

2022



ИНФЕКЦИЯ
И
ИММУНИТЕТ

Иллюстрации к статье «Экологический сценарий видообразования микроба чумы *Yersinia pestis* как основа адекватной молекулярной эволюционной модели» (автор: В.В. Сунцов) (с. 809–818)

Illustrations for the article “Ecological scenario of the plague microbe *Yersinia pestis* speciation underlying adequate molecular evolutionary model” (author: Suntsov V.V.) (pp. 809–818)

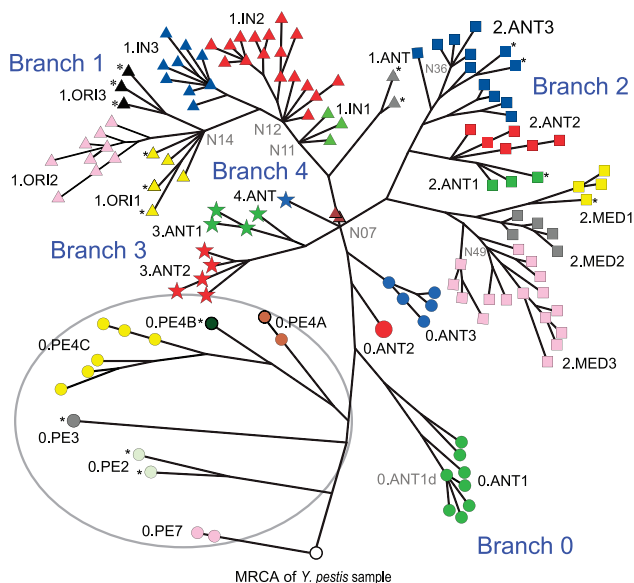


Рисунок 1. Типичная молекулярная филогенетическая дендрограмма *Yersinia pestis*, созданная на основе анализа молекулярных SNP-маркеров [16]

Figure 1. A typical molecular phylogenetic dendrogram of *Yersinia pestis* based on the molecular SNP marker analysis [16]

Примечание. MRCA (most recent common ancestor) — абстрактный наиболее современный статистически обоснованный предок вида *Y. pestis*. N07 — узел политомии (branches 1–4), возникший перед началом 2-й пандемии чумы («Черная смерть»). Овалом выделены «полевковые» геноварианты 0.PE (подвиды) возбудителя чумы, образовавшие зону наиболее древних природных очагов в Евразии.

Note. MRCA (most recent common ancestor) is a putative most recent statistically justified ancestor of the species *Y. pestis*. N07 is a polytomy node (branches 1–4) that arose before the onset of the second plague pandemic (the “Black Death”). The oval highlights the “vole” genovariants 0.PE (subspecies) of the plague causative agent, which formed the zone of most ancient natural foci in Eurasia.

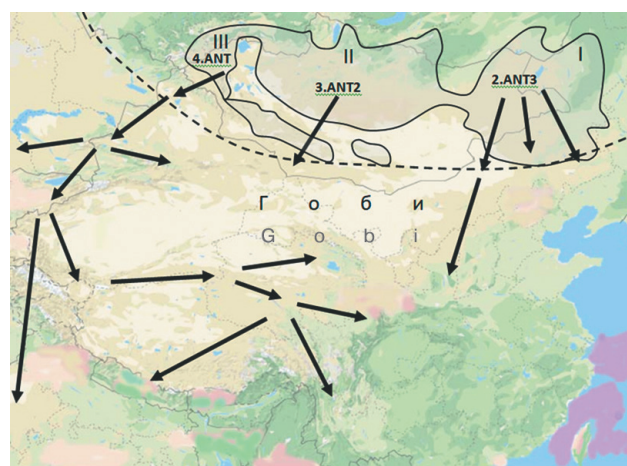


Рисунок 2. Тритопное происхождение трех геновариантов (подвидов) чумного микроба *Yersinia pestis* 2.ANT3, 3.ANT2 и 4.ANT1 в трех географических популяциях монгольского сурка *Marmota sibirica sibirica* (I), *M. sibirica caliginosus* (II) и *M. sibirica* ssp. (III) и три самостоятельных маршрута их территориальной экспансии

Figure 2. The tritopic origin of the three geneovariantes (subspecies) for the plague microbe *Yersinia pestis* 2.ANT3, 3.ANT2 and 4.ANT1 in the three geographic populations of the Mongolian marmot *Marmota sibirica sibirica* (I), *M. sibirica caliginosus* (II) and *M. sibirica* ssp. (III) and three independent routes of relevant territorial expansion

Примечание. Пунктирная линия очерчивает южную границу зоны глубокого промерзания грунта.

Note. Dottedline outlines the southern boundary of the zone of soil deep freezing.

ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ

сентябрь–октябрь
2022, том 12

№ 5

*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
Лоузир Э. профессор, президент Института Пастера Туниса, Тунис
Львов Д.К. д.м.н., профессор, академик РАН, НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, Москва, Россия
Маеда К. д.вет.н., профессор, директор Национального института инфекционных заболеваний, Токио, Япония
Медуницын Н.В. д.м.н., профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, главный научный сотрудник Научного центра экспертизы средств медицинского применения, Москва, Россия
Михайлов М.И. д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, зав. лабораторией вирусных гепатитов НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, зав. кафедрой микробиологии и вирусологии Российского университета дружбы народов, Москва, Россия
Найденски Х. д.м.н., профессор, зав. отделом инфекционной микробиологии Института микробиологии им. Стефана Ангеловфа, София, Болгария
Онищенко Г.Г. д.м.н., профессор, академик РАН, зам. председателя Российской академии образования, Москва, Россия
Покровский В.В. д.м.н., профессор, академик РАН, руководитель Федерального НМЦ по профилактике и борьбе со СПИДом, Москва, Россия
Сантони А. зам. директора по научной работе Института Пастера в Риме, профессор иммунологии и иммунопатологии отдела молекулярной медицины Университета Сапиенца в Риме, Рим, Италия
Симбирцев А.С. д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, научный руководитель ГосНИИ особо чистых биопрепаратов ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия
Тотоян Артем А. д.м.н., профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, главный научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия
Фрейдлин И.С. д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, заслуженный деятель науки РФ, главный научный сотрудник Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия
Хаитов Р.М. д.м.н., профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, научный руководитель ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, Москва, Россия
Черешнев В.А. д.м.н., профессор, академик РАН, научный руководитель Института иммунологии и физиологии, Екатеринбург, Россия
Шпигель А. д.м.н., профессор, директор Института Пастера Мадагаскара, Антананариву, Мадагаскар

Редакционный совет

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

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

Учредители

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Подписано в печать 28.10.2022 г. Формат 60 x 90 1/8.
Печать офсетная. Усл.-печ. л. 25.
Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.).
Заказ № 1329

© Инфекция и иммунитет
© Северо-Западное отделение медицинских наук, 2022
© НИИЭМ имени Пастера, 2022
© СПб РО РААКИ, 2022

Russian Journal of Infection and Immunity (Infektsiya i immunitet)

September–October

2022, volume 12

No. 5

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

Editor-in-chief

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

Deputy editor-in-chief

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

Members of editorial board

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

Luis Barbeito PhD, MD (Medicine), Professor, Institute Pasteur de Montevideo, Head of the Laboratory of Neurodegeneration, Montevideo, Uruguay

Paul Brey PhD, MD (Biology), Professor, Institute Pasteur du Laos, Director; Laboratory of Medical Entomology and Biology of Disease Vectors, Head, Vientiane, Laos

Alexander L. Gintsburg PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, N.F. Gamaleya Federal Center of Epidemiology and Microbiology, Director, Moscow, Russian Federation

Irina N. Lavrentieva PhD, MD (Medicine), St. Petersburg Pasteur Institute, Head of the Laboratory of Experimental Virology, St. Petersburg, Russian Federation

Yuri V. Lobzin PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, Scientific Director, St. Petersburg, Russian Federation

Hechmi Louzir Professor, Institute Pasteur de Tunis, President, Tunis, Tunisia

Dmitry K. Lvov PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, D.I. Ivanovsky Institute of Virology, N.F. Gamaleya Federal Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Ken Maeda PhD, MD (Veterinary), Professor, National Institute of Infectious Diseases, Director, Tokyo, Japan

Nikolai V. Medunitsyn PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, Scientific Center for Expertise of Medical Products, Moscow, Russian Federation

Michael I. Michailov PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Corresponding Member, I.I. Mechnikov Institute of Vaccines and Sera, Head of the Laboratory of Viral Hepatitis; Peoples' Friendship University of Russia, Head of the Department of Microbiology and Virology, Moscow, Russian Federation

Hristo Najdenski PhD, MD (Medicine), Professor, Institute Stephan Angeloff; Head of the Department of Infectious Microbiology, Sofia, Bulgaria

Gennadiy G. Onishchenko PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, Deputy President of the Russian Academy of Education, Moscow, Russian Federation

Vadim V. Pokrovskiy PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, Central Research Institute of Epidemiology, Head of the Federal AIDS Center, Moscow, Russian Federation

Angela Santoni PhD, Professor, Institute Pasteur-Fondation Cenci Bolognetti, Scientific Director; Full Professor of Immunology and Immunopathology, Department of Molecular Medicine, Sapienza University of Rome, Rome, Italy

Andrei S. Simbirtsev PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Corresponding Member, St. Petersburg Institute of Pure Biochemicals, Scientific Director, St. Petersburg, Russian Federation

Artem A. Totolian PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, Institute of Experimental Medicine, Department of Molecular Microbiology, Head Researcher, St. Petersburg, Russian Federation

Irina S. Freidlin PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Corresponding Member, Institute of Experimental Medicine, Head Researcher, St. Petersburg, Russian Federation

Rahim M. Khaitov PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, Institute of Immunology, Scientific Director, Moscow, Russian Federation

Valery A. Chereshev PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, Institute of Immunology and Physiology, Scientific Director, Yekaterinburg, Russian Federation

Andre Spiegel PhD, MD (Medicine), Professor, Institute Pasteur de Madagascar, Director, Antananarivo, Madagascar

Members of editorial council

Vladimir A. Aleshkin	PhD, MD (Biology), Professor, G.N. Gabrichevsky Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Scientific Director, Moscow, Russian Federation
Oleg V. Bukharin	PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, Research Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Scientific Director, Orenburg, Russian Federation
Boris I. Vishnevsky	PhD, MD (Medicine), Professor, Research Institute of Phthisiopulmonology, Head Researcher, Department of Laboratory Diagnostic, St. Petersburg, Russian Federation
Ilija I. Dolgushin	PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, Chelyabinsk State Medical Academy, President, Moscow, Russian Federation
Vitaly V. Zverev	PhD, MD (Biology), Professor, RAS Full Member, I.I. Mechnikov Institute of Vaccines and Sera, Scientific Director, Moscow, Russian Federation; I.M. Sechenov State Medical University, Head of the Department of Microbiology, Virology and Immunology, Moscow, Russian Federation
Lidiia A. Kaftyreva	PhD, MD (Medicine), Professor, St. Petersburg Pasteur Institute, Head of the Laboratory of Intestinal Infections, St. Petersburg, Russian Federation
Kirill P. Kashkin	PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, Russian Academy of Postgraduate Medical Education, Professor of the Department of Immunology, Moscow, Russian Federation
Olga I. Kubar	PhD, MD (Medicine), Professor, St. Petersburg Pasteur Institute, Leading Researcher, St. Petersburg, Russian Federation
Victor V. Maleev	PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, Central Research Institute of Epidemiology, Adviser of the Director, Moscow, Russian Federation
Olga V. Narvskaya	PhD, MD (Medicine), Professor, St. Petersburg Pasteur Institute, Laboratory of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics, St. Petersburg, Leading Researcher, Russian Federation
Alevtina M. Savicheva	PhD, MD (Medicine), Professor, D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, Head of the Laboratory of Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation
Sergei A. Selkov	PhD, MD (Medicine), Professor, D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, Head of the Laboratory of Immunology, St. Petersburg, Russian Federation
Viktor V. Tets	PhD, MD (Medicine), Professor, Pavlov State Medical University, Head of the Department of Microbiology and Virology, St. Petersburg, Russian Federation
Susanna M. Kharit	PhD, MD (Medicine), Professor, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, Head of the Prevention Department of Infectious Diseases, St. Petersburg, Russian Federation
Sergei B. Cheknev	PhD, MD (Medicine), N.F. Gamaleya Federal Center of Epidemiology and Microbiology, Deputy Director on Science, Head of the Laboratory of Cellular Interactions, Moscow, Russian Federation
Vyacheslav V. Shkarin	PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Corresponding Member, State Medical Academy, President, Head of the Department of Epidemiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation

Assistant editor: Natalia V. Rakitianskaia (St. Petersburg)

Translation editor: Dmitrii V. Isakov (St. Petersburg)

Copy editor: Aram Ya. Muradyan (St. Petersburg)

Online version editorial manager: Vera S. Erofeeva (St. Petersburg)

Founders

North-West Regional Branch of Medical Sciences

Saint Petersburg Pasteur Institute

Russian Association of Allergologists and Clinical Immunologists, St. Petersburg Regional Branch (SPb RAACI)

The journal is registered by the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology and Mass media in Saint Petersburg and Leningrad region

Certificate of registration PI no. TU 78–00578 from April, 26, 2010

Certificate of registration PI no. TU 78–00910 from June, 24, 2011

The journal is registered by the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology and Mass Media

Certificate of registration PI no. FS 77–64788 from February, 02, 2016

Electronic version: www.iimmun.ru and www.elibrary.ru

Since 2012, the Infection and Immunity journal is admitted to the Index of leading peer-reviewed scientific journals intended for publication of key research results of MD Theses, as recommended by the Higher Attestation Commission of the Russian Ministry of Education and Science

Since 2014 the Infection and Immunity journal is included into international Ulrich's Periodicals Directory database

Since 2016 included in Russian Science Citation Index (RSCI) database, integrated in Web of Science

Since 2016 the Russian Journal of Infection and Immunity is included in Web of Science (Emerging Sources Citation Index)

Since 2017 the Russian Journal of Infection and Immunity is included into international Scopus database

Editorial Office

197101, St. Petersburg, Mira str., 14.
Tel.: (812) 233-08-58.

Publishing House of St. Petersburg Pasteur Institute

197101, St. Petersburg, Mira str., 14.
Phone/fax: (812) 644-63-11.
E-mail: izdatelstvo@pasteurorg.ru

Produced at the Allegro Printing House

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

Passed for printing 28.10.2022. Print format 60 x 90 1/8.
Offset printing. Printed sheets 25.
Circulation 2000 copies. (1st edition – 1000 copies).

© Russian Journal of Infection and Immunity =
Infektsiya i immunitet

© North-West Regional Branch of Medical Sciences, 2022

© St. Petersburg Pasteur Institute, 2022

© SPb RAACI, 2022

СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

Сунцов В.В.

ЭКОЛОГИЧЕСКИЙ СЦЕНАРИЙ ВИДООБРАЗОВАНИЯ МИКРОБА ЧУМЫ *YERSINIA PESTIS* КАК ОСНОВА АДЕКВАТНОЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЭВОЛЮЦИОННОЙ МОДЕЛИ 809

Лоскутов С.И., Прошин С.Н., Рябухин Д.С.

ЭВОЛЮЦИОННЫЕ АСПЕКТЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МИКРОБИОМА ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА И ОРГАНИЗМА-ХОЗЯИНА В ФОРМИРОВАНИИ ЦЕЛОСТНОСТИ ГАСТРОИНТЕСТИНАЛЬНОГО БАРЬЕРА 819

Коротецкая М.В., Рубакова Э.И.

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ДИАГНОСТИКИ И МОНИТОРИНГА ТЕЧЕНИЯ ТУБЕРКУЛЕЗА 827

Оригинальные статьи

Форгани М., Фирстков А.Л., Аляннеджади М.М., Даниленко Д.М., Комиссаров А.Б.

КОДИРОВАНИЕ С ПОМОЩЬЮ СОКРАЩЕННОГО АМИНОКИСЛОТНОГО АЛФАВИТА И ЕГО ВЛИЯНИЕ НА МОДЕЛИРОВАНИЕ АНТИГЕННОЙ ЭВОЛЮЦИИ ГРИППА 837

Нестерова И.В., Халтурина Е.О., Нелюбин В.Н., Хайдуков С.В., Чудилова Г.А.

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ СИНТЕТИЧЕСКОГО ТИМИЧЕСКОГО ГЕКСАПЕПТИДА В СИСТЕМЕ *IN VITRO* НА УРОВНИ ЭКСПРЕССИИ *NF-κB*, *IFNα/βR* И *CD119* НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМИ ГЕРПЕСВИРУСНЫМИ КОИНФЕКЦИЯМИ 850

Арсентьева Н.А., Любимова Н.Е., Бацунов О.К., Коробова З.Р., Кузнецова Р.Н., Рубинштейн А.А., Станевич О.В., Лебедева А.А., Воробьев Е.А., Воробьева С.В., Куликов А.Н., Гаврилова Е.Г., Певцов Д.Э., Полушин Ю.С., Шлык И.В., Тотолян А.А.

ПРОГНОЗНАЯ ЗНАЧИМОСТЬ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ЦИТОКИНОВ В ОТНОШЕНИИ ЛЕТАЛЬНОГО ИСХОДА COVID-19 859

Рази А., Азимьян А., Арезуманд Р., Солати А., Ахмадабад Х.Н.

СВЯЗЬ УРОВНЯ СЫВОРОТОЧНЫХ *C3*, *C4* И ОБЩЕЙ АКТИВНОСТИ КЛАССИЧЕСКОГО ПУТИ АКТИВАЦИИ КОМПЛЕМЕНТА У ПАЦИЕНТОВ С COVID-19 ПРИ ГОСПИТАЛИЗАЦИИ С КЛИНИЧЕСКИМ ИСХОДОМ 869

Самсонова А.П., Петров Е.М., Савельева О.В., Иванова А.Е., Шарапова Н.Е.

АНАЛИЗ ДОКУМЕНТИРОВАННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ СЫВОРОТОК КРОВИ БОЛЬНЫХ, ПОДОЗРИТЕЛЬНЫХ НА ЗАБОЛЕВАНИЕ ЛЕПТОСПИРОЗАМИ, В РЕАКЦИИ МИКРОАГГЛЮТИНАЦИИ 875

Токаревич Н.К., Блинова О.В., Стоянова Н.А., Баимова Р.Р., Сюсюмова Е.А., Ломоносова В.И., Тронин А.А., Бузинов Р.В., Соколова О.В., Гнатив Б.Р., Буц Л.В., Бубнова Л.А., Сафонова О.С., Станкевич А.И., Калинина Е.Л., Виксе Р., Андреассен А.К.

СЕРОПРЕВАЛЕНТНОСТЬ КЛЕЩЕВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ В СЕВЕРО-ЗАПАДНОМ ФЕДЕРАЛЬНОМ ОКРУГЕ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ 891

Лаврентьева И.Н., Бичурина М.А., Антипова А.Ю., Камара Ж., Хоанг М., Банчевич М.Д., Железнова Н.В., Егорова С.А., Тотолян А.А.

КОЛЛЕКТИВНЫЙ ИММУНИТЕТ К ВИРУСУ КРАСНУХИ В НЕКОТОРЫХ ГЕОГРАФИЧЕСКИХ РЕГИОНАХ 902

Цвиркун О.В., Самойлович Е.О., Тихонова Н.Т., Герасимова А.Г., Тураева Н.В., Ермолович М.А., Семейко Г.В.

СОПОСТАВЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ СОСТОЯНИЯ ПОПУЛЯЦИОННОГО ИММУНИТЕТА К ВИРУСУ КРАСНУХИ У НАСЕЛЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ И РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ 909

Терешко Д.Л., Новицкая И.В., Захарова И.Б., Чиен Д., Кузнецов А.Н., Кулаков М.Я., Будченко А.А., Пушкарь В.Г., Викторов Д.В., Топорков А.В.

ПОЛУЧЕНИЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭРИТРОЦИТАРНОГО АНТИГЕННОГО МЕЛИОИДОЗНОГО ДИАГНОСТИКУМА ПРИ АНАЛИЗЕ ПРОБ СЫВОРОТОК ОТ ЛИЦ ИЗ ЭНДЕМИЧНЫХ ПО МЕЛИОИДОЗУ ПРОВИНЦИЙ ХА ЗАНГ, ЛАНГШОН И КУАНГНИНЬ СОЦИАЛИСТИЧЕСКОЙ РЕСПУБЛИКИ ВЬЕТНАМ 919

Воропаев А.Д., Катеринчев Д.А., Урбан Ю.Н., Зверев В.В., Несвижский Ю.В., Воропаева Е.А., Лиханская Е.И., Афанасьев М.С., Афанасьев С.С.
ЭКСПРЕССИЯ CDR1, CDR2, MDR1 И ERG11 У УСТОЙЧИВЫХ К АЗОЛАМ ШТАММОВ CANDIDA ALBICANS, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ В ГОРОДЕ МОСКВЕ 929

Самойленко Е.С., Колесникова Н.В., Баклай В.И., Майданникова Е.Ю., Омельченко Е.В.
ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ VEGF ПРИ ОСЛОЖНЕННОМ ИНФЕКЦИОННОМ ЭНДОКАРДИТЕ 938

Вализаде Г., Хамсе М.-Э., Кашаниян М., Рафии-Сефиддашти Р., Хадиги Р.
РОЛЬ TOXOPLASMA GONDII ПРИ ТИРЕОИДИТЕ БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН 947

Скупневский С.В., Пухаева Е.Г., Бадтиев А.К., Руруа Ф.К., Батагова Ф.Э., Фарниева Ж.Г.
ПОВЫШЕНИЕ БЕЗОПАСНОСТИ ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКИ НА ОСНОВЕ МАСЛЯНЫХ АДЬЮВАНТОВ 953

Краткие сообщения

Котенева Е.А., Цыганкова О.И., Щербакова В.Ю., Калинин А.В., Родионов И.С., Сердюков В.В., Абрамович А.В., Куличенко А.Н.
ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ КУЛЬТУРЫ МЫШИНЫХ МАКРОФАГОВ IN VITRO ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ СПОРАМИ BACILLUS ANTHRACIS С РАЗНЫМ ПЛАЗМИДНЫМ СОСТАВОМ 963

Курашова С.С., Баловнева М.В., Ишмухаметов А.А., Теодорович Р.Д., Попова Ю.В., Ткаченко Е.А., Дзагурова Т.К.
ГУМОРАЛЬНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ ПОСЛЕ ИММУНИЗАЦИИ МОРСКИХ СВИНОК ВАКЦИННЫМ ПРЕПАРАТОМ НА ОСНОВЕ ВИРУСА ПУУМАЛА 971

Методы

Огарков О.Б., Жданова С.Н., Орлова Е.А., Хромова П.А., Белькова Н.Л., Синьков В.В., Кондратов И.Г.
СЕКВЕНИРОВАНИЕ 16S-ITS-23S ФРАГМЕНТА РИБОСОМАЛЬНОГО ОПЕРОНА ОБЕСПЕЧИВАЕТ НЕОБХОДИМЫЕ И ДОСТАТОЧНЫЕ УСЛОВИЯ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКОБАКТЕРИЙ 976

Сайтгалина М.А., Останкова Ю.В., Любимова Н.Е., Семенов А.В., Кузнецова Р.Н., Тотолян А.А.
МОДИФИЦИРОВАННЫЙ МЕТОД КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЕЙ ТРЕС И КРЕС В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ С ИММУНОДЕФИЦИТНЫМИ СОСТОЯНИЯМИ 981

Правила для авторов 997

Авторский указатель 1000

Предметный указатель 1000

CONTENTS

Reviews

Suntsov V.V.

ECOLOGICAL SCENARIO OF THE PLAGUE MICROBE *YERSINIA PESTIS* SPECIATION UNDERLYING ADEQUATE MOLECULAR EVOLUTIONARY MODEL 809

Loskutov S.I., Proshin S.N., Ryabukhin D.S.

EVOLUTIONARY ASPECTS OF GASTROINTESTINAL TRACT MICROBIOME-HOST INTERACTION UNDERLYING GASTROINTESTINAL BARRIER INTEGRITY 819

Korotetskaya M.V., Rubakova E.I.

METABOLIC BIOLOGICAL MARKERS FOR DIAGNOSING AND MONITORING THE COURSE OF TUBERCULOSIS 827

Original articles

Forghani M., Firstkov A.L., Alyannezhadi M.M., Danilenko D.M., Komissarov A.B.

REDUCED AMINO ACID ALPHABET-BASED ENCODING AND ITS IMPACT ON MODELING INFLUENZA ANTIGENIC EVOLUTION 837

Nesterova I.V., Khalturina E.O., Nelyubin V.N., Khaidukov S.V., Chudilova G.A.

EVALUATION OF THE EFFECTS IN THE *IN VITRO* SYSTEM OF SYNTHETIC THYMIC HEXAPEPTIDE ON THE EXPRESSION LEVELS OF NF- κ B, IFN α/β R AND CD119 NEUTROPHILIC GRANULOCYTES IN PATIENTS WITH CHRONIC HERPES VIRAL CO-INFECTIONS 850

Arsentieva N.A., Liubimova N.E., Batsunov O.K., Korobova Z.R., Kuznetsova R.N., Rubinstein A.A., Stanevich O.V., Lebedeva A.A., Vorobyov E.A., Vorobyova S.V., Kulikov A.N., Gavrilova E.G., Pevtcov D.E., Polushin Yu.S., Shlyk I.V., Totolian A.A.

PREDICTIVE VALUE OF SPECIFIC CYTOKINES FOR LETHAL COVID-19 OUTCOME 859

Razi A., Azimian A., Arezumand R., Solati A., Ahmadabad H.N.

ASSOCIATIONS BETWEEN SERUM LEVELS OF C3, C4, AND TOTAL CLASSICAL COMPLEMENT ACTIVITY IN COVID-19 PATIENTS AT THE TIME OF ADMISSION AND CLINICAL OUTCOME 869

Samsonova A.P., Petrov E.M., Savelyeva O.V., Ivanova A.E., Sharapova N.E.

ANALYZING THE DOCUMENTED RESULTS BY USING MICROSCOPIC AGGLUTINATION TEST TO EXAMINE SERA FROM PATIENTS SUSPECTED OF LEPTOSPIROSIS 875

Tokarevich N.K., Blinova O.V., Stoyanova N.A., Baimova R.R., Siuziumova E.A., Lomonosova V.I., Tronin A.A., Buzinov R.V., Sokolova O.V., Gnativ B.R., Buts L.V., Bubnova L.A., Safonova O.S., Stankevich A.I., Kalinina E.L., Vikse R., Andreassen A.K.

SEROPREVALENCE OF TICK-BORNE DISEASES IN THE NORTHWEST FEDERAL DISTRICT OF THE RUSSIAN FEDERATION 891

Lavrentieva I.N., Bichurina M.A., Antipova A.Yu., Camara J., Hoang M., Bancevic M.D., Zheleznova N.V., Egorova S.A., Totolian A.A.

A HERD IMMUNITY TO RUBELLA VIRUS IN SELECTED GEOGRAPHICAL REGIONS 902

Tsvirkun O.V., Samoilovich E.O., Tikhonova N.T., Gerasimova A.G., Turaeva N.V., Ermolovich M.A., Semeiko G.V.

STATE OF ANTI-RUBELLA VIRUS POPULATION IMMUNITY IN THE REPUBLIC OF BELARUS AND RUSSIAN FEDERATION 909

Tereshko D.L., Novitskaya I.V., Zakharova I.B., Trien D., Kuznetsov A.N., Kulakov M.Ya., Budchenko A.A., Pushkar V.G., Viktorov D.V., Toporkov A.V.

OBTAINING AND USING ERYTHROCYTE ANTIGENIC MELIIDOSIS DIAGNOSTIC AGENT IN THE ANALYSIS OF SERUM SAMPLES FROM MELIIDOSIS-ENDEMIC PROVINCES HA GIANG, LANG SON AND QUANG NINH OF THE SOCIALIST REPUBLIC OF VIETNAM 919

Voropaev A.D., Yekaterinchev D.A., Urban Yu.N., Zverev V.V., Nesvizhsky Yu.V., Voropaeva E.A., Likhanskaya E.I., Afanasiev M.S., Afanasiev S.S.

CDR1, CDR2, MDR1 AND ERG11 EXPRESSION IN AZOLE RESISTANT CANDIDA ALBICANS ISOLATED FROM HIV-INFECTED PATIENTS IN CITY OF MOSCOW 929

Samoylenko E.S., Kolesnikova N.V., Baklay V.I., Maydannikova E.Yu., Omelchenko E.V.

VEGF GENE POLYMORPHISM IN COMPLICATED INFECTIVE ENDOCARDITIS 938

Valizadeh G., Khamseh M.-E., Kashaniyan M., Rafiei-Sefiddashti R., Hadighi R.

ROLE OF TOXOPLASMA GONDII IN THYROIDITIS IN PREGNANT WOMEN 947

Skupnevskii S.V., Pukhaeva E.G., Badtiev A.K., Rurua F.K., Batagova F.E., Farnieva Zh.G.

IMPROVING SAFETY OF OIL ADJUVANT-BASED VACCINES 953

Short communications

Koteneva E.A., Tsygankova O.I., Shcherbakova V.Yu., Kalinin A.V., Rodionov I.S., Serdyukov V.V., Abramovich A.V., Kulichenko A.N.

CYTOKINE PROFILE IN IN VITRO MOUSE MACROPHAGE CULTURE INFECTED WITH BACILLUS ANTHRACIS SPORES WITH VARYING PLASMID COMPOSITION 963

Kurashova S.S., Balovneva M.V., Ishmukhametov A.A., Teodorovich R.D., Popova Yu.V., Tkachenko E.A., Dzagurova T.K.

IMMUNE RESPONSE EVALUATION IN THE GUINEA PIGS AFTER IMMUNIZATION WITH THE EXPERIMENTAL PUUMALA VIRUS VACCINE 971

Methods

Ogarkov O.B., Zhdanova S.N., Orlova E.A., Khromova P.A., Belkova N.L., Sinkov V.V., Kondratov I.G.

