток крови от детей 3–4 лет (n = 70) параллельно первым и вторым набором. При использовании первого набора получено 40 положительных и 30 отрицательных результатов; второго — 44 и 26 соответственно. В сравнительной внутрилабораторной панели образцы распределились следующим образом: истинно-положительных (a) — 38; ложноположительных (b) — 2; ложноотрицательных (c) — 6; истинно-отрицательных (d) — 24. Точность результатов определялась по формуле: $((a+d)/(a+b+c+d)) \times 100\%$, и составила 88,6%, или 0,886.

Для набора «RIDASCREEN® Bordetella» прогностическая ценность положительных результатов составила 95,0% (0,950); отрицательных —

80,0% (0,800). Для набора «SeroPertussis™ IgG» прогностическая ценность положительных результатов составила 86,4% (0,864); отрицательных — 92,3% (0,923).

Интерпретация массовых ИФА результатов с учетом прогностической ценности может выглядеть следующим образом: доля серонегативных детей в индикаторной группе 3–4 лет составляет 0,552 (55,2%), но с учетом известной прогностической ценности отрицательных результатов используемого набора («RIDASCREEN® Bordetella») она будет расчетной и составит $0,552 \times 0,800 = 0,442$ (44,2%). Этот показатель сопоставим с результатами, полученным при использовании РА (30–40%).

Выводы

Доля серонегативных привитых от коклюша детей в Самарской области существенно выше рекомендованных 10% и максимальна в группе привитых клеточными вакцинами, что может

являться неблагоприятным признаком для прогноза по заболеваемости коклюшем в регионе.

Процентная доля серонегативных лиц с завершенной вакцинацией минимальная в группе детей младше 3 лет, в последующих возрастных группах она достоверно увеличивается до школьного возраста, в котором наблюдается резкое снижение доли серонегативных лиц, свидетельствующее о появлении в популяции лиц с постинфекционным иммунитетом [4, 8].

Сличительные исследования позволяют на небольшой выборке определить у доступных наборов прогностическую ценность отрицательных результатов, которую возможно использовать в качестве поправочного коэффициента для интерпретации результатов серомониторинга.

Для достоверной оценки доли серонегативных лиц в популяции следует отдавать предпочтение наборам с более высокой прогностической ценностью отрицательных результатов (специфичностью).