16S-ITS-23S rRNA OPERON SEGMENT SEQUENCING PROVIDES NECESSARY AND SUFFICIENT CONDITIONS FOR BACTERIAL SPECIES-SPECIFIC IDENTIFICATION 976

Saitgalina M.A., Ostankova Yu.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 981

Instructions to Authors 997

Author index 1000

Subject index 1000

ЭКОЛОГИЧЕСКИЙ СЦЕНАРИЙ ВИДОБРАЗОВАНИЯ МИКРОБА ЧУМЫ *YERSINIA PESTIS* КАК ОСНОВА АДЕКВАТНОЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЭВОЛЮЦИОННОЙ МОДЕЛИ

В.В. Сунцов

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

Резюме. Известно, что прямым предком возбудителя чумы — микроба *Yersinia pestis* — является психрофильный псевдотуберкулезный микроб 1-го серотипа (*Y. pseudotuberculosis* 0:1b) — возбудитель дальневосточной скарлатиноподобной лихорадки (ДСЛ) — кишечной инфекции широкого круга беспозвоночных и позвоночных животных, обитающих в холодных районах Северной и Центральной Азии и Дальнего Востока. Однако механизм видообразования *Y. pestis* остается не вполне ясным. Многочисленные филогении возбудителя, созданные на основе молекулярно-генетических (МГ) технологий, во многом противоречивы, не согласуются с надежными фактами классических естественнонаучных направлений — экологии, эпизоотологии, биогеографии, палеонтологии и других и не соответствуют положениям современного эволюционного учения (синтетической теории эволюции). На вопросы, где, когда, каким образом и при каких обстоятельствах возник вид *Y. pestis*, МГ-подход доверительного ответа не дает. Одной из причин сложившейся ситуации видится неадекватность используемой в филогенетике *Y. pestis* молекулярной эволюционной модели. Знание жизненных циклов предкового псевдотуберкулезного и производного чумного микробов и их уникальных экологических особенностей позволяет создать доверительную экологическую модель эволюции чумного микроба, на основе которой следует оценивать закономерности молекулярной изменчивости и выстраивать адекватную молекулярную модель, которую можно будет принять для МГ-реконструкции истории этого патогена. Согласно экологической модели, вид *Y. pestis* сформировался тритопно (почти) одновременно из клонов (популяций) возбудителя ДСЛ в трех географических популяциях монгольского сурка-гарбагана (*Marmota sibirica*) и паразитирующей на нем блохи *Oropsylla silantiewi*. Индуктором видообразования послужило последнее максимальное (сарпанское) похолодание в Центральной Азии, имевшее место 22–15 тыс. лет назад. Похолодание и глубокое промерзание грунта стало причиной изменения поведения личинок сурочьей блохи — возникновения факультативной гематофагии, которая, в свою очередь, привела к уникальному, травматическому (не традиционному алиментарному), способу заражения спящих сурков ДСЛ и, как следствие, к уникальному способу видообразования *Y. pestis*. Молекулярная модель должна предусматривать перипатрическое тритопное видообразование *Y. pestis*, наличие многочисленных параллелизмов внутривидовой изменчивости, связанной с тритопным видообразованием, и квантовый принцип видообразования в высокоизменчивой гетеротермной (гетероиммунной) стрессовой гостально-векторной среде сурков–блоха (*Marmota sibirica* — *Oropsylla silantiewi*) с участием стрессиндуцированного мутагенеза. Такая молекулярная модель эволюции может быть полезной для совершенствования молекулярной методологии филогенетических построений других паразитических микроорганизмов.

Ключевые слова: *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, видообразование, филогенез, эволюционные модели, экологический сценарий.

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. Экологический сценарий видообразования микроба чумы *Yersinia pestis* как основа адекватной молекулярной эволюционной модели // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 5. С. 809–818.
doi: 10.15789/2220-7619-ESO-1955

Citation:

Suntsov V.V. Ecological scenario of the plague microbe *Yersinia pestis* speciation underlying adequate molecular evolutionary model // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 5, pp. 809–818. doi: 10.15789/2220-7619-ESO-1955

ECOLOGICAL SCENARIO OF THE PLAGUE MICROBE *YERSINIA PESTIS* SPECIATION UNDERLYING ADEQUATE MOLECULAR EVOLUTIONARY MODEL

Suntsov V.V.

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

Abstract. It is known that the psychrophilic pseudotuberculosis microbe serotype 1 (*Y. pseudotuberculosis* 0:1b) causing Far East scarlet-like fever (FESLF) — an intestinal infection found in a wide range of invertebrates and vertebrates inhabiting cold regions in the Northern and Central Asia as well as Far East is direct ancestor of the plague causative agent *Yersinia pestis*. However, the mechanism of *Y. pestis* speciation remains poorly elucidated. Numerous *Y. pestis* phylogenies created by using molecular genetic (MG) technologies are largely contradictory, being not in line with reliable data obtained by natural science approaches (e.g., ecology, epizootology, biogeography, and paleontology), which disagree with current evolutionary doctrine (synthetic theory of evolution). The MG approach provides no definitive answer to the questions of where, when, how, and under what circumstances the species *Y. pestis* arose. One of the reasons for such situation might be due to inadequacy of using the molecular evolutionary model for *Y. pestis* phylogenetics. Knowledge of the life cycles for the ancestral pseudotuberculosis and derivative plague microbes as well as related unique environmental features allows to create a reliable ecological model for the plague microbe evolution to be further used for assessing patterns of molecular variability and building proper molecular model that might be accepted for MG-reconstruction of plague microbe history. According to the ecological model, the species *Y. pestis* was formed in a tritopic manner (almost) simultaneously from FESLF clones (populations) in the three geographical populations of the Mongolian marmot-tarbagan (*Marmota sibirica*) and the flea *Oropsylla silantiewi* parasitizing on it. The inducer of speciation was coupled to the last maximum (Sartan) cooling in Central Asia occurred 22–15 thousand years ago. Soil cooling and deep freezing resulted in altered behavior of the marmot flea larvae with emergence of facultative hematophagy, which, in turn, led to a unique traumatic (compared to routine alimentary) infection route of sleeping marmots with FESLF and, as a result, a unique way of *Y. pestis* speciation. The molecular model should predict a *Y. pestis* peripatric tritope speciation, existing numerous parallelisms in intraspecific variability associated with tritope speciation, and the quantum principle of speciation in the highly variable heterothermic (heteroimmune) stressful marmot-flea (*Marmota sibirica* — *Oropsylla silantiewi*) host-vector environment involving stress-induced mutagenesis. Such molecular model of evolution may be useful for improving molecular methodology of phylogenetic constructions for a wide range of parasitic microorganisms.

Key words: *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, speciation, phylogenesis, evolutionary models, ecological scenario.

Введение

Возбудитель чумы — микроб *Yersinia pestis* — был открыт Александром Йерсеном в Гонконге в 1894 г. в начале 3-й пандемии. С этого момента началось глубокое всестороннее изучение возбудителя и вызываемой им болезни. Еще на начальных этапах исследований было высказано предположение о происхождении чумного микроба от псевдотуберкулезного: возбудители этих болезней имеют некоторые сходные морфологические признаки и биохимические свойства. На рубеже нового тысячелетия в инфектологии стали широко применять молекулярно-генетические (МГ) методы исследований, которые возвели диагностику возбудителя чумы до высокой степени совершенства. К настоящему времени определены структуры геномов популяций чумного микроба из большинства природных очагов мира [16]. Обнаружены и описаны фрагменты «археологической» ДНК, извлеченной из останков (зубы, кости) человеческих жертв былых пандемий [26, 27, 35]. Полученные МГ-данные позволили в общих чертах представить молекулярную эволюционную модель микроба *Y. pestis* и на ее основе предложить молекулярную версию истории воз-

никновения, высказать предположения о хронологии, географии и исторической динамике мирового распространения возбудителя чумы, иными словами, реконструировать его филогению [16, 17, 24]. Однако все предложенные МГ-филогении видятся крайне противоречивыми, не подтверждаются фактами, представленными классическими естественнонаучными направлениями: экологией, эпизоотологией, биogeографией, палеонтологией и другими, и не соответствуют положениям современного эволюционного учения (синтетической теории эволюции). Возникла парадоксальная ситуация. С одной стороны, МГ-методология филогенетических реконструкций возбудителя чумы хорошо разработана, созданы и адаптированы алгоритмы и многочисленные компьютерные программы для анализа молекулярных признаков, имеется продвинутая технологическая база молекулярных исследований, молекулярные технологии стали мейнстримными в филогенетике *Y. pestis*. С другой стороны, за прошедшие почти четверть века интенсивных МГ-исследований силами многих специализированных лабораторий в развитых странах мира так и не удалось создать достоверный сценарий происхождения и мировой экспан-

сии этого патогена. На тривиальные вопросы, где, когда, каким образом и при каких обстоятельствах возникла чума и как распространялась в мире, МГ-подход удовлетворительного ответа дать не в состоянии. Насколько впечатляющими являются достижения МГ-подхода в диагностике возбудителя, выявлении его генетического и молекулярного разнообразия, настолько удручающими выглядят озвученные закономерности молекулярной эволюции. Выявленное внутривидовое МГ-разнообразие *Y. pestis* пока не удается ранжировать в достоверные эволюционные линии. Как правило, работы по филогенетике чумного микроба завершаются демонстрацией филогенетических дендрограмм, показывающих молекулярно-статистические взаимоотношения геновариантов (подвидов, географических популяций), и эти отношения не привязаны к природным и/или историческим событиям. К примеру, все молекулярные филогенетические дендрограммы фиксируют наличие политомии (узел N07, «Big Bang»), которая возникла в Азии, якобы накануне 2-й пандемии («Черная смерть», 1346 г.). Но причин возникновения этого совершенно не тривиального природного события — недавнего в эволюционном масштабе времени почти одновременного, взрывного возникновения основных генеалогических ветвей *Y. pestis* (branches 1–4) — МГ-подход не называет и даже не предполагает (рис. 1, II обложка).

Явным несоответствием МГ-выводов классическим положениям эпизоотологии видится прокламируемая МГ-подходом двухволновая экспансия возбудителя чумы из района видообразования в Азии [10]. Полагают, что сначала возникли «полевковые» (*Microtinae*) природные очаги в Азии — или на Кавказе [24], или на Цинхайском плато (Восточный Тибет) [16], которые очень быстро, в течение сотен или нескольких тысяч лет, широко распространились на гигантской по площади территории в Евразии — от Маньчжурии и восточного Тибета на востоке до Предкавказья и Ближнего Востока на западе и от Забайкалья и северного Прикаспия на севере до Гималаев на юге — образовав зону первичных природных «полевковых» очагов (рис. 1, II обложка). Полагают, что возбудитель в этих очагах был слабовирулентным или авирулентным для сусликов, сурков, песчанок и человека, не имел полноценного набора факторов вирулентности. Затем через тысячи лет существования некоторый слабовирулентный «полевковый» подвид (возможно *Y. pestis* ssp. *ulegeica*, 0.PE5, циркулирующий в популяциях монгольской пищухи на Алтае, цит. по [17]) при неизвестных обстоятельствах «мигрировал» из Монголии на Тянь-Шань в популяции алтайского сурка (*Marmota*

baibacina), приобрел свойство высокой вирулентности и второй волной распространился в пределах «полевковых» очагов, также проник на Индостан и Ближний Восток. Так, согласно МГ-подходу, в два этапа возникли существующие ныне симпатричные, семисимпатричные (смежные) и аллопатричные природные очаги Евразии со слабо- и высокопатогенными возбудителями. Эта молекулярная схема двух волн азиатской экспансии природных очагов чумы не поддается эпизоотологической и биогеографической логике: в природе чума распространяется последовательно по принципу «масляного пятна» при внутри- и межпопуляционных и внутри- и межвидовых паразитарных контактах через укусы блох-переносчиков; один вид *Y. pestis* не может формировать один и тот же первичный природный ареал дважды, в противном случае такое уникальное явление должно иметь достоверное объяснение [10].

Другим казусным примером может служить обоснование монофилии вновь предложенного подвида *Y. pestis central-asiatica* только сходством молекулярных маркеров [20]. Этот подвид включает якобы близкородственные биовары *hissarica* (0.PE4h), *talassica* (0.PE4t), *altaica* (0.PE4a) и *microtus* (0.PE4m), циркулирующие в разделенных огромными расстояниями природных очагах чумы на Гиссаре, Таласе, в Горном Алтае и на Хэнтэе и во Внутренней Монголии (Китай). На основании сходства SNP-маркеров полагают, что перечисленные биовары образуют голофилетическую группу (то есть реальный подвид). При этом известно, что основными хозяевами инфекции в этих разрозненных, широко разбросанных на азиатских пространствах очагах являются млекопитающие, относящиеся к разным видам, родам, даже к разным отрядам (*Rodentia* и *Lagomorpha*). С экологических и биогеографических позиций утверждение близкого родства выше перечисленных биоваров и их монофилетическое (голофилетическое) происхождение только по сходству нуклеотидных SNP-маркеров представляется логическим нонсенсом.

Корректность результатов любого филогенетического анализа зависит от выбора адекватной эволюционной модели, наиболее точно описывающей исследуемые объекты. Судя по очевидным в МГ-филогенетических схемах противоречиям, применяемые для реконструкции филогенеза микроба чумы эволюционные модели не срабатывают. Напрашивается вопрос: почему? Ответ, по нашему представлению, следует искать в эволюционной уникальности чумного микроба. Этот патоген занимает уникальное систематическое положение. По молекулярно-генетическим признакам он относится к семейству возбудителей кишечных инфекций

Enterobacteriaceae и к роду *Yersinia*. В то же время по экологическим (этиологическим, клиническим) свойствам он является возбудителем системной («кровяной») инфекции. То есть этот патоген занимает отличную от кишечных бактерий экологическую нишу и адаптивную зону. Микроб чумы — единственный среди кишечных возбудителей семейства *Enterobacteriaceae*, насчитывающего более 250 видов [22], который передается трансмиссивным (не пищевым!) способом. Уникальность положения чумного микроба в семействе кишечных микроорганизмов предписывает разработку для него *ad hoc* молекулярной эволюционной модели. Такая модель может быть создана на основе экологических знаний о жизненных циклах микроба чумы и его предковой формы — псевдотуберкулезного микроба.

Внедрение МГ-методологий в исследование возбудителей чумы и псевдотуберкулеза в последние два десятилетия привело к двум краеугольным открытиям, позволившим пересмотреть положения классической теории природной очаговости чумы и приблизившим решение проблемы происхождения и мировой экспансии этой инфекции. В предлагаемом обзоре описаны некоторые параметры экологической модели (сценария) видообразования и мировой экспансии возбудителя чумы и приведено сравнение ее параметров с параметрами молекулярной модели. Сравнительный анализ двух моделей позволит наметить пути создания адекватной молекулярной модели.

Прямой предок возбудителя чумы

Генетическими исследованиями О-антигена чумного и псевдотуберкулезного микробов было установлено, что прямым предком возбудителя чумы является возбудитель псевдотуберкулеза 1-го серотипа *Y. pseudotuberculosis* 0:1b, вызывающий дальневосточную скарлатиноподобную лихорадку (ДСЛ) — кишечную инфекцию, широко распространенную в холодных районах Северной и Центральной Азии и Дальнего Востока [8, 18, 19, 29]. Таким образом, был надежно определен корень филогенетического дерева *Y. pestis*, что с учетом экологической фактологии сделало избыточным в филогенетической методологии сложный молекулярно-статистический поиск абстрактной анцестральной формы чумного микроба MRCA. Это открытие инициировало дедуктивную переоценку известных экологических фактов, на которых выстраивались гипотезы о филогенезе возбудителя в классической версии теории природной очаговости чумы. Возник вопрос: каким образом и при каких уникальных обстоятельствах произо-

шел эволюционный переход возбудителя ДСЛ из пищеварительного тракта в принципиально иную среду обитания — кровь теплокровных хозяев-грызунов?

Ответ на этот вопрос был получен экологическими исследованиями природных очагов в Центральной Азии [11, 34]. Было показано, что вид *Y. pestis* сформировался из клона (популяции) возбудителя ДСЛ в популяциях монгольского сурка-тарбагана (*Marmota sibirica*) и паразитирующей на нем блохи *Oropsylla silantiewi*. Видообразовательный процесс проходил в популяциях монгольского сурка, находящегося в состоянии зимней спячки. В течение спячки сурки в зимовочном гнезде регулярно просыпаются. С октября по апрель состояние глубокого сна (торпора) до 15–20 раз сменяется состоянием бодрствования (эутермии). Во время торпора температура тела зимоспящих грызунов (сурков, сусликов, бурундуков) составляет 2–10°C, и иммунные процессы подавлены. Во время эутермии температура тела возвращается к норме, около 37°C, и активность иммунных ответов нормализуется [14, 25]. Выход из торпорного состояния у сурков проходит достаточно быстро, в течение 3–6 часов. То есть в течение этих нескольких часов возбудители инфекций, оказавшиеся в крови сурков, подвергаются колоссальному температурно-иммунному стрессу. Но как кишечный возбудитель ДСЛ оказался в крови спящих монгольских сурков в зимний период, когда сурки не питаются? Однозначный ответ на этот вопрос дают экологические наблюдения [11, 34].

Сурки зимуют семьями, включающими до 20 и более зверьков. Перед залеганием в спячку входы зимовочной норы, кроме одного, засыпают снаружи растительной ветошью, мелкоземом, щебнем и камнями. Последний лаз закрывают «пробкой» изнутри. Монгольский сурок обитает в Центральной Азии — аридном районе, где выпадает мало осадков и почва сухая. «Пробка», изготовленная из сухих сыпучих материалов непрочная, может быть легко раскопана хищниками — степным хорьком и корсаком. В связи с этим у монгольского сурка выработано специфичное защитное поведение — использование для изготовления пробки собственной метаболической воды. Накануне ухода в спячку сурки в отнорках-уборных накапливают строительный материал и экскременты, которые используются в качестве цементирующего состава сухой сыпучей строительной смеси. В процессе устройства пробки камни, обваленные в экскрементах, сурки из отнорков-уборных перемещают в зубы. Таким необычным способом с фекалиями возбудитель ДСЛ в массе попадает в ротовую полость готовящихся к спячке сурков. При этом сурки

перед спячкой не питаются, возбудитель ДСЛ не проникает в тонкий кишечник и популяция сурков не инфицируется ДСЛ. Описанное видоспецифическое норостроительное поведение монгольского сурка сложилось в течение второй половины кайнозоя как поведенческая адаптация к обитанию в аридных условиях Центральной Азии. Но как кишечный возбудитель ДСЛ из ротовой полости сурков эволюционным путем проник в лимфо-миелоидный комплекс животных, преодолев барьер между пищеварительной и кровеносной (лимфо-миелоидной) системами теплокровного хозяина, и преобразовался в нового патогена?

Эволюционная молодость возбудителя чумы

Согласно классической версии теории природной очаговости чумы ее возбудитель сформировался в процессе коэволюции сочленов эпизоотической триады «грызун–блоха–возбудитель» в отдаленные геологические эпохи, олигоцен–плиocene, от 30 до 5 млн лет назад [5, 7]. Полагали, что видообразование могло пройти либо в популяциях песчанок (*Gerbillinae*) в Старом Свете, вероятно в Евразии, либо в Новом Свете в популяциях сурков (*Marmotini*). Межконтинентальное распространение возбудителя могло проходить при миграциях и расселении норových грызунов по межконтинентальным сухопутным мостам, периодически возникавшим в геологическое время. Но современные исследования, проведенные на основе молекулярной методологии, надежно показали, что микроб чумы является эволюционно молодым патогеном. Время его появления на Земле как вида *Y. pestis* оценивается в диапазоне от 1500 до 20 000 лет назад [12, 13] или не ранее 30 000 лет назад [21].

Согласно экологическому подходу, индуктором видообразования стал известный физико-климатический фактор — наступление в финале плейстоцена 22–15 тыс. лет назад максимального (сарганского) похолодания в Северной и Центральной Азии и на Дальнем Востоке [11, 34]. В Центральной Азии грунт стал промерзать на глубину более 3 м [23]. Глубокое промерзание грунта вызвало изменение поведения личинок сурковой блохи: в силу положительного термотаксиса в холодные месяцы года блошинные личинки стали перемещаться из промерзающей гнездовой выстилки зимовочных нор монгольского сурка, располагающиеся на глубине 2–2,5 м, на более теплые тела спящих животных (5...37°C). Этот феномен сохранился до настоящего времени и может быть изучен актуальными методами. Личинки со стохастиче-

ческой закономерностью проникают в ротовую полость спящих животных, создают на слизистой скарификации и питаются кровью [9]. Раны на слизистой стали входными воротами для инфекции ДСЛ, то есть заражение популяции монгольского сурка в зимний период проходило уникальным травматическим (не традиционным пищевым!) способом (помним, что в зимне-весенние месяцы в ротовой полости спящих сурков вместе с личинками блох присутствуют экскременты и, соответственно, возбудитель ДСЛ). Уникальный способ заражения привел к формированию уникального возбудителя новой инфекции.

Согласно МГ и экологическим выводам, видообразование *Y. pestis* прошло в короткий промежуток времени [16]. Экологические факты дают основания полагать, что в быстром «квантовом» видообразовании чумного микроба решающую роль сыграли два пока еще слабо изученных явления — кислородный «взрыв» макрофагов в организме гибернирующих гетеротермных (гетероиммунных) сурков, создавший быстро изменяющиеся («in an eye blink» [36]) стрессовые условия для предкового возбудителя ДСЛ, и стресс-индуцированный мутагенез в эволюционирующей микробной популяции, на порядки ускоряющий изменчивость и скорость эволюции [30, 32].

Тритопное происхождение возбудителя чумы

Для того, чтобы понять, как проходило преобразование клона возбудителя ДСЛ в популяцию чумного микроба, необходимо иметь представление о территориальной структуре среды обитания чумного и псевдотуберкулезного микробов, прежде всего о структуре ареала монгольского сурка, с которым экологический подход связывает истоки чумы.

Как было показано [11, 34], триггером видообразования *Y. pestis* послужило максимальное сарганское похолодание в Центральной Азии, охватившее (почти) одновременно весь ареал монгольского сурка. Ареал этого вида включает три относительно изолированные географические популяции, представленные отдельными подвидами. Подвид *M. sibirica sibirica* обитает в восточной части ареала, на Хэнтэе, в Забайкалье, Маньчжурии и в китайской провинции Внутренняя Монголия. *M. sibirica caliginosus* заселяет Хангайское горное плато в центральных районах Монголии. В западной Монголии и в Тыве на Хархира-Турген-Монгун-Тайгинском горном поднятении обитает пока не описанный подвид *M. sibirica* ssp. [2, 15]. Сурочьи очаги чумы имеются во всех трех

Таблица. Некоторые параметры молекулярной и экологической эволюционных моделей *Yersinia pestis*
 Table. Some parameters of molecular and ecological *Yersinia pestis* evolutionary models

Параметры Parameters	Экологическая модель Ecological model	Молекулярная модель Molecular model
Базовая модель Baseline model	Модель прогрессивной эволюции. Анализируются адаптивные генетические и экологические признаки Model of progressive evolution. Adaptive genetic and ecological traits are analyzed	Модель нейтральной эволюции. Анализируются нейтральные мутации нуклеотидных признаков-маркеров Model of neutral evolution. Neutral mutations of nucleotide traits-markers are analyzed
Предковая(-ые) форма(-ы) микроба чумы Ancestral form(s) of plague microbe	<i>Y. pseudotuberculosis</i> 0:1b. Три геноварианта (популяции) возбудителя ДСЛ на Хэнтэе, Хангае и Хархира-Турген-Монгун-Тайгинском горном поднятии <i>Y. pseudotuberculosis</i> 0:1b. Three FESLF genovariants (populations) in Khentei, Khangai and Kharhira-Turgen-Mongun-Taiginsky mountain uplift	<i>Y. pseudotuberculosis</i> 0:1b. MRCA (most recent common ancestor) — абстрактная статистически обоснованная предковая форма <i>Y. pestis</i> <i>Y. pseudotuberculosis</i> 0:1b. MRCA (most recent common ancestor) is a putative statistically justified ancestral form of <i>Y. pestis</i>
Способ видообразования Method of speciation	Перипатрическое. «Миграция» возбудителя ДСЛ в кровь монгольского сурка в трех географических популяциях. Автономное постепенное трилопное популяционно-генетическое преобразование клонов-основателей Peripatric. «Migration» of FESLF into circulation of Mongolian marmot in three geographical populations. Autonomous gradual tritope population-genetic transformation of founder clones	Генетическая сальтация. Горизонтальный перенос генных структур от других микроорганизмов или из внешней среды, делеции и инактивации генов, утративших функции в новой среде Genetic saltation. Horizontal transfer of gene structures from other microorganisms or from the external environment, deletion and inactivation of genes, which lost their functions in the new environment
Эволюционный возраст возбудителя чумы Evolutionary age of the plague pathogen	Эволюционно молодой, сформировался под влиянием последнего максимального (сартанского) похолодания в Центральной Азии 22–15 тыс. лет назад Evolutionarily young, it was formed under the influence of the last maximum (Sartan) cooling in Central Asia occurred 22–15 thousand years ago	Эволюционно молодой, «генетическое» видообразование прошло не ранее 30 тыс. лет назад Evolutionarily young, “genetic” speciation occurred as few as 30 thousand years ago
Скорость видообразования Speciation rate	Быстрое, квантовое, постепенное (несальтационное) формирование популяции <i>Y. pestis</i> с участием кислородного взрыва макрофагов в организме исходного хозяина — монгольского сурка, и стресс-индуцированного мутагенеза предкового возбудителя ДСЛ и переходных форм Rapid, quantum, gradual (non-saltation) formation of a <i>Y. pestis</i> population involving macrophage oxidative burst in the original host species, the Mongolian marmot, and stress-induced mutagenesis of the ancestral FESLF pathogen and its transitional forms	Быстрое, сальтационное видообразование путем нескольких генетических актов аквизиции, делеций и инактиваций Rapid, saltational speciation via several genetic rounds of acquisition, deletion and inactivation

Параметры Parameters	Экологическая модель Ecological model	Молекулярная модель Molecular model
Район видообразования Region of speciation	Одновременное тритопное видообразование в Центральной Азии (Монголии): на Хэнтэе, Хангае и Хархира-Турген-Монгун-Тайгинском горном комплексе Simultaneous tritopic speciation in Central Asia (Mongolia): on Khentei, Khangai and Kharhira-Turgen-Mongun-Taiginsky mountain massive	Не определен. Предположительно Кавказ или Восточный Тибет (Цинхайское плато) Not determined. Presumably the Caucasus or Eastern Tibet (Qinghai Plateau)
Исходный хозяин микроба чумы Original host species for plague microbe	Монгольский сурок <i>Marmota sibirica</i> Mongolian marmot <i>Marmota sibirica</i>	Не определен. Предположительно сибирский тушканчик <i>Allactaga sibirica</i> (Цинхайское плато), обыкновенная полевка <i>Microtus arvalis</i> (Кавказ) или какой-либо вид сурка Not determined. Presumably Siberian jerboa <i>Allactaga sibirica</i> (Qinghai Plateau), common vole <i>Microtus arvalis</i> (Caucasus), or some kind of marmot
Родственные отношения в видовой группе <i>Y. pestis</i> Relationships in the <i>Y. pestis</i> species group	Три самостоятельных голофилетических группы Three independent holophyletic groups	Единая монофилетическая (голофилетическая) группа A single monophyletic (holophyletic) group
Структура эволюционного процесса <i>Y. pestis</i> Pattern of <i>Y. pestis</i> evolutionary process	Видообразование и территориальная экспансия — принципиально разные процессы. Видообразование — тритопный «квантовый» процесс, экспансия — относительно равномерное территориальное расселение по принципу «масляного пятна» Speciation and territorial expansion are fundamentally different processes. Speciation is a tritopic “quantum” process, expansion is a relatively uniform territorial distribution according to the “oil spot” strategy	Единый относительно равномерный процесс видообразования и последующей дивергенции, совершающийся по единому эволюционному принципу — накоплению нейтральных мутаций A single relatively uniform process of speciation and subsequent divergence occurring according to a single evolutionary principle — accumulation of neutral mutations

географических популяциях, и в каждом очаге циркулирует свой определенный геновариант (подвид) возбудителя: 2.ANT3, 3.ANT2 и 4.ANT1 соответственно [1, 3, 4, 6, 20, 28]. Так как максимальное похолодание охватило все географические популяции монгольского сурка (почти) одновременно [23], можно полагать, что видообразование чумного микроба из клонов возбудителя ДСЛ прошло (почти) одновременно во всех трех популяциях сурка. Дальнейшая территориальная экспансия трех геновариантов (подвидов) возбудителя сурочьей чумы проходила самостоятельными параллельными маршрутами [33] (рис. 2). В таком случае три исходных геноварианта (подвида) чумного микроба 2.ANT3, 3.ANT2 и 4.ANT1 образовали три самостоятельных голофилетических группы, имеющие разные эволюционные судьбы. Этот факт принципиально важен при создании эволюционной модели *Y. pestis*: сходные признаки геновариантов из разных филогенетических линий (голофилетических групп) могут быть гомоплазиями, которые следует исключать из филогенетического анализа.

Параметры эволюционных моделей

Приведенное выше частичное описание жизненных циклов и экологических особенностей предкового псевдотуберкулезного и производного чумного микробов позволяет сравнить некоторые параметры экологической и молекулярной моделей эволюции, которые используются в реконструкции филогенеза возбудителя чумы (табл.).

Сравнение параметров моделей позволяет заключить, что экологический сценарий происхождения и мировой экспансии возбудителя чумы является более достоверным, более очевидным, так как согласуется с широким кругом природных событий, произошедших в позднем плейстоцене и голоцене и описанных в научных публикациях [9, 10, 11, 30, 31, 32, 33, 34]. В таком случае, экологический сценарий может быть принят за вербальную модель, на которую следует ориентироваться при разработке молекулярной модели и для оценки достоверности выводов и заключений, которые следуют из МГ-филогенетического анализа [31].

Заключение

Экологический сценарий в настоящее время является «нитью Ариадны» в проблеме происхождения и мировой экспансии чумы и стимулом для создания адекватной модели молекулярной эволюции чумного микроба и методологии филогенетической реконструкции в целом. Установить отношения родства или филогенетические взаимоотношения между таксонами и группами живых организмов можно только в том случае, если известен прямой общий предок изучаемых объектов. В МГ-подходе при изучении возбудителя чумы общим предком всего разнообразия внутривидовых форм *Y. pestis* называют абстрактную, только статистически обоснованную предковую форму (MRCА, а совокупность внутривидовых форм (геновариантов, подвидов, биоваров) без каких-либо обоснований интуитивно рассматривают как монофилетическую (голофилетическую) группу близкородственных микроорганизмов. Экологические факты указывают на ошибочность выстраивания МГ-филогенетической схемы по монофилетическому (голофилетическому) принципу. Совокупность внутривидовых форм *Y. pestis* образована не одной, а тремя голофилетическими группами. Родство геновариантов, входящих в разные голофилетические группы, опосредуется псевдотуберкулез-

ными предками. Это следует учитывать при создании филогенетической эволюционной модели *Y. pestis*. Молекулярная модель должна предусматривать тритоппное видообразование *Y. pestis*, наличие многочисленных параллелизмов внутривидовой изменчивости, связанной с тритоппным видообразованием, и квантовый принцип видообразования в высокоизменчивой гетеротермной (гетероиммунной) гостально-векторной среде сурок–блоха (*Marmota sibirica* — *Oropsylla silantiewi*) с участием стресс-индуцированного мутагенеза.

Экологический сценарий происхождения и мировой экспансии возбудителя чумы раскрывает панораму природных событий, на фоне которых разворачивалась «молекулярная» история чумы и с которой молекулярный сценарий не должен иметь каких-либо противоречий. Аналитическая оценка молекулярных сценариев по отношению к экологическому может выявить закономерности молекулярной эволюции и внесет важный вклад в развитие теории молекулярной эволюции чумного патогена. После того как будут выявлены молекулярные закономерности эволюции, конгруэнтные многочисленным фактам и факторам других естественнонаучных направлений, можно будет заявить о рождении полноценной теории молекулярной эволюции *Y. pestis*, обладающей прогностическими свойствами.

Список литературы/References

1. Балахонов С.В., Ярыгина М.Б., Гладких А.С., Миронова Л.В., Феранчук С.И., Бочалгин Н.О., Рождественский Е.Н., Витязева С.А., Нацагдорж Б., Цэрэнноров Д., Цогбадрах Н., Косилко С.А., Корзун В.М. Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Yersinia pestis*, выделенных на монгольской территории трансграничного Сайлюгемского природного очага чумы // Проблемы особо опасных инфекций. 2019. № 3. С. 34–42. [Balakhonov S.V., Yarygina M.B., Gladkikh A.S., Mironova L.V., Feranchuk S.I., Bochalgin N.O., Rozhdestvensky E.N., Vityazeva S.A., Natsagdorzh B., Tserenrorov D., Tsogbadrakh N., Kosilko S.A., Korzun V.M. Molecular-genetic characteristics of *Yersinia pestis* strains isolated in the mongolian territory of transboundary Sailyugem natural plague focus. *Problemy osobo opasnykh infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2019, no. 3, pp. 34–42. (In Russ.)] doi: 10.21055/0370-1069-2019-3-34-42
2. Банников А.Г. Млекопитающие Монгольской Народной Республики. М.: Изд-во АН СССР, 1954. 670 с. [Bannikov A.G. Mammals of Mongol People Republic. *Moscow: Acad. Sci. USSR*, 1954. 670 p. (In Russ.)]
3. Ерошенко Г.А., Попов Н.В., Краснов Я.М., Никифоров К.А., Кузнецов А.А., Матросов А.Н., Кутырев В.В. Природный мегаочаг основного подвида *Yersinia pestis* античного биовара филогенетической ветви 4.ANT в Горном Алтае // Проблемы особо опасных инфекций. 2018. № 2. С. 49–56. [Eroshenko G.A., Popov N.V., Krasnov Y.M., Nikiforov K.A., Kuznetsov A.A., Matrosov A.N., Kutuyrev V.V. Natural mega-focus of *Yersinia pestis* main subspecies, antique biovar, phylogenetic line 4.ANT in Gorny Altai. *Problemy osobo opasnykh infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2018, no. 2, pp. 49–56. (In Russ.)] doi: 10.21055/0370-1069-2018-2-49-56
4. Куклева Л.М., Шавина Н.Ю., Одинокоев Г.Н., Оглодин Е.Г., Носов Н.Ю., Виноградова Н.А., Гусева Г.А., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Анализ разнообразия и определение геновариантов штаммов возбудителя чумы из очагов Монголии // Генетика. 2015. Т. 51, № 3. С. 298–305. [Kukleva L.M., Shavina N.Yu., Odinokov G.N., Oglochin E.G., Nosov N.Yu., Vinogradova N.A., Guseva N.P., Eroshenko G.A., Kutuyrev V.V. Analysis of diversity and identification of the genovariants of plague agent strains from mongolian foci. *Genetika = Genetics*, 2015, vol. 51, no. 3, pp. 298–305. (In Russ.)]
5. Кучерук В.В. Вопросы палеогенезиса 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. Павлова А.И., Ерошенко Г.А., Одинокоев Г.Н., Куклева Л.М., Шавина Н.Ю., Краснов Я.М., Кутырев В.В. Анализ генетической изменчивости штаммов *Yersinia pestis* средневекового биовара из природных очагов чумы России и Монголии // Проблемы особо опасных инфекций. 2012. № 114. С. 49–53. [Pavlova A.I., Eroshenko G.A., Odinokov G.N., Koukleva L.M., Shavina N.Yu., Krasnov Ya.M., Kutuyrev V.V. Analysis of genetic variability of *Yersinia pestis* strains (medieval biovar) isolated in natural plague foci of the Russian Federation and Mongolia. *Problemy osobo opasnykh infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2012, no. 114, pp. 49–53. (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. Дальневосточная скарлатиноподобная лихорадка. М.: Медицина, 1979. 184 с. [Somov G.P. Far Eastern scarlet-like fever. *Moscow: Medicina, 1979. 184 p. (In Russ.)*]
9. Сунцов В.В. Исключительная роль специфической блохи сурков *Oropsylla silantiewi* (Ceratomyzidae: Siphonaptera) в видообразовании микроба чумы *Yersinia pestis* // Паразитология. 2018. Т. 52, № 1. С. 3–18. [Suntsov V.V. The exceptional role of the specific marmot flea *Oropsylla silantiewi* (Ceratomyzidae: Siphonaptera) in the speciation of the plague microbe *Yersinia pestis*. *Parazitologiya = Parazitologiya, 2018, vol. 1, pp. 3–18. (In Russ.)*]
10. 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
11. Сунцов В.В., Сунцова Н.И. Чума. Происхождение и эволюция эпизоотической системы (экологические, географические и социальные аспекты). М.: КМК, 2006. 247 с. [Suntsov V.V., Suntsova N.I. The plague. Origin and evolution of epizootic system (ecological, geographical and social aspects). *Moscow: KMK, 2006. 247 p. (In Russ.)*]
12. 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*
13. 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*
14. Bouma H.R., Carey H.V., Kroese F.G.M. Hibernation: the immune system at rest? *J. Leukoc. Biol., 2010, vol. 88, pp. 619–624. doi: 10.1189/jlb.0310174*
15. Brandler O. Molecular diversity and taxonomy in marmots. Marmots of the old and new world: Proceed. 7th Intern. Conf. on the Genus *Marmota*. *Ulan-Bator, 2018, pp. 97–104*.
16. 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*
17. 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*
18. Fukushima H., Gomyoda M., Hashimoto N., Takashima I., Shubin F.N., Isachikova L.M., Paik I.K., Zheng X.B. Putative origin of *Yersinia pseudotuberculosis* in western and eastern countries. A comparison of restriction endonuclease analysis of virulence plasmids. *Int. J. Med. Microbiol., 1998, vol. 288, pp. 93–102. doi: 10.1016/s0934-8840(98)80105-9*
19. 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*
20. Kutuyev 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: 1106. doi: 10.3389/fmicb.2018.01106*
21. 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*
22. Octavia S., Lan R. The family Enterobacteriaceae. The prokaryotes. Eds.: Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. *Berlin; Heidelberg: Springer, 2014, pp. 225–286*.
23. Owen L.A., Richards B., Rhodes E.J., Cunningham W.D., Windley B.F., Badamgarav J., Dorjnamjaa D. Relict permafrost structures in the Gobi of Mongolia: age and significance. *J. Quaternary Sci., 1998, vol. 13, no. 6, pp. 539–547*.
24. Pisarenko S.V., Evchenko A.Yu., Kovalev D.A., Evchenko Y.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, pp. 1952–1961. doi: 10.1016/j.ygeno.2021.04.021*
25. Prendergast B.J., Freeman D.A., Zucker I., Nelson R.J. Periodic arousal from hibernation is necessary for initiation of immune responses in ground squirrels. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol., 2002, vol. 282, no. 4, pp. 1054–1062. doi: 10.1152/ajpregu.00562.2001*
26. Rascovan N., Sjogren K.G., Kristiansen K., Nielsen R., Willerslev E., Desnues C., Rasmussen S. Emergence and spread of basal lineages of *Yersinia pestis* during the Neolithic Decline. *Cell, 2019, no. 176, pp. 295–305. doi: 10.1016/j.cell.2018.11.005*
27. Rasmussen S., Allentoft M.E., Nielsen K., Orlando L., Sikora M., Sjogren K.-G., Pedersen A.G., Schubert M., Dam A.V., Kapel C.M.O., Nielsen H.B., Brunak S., Avetisyan P., Epimakhov A., Khalyapin M.V., Gnuni A., Kriiska A., Lasak I., Metspalu M., Moiseyev V., Gromov A., Pokutta D., Saag L., Varul L., Yepiskoposyan L., Sicheritz-Ponte T., Foley R.A., Lahr M.M., Nielsen R., Kristiansen K., Willerslev E. Early divergent strains of *Yersinia pestis* in Eurasia 5,000 years ago. *Cell, 2015, no. 163: 571e82. doi: 10.1016/j.cell.2015.10.009*
28. Riehm J.M., Vergnaud G., Kiefer D., Damdindorj T., Dashdavaa O., Khurelsukh T., Zoller L., Wolfe R., Le Fleche P., Scholz H.C. *Yersinia pestis* Lineages in Mongolia. *PLoS One, 2012, vol. 7, no. 2: e30624. doi: 10.1371/journal.pone.0030624*

29. Skurnik M., Peippo A., Ercela 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
30. Suntsov V.V. Origin of the plague: prospects of ecological-molecular-genetic synthesis. *Herald of the Russian Academy of Sciences*, 2019, vol. 89, no. 3, pp. 271–278. doi: 10.1134/S1019331619010118
31. Suntsov V.V. Prospects for the synthesis of ecological and molecular-genetic approaches to the problem of the speciation of the plague microbe *Yersinia pestis*. *Biology Bulletin Reviews*, 2020, vol. 10, no. 4, pp. 324–337. doi: 10.1134/S2079086420040088
32. Suntsov V.V. Quantum speciation of *Yersinia pestis* plague microbe in a heteroimmune environment: in the populations of hibernating tarbagan marmots (*Marmota sibirica*). *Contemporary Problems of Ecology*, 2018, vol. 11, no. 4, pp. 343–354. doi: 10.1134/S199542551804008X
33. Suntsov V.V. Host aspect of territorial expansion of the plague microbe *Yersinia pestis* from the populations of the tarbagan marmot (*Marmota sibirica*). *Biol. Bull. Russ. Acad. Sci.*, 2021, vol. 48, pp. 1367–1379. doi: 10.1134/S1062359021080288
34. Suntsov V.V., Suntsova N.I. Ecological aspects of evolution of the plague microbe *Yersinia pestis* and the genesis of natural foci. *Biology Bulletin*, 2000, vol. 27, pp. 541–552. doi: 10.1023/A:1026651329721
35. Valtuena A.A., Neumann G.U., Spyrou M.A., Musralina L., Aronb F., Beisenov A., Belinskiy A.B., Bos K.I., Buzhilova A., Conrad M., Djansugurova L.B., Dobes M., Ernee M., Fernandez-Eraso J., Frohlich B., Furmanek M., Hałuszkon A., Hansen S., Harney E., Hiss A.N., Hubner A., Key F.M., Khussainova E., Kitov E., Kitova A.O., Knipper C., Kuhner D., Lalueza-Foxa C., Littleton J., Ken Massy K., Mitnik A., Mujika-Alustiza J.A., Olald I., Papac L., Penske S., Peska J., Pinhasi R., Reich D., Reinhold S., Stah R., Stauble H., Tukhbatova R.I., Vasilyev S., Veselovskaya E., Warinner C., Philipp W., Stockhammer P.W., Haak W., Krause J., Herbiga A. Stone age *Yersinia pestis* genomes shed light on the early evolution, diversity, and ecology of plague. *PNAS*, 2022, vol. 119, no. 17: e2116722119. doi: 10.1073/pnas.2116722119
36. Wren B.W. The *Yersinia* — a model genus to study the rapid evolution of bacterial pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2003, vol. 1, no. 1, pp 55–64. doi: 10.1038/nrmicro730

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., PhD, MD (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 23.05.2022
Принята к печати 19.07.2022

Received 23.05.2022
Accepted 19.07.2022

ЭВОЛЮЦИОННЫЕ АСПЕКТЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МИКРОБИОМА ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА И ОРГАНИЗМА-ХОЗЯИНА В ФОРМИРОВАНИИ ЦЕЛОСТНОСТИ ГАСТРОИНТЕСТИНАЛЬНОГО БАРЬЕРА

С.И. Лоскутов¹, С.Н. Прошин², Д.С. Рябухин¹

¹ *Всероссийский научно-исследовательский институт пищевых добавок — филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН, Санкт-Петербург, Россия*

² *Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена, Санкт-Петербург, Россия*

Резюме. Ключевым компонентом функциональной системы жизнеобеспечения и поддержания гомеостаза организма-хозяина является микробиом. На протяжении всего онтогенетического развития, микробиом, включая микробиоту желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), является тем витальным фактором, который обеспечивает не только функционирование организма-хозяина, но и его взаимодействие с окружающей средой. Чтобы раскрыть механизмы, на основе которых микробиом ЖКТ оказывает решающее влияние на организм-хозяина, необходим системный подход, поскольку разные микроорганизмы в разной степени присутствуют в тех или иных отделах ЖКТ. Получившее в последнее время интенсивное развитие новое междисциплинарное направление науки — нанобиоинформатика — рассматривает в качестве основного объекта изучения «генные сети», представляющие собой координируемую группу генов, функционально обеспечивающих формирование и фенотипическое «раскрытие» различных признаков у организма-хозяина. Важное место здесь должно быть уделено генетически детерминированному уровню микробиома ЖКТ, его взаимодействию на уровне пищевых систем организма-хозяина. Появляется все больше данных, указывающих на то, что микробиом прямо участвует в патогенезе заболеваний организма-хозяина, комплексно взаимодействуя с метаболической и иммунной системами хозяина. При этом микробное сообщество неравномерно распределено по ЖКТ, а разные его отделы по-разному активны при взаимодействии с иммунной системой организма-хозяина. «Архитектура» взаимодействия между микробиомом и клетками организма-хозяина чрезвычайно комплексна, а взаимодействие отдельных клеток при этом сильно различается. Бактерии, колонизирующие крипты тонкого кишечника, регулируют пролиферацию энтероцитов, оказывая влияние на репликацию

Адрес для переписки:

Лоскутов Святослав Игоревич
191014, Россия, Санкт-Петербург, Литейный пр., 55,
Всероссийский научно-исследовательский институт
пищевых добавок.
Тел.: 8 905 214-43-23.
E-mail: lislosk@mail.ru

Contacts:

Svyatoslav I. Loskutov
191014, Russian Federation, St. Petersburg, Liteyny pr., 55,
All-Russian Research Institute for Food Additives.
Phone: +7 905 214-43-23.
E-mail: lislosk@mail.ru

Для цитирования:

Лоскутов С.И., Прошин С.Н., Рябухин Д.С. Эволюционные аспекты взаимодействия микробиома желудочно-кишечного тракта и организма-хозяина в формировании целостности гастроинтестинального барьера // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 5. С. 819–826. doi: 10.15789/2220-7619-ЕАО-1633

Citation:

Loskutov S.I., Proshin S.N., Ryabukhin D.S. Evolutionary aspects of gastrointestinal tract microbiome-host interaction underlying gastrointestinal barrier integrity // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 5, pp. 819–826. doi: 10.15789/2220-7619-ЕАО-1633

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема FGUS 2022-0017 ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН).

This work was performed within the framework of the state assignment of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (topic FGUS 2022-0017 FGBNU "V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems" RAS).

ДНК и экспрессию генов, тогда как бактерии на верхушках ворсинок кишечника опосредуют экспрессию генов, отвечающих за метаболизм и иммунный ответ. Энтероциты и клетки Панета, в свою очередь, регулируют жизнедеятельность сообщества микроорганизмов через продукцию полисахаридов (карбогидратов) и антибактериальных факторов на своей поверхности. Таким образом, поддерживается целостность гастроинтестинального барьера (ГИБ), который защищает организм от инфекций и воспаления, тогда как нарушение его целостности приводит к ряду заболеваний. Показано, что микробиом в зависимости от доминирования определенных видов бактерий может поддерживать или нарушать целостность ГИБ. Структурно-функциональная целостность ГИБ важна для гомеостаза организма. К настоящему времени охарактеризовано не менее 50 белков, участвующих в структурно-функциональной интегративности плотных контактов между эпителиальными клетками ЖКТ. В предложенном обзоре рассмотрены именно эти вопросы. В нем представлены оригинальные исследования, выполненные на различных объектах трансляционной биомедицины.

Ключевые слова: микробиом, эволюция, гастроинтестинальный барьер, желудочно-кишечный тракт, белок, трансляционная биомедицина.

EVOLUTIONARY ASPECTS OF GASTROINTESTINAL TRACT MICROBIOME-HOST INTERACTION UNDERLYING GASTROINTESTINAL BARRIER INTEGRITY

Loskutov S.I.^a, Proshin S.N.^b, Ryabukhin D.S.^a

^a All-Russian Research Institute for Food Additives — Branch of V.M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of RAS, St. Petersburg, Russian Federation

^b Herzen University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. In the host sustenance and homeostasis, the microbiome is a key component in the functional system. Throughout ontogenetic development, microbiome including that of the gastrointestinal tract (GIT) is the vital factor that ensures not only host functioning, but also its interaction with environment. To uncover the mechanisms underlying GIT microbiome showing a decisive influence on host organism, a systematic approach is needed, because diverse microorganisms are predominantly localized in different parts of the GIT. Recently, a new interdisciplinary direction of science, nanobioinformatics that has been extensively developed considers “gene networks” as the major object of study representing a coordinated group of genes that functionally account for formation and phenotypic “disclosure” of various host traits. Here, an important place should be provided to the genetically determined level of the gastrointestinal tract microbiome, its interaction at the level of the host food systems. There have been increasing evidence indicating that the microbiome is directly involved in the pathogenesis of host diseases showing a multi-layered interaction with host metabolic and immune systems. At the same time, the microbial community is unevenly distributed throughout the gastrointestinal tract, and its different portions are variously active while interacting with the host immune system. The “architecture” of interaction between the microbiome and host cells is extremely complex, and the interaction of individual cells, at the same time, varies greatly. Bacteria colonizing the crypts of the small intestine regulate enterocyte proliferation by affecting DNA replication and gene expression, while bacteria at the tip of the intestinal villi mediate gene expression responsible for metabolism and immune response. Enterocytes and Paneth cells, in turn, regulate the vital activity of the community of microorganisms through the production of polysaccharides (carbohydrates) and antibacterial factors on their surface. Thus, the integrity of the gastrointestinal barrier (GIB) is maintained, which protects the body from infections and inflammation, while violation of its integrity leads to a number of diseases. It has been shown that depending on the dominance of certain types of bacteria the microbiome can maintain or disrupt GIB integrity. The structural and functional GIB integrity is important for body homeostasis. To date, at least 50 proteins have been characterized as being involved in the structural and functional integrability of tight junctions between gastrointestinal tract epithelial cells. The current review comprehensively discusses such issues and presents original research carried out at various facilities of translational biomedicine.

Key words: microbiome, evolution, gastrointestinal barrier, gastrointestinal tract, protein, translational biomedicine.

Введение

Нейрогуморальная регуляция всего организма в целом и желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) в частности всегда была предметом пристального внимания исследователей и ведущих научных школ. Иван Петрович Павлов впервые предложил концепцию нервизма, которая оказала огромное влияние на развитие исследований, связанных с влиянием высших отделов

нервной системы на работу различных органов и систем организма [40]. Вместе с тем с открытием гистамина и его влияния на функцию ЖКТ стало очевидным, что работа системы пищеварения не может быть объяснена только в рамках концепции нервизма, она подчиняется и гуморальной регуляции. Важную роль в развитии этой концепции сыграли данные о том, что гистамин является фактором, который не всегда связан с секрецией гастрином,

выделение которого контролируется блуждающим нервом. Определенные формы гистамина, такие как α -метилгистамин, секретируемый грамотрицательной бактерией *Helicobacter pylori* (фила *Proteobacteria*), стимулируют высвобождение гастрина [8, 30, 42]. Персистируя в ЖКТ, *H. pylori* посредством секретируемых цитокинов CagA и VacA вызывает повреждение слизистой желудка, что сопровождается усиленной экспрессией и высвобождением провоспалительных цитокинов, включая IL-1 β , IL-8 и TNF α , а это, в свою очередь, нарушает ГИБ для различных молекул и факторов [55, 57]. Таким образом, начиная с открытия патогенетической роли *H. pylori* в возникновении язвенной болезни, стало очевидным, что не только нейрогуморальная среда хозяина способна регулировать рост и вирулентность грамположительных и грамотрицательных бактерий ЖКТ, но и микробиом ЖКТ оказывает влияние на разные органы и системы организма-хозяина, вызывая и/или модулируя развитие патологического процесса [2, 25, 32, 44].

Метаболическая активность бактерий может оказывать влияние на гормональный статус организма. При анализе метаболизма гормонов щитовидной железы установлено, что трийодтиронин (Т3) подвергается метилированию и максимально выводится из организма, тогда как тироксин (Т4), являющийся «классическим» прогормоном, подвергается энтерогепатической циркуляции вследствие глюкуронидации. При этом сделано важное наблюдение, что глюкуронидазы, участвующие в конъюгации Т4 с глюкуроновой кислотой, — это, главным образом, ферменты, экспрессируемые бактериальными клетками ЖКТ [23, 24]. К настоящему времени уже не вызывает никакого сомнения, что как сами микроорганизмы, так и их изолированные антигены являются этиологическими факторами индукции аутоиммунных процессов, обуславливающих поражение эндокринных органов, хотя впервые связь между лихорадкой ревматического происхождения и бактериальной инфекцией была установлена Трибуле и Койоном в конце XIX столетия [53].

Изменение количественного и, главным образом, качественного состава микробиома ЖКТ способно провоцировать развитие резистентности к инсулину, ожирению и возникновению метаболического синдрома, то есть значимым расстройствам эндокринной системы [3, 4, 5, 10, 33, 48].

Однако только несколькими десятилетиями позже были получены неоспоримые экспериментальные и клинические данные, указывающие на то, что развитие аутоиммунной реакции и ревматизма является следствием ответа организма на инфекцию, вызываемую грам-

положительной бактерией — стрептококком группы А [12].

К настоящему времени на острие научного поиска находится изучение генетически детерминированных механизмов гиперответа иммунной системы на инвазию того или иного микробного агента или класса антигенов. Также предложено несколько механизмов, объясняющих патогенез аутоиммунного процесса, вызванного бактериальной инфекцией: молекулярная мимикрия, «расползание» эпитопа, «активация свидетеля» и так называемые неопознанные антигены [12, 43].

Появляется все больше данных, указывающих на то, что микробиом непосредственно участвует в патогенезе заболеваний организма-хозяина, комплексно взаимодействуя с иммунной системой хозяина и встраиваясь в определенные системы метаболизма. При этом микробное сообщество неравномерно распределено по ЖКТ, отделы которого различаются по активности взаимодействия с иммунной системой организма-хозяина [62]. Так, например, подвздошная кишка и толстый кишечник иммунологически более «активны», чем проксимальный отдел тонкого кишечника, и формируют значимую часть мукозальной иммунной системы [50].

Взаимодействие микробиома ЖКТ и клеток организма-хозяина выражается в формировании микробно-тканевого комплекса со сложной системой взаимодействий, различающейся в зависимости от его локализации. Например, бактерии, колонизирующие крипты тонкого кишечника, регулируют пролиферацию энтероцитов, оказывая влияние на репликацию ДНК и экспрессию генов, тогда как бактерии на верхушках ворсинок кишечника опосредуют экспрессию генов, отвечающих за метаболизм и иммунный ответ [38]. Энтероциты и клетки Панета, в свою очередь, регулируют жизнедеятельность микроорганизмов через продукцию полисахаридов (карбогидратов) и антибактериальных факторов на своей поверхности [7, 20, 41]. Таким образом, поддерживается не только целостность ГИБ, но и взаимодействие между макроорганизмом и микробиомом на уровне микробно-тканевого комплекса, что проявляется в модулировании реактивности иммунной системы [13, 17]. Продемонстрировано, что микробиом в зависимости от доминирования определенных видов бактерий может поддерживать или нарушать целостность ГИБ [49, 58].

В геноме прокариот идентифицированы аминокислотные последовательности, показывающие гомологию с рядом семейств рецепторов эукариот (рецепторов киназы, ионных каналов, трансмембранных рецепторов и др.). Данное наблюдение свидетельствует о наличии

у бактерий рецепторов и способности реагировать не только на множество «сигнальных» молекул хозяина, но также способности использовать рецепторы хозяина для того, чтобы доставить бактериальные факторы в организм хозяина [15, 46]. Хорошо известно, что не только человеческие эритроциты несут на своей мембране такие Rh-белки (резус-антиген), как RhD и RhCcEe, которые могут экспрессироваться как антигены в комплексе RhAG. При этом такие Rh-белки, как RhBG и RhCG, экспрессируются в почках, центральной нервной системе (ЦНС) и ряде других органов и тканей, включая ЖКТ. У млекопитающих экспрессия RhBG- и RhCG-белков жизненно важна особенно для гомеостаза и нормального функционирования мочевыделительной системы, например, для поддержания pH и секреции почками аммиака и аминов [28]. Транспорт аммиака через биологическую мембрану является ключевым физиологическим процессом всех живых существ. И большинство видов имеют множество различных белков семейства Amt/MEP/Rh, гомологичных Rh-белкам млекопитающих, что отражает их жизненно важную роль в биологии живых организмов [34, 45]. Бактерия *Escherichia coli*, например, имеет одиночный транспортер для аммиака (Amt), который контролируется опероном *glnKamtB*. Белок AmtB экспрессируется лишь в том случае, если поступление аммиака в бактерию для ее роста становится ограниченным, в таком случае ген, кодирующий этот транспортер, активируется. У бактерий транспортер для аммиака входит в семейство, которое обозначено как AmtS. У дрожжей присутствуют три подобных транспортера и они обозначены как метиламмиак/аммиак-пермеазы, или MEPs [19, 22, 31]. Транспортеры AmtS также обнаружены у беспозвоночных в геноме *Caenorhabditis elegans*, где выявлено четыре гомолога этих белков [26]. При сравнении структуры транспортера AmtB и белков RhAG, RhBG и, особенно, белка RhCG было установлено сходство их консервативных критических доменов, что позволило сделать вывод о структурном и функциональном подобии Rh-белков транспортеру AmtB [9, 27]. В связи с этим безусловный интерес представляют данные об ассоциации разных групп крови и Rh-белков с инфекционными заболеваниями у млекопитающих, включая человека. Так, доказано, что разные виды малярийного плазмодия, включая *Plasmodium falciparum* и *Plasmodium vivax*, для внедрения в эритроцит млекопитающих используют семейство лигандов: эритроцит-связывающий белок (EBA175) и ретикулоцит-связывающие белки (RBLP) [29, 39]. У некоторых бактерий — представителей нормобиоты ЖКТ человека — также выявлены семейства белков, гомологич-

ных эритроцит- и ретикулоцит-связывающим белкам плазмодия [36]. У грамположительной бактерии *Ruminococcus actaridis*, принадлежащей к филе *Firmicutes*, идентичность аминокислотной последовательности VaFE repeat-containing surface-anchored-белка с аминокислотной последовательностью ретикулоцит-связывающего белка плазмодия достигает 30% [52]. У бактерии *Enterococcus faecium*, обладающей высокой резистентностью к антибиотикам, идентичность аминокислотной последовательности VaFE repeat-containing surface-anchored-белка с аминокислотной последовательностью ретикулоцит-связывающего белка плазмодия также достигает 30% [16]. У грамположительной бактерии *Lactobacillus johnsonii*, также принадлежащей к филе *Firmicutes*, идентичность аминокислотной последовательности трансгликозидазы MltG, участвующей в резистентности к антибиотикам, с аминокислотной последовательностью RBLP плазмодия достигает 50% [61]. Белок с гистидин-фосфатазной активностью бактерии *Clostridioides difficile*, принадлежащей к филе *Firmicutes*, более чем на 75% идентичен по аминокислотной последовательности белкам семейства RBLP [1]. У бактерий, принадлежащих к филе *Fusobacterium* и в избыточном количестве обнаруживаемых у пациентов с гипертиреозом, также выявлен белок endonuclease MutS с высокой гомологией к белкам RBLP [11]. Между VaFE repeat-containing surface-anchored-белком бактерии *Ruminococcus actaridis* и белком, содержащим богатые лейцином повторы (leucine-rich repeat [LRR]), бактерии *Fusobacterium naviforme* выявлена идентичность аминокислотных последовательностей, которая достигает 23,65%. В белке LRR выявлена последовательность от 2997 до 3081 аминокислоты, которая имеет высокое сродство связывания с белком коллагена человека (collagen-binding protein B domain). При этом бактерии, продуцирующие молочную кислоту, например *Lactococcus raffinolactis*, также используют этот белок для агрегации и образования биопленок [35]. Как следует из анализа базы данных бактериального протеома, у многих микроорганизмов и прежде всего грамположительных бактерий филы *Firmicutes*, колонизирующих ЖКТ человека, выявляется высокая гомология и идентичность по аминокислотной последовательности семейств бактериальных белков с семейством эритроцит- и ретикулоцит-связывающих белков малярийного плазмодия. Это указывает на то, что у бактерий экспрессируются потенциальные лиганды для взаимодействия с клетками ГИБ. При этом важно отметить, что доказана идентичность, достигающая 40%, аминокислотных последовательностей белков групп крови Duffy, Basigin (BSG) и резус-белка RhCG, который экспресси-

руется в ЖКТ млекопитающих, включая человека [51, 59, 60]. Структурно-функциональная целостность ГИБ важна для гомеостаза организма [21]. К настоящему времени охарактеризовано не менее 50 белков, участвующих в структурно-функциональной интегративности плотных контактов между эпителиальными клетками ЖКТ [18, 37]. Эти плотные контакты являются комплексами, структурно представленными, главным образом, четырьмя трансмембранными белками: окклюдином, клаудином, молекулами контактной адгезии и трицеллюлином, которые, в свою очередь, взаимодействуют со структурными белками плотных контактов (*zonula occludens*): ZO1, ZO2 и ZO3. В физиологических условиях комплексы плотных контактов поддерживают поляризацию ГИБ, контролируя прохождение между клетками молекул воды и некоторых ионов [18]. Как при физическом, так и физиологическом стрессе вырабатывается избыточное количество гормонов стресса, что, как правило, приводит к транслокации в просвет ЖКТ липополисахарида (ЛПС), являющегося триггер-фактором для иммунного и воспалительного ответа, который может привести к повышенной проницаемости ГИБ. В иммунной реакции на ЛПС немедленно реагируют рецепторы CD14 и TLR4 макрофагов, локализующихся в кишечнике, что приводит к мощной продукции провоспалительных цитокинов в стенке ЖКТ: TNF α , IFN α и IFN γ , IL-1 β . Провоспалительные цитокины провоцируют открытие плотных контактов, что опосредуется белками ZO1 и ZO2, приводя к транслокации микробиоты ЖКТ и эндотоксемии [63]. Нарушению равновесия в микробно-тканевом комплексе и повышению проницаемости ГИТ также способствует активация гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси, которая стимулирует тучные клетки, местом скопления которых является субэпителиальный слой ЖКТ. Тучные клетки начинают секретировать в избыточном количестве депонированные в них факторы, такие как гистамин, протеазы и провоспалительные цитокины. Это еще больше повышает проницаемость стенки кишечника [14, 54].