Список литературы/References

1. Алексеева И.А., Перельгина О.В. Сравнительный анализ использования цельноклеточных и бесклеточных коклюшных вакцин для профилактики коклюшной инфекции // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2017. Т. 17, № 4 (64). С. 207–215. [Alekseeva I.A., Pereylygina O.V. Comparative analysis of the use of whole-cell and cell-free pertussis vaccines for the prevention of pertussis infection. *Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*, 2017, vol. 17, no. 4 (64), pp. 207–215. (In Russ.)]
2. Безроднова С.М., Демурчева И.В., Батурин В.А., Кравченко О.О. Анализ напряженности иммунитета к коклюшу в возрастной группе от 1 года до 17 лет // Вестник Дагестанской государственной медицинской академии. 2021. № 3 (40). С. 35–41. [Bezrodnova S.M., Demurcheva I.V., Baturin V.A., Kravchenko O.O. Analysis of the intensity of immunity to pertussis in the age group from 1 to 17 years old. *Vestnik Dagestanskoi gosudarstvennoi meditsinskoi akademii = Bulletin of the Dagestan State Medical Academy*, 2021, no. 3 (40), pp. 35–41. (In Russ.)]
3. Богвилене Я.А., Мартынова Г.П., Евреимова С.В., Комарова Б.Л., Карасев А.В. Коклюш у детей: клинико-эпидемиологические особенности, возможности вакцинопрофилактики // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2021. Т. 20, № 6. С. 56–62. [Bogvilene Y.A., Martynova G.P., Evreimova S.V., Komarova B.L., Karasev A.V. Pertussis in children: clinical and epidemiological features, the possibilities of vaccine prevention. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2021, vol. 20, no. 6, pp. 56–62. (In Russ.)] doi: 10.31631/2073-3046-2021-20-6-56-62
4. Брико Н.И., Миндлина А.Я., Михеева И.В., Попович Л.Д., Ломоносова А.В. Моделирование потенциального эффекта ревакцинации против коклюша детей в 6–7 и 14 лет в рамках национального календаря профилактических прививок // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2021. Т. 20, № 5. С. 4–20. [Briko N.I., Mindlina A.Ya., Mikheeva I.V., Popovich L.D., Lomonosova A.V. Modeling of the potential effect of revaccination against whooping cough in children aged 6–7 and 14 years within the framework of the national calendar of preventive vaccinations. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2021, vol. 20, no. 5, pp. 4–20. (In Russ.)] doi: 10.31631/2073-3046-2021-20-5-4-20
5. Деркач А.А., Масалова А.В., Ловчикова С.А., Симонова В.Г. Эпидемиология коклюша в условиях современного общества // Международный студенческий научный вестник. 2022. № 6. С. 8. [Derkach A.A., Masalova A.V., Lovchikova S.A., Simonova V.G. The whooping cough epidemiology under conditions of modern society. *Mezhdunarodnyi studentcheskii nauchnyi vestnik = European Student Scientific Journal*, 2022, no. 6, p. 8. (In Russ.)]
6. Организация и проведение серологического мониторинга состояния коллективного иммунитета к инфекциям, управляемым средствами специфической профилактики (дифтерия, столбняк, коклюш, корь, краснуха, эпидемический паротит, полиомиелит, гепатит В). Методические указания МУ 3.1.2943-11. [Organization and conduct of serological monitoring of the state of collective immunity to infections controlled by means of specific prevention (diphtheria, tetanus, whooping cough, measles, rubella, mumps, polio, hepatitis B). *Methodological guidelines MU 3.1.2943-11* (In Russ.)]
7. Ткалич А.А., Савин Л.Т., Гирина А.А., Петровский Ф.И. Состояние поствакцинального иммунитета к коклюшу у детей 3–4 лет // Научный медицинский вестник Югры. 2021. Т. 1, № 5. С. 106–108. [Tkalic A.A., Savin L.T., Girina A.A., Petrovsky F.I. Post-vaccination immunity to pertussis in children aged 3–4 years old. *Nauchnyi meditsinskii vestnik Yugry = Scientific Medical Bulletin of Yugra*, 2021, vol. 1, no. 5, pp. 106–108. (In Russ.)]
8. Чернова Т.М., Тимченко В.Н., Педаш А.И., Субботина М.Д., Булина О.В., Ермакова Е.О., Ускова С.Ю. Оценка своевременности вакцинации против коклюша детей первого года жизни и причин нарушения графика прививок // Журнал инфектологии. 2021. Т. 13, № 2. С. 79–86. [Chernova T.M., Timchenko V.N., Pedash A.I., Subbotina M.D., Bulina O.V., Ermakova E.O., Uskova S.Yu. Assessment of the timeliness of vaccination against pertussis in children of the first

- year of life and the reasons for the violation of the vaccination schedule. *Zhurnal infektologii = Journal Infectology*, 2021, vol. 13, no. 2, pp. 79–86. (In Russ.)] doi: 10.22625/2072-6732-2021-13-2-79-86
9. Эпидемиологический надзор за коклюшной инфекцией. Методические указания МУ 3.1.2.2160-07. [Epidemiological surveillance of pertussis infection. Methodological guidelines of MU 3.1.2.2160-07. (In Russ.)]
 10. Chit A., Zivaripiran H., Shin T., Lee J.K.H., Tomovici A., Macina D., Johnson D.R., Decker M.D., Wu J. Acellular pertussis vaccines effectiveness over time: a systematic review, meta-analysis and modeling study. *PLoS One*, 2018, vol. 13, no. 6: e0197970. doi: 10.1371/journal.pone.0197970
 11. Greco D., Salmaso S., Mastrantonio P., Giuliano M., Tozzi A.E., Anemona A., Ciofi degli Atti M.L., Giammanco A., Panei P., Blackwelder W.C., Klein D.L., Wassilak S.G. A controlled trial of two acellular vaccines and one whole-cell vaccine against pertussis. Progetto Pertosse Working Group. *N. Engl. J. Med.*, 1996, vol. 334, no. 6, pp. 341–348. doi: 10.1056/NEJM199602083340601
 12. Kapil P., Merkel T.J. Pertussis vaccines and protective immunity. *Curr. Opin. Immunol.*, 2019, vol. 59, pp. 72–78. doi: 10.1016/j.coi.2019.03.006
 13. Riffelmann M., Thiel K., Schmetz J., Wirsing von Koenig C.H. Performance of commercial enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to *Bordetella pertussis*. *J. Clin. Microbiol.*, 2010, vol. 48, no. 12, pp. 4459–4463. doi: 10.1128/JCM.01371-10
 14. Vickers D., Ross A.G., Mainar-Jaime R.C., Neudorf C., Shah S. Whole-cell and acellular pertussis vaccination programs and rates of pertussis among infants and young children. *CMAJ*, 2006, vol. 175, no. 10, pp. 1213–1217. doi: 10.1503/cmaj.051637