В модели на мышах показано, что физический стресс (интенсивная физическая нагрузка) изменял количественный и качественный состав микробиоты, при этом в составе микробиоты ЖКТ начинали преобладать такие бактерии, как *Ruminococcus gnavus*, *Butyrivibrio* spp., *Oscillospira* spp. и *Coprococcus* spp. [6]. При индукции у крыс хронического стресса показано, что грамположительные бактерии видов *Lactobacillus* филы *Firmicutes* начинают вырабатывать повышенное количество молочной кислоты в ЖКТ, а это, в свою очередь, приводит к активации липолиза через торможение сигнального каскада, связанного с протеинкиназой A, и активации ассоциированного с G-белком рецептора GPR81 в печени, что также сопровождается повышенной экспрессией провоспалительного цитокина TNF α [47]. На модели острого колита с использованием декстрансульфата натрия у мышей, дефицитных по актин-связывающему белку синаптоподину (SYNPO), выявлено нарушение проницаемости (интегративности) ГИБ. В данной модели показано истощение по микробиоте ЖКТ, ассоциированное с повышенным синтезом короткоцепочечных жирных кислот (SCFAs). Как известно, SYNPO вместе с фибриллами F-актина, чувствительными к стресс-факторам (F-actin stress fibers), локализуется в плотных контактах между энтероцитами, где этот комплекс белков регулирует целостность ГИБ [56].

Из материалов, изложенных в обзоре, становится очевидным, что системный подход, используемый при оценке микробиома ЖКТ хозяина в формировании ГИБ, должен способствовать выявлению микроорганизмов-индикаторов с новыми свойствами, что позволит повысить эффективность пищевых опций организма-хозяина на микробиом ЖКТ.

Из материалов, изложенных в обзоре, становится очевидным, что системный подход, используемый при оценке микробиома ЖКТ хозяина в формировании ГИБ, должен способствовать выявлению микроорганизмов-индикаторов с новыми свойствами, что позволит повысить эффективность пищевых опций организма-хозяина на микробиом ЖКТ.

Список литературы/References

1. Abhyankar W.R., Zheng L., Brul S., de Koster C.G., de Koning L.J. Vegetative cell and spore proteomes of *Clostridioides difficile* show finite differences and reveal potential protein markers. *J. Proteome Res.*, 2019, vol. 18, no. 11, pp. 3967–3976. doi: 10.1021/acs.jproteome.9b00413
2. Barko P.C., McMichael M.A., Swanson K.S., Williams D.A. The gastrointestinal microbiome: a review. *J. Vet. Intern. Med.*, 2018, vol. 32, pp. 9–25. doi: 10.1111/jvim.14875
3. Cani P.D., Delzenne N.M. Interplay between obesity and associated metabolic disorders: new insights into the gut microbiota. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2009, vol. 9, no. 6, pp. 737–743. doi: 10.1016/j.coph.2009.06.016
4. Cani P.D., Delzenne N.M. Involvement of the gut microbiota in the development of low grade inflammation associated with obesity: focus on this neglected partner. *Acta Gastroenterol. Belg.*, 2010, vol. 73, pp. 267–269
5. Cecil R.L., Nicholls E.E., Stainsby W.J. Bacteriology of the blood and joints in rheumatic fever. *J. Exp. Med.*, 1929, vol. 50, pp. 617–642. doi: 10.1084/jem.50.5.617
6. Clark A., Mach N. Exercise-induced stress behavior, gut microbiota-brain axis and diet: a systematic review for athletes. *J. Int. Soc. Sports Nutr.*, 2016, vol. 13: 43. doi: 10.1186/s12970-016-0155-6
7. Circu M.L., Aw T.Y. Intestinal redox biology and oxidative stress. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 2012, vol. 23, pp. 729–737. doi: 10.1016/j.semcdb.2012.03.014

8. Code C.F. Histamine and gastric secretion. Ed. Wolstenholme G., O'Connor C. *Little Brown & Co*, 1956, pp. 189–219.
9. Conroy M.J., Bullough P.A., Merrick M., Avent N.D. Modelling the human rhesus proteins: implications for structure and function. *Br. J. Haematol.*, 2005, vol. 131, pp. 543–551. doi: 10.1111/j.1365-2141.2005.05786.x
10. Delzenne N.M., Neyrinck A.M., Backhed F., Cani P.D. Targeting gut microbiota in obesity: effects of prebiotics and probiotics. *Nat. Rev. Endocrinol.*, 2011, vol. 7, pp. 639–646. doi: 10.1038/nrendo.2011.126
11. Eisen J.A. A phylogenomic study of the MutS family of proteins. *Nucleic Acids Res.*, 1998, vol. 26, no. 18, pp. 4291–4300. doi: 10.1093/nar/26.18.4291
12. Ercolini A.M., Miller S.D. The role of infections in autoimmune disease. *Clin. Exp. Immunol.*, 2009, vol. 155, pp. 1–15. doi: 10.1111/j.1365-2249.2008.03834.x
13. Faith J.J., McNulty N.P., Rey F.E., Gordon J.I. Predicting a human gut microbiota's response to diet in gnotobiotic mice. *Science*, 2011, vol. 333, no. 6038, pp. 101–104. doi: 10.1126/science.1206025
14. Ferrier L. Significance of increased human colonic permeability in response to corticotrophin-releasing hormone (CRH). *Gut*, 2008, vol. 57, pp. 7–9. doi: 10.1136/gut.2007.129841
15. Freestone P.P., Sandrini S.M., Haigh R.D., Lyte M. Microbial endocrinology: how stress influences susceptibility to infection. *Trends Microbiol.*, 2008, vol. 16, no. 2, pp. 55–64. doi: 10.1016/j.tim.2007.11.005
16. Gao W., Howden B.P., Stinear T.P. Evolution of virulence in *Enterococcus faecium*, a hospital-adapted opportunistic pathogen. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2018, vol. 41, pp. 76–82. doi: 10.1016/j.mib.2017.11.030
17. Gareau M.G., Sherman P.M., Walker W.A. Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 2010, vol. 7, pp. 503–514. doi: 10.1038/nrgastro.2010.117
18. Gareau M.G., Silva M.A., Perdue M.H. Pathophysiological mechanisms of stress-induced intestinal damage. *Curr. Mol. Med.*, 2008, vol. 8, pp. 274–281. doi: 10.2174/156652408784533760
19. Gazzarrini S., Lejay L., Gojon A., Ninnemann O., Frommer W.B., von Wiren N. Three functional transporters for constitutive, diurnally regulated, and starvation-induced uptake of ammonium into *Arabidopsis* roots. *Plant Cell*, 1999, vol. 11, pp. 937–947. doi: 10.1105/tpc.11.5.937
20. Gerbe F., van Es J.H., Makrini L., Brulin B., Mellitzer G., Robine S., Romagnolo B., Shroyer N.F., Bourgaux J.-F., Pignodel C., Clevers H., Jay P. Distinct ATOH1 and Neurog3 requirements define tuft cells as a new secretory cell type in the intestinal epithelium. *J. Cell Biol.*, 2011, vol. 192, pp. 767–780. doi: 10.1083/jcb.201010127
21. Gravit L. Microbiome: the critters within. *Nature*, 2012, vol. 485, pp. S12–13. doi: 10.1038/485S12a
22. Hackett S.L., Skye G.E., Burton C., Segel I.H. Characterization of an ammonium transport system in filamentous fungi with methylammonium-14C as the substrate. *J. Biol. Chem.*, 1970, vol. 245, pp. 4241–4250. doi: 10.1016/S0021-9258(19)63786-5
23. Hazenberg M.P., Herder W.W. de, Visser T.J. Hydrolysis of iodothyronine conjugates by intestinal bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 1988, vol. 4, pp. 9–16. doi: 10.1111/j.1574-6968.1988.tb02709.x-i1
24. Herder W.W. de, Hazenberg M.P., Pennock-Schroder A.M., Hennemann G., Visser T.J. Rapid and bacteria-dependent in vitro hydrolysis of iodothyronine-conjugates by intestinal contents of humans and rats. *Med. Biol.*, 1986, vol. 64, no. 1, pp. 31–35
25. Jeffrey M.P., MacPherson C.W., Mathieu O., Tompkins T.A., Green-Johnson J.M. Secretome-mediated interactions with intestinal epithelial cells: a role for secretome components from *Lactobacillus rhamnosus* R0011 in the attenuation of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium secretome and TNF- α -induced proinflammatory responses. *J. Immunol.*, 2020, vol. 204, no. 9, pp. 2523–2534. doi: 10.4049/jimmunol.1901440
26. Ji Q., Hashimi S., Liu Z., Zhang J., Chen Y., Huang C.-H. CeRh1 (rhr-1) is a dominant Rhesus gene essential for embryonic development and hypodermal function in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, vol. 103, no. 15, pp. 5881–5886. doi: 10.1073/pnas.0600901103
27. Khademi S., O'Connell J., Remis J., Robles-Colmenares Y., Miercke L.J., Stroud R.M. Mechanism of ammonia transport by Amt/MEP/Rh: structure of AmtB at 1.35 Å. *Science*, 2004, vol. 305, pp. 1587–1594. doi: 10.1126/science.1101952
28. Knepper M.A. NH₄⁺ transport in the kidney. *Kidney Int. Suppl.*, 1991, vol. 33, pp. S95–S102.
29. Koch M., Wright K.E., Ottob O., Herbig M., Salinas N.D., Toliac N.H., Satchwell T.J., Guck J., Brookse N.J., Bauma J. Plasmodium falciparum erythrocyte-binding antigen 175 triggers a biophysical change in the red blood cell that facilitates invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2017, vol. 114, no. 16, pp. 4225–4230. doi: 10.1073/pnas.1620843114
30. Konturek P.C., Konturek S.J., Sito E., Kwiecien N., Obtulowicz W., Bielanski W., Hahn E.G. Luminal alpha methyl histamine stimulates gastric secretion in duodenal ulcer patients via releasing gastrin. *Eur. J. Pharmacol.*, 2001, vol. 301, pp. 181–192. doi: 10.1016/S0014-2999(01)00720-8
31. Lauter F.R., Ninnemann O., Bucher M., Riesmeier J.W., Frommer W.B. Preferential expression of an ammonium transporter and of two putative nitrate transporters in root hairs of tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, vol. 93, pp. 8139–8144. doi: 10.1073/pnas.93.15.8139
32. Lesouhaitier O., Clamens T., Rosay T., Desriac F., Louis M., Rodrigues S., Gannesen A., Plakunov V.K., Bouffartigues E., Tahrioui A., Bazire A., Dufour A., Cornelis P., Chevalier S., Feuilloley M.G. Host peptidic hormones affecting bacterial biofilm formation and virulence. *J. Innate Immun.*, 2019, vol. 11, no. 3, pp. 227–241. doi: 10.1159/000493926
33. Li R., Li Y., Li C., Zheng D., Chen P. Gut microbiota and endocrine disorder. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2020, vol. 1238, pp. 143–164. doi: 10.1007/978-981-15-2385-4_9
34. Merrick M., Javelle A., Durand A., Severi E., Thornton J., Avent N.D., Conroy M.J., Bullough P.A. The *Escherichia coli* AmtB protein as a model system for understanding ammonium transport by Amt and Rh proteins. *Transfus. Clin. Biol.*, 2006, vol. 13, pp. 97–102. doi: 10.1016/j.tracli.2006.02.015
35. Miljkovic M., Marinkovic P., Novovic K., Jovic B., Terzic-Vidojevic A., Kojic M. AggLr, a novel aggregation factor in *Lactococcus raffinolactis* BGTRK10-1: its role in surface adhesion. *Biofouling*, 2018, vol. 34, no. 6, pp. 685–698. doi: 10.1080/08927014.2018.1481956
36. Ochola-Oyier L.I., Okombo J., Wagatua N., Ochieng J., Tetteh K.K., Fegan G., Bejon P., Marsh K. Comparison of allele frequencies of *Plasmodium falciparum* merozoite antigens in malaria infections sampled in different years in a Kenyan population. *Malar. J.*, 2016, vol. 15, no. 1: 261. doi: 10.1186/s12936-016-1304-8

37. Oliveira E.P. de, Burini R.C., Jeukendrup A. Gastrointestinal complaints during exercise: Prevalence, etiology, and nutritional recommendations. *Sports Med.*, 2014, vol. 44, pp. 79–85. doi: 10.1007/s40279-014-0153-2
38. Olszak T., An D., Zeissig S., Vera M.P., Richter J., Franke A., Glickman J.N., Siebert R., Baron R.M., Kasper D.L., Blumberg R.S. Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. *Science*, 2012, vol. 336, pp. 489–493. doi: 10.1126/science.1219328
39. Paul A.S., Egan E.S., Duraisingh M.T. Host-parasite interactions that guide red blood cell invasion by malaria parasites. *Curr. Opin. Hematol.*, 2015, vol. 22, no. 3, pp. 220–226. doi: 10.1097/MOH.0000000000000135
40. Pavlov I.P. The work of the digestive glands. London: Charles Griffin & Co. Ltd., 1902. 266 p.
41. Pelaseyed T., Bergström J.H., Gustafsson J.K., Ermund A., Birchenough G.M., Schütte A., van der Post S., Svensson F., Rodríguez-Piñero A.M., Nyström E.E., Wising C., Johansson M.E., Hansson G.C. The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunol. Rev.*, 2014, vol. 260, pp. 8–20. doi: 10.1111/imr.12182
42. Popielski L. β -imidazolylaethylamin und die Organextrakte. *Pflug. Arch. Ges. Physiol.*, 1920, vol. 178, pp. 237–259. doi: 10.1007/BF01722025
43. Proctor L.M., Creasy H.H., Fettweis J.M., Lloyd-Price J., Mahurkar A., Zhou W., Buck G.A., Snyder M.P., Strauss J.F., Weinstock G.M., White O., Huttenhower C. The integrative human microbiome project. *Nature*, 2019, vol. 569, no. 7758, pp. 641–648. doi: 10.1038/s41586-019-1238-8
44. Rajagopala S.V., Vashee S., Oldfield L.M., Suzuki Y., Venter J.C., Telenti A., Nelson K.E. The human microbiome and cancer. *Cancer Prev. Res. (Phila)*, 2017, vol. 10, no. 4, pp. 226–234. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-16-0249
45. Saier M.H., Eng B.H., Fard S., Garg J., Haggerty D.A., Hutchinson W.J., Jack D.L., Lai E.C., Liu H.J., Nusinew D.P., Omar A.M., Pao S.S., Paulsen I.T., Quan J.A., Sliwinski M., Tseng T.-T., Wachi S., Young G.B. Phylogenetic characterization of novel transport protein families revealed by genome analyses. *Biochim. Biophys. Acta*, 1999, vol. 1422, iss. 1, pp. 1–56. doi: 10.1016/s0304-4157(98)00023-9
46. Sarkodie E.K., Zhou S., Baidoo S.A., Chu W. Influences of stress hormones on microbial infections. *Microb. Pathog.*, 2019, vol. 131, pp. 270–276. doi: 10.1016/j.micpath.2019.04.013
47. Shan B., Ai Z., Zeng S., Song Y., Song J., Zeng Q., Liao Z., Wang T., Huang C., Su D. Gut microbiome-derived lactate promotes to anxiety-like behaviors through GPR81 receptor-mediated lipid metabolism pathway. *Psychoneuroendocrinology*, 2020, vol. 117: 104699. doi: 10.1016/j.psyneuen.2020.104699
48. Shen J., Obin M.S., Zhao L. The gut microbiota, obesity and insulin resistance. *Mol. Aspects Med.*, 2013, vol. 34, no. 1, pp. 39–58. doi: 10.1016/j.mam.2012.11.001
49. Siciliano R.A., Mazzeo M.F. Molecular mechanisms of probiotic action: a proteomic perspective. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2012, vol. 15, pp. 390–396. doi: 10.1016/j.mib.2012.03.006
50. Sommer F., Backhed F. The gut microbiota engages different signaling pathways to induce Duox2 expression in the ileum and colon epithelium. *Mucosal Immunol.*, 2015, vol. 8, pp. 372–379. doi: 10.1038/mi.2014.74
51. Strausberg R.L., Feingold E.A., Grouse L.H., Derge J.G., Klausner R.D., Collins F.S., Wagner L., Shenmen C.M., Schuler G.D., Altschul S.F., Zeeberg B., Buetow K.H., Schaefer C.F., Bhat N.K., Hopkins R.F., Jordan H., Moore T., Max S.I., Wang J., Hsieh F., Diatchenko L., Marusina K., Farmer A.A., Rubin G.M., Hong L., Stapleton M., Soares M.B., Bonaldo M.F., Casavant T.L., Scheetz T.E., Brownstein M.J., Usdin T.B., Toshiyuki S., Carninci P., Prange C., Raha S.S., Loquellano N.A., Peters G.J., Abramson R.D., Mullahy S.J., Bosak S.A., McEwan P.J., McKernan K.J., Malek J.A., Gunaratne P.H., Richards S., Worley K.C., Hale S., Garcia A.M., Gay L.J., Hulyk S.W., Villalon D.K., Muzny D.M., Sodergren E.J., Lu X., Gibbs R.A., Fahey J., Helton E., Kettelman M., Madan A., Rodrigues S., Sanchez A., Whiting M., Madan A., Young A.C., Shevchenko Y., Bouffard G.G., Blakesley R.W., Touchman J.W., Green E.D., Dickson M.C., Rodriguez A.C., Grimwood J., Schmutz J., Myers R.M., Butterfield Y.S., Krzywinski M.I., Skalska U., Smailus D.E., Schnerch A., Schein J.E., Jones S.J., Marra M.A. Mammalian Gene Collection Program Team. Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, vol. 99, no. 26, pp. 16899–16903. doi: 10.1073/pnas.242603899
52. Togo A.H., Diop A., Bittar F., Maraninchi M., Valero R., Armstrong N., Dubourg G., Labas N., Richez M., Delerce J., Lévassour A., Fournier P.E., Raoult D., Million M. Description of *Mediterraneibactermassiliensis*, gen. nov., sp. nov., a new genus isolated from the gut microbiota of an obese patient and reclassification of *Ruminococcusfaecis*, *Ruminococcuslactaris*, *Ruminococcus torques*, *Ruminococcusnavus* and *Clostridium glycyrrhizinilyticum* as *Mediterraneibacterfaecis* comb. nov., *Mediterraneibacterlactaris* comb. nov., *Mediterraneibacter torques* comb. nov., *Mediterraneibactergnavus* comb. nov. and *Mediterraneibacterglycyrrhizinilyticum* comb. nov. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2018, vol. 111, no. 11, pp. 2107–2128. doi: 10.1007/s10482-018-1104-y
53. Triboulet H., Coyon A. Le rhumatisme articulaire aigu en bacteriologie. Paris: Librairie J.-B. Bailliere et Fils, 1900. 100 p.
54. Wallon C., Yang P.C., Keita A.V., Ericson A.C., McKay D.M., Sherman P.M., Perdue M.H., Söderholm J.D. Corticotropin-releasing hormone (CRH) regulates macromolecular permeability via mast cells in normal human colonic biopsies in vitro. *Gut*, 2008, vol. 57, no. 1, pp. 50–58. doi: 10.1136/gut.2006.117549
55. Wang F., Meng W., Wang B., Qiao L. Helicobacter pylori-induced gastric inflammation and gastric cancer. *Cancer Lett.*, 2014, vol. 345, no. 2, pp. 196–202. doi: 10.1016/j.canlet.2013.08.016
56. Wang R.X., Lee J.S., Campbell E.L., Colgan S.P. Microbiota-derived butyrate dynamically regulates intestinal homeostasis through regulation of actin-associated protein synaptopodin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2020, vol. 117, no. 21, pp. 11648–11647. doi: 10.1073/pnas.1917597117
57. Warren R.J., Marshall B.J. Unidentified curved bacilli in gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet*, 1983, vol. 321, no. 8336, pp. 1273–1275. doi: 10.1016/S0140-6736(83)92719-8
58. Wells J.M., Rossi O., Meijerink M., van Baarlen P. Epithelial crosstalk at the microbiota–mucosal interface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011, vol. 108, pp. 4607–4614. doi: 10.1073/pnas.1000092107

59. Weng Y., Chen T., Ren J., Lu D., Liu X., Lin S., Xu C., Lou J., Chen X., Tang L. The association between extracellular matrix metalloproteinase inducer polymorphisms and coronary heart disease: a potential way to predict disease. *DNA Cell Biol.*, 2020, vol. 39, no. 2, pp. 244–254. doi: 10.1089/dna.2019.5015
60. Yin Q., Srivastava K., Gebremedhin A., Makuria A.T., Flegel W.A. Long-range haplotype analysis of the malaria parasite receptor gene ACKR1 in an East-African population. *Hum. Genome Var.*, 2018, vol. 5, pp. 26. doi: 10.1038/s41439-018-0024-8
61. Yunck R., Cho H., Bernhardt T.G. Identification of MltG as a potential terminase for peptidoglycan polymerization in bacteria. *Mol. Microbiol.*, 2016, vol. 99, no. 4, pp. 700–718. doi: 10.1111/mmi.13258
62. Zoetendal E.G., Raes J., van den Bogert B., Arumugam M., Booijink C.C.G.M., Troost F.J., Bork P., Wels M., de Vos W.M., Kleerebezem M. The human small intestinal microbiota is driven by rapid uptake and conversion of simple carbohydrates. *ISME J.*, 2012, vol. 6, pp. 1415–1426. doi: 10.1038/ismej.2011.212
63. Zuhl M., Schneider S., Lanphere K., Conn C., Dokladny K., Moseley P. Exercise regulation of intestinal tight junction proteins. *Br. J. Sports Med.*, 2014, vol. 48, no. 12, pp. 980–986. doi: 10.1136/bjsports-2012-091585

Авторы:

Лоскутов С.И., к.с.-х.н., старший научный сотрудник лаборатории биотехнологии и биоинженерии Всероссийского научно-исследовательского института пищевых добавок — филиала ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН, Санкт-Петербург, Россия;
Прошин С.Н., д.м.н., профессор кафедры медико-валеологических дисциплин Российского государственного педагогического университета им. А.И. Герцена, Санкт-Петербург, Россия;
Рябухин Д.С., к.х.н., старший научный сотрудник лаборатории структурной переработки биоресурсов Всероссийского научно-исследовательского института пищевых добавок — филиала ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Loskutov S.I., PhD (Agriculture), Senior Researcher, Laboratory of Biotechnology and Bioengineering, All-Russian Research Institute for Food Additives — Branch of V.M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of RAS, St. Petersburg, Russian Federation;
Proshin S.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Medicine and Valeology, Herzen University, St. Petersburg, Russian Federation;
Ryabukhin D.S., PhD (Chemistry), Senior Researcher, Laboratory of Bioresources Processing, All-Russian Research Institute for Food Additives — Branch of V.M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of RAS, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 12.11.2020
Отправлена на доработку 05.11.2021
Принята к печати 28.07.2022

Received 12.11.2020
Revision received 05.11.2021
Accepted 28.07.2022

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ДИАГНОСТИКИ И МОНИТОРИНГА ТЕЧЕНИЯ ТУБЕРКУЛЕЗА

М.В. Коротецкая^{1,2}, Э.И. Рубакова¹

¹ ФГБНУ Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Москва, Россия

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Резюме. Перед международным медико-биологическим сообществом в настоящее время стоит вопрос о поиске наиболее простого и доступного типа анализа, помогающего с максимальной достоверностью диагностировать туберкулез (ТБ) еще до появления клинических проявлений. Туберкулез вызывает больше смертей, чем любое другое заболевание, уступая только пневмонии, вызванной вирусом SARS-CoV-2, однако большинство инфицированных людей переносят его бессимптомно. Кроме того, важно разработать методы, позволяющие отличить на ранних стадиях различные формы течения туберкулезной инфекции и достоверно разделить пациентов по соответствующим группам (лица с быстро прогрессирующей инфекцией, хроническим течением, латентные носители инфекции). В последнее время все большее значение в научных исследованиях придается изучению иммунометаболизма, т. е. взаимосвязи между биоэнергетическими путями и специфическими функциями иммунных клеток. Иммунный ответ хозяина на микобактерии при туберкулезе регулируется рядом метаболических сетей, которые могут действовать как совместно, так и антагонистически, влияя на исход заболевания. Баланс воспалительных и иммунных реакций ограничивает распространение микобактерий в организме и обеспечивает протекцию организма от развития туберкулеза. Цитокины необходимы для защиты хозяина, но если не контролировать их концентрацию, некоторые медиаторы могут способствовать развитию заболевания и патологии. Различия в содержании метаболитов в плазме крови между лицами с прогрессирующей инфекцией, ЛТБИ и здоровыми могут выявляться задолго до появления основных клинических признаков заболевания. Изменения содержания аминокислот и кортизола могут быть обнаружены еще за 12 месяцев до начала заболевания и становятся сильнее на стадии постановки клинического диагноза. Определение содержания некоторых аминокислот и их соотношений в плазме крови может быть использовано в качестве дополнительных диагностических маркеров активного ТБ легких. Метаболиты, включающие жирные кислоты, аминокислоты и липиды в плазме крови, могут способствовать выявлению активного ТБ. Метаболические профили указывают на повышенную активность индоламин-2,3-диоксигеназы 1 (IDO1), снижение активности фосфолипазы, увеличение количества продуктов метаболизма аденозина, а также на показатели фиброзных поражений при активном заболевании по сравнению с латентной инфекцией. Лечение туберкулеза может быть скорректировано на основе индивидуальных особенностей метаболизма пациентов и профиля биомаркеров. Изучение иммунометаболизма при туберкулезе необходимо для разработки новых терапевтических стратегий.

Ключевые слова: туберкулез, иммунный ответ, метаболизм, ферменты, липидные медиаторы, эйкозаноиды.

Адрес для переписки:

Коротецкая Мария Валерьевна
107564, Россия, Москва, Яузская аллея, 2,
ФГБНУ Центральный НИИ туберкулеза.
Тел.: 8 (499) 785-90-72.
E-mail: mkorotetskaya@gmail.com

Contacts:

Mariya V. Korotetskaya
107564, Russian Federation, Moscow, Yauzskaya avenue, 2,
Central TB Research Institute.
Phone: +7 (499) 785-90-72.
E-mail: mkorotetskaya@gmail.com

Для цитирования:

Коротецкая М.В., Рубакова Э.И. Метаболические биологические маркеры диагностики и мониторинга течения туберкулеза // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 5. С. 827–836. doi: 10.15789/2220-7619-MBM-1947

Citation:

Korotetskaya M.V., Rubakova E.I. Metabolic biological markers for diagnosing and monitoring the course of tuberculosis // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 5, pp. 827–836. doi: 10.15789/2220-7619-MBM-1947

METABOLIC BIOLOGICAL MARKERS FOR DIAGNOSING AND MONITORING THE COURSE OF TUBERCULOSIS

Korotetskaya M.V.^{a,b}, Rubakova E.I.^a

^a Central Research Institute of Tuberculosis, Moscow, Russian Federation

^b Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Abstract. The international biomedical community has been currently facing a need to find a simple and most accessible type of analysis that helps to diagnose tuberculosis (TB) with the maximum reliability even before the onset of clinical manifestations. Tuberculosis results in more deaths than any other pathogen, second only to pneumonia caused by the SARS-CoV-2 virus, but the majority of infected people remain asymptomatic. In addition, it is important to develop methods to distinguish various forms of tuberculosis infection course at early stages and to reliably stratify patients into appropriate groups (persons with a rapidly progressing infection, chronic course, latent infection carriers). Immunometabolism investigates a relationship between bioenergetic pathways and specific functions of immune cells that has recently become increasingly important in scientific research. The host anti-mycobacteria immune response in tuberculosis is regulated by a number of metabolic networks that can interact both cooperatively and antagonistically, influencing an outcome of the disease. The balance between inflammatory and immune reactions limits the spread of mycobacteria *in vivo* and protects from developing tuberculosis. Cytokines are essential for host defense, but if uncontrolled, some mediators may contribute to developing disease and pathology. Differences in plasma levels of metabolites between individuals with advanced infection, LTBI and healthy individuals can be detected long before the onset of the major related clinical signs. Changes in amino acid and cortisol level may be detected as early as 12 months before the onset of the disease and become more prominent at verifying clinical diagnosis. Assessing serum level of certain amino acids and their ratios may be used as additional diagnostic markers of active pulmonary TB. Metabolites, including serum fatty acids, amino acids and lipids may contribute to detecting active TB. Metabolic profiles indicate about increased indolamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) activity, decreased phospholipase activity, increased adenosine metabolite level, and fibrous lesions in active vs. latent infection. TB treatment can be adjusted based on individual patient metabolism and biomarker profiles. Thus, exploring immunometabolism in tuberculosis is necessary for development of new therapeutic strategies.

Key words: tuberculosis, immune response, metabolism, enzymes, lipid mediators, eicosanoids.

За исключением пневмонии, вызванной вирусом SARS-CoV-2, туберкулез (ТБ) вызывает больше смертей, чем любое другое инфекционное заболевание, однако большинство инфицированных людей переносят его без клинических проявлений. Около 25% населения планеты инфицировано *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), но лишь у 5–10% инфицированных людей развивается активная инфекция [82]. Чувствительность к микобактериям туберкулеза и развитие инфекции зависят от разных факторов, в том числе генетики хозяина и состояния его иммунной системы, вирулентности и иммуногенности штамма возбудителя, уровня распространенности в окружающей среде других видов микобактерий, сбалансированности питания и др. [3]. Наиболее распространенная форма инфекции — это легочный туберкулез, и именно от иммунного ответа в легочном эпителии и паренхиме зависит, разовьется ли эффективная защита, или активный ТБ в ответ на заражение микобактериями [27]

Иммунный ответ в легких

Множество разнообразных белков и клеток участвует в развитии иммунного ответа против Mtb. В частности, довольно подробно охарактеризовано влияние на резистентность хозяина различных цитокинов. Определяющими цито-

кинами в защите организма от ТБ являются интерферон- γ (IFN γ), фактор некроза опухоли- α (TNF α) и интерлейкин-12 (IL-12) [16, 17, 30, 31]. IL-12, продуцируемый на ранних стадиях инфекции альвеолярными макрофагами и дендритными клетками, стимулирует синтез IFN γ натуральными киллерами (NK) и Т-клетками, что, в свою очередь, активирует выработку TNF α интерстициальными макрофагами [18, 58]. Макрофаги и нейтрофилы фагоцитируют Mtb и секретируют IL-1, IL-12, IL-23, активные метаболиты кислорода и азота (ROS, iNOS), а также антимикробные пептиды, разрушающие патоген [18, 26]. TNF α выступает в роли ключевого цитокина при образовании и поддержании целостности туберкулезных гранул. Нейтрализация TNF α приводит к нарушению архитектуры легочной гранулемы и повышению выработки IL-1 β , IL-6, IL-10 [26]. Избыточная выработка TNF α вызывает так называемый ответ острой фазы и кахексию. Концентрация TNF α в плазме крови повышается при ухудшении течения инфекции у больных ТБ [38, 49].

Важную роль в ответе на инфекцию играют IL-1 α и IL-1 β — медиаторы острого воспаления, сигнал от которых проводит единый рецептор IL-1R. В экспериментах на животных была показана их защитная функция при туберкулезе, поскольку дефицит IL-1 α или IL-1 β сопровождается повышением чувствительности мышей

к Mtb и усиленным размножением микобактерий в органах [38, 83]. Важно упомянуть о петлях обратной связи между IL-1/2 и интерферонами типа I — IFN-1 α и IFN-1 β . Последние ингибируют выработку IL-1 α и IL-1 β инфицированными макрофагами и дендритными клетками, что приводит к росту числа микобактерий в легких, и их накопление в большой концентрации оказывает негативное действие на развитие защитного иммунного ответа при ТБ в целом [24]. IL-1 оказывает защитное действие за счет индукции выработки эйкозаноидов, которые ограничивают избыточную выработку IFN типа I. Кроме того, IL-1 контролирует синтез простагландина E2 (PGE2), что значительно ингибирует выработку IFN типа I. Экспериментально показано, что терапия разрешенными для клинического применения препаратами, повышающими уровень PGE2, предотвращала быструю смерть мышей, инфицированных Mtb [51, 52].

Еще одной группой важных регуляторов иммунного ответа и воспаления при туберкулезе являются цитокины семейства gp130 — IL-6 [10], IL-11 [39] и OSM [66]. Один из них — IL-11 — является полифункциональным цитокином, но его физиологическая роль при ТБ недостаточно изучена. Было показано, что введение специфических антител против IL-11 уменьшает гистопатологию и нейтрофильную инфильтрацию легочной ткани у линии мышей, чувствительных к туберкулезу, а также снижает уровень концентрации как самого IL-11, так и других ключевых воспалительных цитокинов, подавляет экспрессию мРНК IL-11 [39].

Роль IL-6 при туберкулезной инфекции тоже является спорной, отчасти из-за того, что IL-6 продуцируется разными типами клеток. Одним из продуцентов большого количества плейотропного цитокина gp130 IL-6 в легких являются В-клетки. Выведенная линия мышей со специфическим дефицитом IL-6 в В-клетках (CD19cre-IL-6fl/fl, В-IL-6KO) продемонстрировала сокращение продолжительности жизни мышей В-IL-6KO, инфицированных туберкулезом, по сравнению с контрольной группой дикого типа. Предполагается, что на начальных стадиях туберкулеза В-клетки служат критическим источником IL-6, отсутствие которого вызывает уменьшение В-клеток и популяций фолликулярных Т-клеток, следовательно эффект IL-6 связан с межклеточным взаимодействием В-клеток и Т-клеток на стадии противотуберкулезного иммунного ответа [47].

Исследования третьего участника группы цитокинового семейства gp130 — онкостатина М (OSM) показали, что при заражении моноцитов и макрофагов человека Mtb происходит усиление секреции OSM. В синергизме TNF α с OSM являются важнейшими факторами об-

разования и поддержания структуры гранул. Кроме того, эти белки стимулируют выработку матричных металлопротеиназ MMP1 и MMP2 [28], ферментов, играющих важную роль при туберкулезном воспалении (см. ниже).

Цитотоксические молекулы, такие как гранулизин, перфорин и гранзимы, продуцируемые цитотоксическими Т-клетками, способствуют иммунной защите от Mtb. Guggino G. и соавт. [34] оценивали уровни гранзима А в плазме крови у пациентов с активным ТБ и пациентов с латентной туберкулезной инфекцией (ЛТБИ) и показали, что уровни гранзима А в сыворотке крови у пациентов с активным ТБ были значительно ниже, чем у лиц с ЛТБИ.

Роль белков ESAT-6 и CFP-10 в регуляции иммунного ответа и клеточного метаболизма

Захват аттенуированных штаммов Mtb приводит к апоптозу зараженных макрофагов, тогда как вирулентные штаммы вызывают некроз макрофагов и диссеминацию возбудителя [42]. Комплекс ESAT-6/CFP-10 — это один из основных факторов вирулентности патогенных штаммов, он играет важную роль в регуляции метаболизма и иммунного ответа хозяина во время инфекции. Подавление воспалительных и антимикробных реакций иммунных клеток хозяина связано со способностью комплекса ESAT-6/CFP-10 влиять на метаболизм этих клеток [52, 72]. Два низкомолекулярных секретируемых белка ESAT-6 и CFP-10, которые кодируются областью RD1 в геноме Mtb, участвуют в репликации Mtb и определяют патогенез ТБ [6]. Область RD1 отсутствует во всех вакцинных штаммах *Mycobacterium bovis* BCG, но присутствует в вирулентных лабораторных и клинических штаммах *M. bovis* и Mtb [33]. Вирулентные свойства белков ESAT-6/CFP-10 проявляются через угнетение функций макрофагов, дендритных клеток и Т-клеток [32]. ESAT-6 ингибирует передачу сигнала в клетке хозяина путем прямого связывания с рецептором TLR2, что приводит к снижению секреции IL-12 p40 и TNF α макрофагами [62]. Показано, что ESAT-6 секретируется Mtb в цитозоль инфицированных макрофагов [46] и индуцирует выработку IFN типа I [57, 76]. Экзогенный ESAT-6 индуцирует поглощение глюкозы клетками хозяина и запускает гликолитический путь окисления глюкозы, что показано и для самих вирулентных штаммов Mtb. Это приводит к образованию пенистых макрофагов, клеток с высоким содержанием липидов и нарушенными антиген-презентирующими свойствами. В таких макрофагах, по-видимому, микобактерии находят удобную нишу для персистенции [21, 54, 74].

Метаболический профиль туберкулезной инфекции

Во многих случаях проявление активного ТБ является итогом длительного процесса, который остается субклиническим в течение многих месяцев, но метаболические изменения могут быть обнаружены у инфицированных лиц еще в бессимптомной фазе.

Аминокислоты, белки, гормоны

Изменения в уровнях аминокислот и кортизола могут быть обнаружены еще за 12 месяцев до начала активного заболевания, становясь более заметными в клинической фазе [81, 82]. Метаболический профиль позволяет прогнозировать риск развития активного ТБ у людей с латентной туберкулезной инфекцией (ЛТБИ), так же как это показано для изменений в профилях экспрессии генов в клетках периферической крови [48]. Weiner и соавт. сравнивали 3 группы индивидов: пациентов с активным ТБ, пациентов с ЛТБИ и здоровых людей. При активном ТБ наблюдали нарушение метаболизма триптофана и увеличение содержания фермента индоламин-2,3-диоксигеназы 1 (IDO-1). Также был выявлен очень высокий уровень кинуренина, повышенный уровень кортизола, лизофосфатидилхолина, сниженная фосфолипазная активность и избыток продуктов метаболизма аденозина. Авторы предложили использовать 20 метаболитов для оценки состояния пациентов с ТБ [48, 82]. Триптофан способствует ограничению роста *Mtb*, и нарушение метаболизма триптофана при ТБ связывают с неблагоприятным течением заболевания. IDO-1 индуцирует ферментативный распад L-триптофана по кинурениновому пути. Кинуренин образуется при действии IFN γ на негемопоэтические клетки легких и вызывает угнетение иммунного ответа. IDO-1 ингибирует ответ Th17, подавляет функцию NK- и T-клеток, активирует образование регуляторных клеток (Treg) и миелоидных супрессорных клеток, поэтому концентрация IDO-1 в сыворотке крови может служить прогностическим маркером при легочном ТБ [77, 78]. Активность IDO-1, измеряемая соотношением L-TRP/KYN (L-триптофан/кинуренин), может определять тяжесть ТБ, поскольку пациенты с активным ТБ и с низким соотношением L-TRP/KYN (высокая активность IDO-1) имеют худшие показатели других анализов по сравнению с таковой у пациентов с низкой активностью IDO [78]. Кроме того, у больных активным ТБ с плевритом наблюдалась повышенная активность IDO-1 в плевральной жидкости по сравнению с таковой у пациентов с неинфекционным плевритом [77]. У пациентов с активным ТБ в мокроте по сравнению с пациентами с другими заболеваниями легких выяв-

лялся повышенный уровень IDO-1 [2]. У ВИЧ-положительных пациентов активность IDO-1 в плазме крови повышается при инфекции *Mtb*, что может быть обнаружено за 6 месяцев до постановки диагноза ТБ [7]. Таким образом, измерение активности IDO-1 может иметь прогностическое значение в диагностике ТБ.

При туберкулезной инфекции изменяется содержание аминокислот в сыворотке крови. При инфицировании *Mtb* лимфоциты, нейтрофилы и макрофаги быстро потребляют глютамин, и снижение его уровня в сыворотке, наблюдаемое у пациентов с прогрессирующим заболеванием, вероятно, свидетельствует о нарастании патологических изменений в легких [41, 59]. У пациентов с активным ТБ наблюдалось повышение сывороточных концентраций глютамата, метионинсульфоксида и аспартата и снижение концентраций метионина и аспарагина по сравнению с группой ЛТБИ и здоровыми людьми. Вместе с этими метаболитами при активном ТБ высокую диагностическую ценность имеют соотношения глютамат/глютамин, сульфоксид метионина/метионин и аспартат/аспарагин [14]. Авторы предположили, что наблюдаемые метаболические изменения отражают как адаптивные механизмы выживания *Mtb*, так и реакции иммунного ответа хозяина. В частности, повышенное соотношение глютамат/глютамин у пациентов с активным ТБ может отражать ферментативную активность бактериальной глютаминазы. Этот фермент превращает глютамин в глютамат, что снижает pH в цитоплазме клетки-хозяина до нейтральных значений и создает благоприятную среду для размножения внутриклеточного патогена. При этом при сравнении групп с разной тяжестью течения заболевания никакой существенной разницы в концентрации этих метаболитов в плазме крови не выявляли [81].

Другой класс соединений, чье содержание в сыворотке крови существенно меняется при ТБ — это гормоны жирового обмена, в частности, лептин и адипонектин — два важных медиатора, участвующих в регуляции ответа организма на инфекции. При острых и хронических воспалительных состояниях уровень лептина в крови повышается. У больных легочным ТБ уровень лептина в сыворотке крови снижается, а адипонектина повышается, что может служить биологическим маркером риска прогрессирования инфекции [50].

Выше было упомянуто, что цитокины семейства gp130 активно регулируют туберкулезное воспаление и продукцию металлопротеиназ (MMP) клетками хозяина. Kubler A. и соавт. [45] исследовали механизмы патогенеза, связанные с балансом MMP/TIMP (TIMP, Tissue Inhibitor of Metalloproteinase — тканевой ингибитор металлопротеиназ). Авторы выявили повышен-

ную концентрацию ММР-1 в полостях каверн по сравнению с гранулемами и значительное снижение уровня ТИМРЗ в стенке каверны. Кроме того, уровень ММР-1 был выше при казеозной пневмонии, чем при гранулематозной форме ТБ. Соотношение ММР-1/ТИМРЗ в сыворотке крови может использоваться как диагностический показатель, отличающий активный ТБ от ЛТБИ, поскольку с ним прямо коррелировал риск развития активного ТБ [45]. Преобладание выработки ТИМР наблюдается при благоприятном течении инфекции, а стимулирующим фактором его выработки служит витамин D3 [37, 45].

Интересно, что эпителиоидные клетки легкого и, в меньшей степени, легочные макрофаги вырабатывают ММР-9 в ответ на антиген ESAT-6. Это приводит к повышению проница-

мости кровеносных сосудов, отеку и усилению миграции лейкоцитов [28]. При деструктивных процессах в легких и образовании каверн обнаруживается высокий уровень ММР-9 в плазме крови пациентов, что может служить коррелятом распада гранулемы [44, 47], и вполне объяснимо, что количество нейтрофилов — основных источников веществ, разрушающих целостность тканей в легких — коррелирует с активностью ММР-9 [19, 60, 68]. Как и в случае с ММР-1, основными ингибиторами синтеза ММР-9 являются витамин D3 и ТИМР1 [20].

Прокальцитонин (РСТ) — это полипептид, который является неактивным предшественником гормона кальцитонина. У здоровых людей РСТ преобразуется в кальцитонин и практически не поступает в кровоток, но на фоне

Таблица. Метаболические изменения при туберкулезе

Table. Metabolic changes in tuberculosis

Метаболит Metabolite	Биоматериал Biomaterial	Наблюдение Notice	Источник Reference
Трехалоз-6 миколат, фосфатидилинозитол, резольвин Trehalose-6 mycolate, phosphatidyl inositol, resolvins	Плазма крови Blood plasma	Значительно выше у пациентов с активным ТБ, чем у пациентов с ЛТИ или у здоровых людей Markedly increased in patients with active TB vs patients with LTBI or healthy controls	Frediani J.K. et al., 2014
Кинуренин, хинолиновая кислота Kynurenin, quinolinic acid	Сыворотка крови Blood serum	Значительно выше у пациентов с активным ТБ, чем у пациентов с ЛТИ или у здоровых людей Markedly increased in patients with active TB vs patients with LTBI or healthy controls	Feng S. et al., 2015
Гранзим А Granzym A	Плазма крови Blood plasma	Ниже у пациентов с активным ТБ, чем у пациентов с ЛТИ или у здоровых людей Lowered in patients with active TB vs LTBI or healthy controls	Guggino G. et al., 2015
Кинуренин, кортизол, лизофосфатидилхолин, глутамат, метионинсульфоксид, аспарат Kynurenine, cortisol, lysophosphatidylcholine, glutamate, methionine sulfoxide, aspartate	Сыворотка крови Blood serum	Выше у пациентов с активным ТБ, чем у пациентов с ЛТИ или у здоровых людей Higher in active TB patients vs LTBI patients or healthy controls	Weiner J. et al., 2012; 2018
Глутамин, гистидин, метионин, аспарагин Glutamine, histidine, methionine, asparagine	Сыворотка крови Blood serum	Ниже у пациентов с активным ТБ, чем у пациентов с ЛТИ или у здоровых людей Lowered in patients with active TB vs LTBI or healthy controls	Weiner J. et al., 2012; 2018
Фосфатидилглицерол, лизофосфатидилинозитол, ацилфосфатидилинозитол-маннозид Phosphatidylglycerol, lysophosphatidylinositol, acyl phosphatidylinositol-mannoide	Плазма крови Blood plasma	Значительно выше у пациентов с активным ТБ, чем у пациентов с ЛТИ или у здоровых людей Markedly higher in active TB patients than in LTBI patients or healthy controls	Collins J.M. et al., 2018
Глутамин, метионин, аспарагин Glutamine, methionine, asparagine	Сыворотка крови Blood serum	Ниже у пациентов с активным ТБ, чем у пациентов с ЛТИ или у здоровых людей Lowered in patients with active TB vs patients with LTBI or healthy controls	Cho Y. et al., 2020
Глутамат, сульфоксиметионин, аспарат Glutamate, sulfoxymethionine, aspartate	Сыворотка крови Blood serum	Выше у пациентов с активным ТБ, чем у пациентов с ЛТИ или у здоровых людей Higher in active TB patients than in LTBI patients or healthy controls	Cho Y. et al., 2020
Аланин, лизин, глутамин, цитрат, холин Alanine, lysine, glutamine, citrate, choline	Сыворотка крови Blood serum	Ниже у пациентов с активным ТБ, чем у пациентов с ЛТИ или у здоровых людей Lowered in patients with active TB than in patients with LTBI or healthy controls	Albors-Vaquer A. et al., 2020

течения бактериальной инфекции происходит массовое образование эндотоксинов, увеличение уровней провоспалительных цитокинов IL-6 и TNF α [1], что приводит к увеличению синтеза РСТ не только в щитовидной железе, но и экстратиреоидно: в клетках легких, кишечника и печени [1, 13, 77]. Таким образом, измерения РСТ в сыворотке могут быть полезны как для прогнозирования до лечения, так и для мониторинга риска смертности после лечения у пациентов с туберкулезом легких [61, 65].

Особняком стоит работа Stanley и соавт. [76], в которой концентрации медиаторов ответа была измерена в слюне больных. По этим данным в качестве маркеров ответа на лечение ТБ могут служить такие белки, как IL-17A, IL-23, ESM-1 (extracellular matrix protein 1), С-реактивный белок, IP-10 (IFN γ -индуцируемый белок 10) и VEGF (vascular endothelial growth factor).

Медиаторы липидной и углеводной природы

Перспективным направлением исследований в эксперименте и клинике можно считать изучение взаимодействий цитокинов и эйкозаноидов [12]. IL-1 и IFN типа I — это основные регуляторные цитокины, которые функционально связаны с выработкой эйкозаноидов, — липидных медиаторов, которые образуются в результате ферментативного окисления арахидоновой кислоты (АК). Эйкозаноиды, к которым относятся простагландины, резольвины, липоксины и лейкотриены, вызывают различные воспалительные и противовоспалительные реакции. Два класса ферментов — циклооксигеназы (COX) и липоксигеназы (LO) — конкурируют за субстрат АК для образования COX-1- и COX-2-зависимых простагландинов или 5-LO-, и 12/15-LO-зависимых липоксинов (LXA) и лейкотриенов (LT).

На модели туберкулезной инфекции у мышей было показано защитное действие простагландина E2 (PGE2) и патогенный эффект липоксина A4 (LXA4) при индукции гибели зараженных макрофагов [1, 20]. Макрофаги, инфицированные авирулентными штаммами Mtb, вырабатывали PGE2, который препятствовал повреждению митохондрий и инициировал апоптоз зараженных клеток. PGE2 лимитировал диссеминацию микобактерий и обеспечивал восстановление целостности плазматической мембраны клеток. Вирулентные микобактерии стимулировали выработку LXA4, который вызывал некроз макрофагов и блокировал образование PGE2 [79].

Лейкотриены вызывают многочисленные биологические эффекты, включая увеличение миграции нейтрофилов и эозинофилов, агрегацию нейтрофилов и моноцитов, адгезию лейкоцитов, повышенную проницаемость капилляров и сокращение гладких мышц. Эти эффекты спо-

собствуют воспалению, отеку, выделению слизи и вызывают спазм дыхательных путей [52, 61]. Лейкотриен B4 (LTB4) вызывает миграцию нейтрофилов, блокирует клеточный апоптоз и индуцирует высвобождение секреторных гранул нейтрофилов. Кроме того, он усиливает фагоцитоз бактерий макрофагами и вызывает высвобождение ими воспалительных цитокинов. LTB4 можно рассматривать в качестве возможного фактора неблагоприятного течения ТБ, поддающегося фармакологической коррекции [13, 65]. Было установлено, что фермент гидролаза лейкотриена A4 (LTA4H) катализирует заключительную стадию синтеза LTB4, что приводит к тяжелым воспалительным реакциям при ТБ [79]. LTB4-инактивирующий фермент LTB4DH/PTGR1 (лейкотриен B4 дегидрогеназа/простагландин редуктаза 1) облегчает течение инфекции.

Таким образом, накапливаются данные, свидетельствующие о том, что для снижения тяжести ТБ-инфекции возможно применение терапии, основанной на регуляции выработки липидных медиаторов [4, 53, 56]. Уменьшение выработки воспалительных липидных медиаторов путем ингибирования циклооксигеназы с помощью нестероидных противовоспалительных препаратов снижало уровень патологических процессов в легких, активность размножения микобактерий и увеличивало продолжительность жизни экспериментальных животных [8, 25, 43, 80]. Длинноцепочечные полиненасыщенные жирные кислоты омега-3 и их биоактивные метаболиты были идентифицированы как безопасные и эффективные вещества [11, 56], однако необходимы дальнейшие исследования для подтверждения пользы и безопасности данного подхода у больных ТБ.

Липоарабиноманнан (LAM) представляет собой гликолипид, который является компонентом клеточной стенки Mtb, выводится с мочой и может быть обнаружен при анализе [35]. LAM регулирует иммунный ответ у хозяина и приводит к реакции эпителиальных клеток, макрофагов и дендритных клеток [63, 64, 67] при инфицировании человека Mtb, что может играть важную роль во врожденном [29] и адаптивном [40, 70] иммунных ответах при течении заболевания. Довольно давно известно, что LAM обнаруживается и в сыворотке крови больных ТБ [69], поэтому анализ присутствия LAM в крови используют как показатель наличия туберкулеза у больного. Сейчас идет активная работа по усовершенствованию данных тестов, в частности, по увеличению чувствительности данной системы анализа для пациентов с иммуносупрессией [29].

Присутствие в крови и тканях некоторых углеводородных маркеров также связывают с ТБ. Моносахарид манноза — метаболит, который играет одну из центральных ролей у млеко-

питающих в выработке и регуляции выработки энергии. Манноза в сыворотке крови человека, больного ТБ, находится в комплексе с маннозосвязывающего лектином (MBL). Было показано, что при отсутствии расщепления маннозидазных связей в лизосомах происходит накопление олигоманнозидов, что снижает количество свободной маннозы. Эти олигосахариды, содержащие маннозные звенья, взаимодействуют с рецептором IL-2 и вызывают угнетение хемотаксиса лейкоцитов и фагоцитарной активности, что усиливает инфекционный туберкулезный процесс [71, 75]. Другие исследования показали, что более высокие уровни MBL в сыворотке крови могут снижать инфицирование *Mtb* [15, 23, 81]. Постоянно повышенные уровни маннозы у больных с прогрессирующим ТБ могут свидетельствовать о нарушении толерантности к глюкозе или резистентности к инсулину и указывать на связь с риском развития диабета типа 2.

Более высокая концентрация в крови другого важного сахара — глюкозы — может сопровождать течение туберкулезной инфекции [23], но такой важный показатель как уровень глюкозы связан со слишком большим количеством процессов в организме, поэтому опираться только на данный показатель невозможно [9, 36].

Нуклеозид инозин и его составляющие — моносахарид рибоза и гипоксантин, накапливаются в условиях гипоксии при гранулематозном воспалении в легких, то есть напрямую связаны с тяжестью инфекционного процесса в лег-

ких при ТБ [15, 73], хотя материала по корреляции этих маркеров с ТБ накоплено еще мало.

Заключение

Успех в поиске биологических маркеров активного ТБ будет способствовать диагностике и мониторингу лечения заболевания. Различия в содержании метаболитов в плазме крови между лицами с прогрессирующей инфекцией, ЛТБИ и здоровыми людьми могут выявляться задолго до появления основных клинических признаков заболевания. Изменения содержания аминокислот и кортизола могут быть обнаружены еще за 12 месяцев до начала заболевания и становятся более выраженными на стадии постановки клинического диагноза. Определение содержания некоторых аминокислот и их соотношений наряду с измерением концентрации жирных кислот и липидов в плазме крови может быть использовано в качестве дополнительных диагностических методов выявления активного ТБ легких. Для расширения спектра метаболических маркеров ТБ с целью их последующего использования в диагностике указанного заболевания и в мониторинге его лечения необходимо проведение дальнейших исследований.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии у них конфликта интересов.