Автор:

Видманова М.В., ассистент кафедры медицинской микробиологии и иммунологии ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава РФ, г. Самара, Россия; врач-бактериолог ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в Самарской области, г. Самара, Россия.

Author:

Vidmanova M.V., Assistant Professor, Department of Medical Microbiology and Immunology, Samara State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Samara, Russian Federation; Bacteriologist, Hygienic and Epidemiological Centre in the Samara Region, Samara, Russian Federation.

Поступила в редакцию 17.11.2023
Отправлена на доработку 25.02.2024
Принята к печати 16.05.2024

Received 17.11.2023
Revision received 25.02.2024
Accepted 16.05.2024

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Статьи представляются в редакцию через систему электронного издательства (<http://iimmun.ru>) в соответствии с требованиями журнала «Инфекция и иммунитет» и «Инструкцией для авторов», представленной на сайте. С февраля 2016 года журнал «Инфекция и иммунитет» публикует статьи на двух языках (русском и английском).

Основные виды статей, публикуемых в журнале

Оригинальная статья

Статья должна описывать результаты законченного исследования. Допускается объем статьи до 20 машинописных страниц, включая рисунки, таблицы. Статья должна содержать: 1) введение; 2) материалы и методы; 3) результаты исследований; 4) обсуждение результатов; 5) благодарности.

- **Введение** содержит обоснование цели и задач проведенного исследования.
- **Материалы и методы** могут излагаться в виде отдельных фрагментов с короткими подзаголовками.
- Все нетрадиционные модификации методов должны быть описаны с достаточной степенью подробности. Для всех используемых в работе реактивов, животных, клеточных культур и т.д. необходимо точно указывать производителей и/или источники получения (с названиями страны, фирмы, института).
- **Результаты** описываются в логической последовательности в виде отдельных фрагментов, разделенных подзаголовками, без элементов обсуждения, без повторения методических подробностей, без дублирования цифровых данных, приведенных в таблицах и рисунках.
- В **обсуждении** проводится детальный анализ полученных данных в сопоставлении с данными литературы, что служит обоснованием выводов и заключений авторов.
- Раздел **«Благодарности»** не является обязательным, но крайне желателен. В этом разделе авторы могут выразить признательность организации, субсидировавшей проведение исследований, коллегам, консультировавшим работу в процессе ее выполнения и/или написания, а также техническому персоналу за помощь в выполнении исследований. Благодарности за предоставление специфических реактивов или оборудования, как правило, помещаются в разделе «Материалы и методы».

Краткие сообщения

Журнал публикует небольшие по объему статьи, которые имеют безусловную новизну и значимость. Эти статьи проходят ускоренное рецензирование и публикуются в короткие сроки. Общий объем краткого сообщения ограничен 8 машинописными страницами, количество рисунков и/или таблиц не может быть более 3, а список использованных литературных источников не должен превышать 15. Титульный лист оформляется, как описано ниже (см. «Подготовка статей»). Разделы краткого сообщения аналогичны вышеописанным разделам оригинальной статьи, но не выделяются заголовками и подзаголовками, результаты могут быть изложены вместе с обсуждением.

Обзорные статьи и лекции

Обзорные статьи и лекции в основном заказываются редакцией или могут быть рекомендованы одним из членов редколлегии. Более подробную информацию о правилах оформления этих статей можно узнать в редакции.

Библиографические стандарты описания цитируемых публикаций

Описание статьи из журнала:

Салина Т.Ю., Морозова Т.И. Иммунологические методы в дифференциальной диагностике // Туберкулез и болезни легких. 2011. Т. 88, № 11. С. 50–53.

Salina T.Yu., Morozova T.I. Immunological methods in differential diagnostics. Tuberculosis and Lung Diseases, 2011, vol. 88, no. 11, pp. 50–53.

Описание статьи из книги (монографии):

Шурыгина И.А., Чеснокова М.В., Климов В.Т. Псевдотуберкулез. Новосибирск: Наука, 2003. 320 с.

Shurygina I.A., Chesnokova M.V., Klimov V.T. Pseudotuberculosis. Novosibirsk: Nauka, 2003. 320 p.

Примеры правильного оформления англоязычных ссылок:

Turenne C.Y., Wallace R., Behr M.A. Mycobacterium avium in the postgenomic era. Clin. Microb. Rev., 2007, vol. 20, no. 2, pp. 205–229.

Goodman J.W., Parslow T.G. Immunoglobulin proteins. Basic and Clinical Immunology. Ed. Stites D.P., Terr A.I., Parslow T.G. Appleton & Lange, 1994, pp. 66–79.

Ссылки на литературные источники в тексте статьи, в рисунках и таблицах обозначаются арабскими цифрами в квадратных скобках [1, 2, 3,...]. Не допускаются ссылки на диссертации, авторефераты диссертаций, публикации в сборниках, методические документы местного уровня. Количество источников не ограничено. В каждой ссылке приводятся все авторы работы. Неопубликованные статьи в список не включаются.

Обозначения, сокращения и единицы измерения

Для сложных терминов или названий, наиболее часто используемых в тексте статьи, можно ввести (в круглых скобках после первого упоминания полного названия термина) не более 3–5 нетрадиционных сокращений. Узаконенные международными номенклатурами сокращения используются в соответствующей транскрипции. Например, для термина «интерлейкин» используется сокращение «IL», а не русскоязычный вариант «ИЛ»; аналогично этому используются сокращения: «TNF», а не «ТНФ» или «ФНО»; «CD», а не «СД». Названия микроорганизмов приводятся в оригинальной транскрипции с использованием курсива (*E. coli*, *Streptococcus pyogenes*). Единицы измерения приводятся без точки после их сокращенного обозначения, регламентированного международными правилами (с, ч, см, мл, мг, kDa и т.д.).

Оформление иллюстративного материала

Иллюстративный материал должен быть оригинальным, т.е. ранее нигде не опубликованным. Общее количество иллюстраций (таблиц и рисунков) не должно превышать восьми. При большем количестве иллюстраций их публикация оплачивается автором. Публикация цветных иллюстраций (независимо от их количества) также оплачивается автором.

Размеры иллюстраций:

- максимальная высота — 210 мм
- максимальная ширина для 1 столбца — 82 мм, для 2 столбцов — 170 мм

Таблицы. Каждая таблица предоставляется отдельным файлом. Таблицы нумеруются арабскими цифрами отдельно от нумерации рисунков (графиков и фотографий). Название печатается над таблицей. Весь текст на русском языке, содержащийся в таблице, включая единицы измерения, должен быть переведен на английский язык; при этом перевод следует помещать в ячейку с соответствующим русским текстом отдельной строкой. Название таблицы и текст примечания к ней также должны быть переведены на английский язык и приведены под русским текстом с новой строки. Для пометок в таблицах следует использовать одну или несколько (*). Пояснения печатаются после соответствующего количества (*) под таблицей. Единицы измерения, при необходимости, включаются в заголовки строк или столбцов.

Рисунки (графики и фотографии). В тексте статьи названия рисунков (графиков, фотографий) и таблиц размещаются сразу после абзаца, где на них дается первая ссылка. Все рисунки нумеруются последовательно арабскими цифрами по мере их включения в текст статьи. Названия рисунков и подписи к ним выносятся в виде списка в отдельный файл. В списке указываются: номер рисунка, название (с большой буквы), текст примечаний (для микрофотографий должно быть указано увеличение). Подписи к рисункам даются краткие, но достаточно информативные. Названия рисунков и примечаний к ним, нарисовочные подписи, текст легенды должны быть переведены на английский язык и размещены под соответствующим текстом с новой строки. Рисунки могут быть представлены в графических форматах с расширением .tif (разрешение не менее 300 dpi при 100% масштабе), .eps или .ai. Изображения, встроенные в документы Word, не принимаются. Графики и диаграммы предоставляются вместе с таблицами, на основе которых они были созданы, или с численными обозначениями показателей, отображаемых соответствующими графическими элементами (столбиками, секторами и т.п.) в виде файлов с расширениями .doc или, предпочтительнее, .xls.