Список литературы/References

1. Adu-Gyamfi C.G., Snyman T., Makhathini L., Otjombe K., Darboe F., Penn-Nicholson A., Fisher M., Savulescu D., Hoffmann C., Chaisson R., Martinson N., Scriba T.J., George J.A., Suchard M.S. Diagnostic accuracy of plasma kynurenine/tryptophan ratio, measured by enzyme-linked immunosorbent assay, for pulmonary tuberculosis. *Int. J. Infect. Dis.*, 2020, vol. 99, pp. 441–448. doi: 10.1016/j.ijid.2020.08.028
2. Almeida A.S., Lago P.M., Boechat N., Huard R.C., Lazzarini L.C., Santos A.R., Nociari M., Zhu H., Perez-Sweeney B.M., Bang H., Ni Q., Huang J., Gibson A.L., Flores V.C., Pecanha L.R., Kritski A.L., Lapa e Silva J.R., Ho J.L. Tuberculosis is associated with a down-modulatory lung immune response that impairs Th1-type immunity. *J. Immunol.*, 2009, vol. 183, no. 1, pp. 718–731. doi: 10.4049/jimmunol.0801212
3. Apt A.S., Logunova N.N., Kondratieva T.K. Host genetics in susceptibility to and severity of mycobacterial diseases. *Tuberculosis (Edinb.)*, 2017, vol. 106, pp. 1–8. doi: 10.1016/j.tube.2017.05.004
4. Bafica A., Scanga C.A., Serhan C., Machado F., White S., Sher A., Aliberti J. Host control of Mycobacterium tuberculosis is regulated by 5-lipoxygenase-dependent lipoxin production. *J. Clin. Invest.*, 2005, vol. 115, no. 6, pp. 1601–1606. doi: 10.1172/JCI23949
5. Behar S.M., Divangahi M., Remold H.G. Evasion of innate immunity by Mycobacterium tuberculosis: is death an exit strategy? *Nat. Rev. Microbiol.*, 2010, vol. 8, no. 9, pp. 668–674. doi: 10.1038/nrmicro2387
6. Behr M.A., Wilson M.A., Gill W.P., Salamon H., Schoolnik G.K., Rane S., Small P.M. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science*, 1999, vol. 284, no. 5419, pp. 1520–1523. doi: 10.1126/science.284.5419.1520
7. Blumenthal A., Nagalingam G., Huch J.H., Walker L., Guillemin G.J., Smythe G.A., Ehrt S., Britton W.J., Saunders B.M. M. tuberculosis induces potent activation of IDO-1, but this is not essential for the immunological control of infection. *PLoS One*, 2012, vol. 7, no. 5: e37314. doi: 10.1371/journal.pone.0037314
8. Byrne S.T., Denkin S.M., Zhang Y. Aspirin and ibuprofen enhance pyrazinamide treatment of murine tuberculosis. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2007, vol. 59, no. 2, pp. 313–316. doi: 10.1093/jac/dkl486
9. Ca J., Bm M., Pinnelli V.B., Kandi V., As S., Mathew H.A., Gundreddy H., Afreen F., Vadakedath S. The association of pulmonary tuberculosis, abnormal glucose tolerance, and type 2 diabetes mellitus: a hospital-based cross-sectional study. *Cureus*, 2021, vol. 13, no. 11: e19758. doi: 10.7759/cureus.19758
10. Cai Y., Yang Q., Tang Y., Zhang M., Liu H., Zhang G., Deng Q., Huang J., Gao Z., Zhou B., Feng C.G., Chen X. Increased complement C1q level marks active disease in human tuberculosis. *PLoS One*, 2014, vol. 9, no. 3: e92340. doi: 10.1371/journal.pone.0092340
11. Calder P.C. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochim. Biophys. Acta*, 2015, vol. 1851, no. 4, pp. 469–484. doi: 10.1016/j.bbali.2014.08.010

12. Chen M., Divangahi M., Gan H., Shin D.S., Hong S., Lee D.M., Serhan C.N., Behar S.M., Remold H.G. Lipid mediators in innate immunity against tuberculosis: opposing roles of PGE2 and LXA4 in the induction of macrophage death. *J. Exp. Med.*, 2008, vol. 205, no. 12, pp. 2791–2801. doi: 10.1084/jem.20080767
13. Chendi B.H., Snyders C.I., Tonby K., Jennum S., Kidd M., Walzl G., Chegou N.N., Dyrholm-Riise A.M. A plasma 5-marker host biosignature identifies tuberculosis in high and low endemic countries. *Front. Immunol.*, 2021, vol. 12: 608846. doi: 10.3389/fimmu.2021.608846
14. Cho Y., Park Y., Sim B., Kim J., Lee H., Cho S.N., Kang Y.A., Lee S.G. Identification of serum biomarkers for active pulmonary tuberculosis using a targeted metabolomics approach. *Sci. Rep.*, 2020, vol. 10, no. 1: 3825. doi: 10.1038/s41598-020-60669-0
15. Conde R., Laires R., Gonçalves L.G., Rizvi A., Barroso C., Villar M., Macedo R., Simões M.J., Gaddam S., Lamosa P., Puchades-Carrasco L., Pineda-Lucena A., Patel A.B., Mande S.C., Banerjee S., Matzapetakis M., Coelho A.V. Discovery of serum biomarkers for diagnosis of tuberculosis by NMR metabolomics including cross-validation with a second cohort. *Biomed. J.*, 2022, vol. 45, iss. 4, pp. 654–664. doi: 10.1016/j.bj.2021.07.006
16. Cooper A.M. Cell-mediated immune responses in tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.*, 2009, vol. 27, pp. 393–422. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132703
17. Cooper A.M., Magram J., Ferrante J., Orme I.M. Interleukin 12 (IL-12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with mycobacterium tuberculosis. *J. Exp. Med.*, 1997, vol. 186, no. 1, pp. 39–45. doi: 10.1084/jem.186.1.39
18. Cooper A.M., Mayer-Barber K.D., Sher A. Role of innate cytokines in mycobacterial infection. *Mucosal Immunol.*, 2011, vol. 4, no. 3, pp. 252–260. doi: 10.1038/mi.2011.13
19. Corbel M., Theret N., Caulet-Maugendre S., Germain N., Lagente V., Clement B., Boichot E. Repeated endotoxin exposure induces interstitial fibrosis associated with enhanced gelatinase (MMP-2 and MMP-9) activity. *Inflamm. Res.*, 2001, vol. 50, no. 3, pp. 129–135. doi: 10.1007/s000110050736
20. Coussens A., Timms P.M., Boucher B.J., Venton T.R., Ashcroft A.T., Skolimowska K.H., Newton S.M., Wilkinson K.A., Davidson R.N., Griffiths C.J., Wilkinson R.J., Martineau A.R. α ,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits matrix metalloproteinases induced by Mycobacterium tuberculosis infection. *Immunology*, 2009, vol. 127, no. 4, pp. 539–548. doi: 10.1111/j.1365-2567.2008.03024.x
21. Cumming B.M., Pacl H.T., Steyn A.J.C. Relevance of the Warburg effect in tuberculosis for host-directed therapy. *Front. Cell Infect. Microbiol.*, 2020, vol. 10: 576596. doi: 10.3389/fcimb.2020.576596
22. Dey B., Bishai W.R. Crosstalk between Mycobacterium tuberculosis and the host cell. *Semin Immunol.*, 2014, vol. 26, no. 6, pp. 486–496. doi: 10.1016/j.smim.2014.09.002
23. Ding Y., Raterink R.J., Marin-Juez R., Veneman W.J., Egbers K., van den Eeden S., Haks M.C., Joosten S.A., Ottenhoff T.H.M., Harms A.C., Alia A., Hankemeier T., Spaik H.P. Tuberculosis causes highly conserved metabolic changes in human patients, mycobacteria-infected mice and zebrafish larvae. *Sci. Rep.*, 2020, vol. 10, no. 1: 11635. doi: 10.1038/s41598-020-68443-y
24. Dorhoi A., Yermeev V., Nouailles G., Weiner J. 3rd, Jörg S., Heinemann E., Oberbeck-Müller D., Knäul J.K., Vogelzang A., Reece S.T., Hahnke K., Mollenkopf H.J., Brinkmann V., Kaufmann S.H. Type I IFN signaling triggers immunopathology in tuberculosis-susceptible mice by modulating lung phagocyte dynamics. *Eur. J. Immunol.*, 2014, vol. 44, no. 8, pp. 2380–2393. doi: 10.1002/eji.201344219
25. Dutta N.K., Annadurai S., Mazumdar K., Dastidar S.G., Kristiansen J.E., Molnar J., Martins M., Amaral L. Potential management of resistant microbial infections with a novel non-antibiotic: the anti-inflammatory drug diclofenac sodium. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2007, vol. 30, no. 3, pp. 242–249. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2007.04.018
26. Dutta N.K., Karakousis P.C. Latent tuberculosis infection: myths, models, and molecular mechanisms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2014, vol. 78, no. 3, pp. 343–371. doi: 10.1128/MMBR.00010-14
27. Ehlers S., Schaible U.E. The granuloma in tuberculosis: dynamics of a host-pathogen collusion. *Front. Immunol.*, 2013, vol. 3: 411. doi: 10.3389/fimmu.2012.00411
28. Elkington P.T., Ugarte-Gil C.A., Friedland J.S. Matrix metalloproteinases in tuberculosis. *Eur. Respir. J.*, 2011, vol. 38, no. 2, pp. 456–464. doi: 10.1183/09031936.00015411
29. Flores J., Cancino J.C., Chavez-Galan L. Lipoarabinomannan as a point-of-care assay for diagnosis of tuberculosis: how far are we to use it? *Front. Microbiol.*, 2021, vol. 12: 638047. doi: 10.3389/fmicb.2021.638047
30. Flynn J.L., Chan J., Triebold K.J., Dalton D.K., Stewart T.A., Bloom B.R. An essential role for interferon gamma in resistance to Mycobacterium tuberculosis infection. *J. Exp. Med.*, 1993, vol. 178, no. 6, pp. 2249–2254. doi: 10.1084/jem.178.6.2249
31. Flynn J.L., Goldstein M.M., Chan J., Triebold K.J., Pfeffer K., Lowenstein C.J., Schreiber R., Mak T.W., Bloom B.R. Tumor necrosis factor- α is required in the protective immune response against Mycobacterium tuberculosis in mice. *Immunity*, 1995, vol. 2, no. 6, pp. 561–572. doi: 10.1016/1074-7613(95)90001-2
32. Ganguly N., Siddiqui I., Sharma P. Role of M. tuberculosis RD-1 region encoded secretory proteins in protective response and virulence. *Tuberculosis (Edinb.)*, 2008, vol. 88, no. 6, pp. 510–517. doi: 10.1016/j.tube.2008.05.002
33. Gey Van Pittius N.C., Gamielien J., Hide W., Brown G.D., Siezen R.J., Beyers A.D. The ESAT-6 gene cluster of Mycobacterium tuberculosis and other high G+C Gram-positive bacteria. *Genome Biol.*, 2001, vol. 2, no. 10: RESEARCH0044. doi: 10.1186/gb-2001-2-10-research0044
34. Guggino G., Orlando V., Cutrera S., La Manna M.P., Di Liberto D., Vanini V., Petruccioli E., Dieli F., Goletti D., Caccamo N. Granzyme A as a potential biomarker of Mycobacterium tuberculosis infection and disease. *Immunol. Lett.*, 2015, vol. 166, no. 2, pp. 87–91. doi: 10.1016/j.imlet.2015.05.019
35. Hamasur B., Bruchfeld J., Haile M., Pawlowski A., Bjorvatn B., Källenius G., Svenson S.B. Rapid diagnosis of tuberculosis by detection of mycobacterial lipoarabinomannan in urine. *J. Microbiol. Methods*, 2001, vol. 45, no. 1, pp. 41–52. doi: 10.1016/s0167-7012(01)00239-1
36. Hayashi S., Takeuchi M., Hatsuda K., Ogata K., Kurata M., Nakayama T., Ohishi Y., Nakamura H. The impact of nutrition and glucose intolerance on the development of tuberculosis in Japan. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 2014, vol. 18, no. 1, pp. 84–88. doi: 10.5588/ijtld.13.0495
37. Hunter R.L. Pathology of post primary tuberculosis of the lung: an illustrated critical review. *Tuberculosis (Edinb.)*, 2011, vol. 91, no. 6, pp. 497–509. doi: 10.1016/j.tube.2011.03.007

38. Juffermans N.P., Florquin S., Camoglio L., Verbon A., Kolk A.H., Speelman P., van Deventer S.J., van der Poll T. Interleukin-1 signaling is essential for host defense during murine pulmonary tuberculosis. *J. Infect. Dis.*, 2000, vol. 182, no. 3, pp. 902–908. doi: 10.1086/315771
39. Kapina M.A., Shepelkova G.S., Aydeenko V.G., Guseva A.N., Kondratieva T.K., Evstifeev V.V., Apt A.S. Interleukin-11 drives early lung inflammation during Mycobacterium tuberculosis infection in genetically susceptible mice. *PLoS One*, 2011, vol. 6, no. 7: e21878. doi: 10.1371/journal.pone.0021878
40. Karim A.F., Sande O.J., Tomechko S.E., Ding X., Li M., Maxwell S., Ewing R.M., Harding C.V., Rojas R.E., Chance M.R., Boom W.H. Proteomics and network analyses reveal inhibition of Akt-mTOR signaling in CD4⁺ T cells by Mycobacterium tuberculosis mannose-capped lipoarabinomannan. *Proteomics*, 2017, vol. 17, no. 22: 1700233. doi: 10.1002/pmic.201700233
41. Karinch A.M., Pan M., Lin C.M., Strange R., Souba W.W. Glutamine metabolism in sepsis and infection. *J. Nutr.*, 2001, vol. 131 (9 Suppl), pp. 2535S–2538S; discussion 2550S–2551S. doi: 10.1093/jn/131.9.2535S
42. Keane J., Remold H.G., Kornfeld H. Virulent Mycobacterium tuberculosis strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages. *J. Immunol.*, 2000, vol. 164, no. 4, pp. 2016–20. doi: 10.4049/jimmunol.164.4.2016
43. Kroesen V.M., Gröschel M.I., Martinson N., Zumla A., Maeurer M., van der Werf T.S., Vilaplana C. Non-steroidal anti-inflammatory drugs as host-directed therapy for tuberculosis: a systematic review. *Front. Immunol.*, 2017, vol. 8: 772. doi: 10.3389/fimmu.2017.00772
44. Krug S., Parveen S., Bishai W.R. Host-directed therapies: modulating inflammation to treat tuberculosis. *Front. Immunol.*, 2021, vol. 12: 660916. doi: 10.3389/fimmu.2021.660916
45. Kübler A., Luna B., Larsson C., Ammerman N.C., Andrade B.B., Orandle M., Bock K.W., Xu Z., Bagci U., Mollura D.J., Marshall J., Burns J., Winglee K., Ahidjo B.A., Cheung L.S., Klunk M., Jain S.K., Kumar N.P., Babu S., Sher A., Friedland J.S., Elkington P.T., Bishai W.R. Mycobacterium tuberculosis dysregulates MMP/TIMP balance to drive rapid cavitation and unrestrained bacterial proliferation. *J. Pathol.*, 2015, vol. 235, no. 3, pp. 431–444. doi: 10.1002/path.4432
46. Lewinsohn D.M., Grotzke J.E., Heinzel A.S., Zhu L., Owendale P.J., Johnson M., Alderson M.R. Secreted proteins from Mycobacterium tuberculosis gain access to the cytosolic MHC class-I antigen-processing pathway. *J. Immunol.*, 2006, vol. 177, no. 1, pp. 437–442. doi: 10.4049/jimmunol.177.1.437
47. Linge I., Tsareva A., Kondratieva E., Dyatlov A., Hidalgo J., Zvartsev R., Apt A. Pleiotropic Effect of IL-6 produced by B-lymphocytes during early phases of adaptive immune responses against TB infection. *Front. Immunol.*, 2022, vol. 13: 750068. doi: 10.3389/fimmu.2022.750068
48. Logunova N., Korotetskaya M., Apt A. Analysis of gene expression in the lung tissue in mice congenic as per H2-line complex with various severity of tuberculous infection course. *Tuberculosis and Lung Diseases*, 2015, vol. 12, pp. 44–49.
49. Lubbers R., Sutherland J.S., Goletti D., de Paus R.A., van Moorsel C.H.M., Veltkamp M., Vestjens S.M.T., Bos W.J.W., Petrone L., Del Nonno F., Bajema I.M., Dijkman K., Verreck F.A.W., Walz G., Gelderman K.A., Groeneveld G.H., Geluk A., Ottenhoff T.H.M., Joosten S.A., Trouw L.A. Complement component C1q as serum biomarker to detect active tuberculosis. *Front. Immunol.*, 2018, vol. 9: 2427. doi: 10.3389/fimmu.2018.02427
50. Maurya R., Bhattacharya P., Dey R., Nakhasi H.L. Leptin functions in infectious diseases. *Front. Immunol.*, 2018, vol. 9: 2741. doi: 10.3389/fimmu.2018.02741
51. Mayer-Barber K.D., Andrade B.B., Barber D.L., Hieny S., Feng C.G., Caspar P., Oland S., Gordon S., Sher A. Innate and adaptive interferons suppress IL-1 α and IL-1 β production by distinct pulmonary myeloid subsets during Mycobacterium tuberculosis infection. *Immunity*, 2011, vol. 35, no. 6, pp. 1023–1034. doi: 10.1016/j.immuni.2011.12.002
52. Mayer-Barber K.D., Andrade B.B., Oland S.D., Amaral E.P., Barber D.L., Gonzales J., Derrick S.C., Shi R., Kumar N.P., Wei W., Yuan X., Zhang G., Cai Y., Babu S., Catalfamo M., Salazar A.M., Via L.E., Barry C.E. 3rd, Sher A. Host-directed therapy of tuberculosis based on interleukin-1 and type I interferon crosstalk. *Nature*, 2014, vol. 511, no. 7507, pp. 99–103. doi: 10.1038/nature13489
53. Mayer-Barber K.D., Sher A. Cytokine and lipid mediator networks in tuberculosis. *Immunol. Rev.*, 2015, vol. 264, no. 1, pp. 264–275. doi: 10.1111/immr.12249
54. Mehrotra P., Jamwal S.V., Saquib N., Sinha N., Siddiqui Z., Manivel V., Chatterjee S., Rao K.V. Pathogenicity of Mycobacterium tuberculosis is expressed by regulating metabolic thresholds of the host macrophage. *PLoS Pathog.*, 2014, vol. 10, no. 7: e1004265. doi: 10.1371/journal.ppat.1004265
55. Nienaber A., Baumgartner J., Dolman R.C., Ozturk M., Zandberg L., Hayford F.E.A., Brombacher F., Blaauw R., Parihar S.P., Smuts C.M., Malan L. Omega-3 fatty acid and iron supplementation alone, but not in combination, lower inflammation and anemia of infection in Mycobacterium tuberculosis-infected mice. *Nutrients*, 2020, vol. 12, no. 9: 2897. doi: 10.3390/nu12092897
56. Nienaber A., Hayford F.E.A., Variava E., Martinson N., Malan L. The manipulation of the lipid mediator metabolism as adjunct host-directed therapy in tuberculosis. *Front. Immunol.*, 2021, vol. 12: 623941. doi: 10.3389/fimmu.2021.623941
57. Novikov A., Cardone M., Thompson R., Shenderov K., Kirschman K.D., Mayer-Barber K.D., Myers T.G., Rabin R.L., Trinchieri G., Sher A., Feng C.G. Mycobacterium tuberculosis triggers host type I IFN signaling to regulate IL-1 β production in human macrophages. *J. Immunol.*, 2011, vol. 187, no. 5, pp. 2540–2547. doi: 10.4049/jimmunol.1100926
58. O'Garra A., Redford P.S., McNab F.W., Bloom C.I., Wilkinson R.J., Berry M.P. The immune response in tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.* 2013, vol. 31, pp. 475–527. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-095939
59. Oliveira G.P., de Abreu M.G., Pelosi P., Rocco P.R. Exogenous glutamine in respiratory diseases: myth or reality? *Nutrients*, 2016, vol. 8, no. 2: 76. doi: 10.3390/nu8020076
60. Ong C.W., Elkington P.T., Friedland J.S. Tuberculosis, pulmonary cavitation, and matrix metalloproteinases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2014, vol. 190, no. 1, pp. 9–18. doi: 10.1164/rccm.201311-2106PP
61. Osawa T., Watanabe M., Morimoto K., Okumura M., Yoshiyama T., Ogata H., Goto H., Kudoh S., Ohta K., Sasaki Y. Serum procalcitonin levels predict mortality risk in patients with pulmonary tuberculosis: a single-center prospective observational study. *J. Infect. Dis.*, 2020, vol. 222, no. 10, pp. 1651–1654. doi: 10.1093/infdis/jiaa275
62. Pathak S.K., Basu S., Basu K.K., Banerjee A., Pathak S., Bhattacharyya A., Kaisho T., Kundu M., Basu J. Direct extracellular interaction between the early secreted antigen ESAT-6 of Mycobacterium tuberculosis and TLR2 inhibits TLR signaling in macrophages. *Nat. Immunol.*, 2007, vol. 8, no. 6, pp. 610–618. doi: 10.1038/ni1468

63. Palčėková Z., Gilleron M., Angala S.K., Belardinelli J.M., McNeil M., Bermudez L.E., Jackson M. Polysaccharide succinylation enhances the intracellular survival of Mycobacterium abscessus. *ACS Infect. Dis.*, 2020, vol. 6, no. 8, pp. 2235–2248. doi: 10.1021/acinfeddis.0c00361
64. Pavlicek R.L., Fine-Coulson K., Gupta T., Quinn F.D., Posey J.E., Willby M., Castro-Garza J., Karls R.K. Rv3351c, a Mycobacterium tuberculosis gene that affects bacterial growth and alveolar epithelial cell viability. *Can. J. Microbiol.*, 2015, vol. 61, no. 12, pp. 938–947. doi: 10.1139/cjm-2015-0528
65. Rasmussen T.A., Sogaard O.S., Camara C., Andersen P.L., Wejse C. Serum procalcitonin in pulmonary tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 2011, vol. 15, no. 2, pp. 251–256.
66. Ritter K., Rousseau J., Hölscher C. The role of gp130 cytokines in tuberculosis. *Cells*, 2020, vol. 9, no. 12: 2695. doi: 10.3390/cells9122695
67. Rodrigues T.S., Conti B.J., Fraga-Silva T.F.C., Almeida F., Bonato V.L.D. Interplay between alveolar epithelial and dendritic cells and Mycobacterium tuberculosis. *J. Leukoc. Biol.*, 2020, vol. 108, no. 4, pp. 1139–1156. doi: 10.1002/JLB.4MR0520-112R
68. Russell D.G. Who puts the tubercle in tuberculosis? *Nat. Rev. Microbiol.*, 2007, vol. 5, no. 1, pp. 39–47. doi: 10.1038/nrmicro1538
69. Sada E., Aguilar D., Torres M., Herrera T. Detection of lipoarabinomannan as a diagnostic test for tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.*, 1992, vol. 30, no. 9, pp. 2415–2418. doi: 10.1128/jcm.30.9.2415-2418.1992
70. Sande O.J., Karim A.F., Li Q., Ding X., Harding C.V., Rojas R.E., Boom W.H. Mannose-capped lipoarabinomannan from Mycobacterium tuberculosis induces CD4⁺ T cell anergy via GRAIL. *J. Immunol.*, 2016, vol. 196, no. 2, pp. 691–702. doi: 10.4049/jimmunol.1500710
71. Selvaraj P., Jawahar M.S., Rajeswari D.N., Alagarasu K., Vidyanani M., Narayanan P.R. Role of mannose binding lectin gene variants on its protein levels and macrophage phagocytosis with live Mycobacterium tuberculosis in pulmonary tuberculosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2006, vol. 46, no. 3, pp. 433–437. doi: 10.1111/j.1574-695X.2006.00053.x
72. Shi L., Eugenin E.A., Subbiano S. Immunometabolism in tuberculosis. *Front. Immunol.*, 2016, vol. 7: 150. doi: 10.3389/fimmu.2016.00150
73. Singh V., Donini S., Pacitto A., Sala C., Hartkoorn R.C., Dhar N., Keri G., Ascher D.B., Mondésert G., Vocat A., Lupien A., Sommer R., Vermet H., Lagrange S., Buechler J., Warner D.F., McKinney J.D., Pato J., Cole S.T., Blundell T.L., Rizzi M., Mizrahi V. The inosine monophosphate dehydrogenase, guaB2, is a vulnerable new bactericidal drug target for tuberculosis. *ACS Infect. Dis.*, 2017, vol. 3, no. 1, pp. 5–17. doi: 10.1021/acinfeddis.6b00102
74. Singh V., Kaur C., Chaudhary V.K., Rao K.V., Chatterjee S. M. tuberculosis secretory protein ESAT-6 induces metabolic flux perturbations to drive foamy macrophage differentiation. *Sci. Rep.*, 2015, vol. 5: 12906. doi: 10.1038/srep12906
75. Søborg C., Madsen H.O., Andersen A.B., Lillebaek T., Kok-Jensen A., Garred P. Mannose-binding lectin polymorphisms in clinical tuberculosis. *J. Infect. Dis.*, 2003, vol. 188, no. 5, pp. 777–782. doi: 10.1086/377183
76. Stanley S.A., Raghavan S., Hwang W.W., Cox J.S. Acute infection and macrophage subversion by Mycobacterium tuberculosis require a specialized secretion system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, vol. 100, no. 22, pp. 13001–13006. doi: 10.1073/pnas.2235593100
77. Suzuki Y., Miwa S., Akamatsu T., Suzuki M., Fujie M., Nakamura Y., Inui N., Hayakawa H., Chida K., Suda T. Indoleamine 2,3-dioxygenase in the pathogenesis of tuberculous pleurisy. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 2013, vol. 17, no. 11, pp. 1501–1506. doi: 10.5588/ijtld.13.0082
78. Suzuki Y., Suda T., Asada K., Miwa S., Suzuki M., Fujie M., Furuhashi K., Nakamura Y., Inui N., Shirai T., Hayakawa H., Nakamura H., Chida K. Serum indoleamine 2,3-dioxygenase activity predicts prognosis of pulmonary tuberculosis. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2012, vol. 19, no. 3, pp. 436–442. doi: 10.1128/CVI.05402-11
79. Tobin D.M., Roca F.J., Oh S.F., McFarland R., Vickery T.W., Ray J.P., Ko D.C., Zou Y., Bang N.D., Chau T.T., Vary J.C., Hawn T.R., Dunstan S.J., Farrar J.J., Thwaites G.E., King M.C., Serhan C.N., Ramakrishnan L. Host genotype-specific therapies can optimize the inflammatory response to mycobacterial infections. *Cell*, 2012, vol. 148, no. 3, pp. 434–446. doi: 10.1016/j.cell.2011.12.023
80. Tonby K., Wergeland I., Lieske N.V., Kvale D., Tasken K., Dyrhol-Riise A.M. The COX-inhibitor indomethacin reduces Th1 effector and T regulatory cells in vitro in Mycobacterium tuberculosis infection. *BMC Infect. Dis.*, 2016, vol. 16, no. 1: 599. doi: 10.1186/s12879-016-1938-8
81. Weiner J. 3rd, Maertzdorf J., Sutherland J.S., Duffy F.J., Thompson E., Suliman S., McEwen G., Thiel B., Parida S.K., Zyla J., Hanekom W.A., Mohny R.P., Boom W.H., Mayanja-Kizza H., Howe R., Dockrell H.M., Ottenhoff T.H.M., Scriba T.J., Zak D.E., Walzl G., Kaufmann S.H.E.; G6C-74 consortium. Metabolite changes in blood predict the onset of tuberculosis. *Nat. Commun.*, 2018, vol. 9, no. 1: 5208. doi: 10.1038/s41467-018-07635-7
82. Weiner J. 3rd, Parida S.K., Maertzdorf J., Black G.F., Repsilber D., Telaar A., Mohny R.P., Arndt-Sullivan C., Ganoza C.A., Faé K.C., Walzl G., Kaufmann S.H. Biomarkers of inflammation, immunosuppression and stress with active disease are revealed by metabolomic profiling of tuberculosis patients. *PLoS One*, 2012, vol. 7, no. 7: e40221. doi: 10.1371/journal.pone.0040221
83. Yamada H., Mizumo S., Horai R., Iwakura Y., Sugawara I. Protective role of interleukin-1 in mycobacterial infection in IL-1 alpha/beta double-knockout mice. *Lab. Invest.*, 2000, vol. 80, no. 5, pp. 759–767. doi: 10.1038/labinvest.3780079

Авторы:

Коротецкая М.В., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории иммуногенетики отдела иммунологии ФГБНУ Центральный НИИ туберкулеза, Москва, Россия; преподаватель факультета биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия;
Рубакова Э.И., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории иммуногенетики отдела иммунологии ФГБНУ Центральный НИИ туберкулеза, Москва, Россия.

Authors:

Korotetskaya M.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Immunogenetics, Department of Immunology, Central Research Institute of Tuberculosis, Moscow, Russian Federation; Lecturer, Department of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation;
Rubakova E.I., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Immunogenetics, Department of Immunology, Central Research Institute of Tuberculosis, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 11.05.2022
 Принята к печати 19.06.2022

Received 11.05.2022
 Accepted 19.06.2022

REDUCED AMINO ACID ALPHABET-BASED ENCODING AND ITS IMPACT ON MODELING INFLUENZA ANTIGENIC EVOLUTION

M. Forghani^a, A.L. Firstkov^a, M.M. Alyannezhadi^b, D.M. Danilenko^c, A.B. Komissarov^c

^a *N.N. Krasovskii Institute of Mathematics and Mechanics of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences (IMM UB RAS), Ekaterinburg, Russian Federation*

^b *University of Science and Technology of Mazandaran, Behshahr, Iran*

^c *Smorodintsev Research Institute of Influenza, Ministry of Health of the Russian Federation, St.Petersburg, Russian Federation*

Abstract. Currently, vaccination is one of the most efficient ways to control and prevent influenza infection. Vaccine production largely relies on the results of laboratory assays, including hemagglutination inhibition and microneutralization assays, which are time-consuming and laborious. Viruses can escape from the immune response that results in the need to revise and update vaccines biannually. The hemagglutination inhibition assay can measure how effectively antibodies against a reference strain bind and block an antigen of the test strain. Various computer-aided models have been developed to optimize candidate vaccine strain selection. A general problem in modeling of antigenic evolution is the representation of genetic sequences for input into the research model. Our motivation stems from the well-known problem of encoding genetic information for modeling antigenic evolution. This paper introduces a two-fold encoding approach based on reduced amino acid alphabet and amino acid index databases called AAindex. We propose to apply a simplified amino acid alphabet in modeling of antigenic evolution. A simplified alphabet, also called a sub-alphabet or reduced amino acid alphabet, implies to use the 20 amino acids being clustered and divided into amino acid groups. The proposed encoding allows to redefine mutations termed for amino acid groups located in reduced alphabets. We investigated 40 reduced amino acid sets and their performance in modeling antigenic evolution. The experimental results indicate that the proposed reduced amino acid alphabets can achieve the performance of the standard alphabet in its accuracy. Moreover, these alphabets provide deeper insight into various aspects of the relationship between mutation and antigenic variation. By checking identified high-impact sites in the Influenza Research Database, we found that not only antigenic sites have a significant influence on antigenicity, but also other amino acids located in close proximity. The results indicate that all selected non-antigenic sites are related to immune responses. According to the Influenza Research Database, these have been experimentally determined to be T-cell epitopes, B-cell epitopes, and MHC-binding epitopes of different classes. This highlighted a caveat: while simulating antigenic evolution, the model should consider not only the genetic information on antigenic sites, but also that of neighboring positions, as they may indirectly impact antigenicity. Additionally, our findings indicate that structural and charge characteristics are the most beneficial in modeling antigenic evolution, which is in agreement with previous studies.

Key words: AAindex, antigenic evolution, hemagglutinin, influenza, modeling, reduced amino acid alphabet.

Адрес для переписки:

Форгани Маджид
620108, Россия, г. Екатеринбург, ул. Софьи Ковалевской, 16,
ФГБУН Институт математики и механики им. Н.Н. Красовского
УрО РАН.
Тел.: 8 (343) 362-81-88. E-mail: forghani@imm.uran.ru

Contacts:

Majid Forghani
620108, Russian Federation, Yekaterinburg, S. Kovalevskaya str., 16,
N.N. Krasovskii Institute of Mathematics and Mechanics UB RAS.
Phone: +7 (343) 362-81-88. E-mail: forghani@imm.uran.ru

Для цитирования:

Форгани М., Фирстков А.Л., Алянеджади М.М., Даниленко Д.М.,
Комиссаров А.Б. Кодирование с помощью сокращенного
аминокислотного алфавита и его влияние на моделирование
антигенной эволюции гриппа // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 5.
С. 837–849. doi: 10.15789/2220-7619-RAA-1968

Citation:

Forghani M., Firstkov A.L., Alyannezhadi M.M., Danilenko D.M.,
Komissarov A.B. Reduced amino acid alphabet-based encoding and
its impact on modeling influenza antigenic evolution // Russian Journal
of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 5,
pp. 837–849. doi: 10.15789/2220-7619-RAA-1968

This study was funded by the Russian Foundation for Basic Research (RFBR), project number 19-31-60025.