Плата за публикацию статей

При соблюдении правил публикация статей в журнале «Инфекция и иммунитет» является бесплатной для авторов и учреждений, в которых они работают. Редакция может потребовать оплату в следующих случаях: 1) за публикацию цветных иллюстраций; 2) при большом количестве иллюстративного материала (свыше 8 иллюстраций).

Подготовка статей

При предоставлении статьи авторы должны руководствоваться требованиями, приведенными в нижеследующих пунктах. Статья может быть отклонена, если она им не соответствует.

1. Направляя статью в журнал, авторы гарантируют, что поданные материалы не были ранее опубликованы полностью или по частям, в любой форме, в любом месте или на любом языке. Так же авторы гарантируют, что статья не представлена для рассмотрения и публикации в другом журнале. С момента принятия статьи к печати в журнале «Инфекция и иммунитет» приведенный в ней материал не может быть опубликован авторами полностью или по частям в любой форме, в любом месте и на любом языке без согласования с руководством журнала. Исключением может являться: 1) предварительная или последующая публикация материалов статьи в виде тезисов или короткого резюме; 2) использование материалов статьи как части лекции или обзора; 3) использование автором представленных в журнал материалов при написании диссертации или книги. Воспроизведение всего издания или части любым способом запрещается без письменного разрешения издателей. Нарушение закона будет преследоваться в судебном порядке. Охраняется Законом РФ № 5351-1 «Об авторском праве и смежных правах» от 09.07.93 г.
2. Файл отправляемой статьи представлен в формате .doc, .docx, .rtf.
3. Помимо файла со статьей, предоставлены следующие файлы:
 - 1) Файл с метаданными (при загрузке в систему ему присваивается имя «Метаданные»):
 - фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность автора, ответственного за дальнейшую переписку с редакцией (на русском и английском языках);
 - название учреждения, где работает ответственный автор (в русском и официально принятом английском вариантах);
 - почтовый адрес для переписки с указанием почтового индекса (на русском и английском языках);
 - телефон, факс (с указанием кода страны и города), e-mail;
 - фамилия и инициалы остальных соавторов, их ученые степени, ученые звания, должности;
 - полное название статьи, направляемой в редакцию;
 - количество страниц текста, количество рисунков, количество таблиц;
 - раздела журнала, для которого предназначена данная работа: «Лекции», «Обзоры», «Оригинальные статьи», «Краткие сообщения», «В помощь практическому врачу»;
 - дата отправления работы.
 - 2) Отсканированная копия файла с метаданными подписанная всеми авторами (при загрузке в систему ему присваивается имя «Подписи авторов»).

- 3) Титульный лист (при загрузке в систему ему присваивается имя «Титульный лист»), по форме:
 - название статьи (без использования каких-либо сокращений, на русском и английском языках);
 - фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность каждого из соавторов статьи (полностью, на русском и английском языках);
 - подразделение и учреждение, в котором выполнялась работа; в случае, если авторами статьи являются сотрудники разных учреждений, то последние нумеруются по порядку, начиная с единицы, и соответствующая цифра размещается после фамилии автора, представляющего данное учреждение; для маркировки авторов в англоязычной части статьи вместо цифр используются латинские буквы (a, b, c, d и т.д.);
 - сокращенное название статьи для верхнего колонтитула (не более 35 символов, включая пробелы и знаки препинания, на русском и английском языках);
 - не менее 6 ключевых слов на русском и английском языках;
 - адрес для переписки с указанием номера телефона, факса и адреса e-mail.
- 4) Резюме (при загрузке в систему ему присваивается имя «Резюме»). Предоставляется в виде одного абзаца без ссылок и специфических сокращений. Объем — не менее 300 слов. Резюме в полном объеме представляется также в переводе на английский язык. В отдельных случаях, по решению редакционной коллегии, может быть затребован развернутый вариант резюме на английском языке.
- 5) Рисунки, если они есть — каждый отдельным файлом (при загрузке в систему каждому рисунку присваивается имя «Рисунок_Порядковый номер рисунка. Название рисунка»).
- 6) Файл в формате .doc, .docx, .rtf со списком, в котором указываются: номер рисунка, название (с большой буквы), текст примечаний (для микрофотографий должно быть указано увеличение). Подписи к рисункам даются краткие, но достаточно информативные.
- 7) Таблицы, если они есть — каждая отдельным файлом (название каждой таблицы должно быть приведены заголовком в файле с самой таблицей).
- 8) Файл с цитируемой литературой (при загрузке в систему ему присваивается имя «Литература») в виде таблицы из четырех столбцов (альбомная ориентация), где:

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	Ф.И.О., название публикации и источника на английском языке	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи и/или ее DOI
Размещаются в таблице в алфавитном порядке, вначале русскоязычные, затем на языках с латинской графикой	Указывать по библиографическому стандарту, представленному выше	Официальное англоязычное название публикации и источника, где она опубликована — для русскоязычных статей. В редких случаях, когда не существует официальных англоязычных названий, редакция просит предоставлять их перевод, обозначая его красным цветом шрифта. Для англоязычных публикаций и источников в этом столбце ставится прочерк	В том случае, если информация о статье не размещена на официальном сайте издания, допустимо использовать URL статьи со сторонних сайтов, в т.ч. системы www.e-library.ru . DOI статьи приводится в квадратных скобках после URL-адреса

4. Текст должен быть набран с одинарным межстрочным интервалом; используется кегль шрифта в 14 пунктов; для выделения используется курсив, а не подчеркивание; все ссылки на иллюстрации, графики и таблицы расположены в соответствующих местах в тексте, а не в конце документа.
5. Текст соответствует стилистическим и библиографическим требованиям.
6. Если вы отправляете статью в рецензируемый раздел журнала, то вы согласны с требованиями слепого рецензирования, подробнее о котором можно узнать на сайте журнала (<http://iimmun.ru>) в рубрике «Рецензирование» раздела «О журнале».

**Вы можете оформить подписку на журнал
 «Инфекция и иммунитет» через отделения связи:
 ООО «Урал-Пресс-Округ» и электронный каталог «Российская периодика»
 в сети Internet на сайте www.arpk.org.
 Подписной индекс 41392.
 Подписка на электронную версию журнала
 на сайте www.elibrary.ru**

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Агарков Н.М.	740	Лепехова С.А.	672	Соловьева И.Л.	645, 769
Алексеева А.Е.	681	Лесная А.С.	719	Сунцов В.В.	645
Альимова М.В.	740	Ли Ю.А.	769	Тотоян А.А.	756, 795
Андреева Н.П.	769	Линок А.В.	769	Фомина Л.О.	756
Бруснигина Н.Ф.	681	Локтионова М.Н.	769	Харченко Е.П.	709
Верховская М.Д.	756	Макконен К.Ф.	740	Хасанова А.А.	769
Видманова М.В.	827	Махова М.А.	681	Хасанова Р.Р.	690
Волгин А.Р.	645	Машилов К.В.	769	Храпунова И.А.	769
Воронкова О.В.	690	Минакова Е.В.	690	Чернышов Н.А.	690
Григорьев Г.Е.	672	Мосунов А.А.	756	Шолохов Л.Ф.	719
Давыденко В.С.	795	Настаева Н.Ю.	769	Шемелев А.Н.	795
Даренская М.А.	719	Никитина Т.Н.	645	Якунченко Т.И.	740
Добрынина М.А.	756	Никитюк Н.Ф.	769	Ямпольская А.В.	690
Дукардт В.В.	756	Останкова Ю.В.	756, 795	Ямпольская О.В.	690
Есимова И.Е.	690	Охотников О.И.	740	Alekseyev D.V.	701
Жданова Е.В.	747	Петрова А.Г.	719	Azizian R.	781
Забков О.И.	756	Полищук В.Б.	769	Balde R.	809
Зуйкова А.А.	756	Поломошнова Е.М.	690	Baradaran H.R.	781
Зурочка А.В.	756	Раевская Н.М.	645	Ereshchenko A.A.	701
Зурочка В.А.	756	Решетова А.В.	690	Faramarzi M.	781
Ильинских Е.Н.	690	Рубцова Е.В.	747	Jafari E.	781
Казанцева Е.Д.	719	Рычкова Л.В.	719	Hasan K.	788
Колесников С.И.	719	Рябенко Э.Б.	816	Kaftyreva L.A.	809
Колесникова Л.И.	719	Рябенко Ю.Н.	816	Lyamin A.V.	701
Коровкин А.С.	645	Савельев Р.В.	823	Makarova M.A.	809
Костарев С.Н.	731	Сарапульцев Г.П.	756	Masoumi-Asl H.	781
Костинов М.П.	769	Сафронова Э.А.	756	Matveeva Z.N.	809
Костинова А.М.	769	Семенова Н.В.	719	Nateghian A.	781
Костоломова Е.Г.	747, 756	Серета Т.Г.	731	Paryati S.P.Y.	788
Кудрявцев И.В.	756	Серикова Е.Н.	795	Pobezhimova O.O.	701
Курашова Н.А.	719	Симбирцев А.С.	645	Ramadhanti S.	788
Курганский И.С.	672	Скупневский С.В.	823	Reshetnikova V.P.	701
				Zhestkov A.V.	701