КОДИРОВАНИЕ С ПОМОЩЬЮ СОКРАЩЕННОГО АМИНОКИСЛОТНОГО АЛФАВИТА И ЕГО ВЛИЯНИЕ НА МОДЕЛИРОВАНИЕ АНТИГЕННОЙ ЭВОЛЮЦИИ ГРИППА

Форгани М.¹, Фирстов А.Л.¹, Аляннеджади М.М.², Даниленко Д.М.³, Комиссаров А.Б.³

¹ ФГБУН Институт математики и механики им. Н.Н. Красовского Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

² Университет науки и технологии Мазандарана, г. Бехшехр, Иран

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

Резюме. В настоящее время, вакцинация является одним из наиболее эффективных способов контроля и профилактики гриппозной инфекции. Производство вакцин в основном зависит от результатов лабораторных анализов, включая анализ реакции торможения гемагглютинации и микронейтрализации, которые требуют много времени и труда. Вирусы могут избегать иммунного ответа, что приводит к необходимости пересмотра и обновления вакцин два раза в год. Анализ реакции торможения гемагглютинации позволяет измерить, насколько эффективно антитела против эталонного штамма связывают и блокируют антиген испытуемого штамма. Для оптимизации выбора вакцинного штамма-кандидата были разработаны различные компьютерные модели. Одной из общих проблем в моделировании антигенной эволюции является представление генетических последовательностей для ввода в исследовательскую модель. Наша мотивация связана с хорошо известной проблемой кодирования генетической информации для моделирования антигенной эволюции. В данной работе представлен двухэтапный подход к кодированию, основанный на сокращенных аминокислотных алфавитах и базах данных аминокислотных индексов под названием AAindex. Мы предлагаем использовать упрощенные аминокислотные алфавиты для моделирования антигенной эволюции. Упрощенный алфавит, также называемый субалфавитом или сокращенным аминокислотным алфавитом, это алфавит, в котором 20 аминокислот разделены на группы. Предложенное кодирование позволяет переопределить мутации в терминах групп аминокислот, расположенных в сокращенном алфавите. Мы исследовали 40 сокращенных алфавитов и их эффективность при моделировании антигенной эволюции. Результаты экспериментов показывают, что предложенные сокращенные аминокислотные алфавиты могут достичь показателей стандартного алфавита по точности. Более того, эти алфавиты позволяют лучше понять взаимосвязь между мутациями и антигенными изменениями с различных точек зрения. Проверив полученные высокоэффективные сайты в исследовательской базе данных гриппа (Influenza Research Database), мы обнаружили, что не только антигенные сайты оказывают значительное влияние на антигенность, но и их соседние аминокислоты. Результаты показывают, что все выбранные неантигенные участки связаны с иммунным ответом. Согласно исследовательской базе данных гриппа, экспериментально установлено, что это эпитопы Т-клеток, эпитопы В-клеток и МНС-связывающие эпитопы различных классов. Это подчеркивает значимость того, что: при моделировании антигенной эволюции модель должна учитывать не только генетическую информацию антигенных участков, но и генетическую информацию соседних позиций, поскольку они могут косвенно влиять на антигенность. Кроме того, наши результаты показывают, что, в соответствии с предыдущими исследованиями, структурные и зарядовые характеристики аминокислот являются наиболее значимыми при моделировании антигенной эволюции.

Ключевые слова: AAindex, антигенная эволюция, гемагглютинин, грипп, моделирование, сокращенный аминокислотный алфавит.

Introduction

Influenza is a contagious respiratory infection that affects 5–15% of the population worldwide annually, resulting in 3–5 million cases of severe illness and 250 000 to 500 000 deaths [36]. Influenza epidemics influence public health and involve severe economic consequences, making it the subject of various economic studies [4]. The World Health Organization (WHO) continuously monitors viral pathogens, especially those that can become epidemics or pandemics, and decides on strategies to combat them. Given the special status of influenza, the WHO created the Global Influenza Surveillance and Response System, the primary function of which is to monitor the evolution of the influenza virus and

to provide recommendations for the annual vaccine's composition for the Northern and Southern Hemispheres.

Influenza viruses are part of the *Orthomyxoviridae* family. According to antigenic characteristics of their nuclear proteins, they are grouped into four types: IVA (A); IVB (B); IVC (C); and IVD (D). Among them, types A and B are associated with influenza outbreaks. Type C appears to evolve slowly and leads to less severe and less significant health consequences. Type D is an influenza C-like virus that is observed in non-human hosts, e.g., cattle and swine [30]. Type A is further classified according to the combination of hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA), the two main surface antigens of influenza that play a key role in infectivity and

immune responses. HA has 18 variants (H1–H18), while the NA protein can be one of 11 variants (N1–N11). Hence, the virus can theoretically be any of 198 different subtypes; this provides an ability to infect a broad spectrum of various hosts [37]. Despite this diversity, humans are infected with only a limited number of influenza A subtypes (i.e., H1N1, H2N2, H3N2), with H1N1 and H3N2 being currently relevant. Thus, we consider them in this paper. Other zoonotic subtypes represent only sporadic infections and are out of the scope of this study.

Influenza A viruses are capable of enormous genetic variation, both through continuous, gradual mutation and by reassortment of gene segments between viruses, resulting in emerging novel antigenic variants. Epidemics are the result of gradual evolutionary changes called antigenic drift, which leads to the generation of new strains from existing ones through mutation. In addition to antigenic drift, the influenza virus can be altered by antigenic shift. It is an abrupt significant change in influenza viruses resulting in the emergence of new HA and/or NA. It is the process by which at least two subtypes combine into a new subtype that has a mixture of surface antigens of two or more strains [35].

The only effective method to control influenza is vaccination, eliciting protective neutralizing antibodies and memory T-cell responses. Since HA antigen abundance on the viral surface is approximately four-fold greater than NA [31], it is the primary component in vaccine compositions. This is the reason why we consider only HA protein sequences in this paper.

The influenza vaccine requires an update if the vaccine composition strains are antigenically distinct from currently circulating viruses. A gold-standard and widespread laboratory procedure called hemagglutination inhibition (HI) assay is used to assess the measure of antigenic similarity between strains. The HI assay can measure how effectively antibodies against a reference strain bind and block an antigen of the test strain. High HI titers indicate a high degree of antigenic similarity between strains [16]. The main conclusion of HI assay analysis is determining antigenic distance (i.e., similarity between reference and test antigens), which further can be presented in terms of a binary variable called antigenic variant. Currently, there are two widely used definitions of antigenic distance [18, 27]:

$$d_1(i, j) = \log_2\left(\frac{M}{H_{i,j}}\right) \quad (1)$$

$$d_2(i, j) = \sqrt{\frac{H_{i,i} \times H_{j,j}}{H_{i,j} \times H_{j,i}}} \quad (2)$$

where $H_{i,j}$ is the obtained HI titer for antiserum of (reference) strain j against the antigen of (test) strain i , and M is the maximum titer observed for an-

tiserum j against any antigen in the HI table. The antigenic variant is determined by applying the threshold to the obtained antigenic distance. The pair of test and reference viruses whose antigenic distance meets the threshold are designated as antigenic variants; otherwise, they are only antigenically similar.

The HI assay is a labor-intensive and time-consuming procedure, while vaccine development is under time pressure. Over the past decade, various computer-aided approaches have been developed to speed up the process of strain selection and to increase the quality of vaccine production. Klingten et al. [16] has provided a comprehensive review of antigenic evolution prediction associated with vaccine production. They classified the approaches into phylogenetic and population genetics-based methods, statistical methods, epidemiological models, and other methods based on information and graph theories. The approaches employ different data types serving as model inputs, e.g., viral sequence, HI assay data, protein structure, physicochemical properties, etc. A critical step in antigenic variant modeling is describing the biological significance of a mutation between test and reference viruses and linking it to antigenicity.

Unfortunately, the exact roles and how they affect biological properties within evolution are not yet fully understood for many such changes. Generally, it is known that evolution is influenced by several biological properties, especially the volume and hydrophobicity of amino acids [32]. Studies on amino acid property changes provide fundamental information about the evolution of specific proteins. Earlier studies indicated that HA antigen is positively charged, while on the contrary, the glycan receptors of the host cell are negatively charged. Thus, changes in electrostatic charge due to mutation can play a significant role in receptor specificity, enhancing or diminishing the receptor binding affinity and avidity [2, 17]. Moreover, Huang et al. [14] recently showed that charged amino acid mutations impact influenza virus evolution and are beneficial in vaccine research. Accordingly, mutation can be considered a multidimensional event, wherein each dimension represents an amino acid attribute.

Several techniques reflect the biological characteristics of mutation in numerical domains, among which application of the AAindex database [15] is the most popular. The AAindex database is a comprehensive collection of biological, physical, and chemical amino acid properties collected from scientific papers and accessed through www.genome.jp. The database mainly consists of three sections: AAindex1; AAindex2; and AAindex3. AAindex1 includes various amino acid indices, each of which can be represented as a numerical vector of 20 numbers representing 20 standard amino acids. AAindex2 contains different amino acid mutation matrices, while AAindex3 consists of statistical protein con-

tact potentials. The AAindex database (ver.9.2) currently covers 566, 94, and 47 records for AAindex1, AAindex2, and AAindex3, respectively.

As mentioned, the AAindex database has been employed for encoding protein sequence in various studies. Here, we mention some of the more relevant studies in which the AAindex database was used for exploring genetic and antigenic evolution. Yao et al. [39] proposed an algorithm called joint random forest regression to predict antigenic variants. They compared 95 amino acid matrices, including AAindex2, to assess the relationship between genetic and antigenic evolution by amino acid attributes at different protein sites. Their results indicated that structural features are more significant to the antigenicity of the influenza virus. Wang et al. [34] suggested an approach based on matrix completion for predicting antigenic evolution. They studied the impact of 65 amino acid substitution matrices taken from the AAindex database to predict antigenic evolution. Their results suggested that the “homologous structure derived matrix (called HSDM) for alignment of distantly related sequences” outperformed others in terms of RMSE.

Moreover, Qiu et al. [24] developed a structure-based antigenicity scoring model. Their model engages antigenically dominant positions according to structural context, including correlation with local amino acid attribute changes, to analyze antigenicity. They demonstrated that incorporating the structural context of protein can enhance antigenic evolution prediction. Additionally, Forghani and Khachay [10] carried out a principal component analysis on AAindex1 and introduced 11 indices that explained 91% of the total variation in the database. The new indices are further used to encode HA protein sequence and create an input tensor fed into a convolutional neural network. Their model achieves a mean absolute error of 0.935 antigenic units for yearly, non-anticipating prediction of antigenic distance for subtype H1N1 (2001–2009). Cui et al. [6] suggested modeling influenza virus antigenicity by selecting the most significant sites, clustering the AAindex1 based on mutual information, and encoding the sites by the representative from clusters to form the feature vector. The feature vector is further given to a classifier to discretize antigenic variant classes. Recently, we performed a preliminary analysis to study the impact of amino acid encoding on modeling the antigenic evolution of the influenza virus [11]. Apart from Cui et al.’s work, our work introduces an early-stage mutation encoding by applying reduced amino acid alphabets.

The current paper addresses one of the fundamental challenges in bioinformatics: deciding how to represent input genetic information for modeling more efficiently and meaningfully. In response to this problem, we employed simplified amino acid alphabets. A simplified alphabet, also called a sub-alphabet or reduced amino acid alphabet (RAAA),

is an alphabet in which the 20 amino acids are clustered and divided into amino acids groups. RAAA construction is a problem that belongs to the set partitioning problem, which is out of this paper’s scope. Previous studies have shown that RAAAs have been successfully applied in various domains, including: protein annotation and description; protein functionality prediction [21, 41]; protein folding assessment; sequence classification [19]; consensus sequence search; and genetic pattern identification [5].

A reduced amino acid set simplifies protein system complexity, providing a better insight into structural similarities across protein sequences [42]. We considered different definitions of similarity via RAAAs to reconstruct the relationship between genotype and phenotype. A RAAA represents genetic information on a coarse scale, which may highlight attributes that drive antigenic evolution of the influenza virus.

In our approach, encoding is conducted in two steps. In addition to the standard amino acid alphabet, the first step employs a RAAA to represent the mutation in different structural, biological, and physicochemical contexts. Further, the second step encodes the alphabetical information of the encoded genetic sequence into a numerical one, which enables its use in various types of mathematical modeling. Preliminary results indicate that some RAAA-based models outperform models based on the standard amino acid alphabet in terms of accuracy.

In this paper, we take a step forward and perform a comprehensive analysis to further refine result accuracy. The contributions of this paper are three-fold:

1. We propose a novel encoding method using reduced amino acid alphabets, which helps to clarify the genetic/antigenic relationship.
2. Relative to similar previous studies [6, 11], we improve the approach at several levels:
 - 2.1. Increasing the resolution of thresholds.
 - 2.2. Clustering by several methods and comparing their results to find the optimal number of clusters.
 - 2.3. Selecting the closest index to the center of a cluster as its representative.
 - 2.4. Applying five well-known classification algorithms.
 - 2.5. Optimizing of classifier hyperparameters through a comprehensive grid search.
3. Relying on experimental results, we found that incorporating structural and charge properties can enhance modeling quality, which is in agreement with previous studies.

The rest of the paper is organized as follows. Section “Materials and methods” describes the general computational pipeline, data preparation, and all necessary algorithms for primary and secondary encoding. Experimental setup and its outcomes are presented in Section “Results and discussion”. This section also covers interpretation and discussion of the obtained results. Finally, the results of our study are summarized in Section “Conclusion”.

Materials and methods

As mentioned earlier, our experimental design was inspired by a published methodology [6]. However, we propose some modifications and enhancements to improve modeling quality. Our approach is mainly divided into five steps: encoding genetic sequences by RAAA; selecting the most relevant sites; clustering the AAindex1 data set based on selected sites; encoding the selected sites by a representative from each cluster; and modeling antigenic variants by a classifier. The general schema of our pipeline is shown in Figure 1.

Data preparation

Our approach relies on three database types, each of which requires specific preparation in order to be used in the computational pipeline.

Simplified Amino Acid Alphabets. Apart from the standard amino acid alphabet with 20 letters, there are various RAAAs, in which the number of letters is less than 20. Typically, an RAAA is obtained by grouping the 20 amino acids. There are several strategies to perform this, some of which have

been described [29]. For example, the set of 20 amino acids can be divided into three groups based on Van Der Waals volume by setting three ranges (0–2.78, 2.95–4.00, 4.43–8.08), resulting in three partitions: GASCTPD; NVEQIL; and MHKFRYW. This permits new interpretation of the mutation from a different point of view, such as change in hydrophobicity. In total, 40 published RAAAs were collected [8, 29, 38] and are presented in Table 1.

HI Assay Database. Typically, an HI assay database record includes three fields of information: test virus identifier; reference antiserum identifier; and HI titer. Sometimes additional metadata, such as experiment date, may be appended. HI assay results can be presented in four forms: raw HI titer; standardized HI titer; antigenic distance; and antigenic variant. At this point, we only used the antigenic variant obtained via the antigenic distance threshold. We employed Eq. (1) with threshold 4 for calculating the antigenic variant. Duplicated entries were averaged in terms of titer. Therefore, each test/reference virus combination is unique within the database. Here, we considered two subtypes in the influenza vaccine, H1N1 and H3N2. The HI assay database was taken

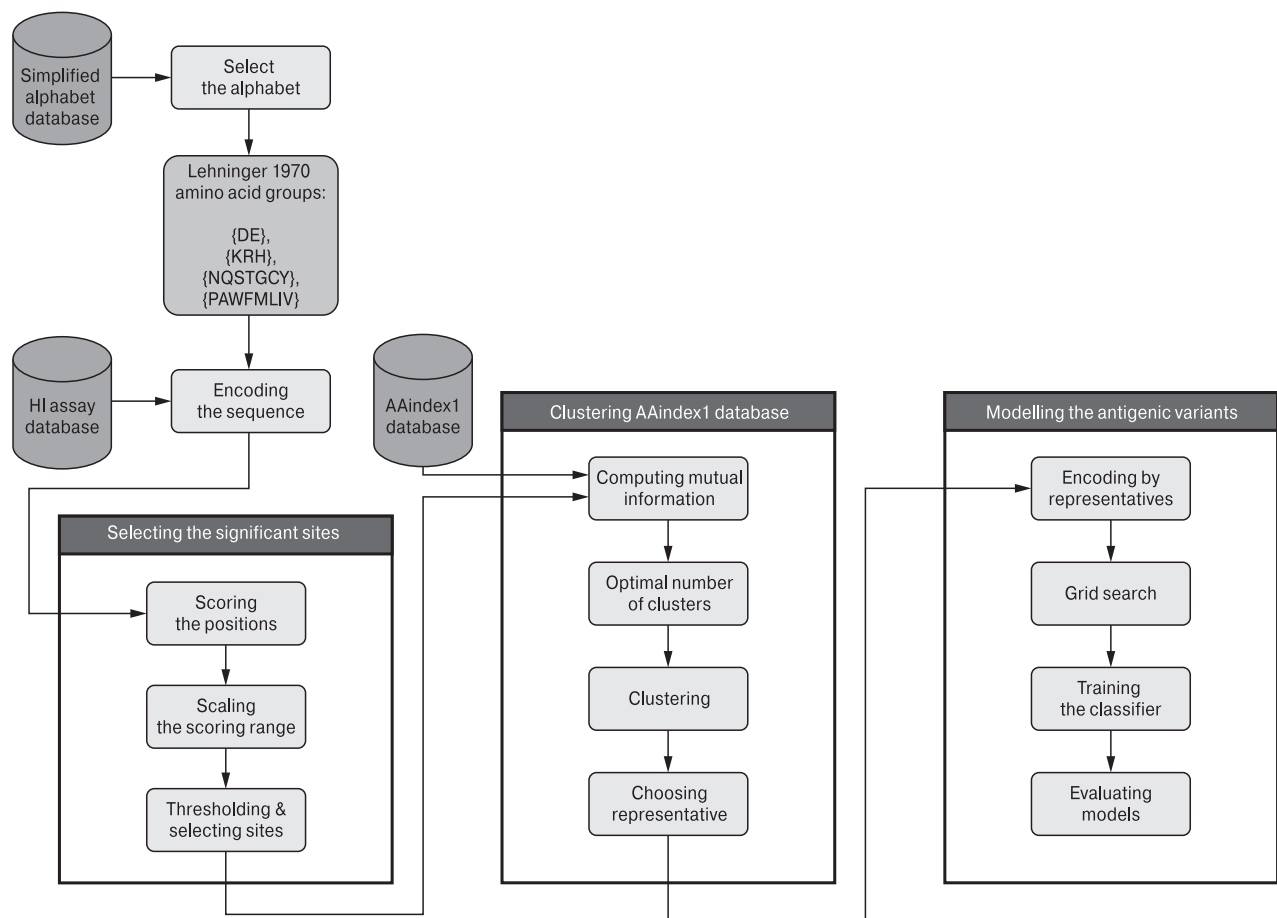


Figure 1. General scheme of the computational pipeline

Comments. Computational pipeline consists of five parts: encoding HA sequences by a reduced amino acid alphabet; selecting significant sites; clustering the AAindex1 database using mutual information of selected sites; encoding the sites by a representative from each cluster; and finally training the classifier.

from references [13, 34]. The final obtained database had 7449 H3N2 and 3747 H1N1 entries. There were 506 viruses for the H1N1 subtype (506 test against 44 references) and 772 for H3N2 (666 test against 130 references).

AAindex1 Database. The latest version of AAindex1, ver. 9.2, consists of 566 entries. A typical database entry includes a vector of 20 numbers, each of which is assigned to a standard amino acid. Since the range of numbers in vectors varies within the data-

base, we individually scaled each vector into the unit interval $[0, 1]$. After removing vectors with missing values, 553 remaining entries were used for analysis.

Encoding of HA sequences

Here, we use RAAAs to take into account the impact of the mutation on antigenic evolution from different physicochemical (amino acid) perspectives. The first step of encoding the sequence by RAAA is selecting an arbitrary amino acid from each group

Table 1. The list of alternative and standard amino acid alphabets employed to encode the protein sequences in our experiments

Name of alphabet	Groups	Method of obtaining the alphabet
Standard	A, C, D, E, Q, F, Y, G, H, I, V, K, R, L, M, N, P, S, T, W	
Hydrophobic	RKEDQN, GASTPHY, CVLIMFW	Amino acid physicochemical attributes
Van Der Waals Volume	GASCTPD, NVEQIL, MHKFRYW	
Polarity	LIFWCMVY, PATGS, HQRKNE	
Polarizability	GASDT, CPNVEQIL, KMHFRYW	
Mahler 1966	DE, KRH, QN, ST, P, CM, WYF, GALIV	
Lehninger 1970	DE, KRH, NQSTGCV, PAWFMLIV	
Dickerson 1983	DENKRQH, STGPACWY, FMLIV	
Taylor 1986	DE, N, KRH, Q, T, SGAC, P, YWF, M, LIV	
Weathers 2004	DENRH, KQST, GPACM, WYFLIV	
SE-B(14)	A, C, D, EQ, FY, G, H, IV, KR, LM, N, P, ST, W	
SE-B(8)	AST, C, DHN, EKQR, FWY, G, ILMV, P	
Risler 1988	D, E, N, KRQ, S, T, G, P, H, A, C, W, YF, ML, IV	
Riddle 1997	DE, NKRQS, THA, GP, CWYFMLIV	
Mirny 1999	DE, KR, NQST, GP, HWYF, ACMLIV	
Prlic SDM12 2000	D, N, EKR, QST, G, P, H, A, C, W, YF, MLIV	
Prlic SDM17 2000	D, EK, N, R, Q, S, T, G, P, H, A, C, W, Y, F, M, LIV	
Melo 2005	DENKRQSTP, GA, H, C, WYFMLIV	
Robson 1976	DKR, EA, GP, STNQ, H, C, WY, FMLIV	
Solis(G) 2000	D, N, S, T, G, P, H, C, Y, EKRQAWFMLIV	Spatial frequency — Protein blocks
Solis(D) 2000	DNS, EKRQ, TH, GP, AM, C, W, F, YL, IV	
Rogov 2001	DNSTA, EKRQ, G, P, H, C, W, M, YFLIV	
Etchebest 2007	DN, EKRQ, SH, TC, G, P, WYF, AML, IV	
Solis GBMR4 2009	DENKRQSTA, G, P, HCWYFMLIV	
Zuo 2009	DN, E, KRQ, SH, T, G, P, A, C, WYF, M, L, IV	
Dayhoff 1978	DENQ, KRH, STGPA, C, WYF, MLIV	
Murphy 2000	DENQ, KR, ST, G, P, H, A, C, WYF, MLIV	
Cannata 2002	D, E, N, KR, Q, ST, G, P, H, A, C, W, Y, F, ML, IV	
Fan 2003	DEQ, KR, STA, G, P, NH, C, WYF, ML, IV	
Li 2003	DE, KRQ, ST, G, P, NH, AC, WYF, ML, IV	
Edgar Se-B 2003	DN, EQ, KR, STA, G, P, HW, C, YF, MLIV	
Edgar Se-V 2003	DEN, KRQ, STA, G, P, H, C, W, YF, MLIV	
Kosiol 2003	DENKRQSTGPHA, C, W, YF, MLIV	
Anderson 2004	D, E, KRQ, NS, T, G, P, H, A, C, WYF, ML, IV	
Lenckowski 2007	DSHFM, ERQL, KPAC, NTWY, GIV	
Crippen 1990	ENRSGHY, DKQTPW, AV, CFMLI	
Maiorov 1992	DENQ, KR, G, P, AV, STHWY, CFMLI	
Thomas 1996	DE, KR, QSTNGPH, C, AWYFMLIV	Spatial frequency — Contact potential
Wang 1999	DE, NKRQS, GP, THA, CWYFMLIV	
Ceiplak 2001	DENRQSTG, K, HA, CWYMV, FLI	
Liu 2002	DE, KR, NQSTGPHY, ACW, FMLIV	

Note. The alphabets are borrowed from [8, 29, 38]. The classification of alphabets is borrowed from [29].

in the alphabet as a group representative. Further, we replace all members of the group with its representative in the protein sequence. This step does not influence data if the standard amino acid alphabet is chosen since this alphabet has 20 groups, not less.

Selection of high impact sites

The model's input is a feature vector produced from encoded relevant sites in the genetic sequence. The model utilizes these sites for reconstructing the relationship between genetic and antigenic evolution in the feature space. Therefore, it is necessary to measure the relevance of site mutations according to the antigenic variation. Cui et al. [6] proposed measurement by introducing the below score for the site's antigenic significance:

$$S_i = |\Phi_i| \times E_i \quad (3)$$

where i is the index of the site in the sequence, S_i is the significance score, and E_i is Shannon's entropy of site i in the whole database as computed by the following formula:

$$E_i = -\sum_{j=1}^{20} P_{i,j} \log P_{i,j} \quad (4)$$

where $P_{i,j}$ is the probability of amino acid j occurrence at position i . Φ_i is a coefficient expressed with the following formula:

$$\Phi_i = \frac{(N_{11} \times N_{00} - N_{10} \times N_{01})}{\sqrt{N_{X1} \times N_{X0} \times N_{1Y} \times N_{0Y}}} \quad (5)$$

where N_{mn} ($m, n \in \{0, 1\}$) is the number of HI entries with $X = m$ and $Y = n$. The variable X represents the occurrence of mutation at site i (0 or 1 for conserved or mutated cases, respectively). The variable Y expresses the antigenic relationship between the test-reference pair of viruses in HI entries. If the test and reference are antigenically similar, the Y variable value is zero. Otherwise, they are variants, and it takes the value of one. $N_{X,n}$ denotes the number of entries with $Y = n$, whereas X can take any value from $\{0, 1\}$. Similarly, $N_{m,Y}$ represents the number of entries with $X = m$, while Y has a value from $\{0, 1\}$. Note that all variables in Eq. (5) are calculated only for site i . In the case of a conserved site, the significance score is set to zero.

The application of Eq. (3) can be extended to sequences encoded by RAAAs. Encoding genetic sequences by such an alphabet notably changes the entropy and Φ values and, accordingly, the significance score. The significance score for all sites obtained by applying a RAAA is further scaled into the unit interval $[0, 1]$. This allows us to compare the significance of a specific site considering different alphabets. The final high-impact sites are determined by setting a threshold on the results of the scaled significance score. The threshold value is selected from

the set $\{0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8\}$. It's worth noting that a site is selected if its scaled significance score is higher than the target threshold. Obviously, decreasing the threshold leads to an increase in the number of selected (high-impact) sites.

Clustering the AAindex1 database

The AAindex1 database is used to perform the second stage of encoding. We select some entries from AAindex1 (called representatives) that are further used to encode the genetic information of obtained selected sites in the previous step. It is known that there is a high correlation between AAindex1 entries. Therefore, we cluster them and choose a representative from each cluster to diminish the number and correlation of final features. Clustering should be performed so that the objects of a cluster have almost the same encoding impact on antigenicity modeling.

Computing Mutual Information. To cluster the AAindex1 database, we create a feature vector for each entry by a similar scenario as described [6] with a modification for RAAAs. In the suggested method, the feature vector characterizes the AAindex1 entry by mutual information (MI). The MI value expresses not only the significance of genetic information but also the impact of encoding for a selected site individually. Note that the size of the feature vector for clustering AAindex1 is the same as the size of selected sites. Indeed, each element of the feature vector is the measure of mutual dependency between the changes in a selected site, encoded by an AAindex1 entry, and antigenic variants within the HI database.

The number of amino acids in the RAAA is less than in the standard alphabet. Thus, a question arises on how encoding is carried out using AAindex1 regarding a RAAA. In order to solve this issue, we define a new database, called pseudo-AAindex1, derived from the original AAindex1 database. The procedure of generating pseudo-AAindex1 is described in Figure 2.

As previously stated, each amino acid group has a representative, which replaces all amino acids of the group in protein sequences. In order to assign a value to the representative, we compute the average of AAindex1 values for the amino acids within the group. This allows each amino acid to participate and have its own effect through the representative. Thus, a pseudo-AAindex1 is created for each RAAA, making it possible to calculate the mutual information in RAAA encoding. For simplicity, we hereafter refer to both the original AAindex1 and the pseudo-AAindex1 simply as AAindex1.

Determining the of optimal number of cluster. When considering an alphabet, we create a feature vector for each AAindex1 entry, the size of which depends on the number of determined high-impact sites. Before clustering AAindex1, it is necessary to determine the optimal number of clusters. Indeed, this

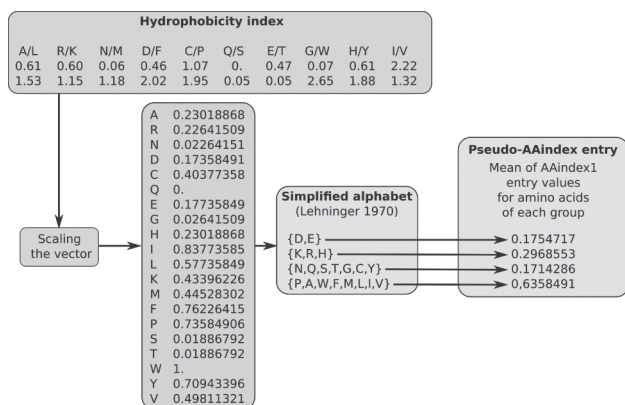


Figure 2. Generation of the pseudo-AAindex1 database from the hydrophobicity index

Note. The pseudo database is created based on the selected RAAA. Note that the value assigned to each group is the average of the group's amino acid values in the scaled AAindex1 vector.

number affects the final feature vector, which is used for antigenic variant modeling. For this purpose, we conduct a comprehensive search for the optimal number by employing three algorithms: K-means; agglomerative clustering with different linkage criteria; and spectral clustering.