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

адреналин	823	мононуклеарные лейкоциты крови	690	эпидемический подъем	769
антибиотикорезистентность	672	мРНК	709	<i>A. baumannii</i>	681
антиоксидантная защита	719	нетоз	823	Africa	809
антисептики	672	описторхоз	816	antibiotic resistance	809
антитела к гриппу	769	особенности структуры	709	antibody	788
белковый профиль	795	острые респираторные вирусные		antibody levels	781
биогельминтозы	816	инфекции	719	anti-idiotype	788
вакцина против гриппа	769	перекисное окисление липидов	719	atopic dermatitis	701
вакцины	709	пневмонии	769	biological diversity	701
вестерн-блот	795	пожилей возраст	740	<i>blaOXA-23</i>	681
вирус гриппа	709	пост-COVID-19	756	<i>blaOXA-72</i>	681
вирус иммунодефицита человека	795	постковидный период	747	<i>Campylobacter infection</i>	809
вирус папилломы человека	655	постковидный синдром	747	<i>Campylobacter</i> spp.	809
вирусная инфекция	672	проточная цитометрия	756	chicken immunoglobulins	788
вирусоподобные частицы	655	проточный цитофотометрический		children's health	781
внеклеточные ловушки нейтрофилов	823	анализ	731	chitosan	788
внутривидовая диверсификация	645	профилактика	672	COVID-19	740, 769
гемограмма	740	профилактические вакцины	655	<i>env</i>	795
ген гемагглютинина	709	рак шейки матки	655	foodborne infections	809
грипп	719	раневая инфекция	672	<i>gag</i>	795
дети	719	ранний период выздоровления	740	immunity	781
дошкольный возраст	719	рекодирование	709	immunological disorders	701
заболеваемость	816	серотонин	823	infants	781
иммуногенность вакцин	655	сиквенс-тип	681	microbiome	701
иммуноглобулины	747	системный анализ	731	<i>Opisthorchis felineus</i>	816
иммунограмма	731	сочетанная вакцинация	769	<i>Opisthorchis viverrini</i>	816
интегрон	681	средний возраст	740	oropharyngeal microbiota	701
интоксикация	719	субпопуляции лимфоцитов	690	pentavalent vaccine	781
ишемическая болезнь сердца	740	терапевтические вакцины	655	<i>pol</i>	795
клещевой энцефалит	690	транспозон	681	poultry farms	809
коронавирус	731	уровень ТРЕС	756	rabies	788
лейкоформула	747	фагоцититарная активность нейтрофилов	823	SARS-CoV-2	672, 731, 747
лейкоциты	731, 747	филогенетический анализ	681	side effects	781
лимфоциты	747	филогения	645	skin diseases	701
липополисахарид	690	цитокины	690, 719	T-лимфоциты	756
лихорадочная форма	690	цитотоксические T-лимфоциты	756	T-хелперы	756
менингеальная форма	690	частоты встречаемости профиля	795	vaccine	788
модификация воспаления	823	экологические признаки	645	<i>Yersinia pestis</i>	645
молекулярные маркеры	645	эпидемическая ситуация	816	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	645

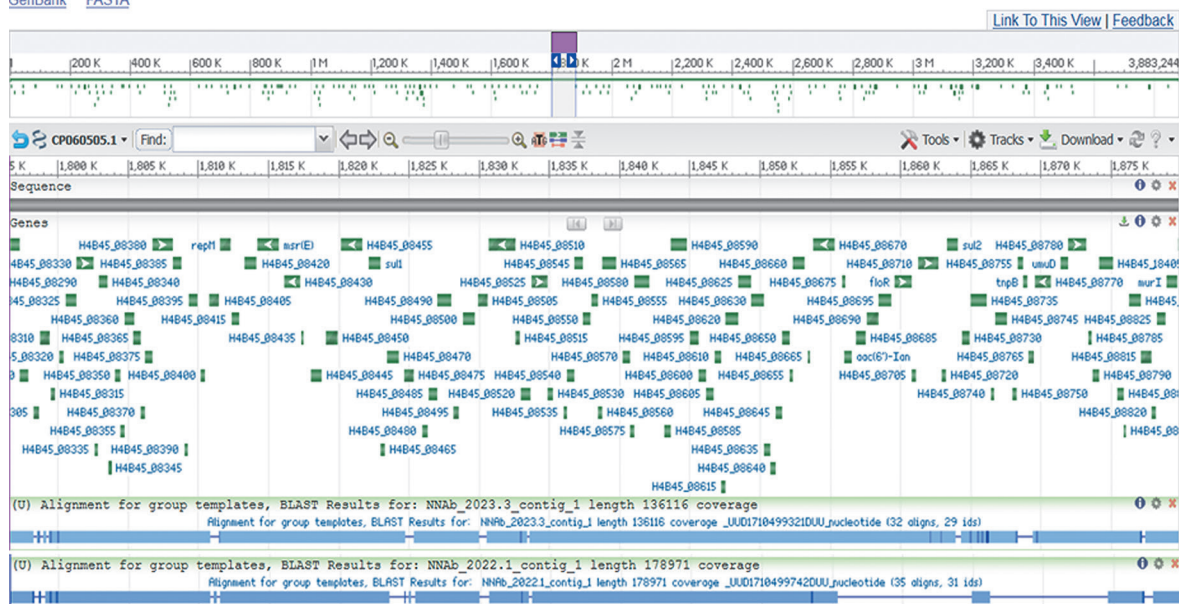
Иллюстрация к статье «Генетический профиль карбапенем-устойчивых штаммов *Acinetobacter baumannii*» (авторы: А.Е. Алексеева, Н.Ф. Бруснигина, М.А. Махова) (с. 681–689)

Illustration for the article “Genetic profile of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains” (authors: Alekseeva A.E., Brusnigina N.F., Makhova M.A.) (pp. 681–689)

***Acinetobacter baumannii* strain AbCTX5 chromosome, complete genome**

GenBank: CP060505.1

[GenBank](#) [FASTA](#)



A (A)

B (B)

Рисунок 2. Выравнивание нуклеотидных последовательностей штаммов *A. baumannii* NNAb_2023.3 (A) и NNAb_2022.1 (Б) относительно последовательности участка генома штамма *A. baumannii* AbCTX5 (CP060505.1) длиной 83 257 п.н. (1796552–1879809), несущего детерминанты антибиотикорезистентности

Figure 2. Alignment of *A. baumannii* NNAb_2023.3 (A) and NNAb_2022.1 (B) strain nucleotide sequences relative to the sequence of *A. baumannii* strain AbCTX5 (CP060505.1) 83 257 bp length genome region (1796552–1879809), carrying antibiotic resistance determinants

Иллюстрация к статье «Оценка титра антител после антиидиотипной вакцинации против бешенства с адъювантом нанохитозаном» (авторы: С.П.Ю. Парьяти, Ш. Рамадханти, Х. Хасан) (с. 788–794)

Illustration for the article “Antibody titer after anti-idiotype rabies vaccination with nano-chitosan adjuvant” (authors: Paryati S.P.Y., Ramadhanti S., Hasan K.) (pp. 788–794)

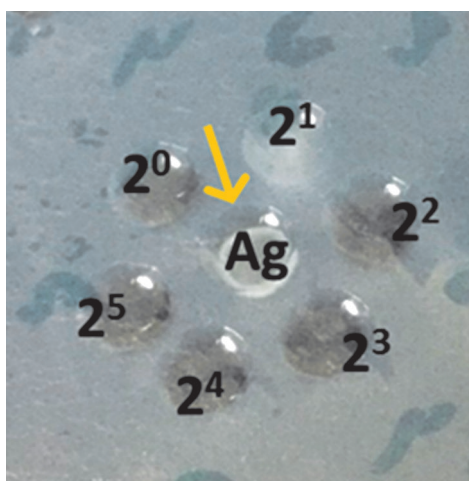


Figure. Positive reactions are indicated by the presence of a white precipitation line between the antigen (Ag, rabies virus) and antibody (serum at dilution 2¹) (arrow)

Подписной индекс:
Урал-Пресс – 41392