First, we determine the number of unique feature vectors. Clustering is not required if the number is less than a threshold (e.g., five). When the number of unique vectors is more than the threshold, we cluster the set of vectors, while the number of clusters starts from two and increases up to ten.

Generally, six clustering variants are applied, including: K-means; agglomerative clustering with four different criteria (ward, average, complete/maximum, and single/minimum); and spectral clustering. The obtained clustering from each algorithm is individually evaluated by four scores, including Silhouette, Calinski-Harabasz, Davies-Bouldin, and the sum of squared distances of objects to their closest cluster. Further, the results are plotted and manually checked to decide the optimal number of clusters for AAindex1 associated with an alphabet.

Clustering. Generally speaking, the aim of clustering is to decrease correlation between AAindex1 entries. This also leads to diminishing the number of features, which are used in the final classification. To cluster the AAindex1 database, we apply the as-

sociated clustering algorithm by which the optimal number of clusters was determined from the previous subsection. Next, we select a representative from each cluster. The representative of a cluster is the closest object to its center. The representative is further employed to encode the information of high-impact sites for the classification.

Classification of antigenic variants

We use the obtained cluster representatives to apply the secondary encoding. This is carried out by replacing an amino acid group representative in the selected sites with its numerical value from the cluster's representative. Then, we individually calculate the differences between the test and the reference strains for each HI assay database entry by subtracting their encoded selected sites (or feature vectors). If we denote the number of high-impact sites and number of clusters representatives with N and M , respectively, then the final feature vector has the size of $N \times M$.

Before performing the final classification, the last step is to determine the best classifier. To decrease the effect of the classifier on the results, we consider five different classifiers, including random forest, multilayer perceptron, logistic regression, support vector, and Gaussian naïve Bayes. Each classifier has its own parameters optimized through grid search (parameter list in Table 2).

Grid search is carried out by cross-validation with different parameter combinations. Note that the Gaussian naïve Bayes classifier has no parameters for grid search, but it assumes that features are independent. Thus, we perform principal component analysis on the feature matrix to decrease the dependency. A threshold on the percentage of variance explained by the selected components was set as a parameter for Gaussian naïve Bayes.

By comparing grid search results, we were able to choose the best classifier with high performance in terms of accuracy. Note that the selection of optimal classifier depends on the results of three procedures:

- Encoding by the alphabet (primary encoding);
- Selection of high-impact sites;
- Clustering the AAindex1 database and choosing representatives for secondary encoding.

Among these procedures, the first has the most decisive influence on classification results. In fact,

Table 2. Parameters used in the grid search

Method	Parameters	Total cases in grid search
Random forest	Criterion, n_estimator, min_samples_split	Fitting 5-fold cross-validation for each of 40 candidates, totaling 200 fits
Logistic regression	Solver, penalty, max_iter	Fitting 5 folds for each of 66 candidates, total 330 fits
Multilayer perceptron	Solver, learning_rate, activation, max_iter, learning_rate_init, hidden_layer_sizes	Fitting 5 folds for each of 648 candidates, total 3240 fits
SVM	Kernel, gamma, C, degree	Fitting 5 folds for each of 24 candidates, total 120 fits
Gaussian naive bayes	PCA_threshold	Fitting 5 fold for each of 3 candidates, total 15 fits

Note. Parameter names are based on the machine learning package Scikit-learn [22].

Table 3. The maximum accuracy was obtained by 10-fold cross-validation using different thresholds for scaled significance score

Subtype \ Threshold	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8
H1N1	0.88	0.88	0.87	0.84	0.77	0.77	0.77
H3N2	0.92	0.92	0.92	0.9	0.88	0.85	0.83

Note. Increasing the threshold may lead to shorter feature vector length and consequent reduced accuracy.

it changes the amino acid space globally, resulting in different representations of genetic variation, as well as different relationships between genotype and phenotype.

Results and discussion

Considering all parameters, we ran 224 147 fits (41 alphabets \times 7 thresholds \times 781 5-fold cross-validations) for each subtype (H3N2 and H1N1) in the experimental data to obtain the best classifiers. Knowing the best classifier for each triple-combination case (subtype, alphabet, threshold), we performed a 10-fold cross-validation by applying its best classifier. A comprehensive report of the results, including the evaluation criteria, is publicly available at: github.com/viroinformatics/Simplified_Alphabets.

The maximum accuracy achieved by each threshold is presented in Table 3. Since the length of the feature vector is decreased by increasing the threshold, this also leads to accuracy reduction. From Table 3, it is observed that threshold 0.4 seems to be a good choice for modeling the antigenic variants. Compared with previous studies [10, 11], our results indicate a high degree of accuracy, especially for H3N2, which suggests potential application in the field of public health.

As expected, some RAAAs achieved the same accuracy as the standard amino acid alphabet. Table 4 presents the alphabets with the highest performance for different thresholds and subtypes. In the case of subtype H1N1 with thresholds 0.3 and 0.5, there are alphabets, the accuracy of which are slightly less (about 0.01) than the standard and Prlic-SDM12–2000 alphabets, but are not added to the table. Since prediction accuracy significantly drops from threshold 0.5 to threshold 0.8 (Table 3), we did not consider their results in Table 4. Interestingly, the Risler-88 and Li-2003 alphabets are observed in the list of each subtype.

Moreover, the Cannata-2002 alphabet seems to be more informative for subtype H3N2 rather than

for H1N1. In some cases, e.g., subtype H1N1 with threshold 0.4 and subtype H3N2 with threshold 0.3, the feature vector obtained from RAAAs is shorter in length than that obtained from the standard alphabet, while their accuracy is the same. This indicates that the amino acid space represented by the standard alphabet has redundant dimensions to express genetic variation of antigenic variants. Next, we briefly discuss each of the alphabets from Table 4.

Stephenson & Freeland analyzed 34 different RAAAs [29] and classified them into five classes based on how grouping was carried out. The classes are chemistry, sequence alignment, structural alignment, contact potential, and protein blocks. Of the alphabets in Table 4, four are based on sequence alignment methods, whereas two rely on structural alignment. Only one alphabet (Zou-2009) was created by protein blocks. The complete classification of RAAAs presented in Table 1 is based on published work [29].

Similarity between amino acids can be defined from various viewpoints, e.g., hydrophobic residues (I, V) and aromatic residues (F, W, Y). The main idea of constructing a RAAA is to use amino acid properties to define similarity, with placing of similar amino acids in a group. For example, the RAAA presented by Li et al. [20] was obtained from amino acid substitutions by scoring similarities that may be beneficial in recognition of protein folds. Their results imply that at least ten amino acid types are required to characterize protein complexity.

Cannata et al. [5] presented a method to produce RAAAs by scoring different amino acid compositions using a branch and bound algorithm and substitution matrix. Their alphabet belongs to the ‘alignment-based methods’ class of sequences. Furthermore, Lenckowski et al. [19] suggested an alphabet generated using a genetic algorithm and strategy based on global sequence alignment. Their results indicate that the proposed alphabet outperformed the standard amino acid set and other RAAAs in the sequence classification task. Andersen and Brunak’s RAAA [1] includes 13 letters; it is also constructed based on se-

Table 4. High performance alphabets in our experiments by virus type and site selection threshold

Threshold	H1N1	H3N2
0.2	Standard, Risler-88, Li-2003, Anderson-2004	Standard, Risler-88, Cannata-2002, Zuo-2009
0.3	Standard*	Standard, Cannata-2002
0.4	Standard, Lenckowski-2007	Standard, Cannata-2002
0.5	Prlic-SDM12–2000*	Risler-88, Li-2003, Zuo-2009

Note. The amino acid groups for each alphabet are presented in Table 1. *There are other alphabets, not listed, whose accuracy was slightly less than the alphabets shown in the table.

quence alignment. In contrast, RAAAs proposed by Prlic et al. [23] and Risler et al. [25] are both derived by substitution frequency of structural alignments.

Zou et al. [42] applied reduced amino acid alphabets to predict defensin family and subfamily. They clustered amino acids by the protein blocks (PBs) method [7, 9], in which the distribution of amino acids in PBs was used to generate clusters of equivalent amino acids with respect to local structure. Indeed, this kind of alphabet can be considered a structural alphabet. Their results indicate that use of such alphabets can improve prediction accuracy with defensin family and subfamily. Surprisingly, no alphabet based on attributes of individual amino acids attained a high level of performance. Taken together, the high-performing RAAAs emphasize the role of structural features in antigenic evolution modeling.

By checking the high-impact sites in the Influenza Research Database (IRD) [40], we found that not only antigenic sites have a significant influence on antigenicity, but also other amino acids located in close proximity. The results indicate that all selected non-antigenic sites are related to immune responses. According to IRD, these have been experimentally determined to be T-cell epitopes, B-cell epitopes, and MHC-binding epitopes of different classes. This highlighted a caveat: In modeling of antigenic evolution, the model should consider not only the genetic information of antigenic sites, but also that of neighboring positions, as they may indirectly impact antigenicity. Note that feature vector construction relies on high-impact sites, but the evo-

lutionary history showed that even one amino acid substitution can change the antigenic cluster of the influenza virus [28]. Such a substitution may present a low impact through the mutual information score. We believe a desirable model must take into account the effects of both high and low impact sites. The visualizations of selected high-impact sites for H1N1 (threshold 0.3), and H3N2 (threshold 0.4), are presented in Figure 3 (see cover III). These are cases with high accuracy and shorter feature vector length.

Various AAindex1 entries were designated as representatives during all experiments with optimized classifiers. The top ten entries and their frequencies are listed in Table 5. The complete list of AAindex1 entries and their frequencies is available (github.com/viroinformatics/Simplified_Alphabets).

It can be seen that the majority of AAindex1 attributes used in model construction are associated with charge properties. This emphasizes that antigenicity notably depends on protein conformation, which cannot be fully reflected in a one-dimensional representation of protein as a sequence. However, the model can capture some attributes information by encoding the genetic sequence using physicochemical properties presented in the AAindex1 database.

Table 5 also indicates that nine out of the ten most frequently AAindex1 entries are common in both subtypes. The last AAindex1 entry in the list of each subtype is different. To better understand the characteristics of entries in Table 5, we computed the Pearson correlation coefficient and visualized it in Figure 4 (see cover III). It is observed that

Table 5. List of the top ten most frequent AAindex1 entries in the experiments with optimized classifiers

ID	Description	Freq.
H1N1		
ANDN920101	alpha-CH chemical shifts (Andersen et al., 1992)	147
CHAM830104	The number of atoms in the side chain labelled 2+1 (Charton-Charton, 1983)	106
KLEP840101	Net charge (Klein et al., 1984)	97
CHAM830103	The number of atoms in the side chain labelled 1+1 (Charton-Charton, 1983)	92
FAUJ880111	Positive charge (Fauchere et al., 1988)	83
CHAM830107	A parameter of charge transfer capability (Charton-Charton, 1983)	83
VENT840101	Bitterness (Venantzi, 1984)	74
FAUJ880112	Negative charge (Fauchere et al., 1988)	70
FAUJ880105	STERIMOL minimum width of the side chain (Fauchere et al., 1988)	47
CHAM830105	The number of atoms in the side chain labelled 3+1 (Charton-Charton, 1983)	38
H3N2		
VENT840101	Bitterness (Venantzi, 1984)	119
CHAM830103	The number of atoms in the side chain labelled 1+1 (Charton-Charton, 1983)	117
FAUJ880111	Positive charge (Fauchere et al., 1988)	101
ANDN920101	alpha-CH chemical shifts (Andersen et al., 1992)	101
KLEP840101	Net charge (Klein et al., 1984)	88
FAUJ880112	Negative charge (Fauchere et al., 1988)	87
CHAM830107	A parameter of charge transfer capability (Charton-Charton, 1983)	66
CHAM830104	The number of atoms in the side chain labelled 2+1 (Charton-Charton, 1983)	60
FAUJ880105	STERIMOL minimum width of the side chain (Fauchere et al., 1988)	59
FAUJ880109	Number of hydrogen bond donors (Fauchere et al., 1988)	58

the majority of entries in Table 5 are not correlated, with two exceptions: FAUJ880111/KLEP840101 and FAUJ880105/CHAM830103.

Although the uncommon entries between H1N1 and H3N2 are different, it can be seen that they are correlated. In addition to the correlation matrix, we used principal component analysis (PCA) to identify the main components of 11 distinct AAindex1 entries in Table 5 and their expression in terms of explained variance. Figure 5 indicates that the first six components describe more than 90% of the explained variance. Seven and nine components represent 95% and 99% of the explained variance, respectively.

We also considered the performance of classifiers for antigenic variant modeling. Among five classifiers, random forest and multilayer perceptron outperformed others, in terms of accuracy, for both the H1N1 and H3N2 subtypes. The Gaussian naive Bayes classifier gave the worst results, so it may not be suitable for this kind of modeling.

In summary, the outstanding ability of our approach is based on redefining the mutation by RAAA and amino acid attributes used for encoding through a two-fold procedure. The primary encoding plays the main role with high priority, whereas secondary encoding has a supplementary role. From one point of view, the primary encoding determines the high-impact sites, while the secondary encoding gives the numerical interpretation to the genetic information of selected sites. From another point of view, the primary encoding interprets the mutation, and the secondary encoding reconstructs the specific relationship between genetic and antigenic differences (for the test and reference strains).

The proposed two-fold encoding approach revealed some aspects of mutations related to the antigenicity. Our findings indicate that encoding associated with structural or charge properties of the protein dramatically impacts the performance of the antigenic model. This is in agreement with recent studies done by other researchers [14, 39]. In addition, RAAA encoding can lead to a smaller feature space dimension, while performance is maintained or improved. So far, this approach was applied only to seasonal human influenza strains. However, there are no theoretical limitations that would prevent further testing as a universal computational model for predicting antigenicity in other influenza subtypes, such as zoonotic H5, H7, H9, or other relevant influenza A subtypes that cause sporadic human infection.

Conclusion

Determining the degree of antigenic similarity between influenza virus strains is crucial in choosing candidate vaccine strains and subsequent timely vaccine production. Currently, the degree is measured via HI assay, a widespread laboratory procedure. Although HI assay is the gold standard method,

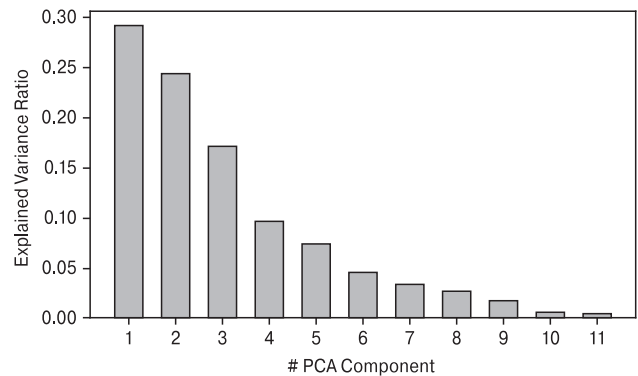


Figure 5. Explained variance ratios for PCA analysis components

Note. Analysis was performed for 11 unique AAindex1 indices from Table 5. The result shows that the first six components represent more than 90% of the explained variance.

it suffers from several shortcomings. Therefore, it has been suggested to employ computer-aided models as auxiliary tools to assess preliminary information about viral antigenicity prior to HI assay.

A notable problem in modeling antigenic evolution is the representation of genetic information to better express the relationship between genetic and antigenic variations. This paper proposes a two-fold encoding approach to genetic information using both a reduced amino acid alphabet (RAAA) and an amino acid index database. By applying a RAAA, we redefine the mutation as changes between amino acid groups of the alphabet, while the output sequence of the primary encoding is still alphabetical. The secondary encoding uses representatives from the AAindex1 database to convert the alphabetical sequence of the primary encoding into the numerical. The experimental results indicate that models built using RAAA encoding are able to achieve the same accuracy as models using the standard amino acid alphabet. The RAAA-based approach, however, features reduced computational complexity and associated cost.

Moreover, the suggested encoding can reveal the amino acid attributes which drive antigenic evolution. In agreement with previous studies, we find that structural and charge characteristics are the most beneficial in modeling antigenic evolution. Although the results obtained by our approach are desirable and promising, they are achieved by taking into account only high-impact sites. It is known that even one substitution can change the antigenic cluster, so we believe that further incorporating the role of low-impact sites into the model may enhance its accuracy and prediction potential; this will be addressed in future studies. Additionally, the model can be improved by: introducing new reduced amino acid alphabets; employing more significant and descriptive criteria for selecting key sites; and incorporating neighboring amino acid effects into the model.

Computational approaches for predicting antigenic properties from genetic sequence are also quite relevant for highly virulent influenza viruses. Laboratory testing of these pathogens requires high biosafety certification levels, and such analysis is not only time-consuming and labor-intensive, but also costly. Unlike current laboratory approaches, computational prediction of antigenic properties from viral sequence has the potential to enable rapid, large-scale antigenic characterization of influenza viruses. It is worth mentioning that application of our ap-

proach is not limited to modeling of antigenic evolution. It can be used in modeling any phenotype that is based on protein sequence, such as interactions with monoclonal antibodies.

Acknowledgments

Our work was performed using the “Uran” supercomputer (IMM UB RAS). The authors would like to thank Edward S. Ramsay for his valuable improvements on the manuscript.

References

- Andersen C.A., Brunak S. Representation of protein-sequence information by amino acid subalphabets. *AI Magazine*, 2004, vol. 25, no. 1, pp. 97–101. doi: 10.1609/aimag.v25i1.1750
- Arinaminpathy N., Grenfell B. Dynamics of glycoprotein charge in the evolutionary history of human influenza. *PLoS One*, 2010, vol. 5, no. 12: e15674. doi: 10.1371/journal.pone.0015674
- Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N., Bourne P.E. The protein data bank. *Nucleic Acids Res.*, 2000, vol. 28, no. 1, pp. 235–242. doi: 10.1093/nar/28.1.235
- Burns A., Van der Mensbrugge D., Timmer H. Evaluating the economic consequences of avian influenza. *World Bank Washington, DC*, 2006. 6 p.
- Cannata N., Toppo S., Romualdi C., Valle G. Simplifying amino acid alphabets by means of a branch and bound algorithm and substitution matrices. *Bioinformatics*, 2002, vol. 18, no. 8, pp. 1102–1108. doi: 10.1093/bioinformatics/18.8.1102
- Cui H., Wei X., Huang Y., Hu B., Fang Y., Wang J. Using multiple linear regression and physicochemical changes of amino acid mutations to predict antigenic variants of influenza A/H3N2 viruses. *Biomed Mater. Eng.*, 2014, vol. 24, no. 6, pp. 3729–3735. doi: 10.3233/BME-141201
- De Brevern A.G. New assessment of a structural alphabet. *In Silico Biol.*, 2005, vol. 5, no. 3, pp. 283–289.
- Edgar R.C. Local homology recognition and distance measures in linear time using compressed amino acid alphabets. *Nucleic Acids Res.*, 2004, vol. 32, no. 1, pp. 380–385. doi: 10.1093/nar/gkh180
- Etchebest C., Benros C., Bornot A., Camproux A.C., De Brevern A.G. A reduced amino acid alphabet for understanding and designing protein adaptation to mutation. *Eur. Biophys. J.*, 2007, vol. 36, no. 8, pp. 1059–1069. doi: 10.1007/s00249-007-0188-5
- Forghani M., Khachay M. Convolutional neural network based approach to in silico non-anticipating prediction of antigenic distance for influenza virus. *Viruses*, 2020, vol. 12, no. 9: 1019. doi: 10.3390/v12091019
- Forghani M., Khachay M., AlyanNezhadi M.M. The impact of amino acid encoding on the prediction of antigenic variants. In: 2020 6th Iranian Conference on Signal Processing and Intelligent Systems (ICSPIS), pp. 1–5, 2020. doi: 10.1109/ICSPIS51611.2020.9349560
- Gamblin S.J., Haire L.F., Russell R.J., Stevens D.J., Xiao B., Ha Y., Vasisht N., Steinhauer D.A., Daniels R.S., Elliot A., Wiley D.C., Skehel J.J. The structure and receptor binding properties of the 1918 influenza hemagglutinin. *Science*, 2004, vol. 303, no. 5665, pp. 1838–1842. doi: 10.1126/science.1093155
- Gregory V., Harvey W., Daniels R.S., Reeve R., Whittaker L., Halai C., Douglas A., Gonsalves R., Skehel J.J., Hay A.J., McCauley J.W., Haydon D. Human former seasonal Influenza A (H1N1) haemagglutination inhibition data 1977–2009 from the WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Influenza, London, UK. *University of Glasgow*, 2016. doi: 10.5525/gla.researchdata.289
- Huang Z.Z., Yu L., Huang P., Liang L.J., Guo Q. Charged amino acid variability related to N-glycosylation and epitopes in A/H3N2 influenza: hem-agglutinin and neuraminidase. *PLoS One*, 2017, vol. 12, no. 7: e0178231. doi: 10.1371/journal.pone.0178231
- Kawashima S., Pokarowski P., Pokarowska M., Kolinski A., Katayama T., Kanehisa M. AAindex: amino acid index database, progress report 2008. *Nucleic Acids Res.*, 2007, vol. 36, suppl. 1, pp. D202–D205. doi: 10.1093/nar/gkm998
- Klingen T.R., Reimering S., Guzmán C.A., McHardy A.C. In silico vaccine strain prediction for human influenza viruses. *Trends Microbiol.*, 2018, vol. 26, no. 2, pp. 119–131. doi: 10.1016/j.tim.2017.09.001
- Kobayashi Y., Suzuki Y. Compensatory evolution of net-charge in influenza A virus hemagglutinin. *PLoS One*, 2012, vol. 7, no. 7: E40422. doi: 10.1371/journal.pone.0040422
- Lee M.S., Chen J.S.E. Predicting antigenic variants of influenza A/H3N2 viruses. *Emerg. Infect. Dis.*, 2004, vol. 10, no. 8, pp. 1385–1390. doi: 10.3201/eid1008.040107
- Lenckowski J., Walczak K. Simplifying amino acid alphabets using a genetic algorithm and sequence alignment. In: *European Conference on Evolutionary Computation, Machine Learning and Data Mining in Bioinformatics*, 2007, pp. 122–131. doi: 10.1007/978-3-540-71783-6_12
- Li T., Fan K., Wang J., Wang W. Reduction of protein sequence complexity by residue grouping. *Protein Eng.*, 2003, vol. 16, no. 5, pp. 323–330. doi: 10.1093/protein/gzg044
- Nanni L., Lumini A. A genetic approach for building different alphabets for peptide and protein classification. *BMC Bioinformatics*, 2008, vol. 9, no. 1, pp. 1–10. doi: 10.1186/1471-2105-9-45
- Pedregosa F., Varoquaux G., Gramfort A., Michel V., Thirion B., Grisel O., Blondel M., Prettenhofer P., Weiss R., Dubourg V., Vanderplas J., Passos A., Cournapeau D., Brucher M., Perrot M., Duchesnay É. Scikit-learn: machine learning in Python. *J. Mach. Learn. Res.*, 2011, vol. 12, pp. 2825–2830.
- Prlić A., Domingues F.S., Sippl M.J. Structure-derived substitution matrices for alignment of distantly related sequences. *Protein Eng.*, 2000, vol. 13, no. 8, pp. 545–550. doi: 10.1093/protein/13.8.545

24. Qiu J., Qiu T., Yang Y., Wu D., Cao Z. Incorporating structure context of HA protein to improve antigenicity calculation for influenza virus A/H3N2. *Sci. Rep.*, 2016, vol. 6, no. 1, pp. 1–9. doi: 10.1038/srep31156
25. Risler J.L., Delorme M.O., Delacroix H., Henaut A. Amino acid substitutions in structurally related proteins a pattern recognition approach: determination of a new and efficient scoring matrix. *J. Mol. Biol.*, 1988, vol. 204, no. 4, pp. 1019–1029. doi: 10.1016/0022-2836(88)90058-7
26. Schrödinger L.L.C. The PyMOL molecular graphics system, version 1.8, 2015.
27. Smith D.J., Forrest S., Ackley D.H., Perelson A.S. Variable efficacy of repeated annual influenza vaccination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, vol. 96, no. 24, pp. 14001–14006. doi: 10.1073/pnas.96.24.14001
28. Smith D.J., Lapedes A.S., De Jong J.C., Bestebroer T.M., Rimmelzwaan G.F., Osterhaus A.D., Fouchier R.A. Mapping the antigenic and genetic evolution of influenza virus. *Science*, 2004, vol. 305, no. 5682, pp. 371–376. doi: 10.1126/science.1097211
29. Stephenson J.D., Freeland S.J. Unearthing the root of amino acid similarity. *J. Mol. Evol.*, 2013, vol. 77, no. 4, pp. 159–169. doi: 10.1007/s00239-013-9565-0
30. Su S., Fu X., Li G., Kerlin F., Veit M. Novel influenza D virus: epidemiology, pathology, evolution and biological characteristics. *Virulence*, 2017, vol. 8, no. 8, pp. 1580–1591. doi: 10.1080/21505594.2017.1365216
31. Sylte M.J., Suarez D.L. Influenza neuraminidase as a vaccine antigen. In: Vaccines for Pandemic Influenza. Current Topics in Microbiology and Immunology. Eds.: R. Compans, W. Orenstein. Vol. 333. Berlin, Heidelberg: Springer, 2009, pp. 227–241. doi: 10.1007/978-3-540-92165-3_12
32. Tomii K., Kanehisa M. Analysis of amino acid indices and mutation matrices for sequence comparison and structure prediction of proteins. *Protein Eng.*, 1996, vol. 9, no. 1, pp. 27–36. doi: 10.1093/protein/9.1.27
33. Tzarum N., de Vries R.P., Peng W., Thompson A.J., Bouwman K.M., McBride R., Yu W., Zhu X., Verheije M.H., Paulson J.C., Wilson I.A. The 150-loop restricts the host specificity of human H10N8 influenza virus. *Cell Rep.*, 2017, vol. 19, no. 2, pp. 235–245. doi: 10.1016/j.celrep.2017.03.054
34. Wang P., Zhu W., Liao B., Cai L., Peng L., Yang J. Predicting influenza antigenicity by matrix completion with antigen and anti-serum similarity. *Front. Microbiol.*, 2018, vol. 9: 2500. doi: 10.3389/fmicb.2018.02500
35. Wikramaratna P.S., Sandeman M., Recker M., Gupta S. The antigenic evolution of influenza: drift or thrift? *Philos Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 2013, vol. 368, no. 1614: 20120200. doi: 10.1098/rstb.2012.0200
36. World Health Organization. Influenza fact sheet: Overview = Aide-mémoire sur la grippe: Généralités. *Weekly Epidemiological Record = Relevé épidémiologique hebdomadaire*, 2003, vol. 78, no. 11, pp. 77–80.
37. Yang H., Carney P.J., Chang J.C., Guo Z., Villanueva J.M., Stevens J. Structure and receptor binding preferences of recombinant human A (H3N2) virus hemagglutinins. *Virology*, 2015, vol. 477, pp. 18–31. doi: 10.1016/j.virol.2014.12.024
38. Yang X.Y., Shi X.H., Meng X., Li X.L., Lin K., Qian Z.L., Feng K.Y., Kong X.Y., Cai Y.D. Classification of transcription factors using protein primary structure. *Protein Pept. Lett.*, 2010, vol. 17, no. 7, pp. 899–908. doi: 10.2174/092986610791306670
39. Yao Y., Li X., Liao B., Huang L., He P., Wang F., Yang J., Sun H., Zhao Y., Yang J. Predicting influenza antigenicity from Hemagglutinin sequence data based on a joint random forest method. *Sci. Rep.*, 2017, vol. 7, no. 1, pp. 1–10. doi: 10.1038/s41598-017-01699-z
40. Zhang Y., Aevermann B.D., Anderson T.K., Burke D.F., Dauphin G., Gu Z., He S., Kumar S., Larsen C.N., Lee A.J., Li X., Macken C., Mahaffey C., Pickett B.E., Reardon B., Smith T., Stewart L., Suloway C., Sun G., Tong L., Vincent A.L., Walters B., Zaremba S., Zhao H., Zhou L., Zmasek C., Klem E.B., Scheuermann R.H. Influenza Research Database: an integrated bioinformatics resource for influenza virus research. *Nucleic Acids Res.*, 2017, vol. 45, no. D1, pp. D466–D474. doi: 10.1093/nar/gkw857
41. Zhang Z.H., Wang Z.H., Zhang Z.R., Wang Y.X. A novel method for apoptosis protein subcellular localization prediction combining encoding based on grouped weight and support vector machine. *FEBS Lett.*, 2006, vol. 580, no. 26, pp. 6169–6174. doi: 10.1016/j.febslet.2006.10.017
42. Zuo Y.C., Li Q.Z. Using reduced amino acid composition to predict defensin family and subfamily: integrating similarity measure and structural alphabet. *Peptides*, 2009, vol. 30, no. 10, pp. 1788–1793. doi: 10.1016/j.peptides.2009.06.032

Авторы:

Форгани М., к.ф.-м.наук, научный сотрудник ФГБУН Институт математики и механики им. Н.Н. Красовского Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия;
Фирстков А.Л., математик первой категории ФГБУН Институт математики и механики им. Н.Н. Красовского Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия;
Аляннеджади М.М., к.комп.н. (специальность: искусственный интеллект), доцент, научный сотрудник и преподаватель Университета науки и технологии Мазандарана, г. Бехшехр, Иран;
Даниленко Д.М., к.б.н., зам. директора по научной работе, руководитель отдела этиологии и эпидемиологии, ФГБУ Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава РФ, Санкт-Петербург, Россия;
Комиссаров А.Б., зав. лабораторией молекулярной вирусологии, ФГБУ Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава РФ, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Forghani M., PhD (Physics and Mathematics), Researcher, N.N. Krasovskii Institute of Mathematics and Mechanics, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation;
Firstkov A.L., Mathematician of the First Category, N.N. Krasovskii Institute of Mathematics and Mechanics, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation;
Alyannezhadi M.M., Doctor in Computer Science (Specialty: Artificial Intelligence), Associate Professor, Researcher and Lecturer, University of Science and Technology of Mazandaran, Behshahr, Iran;
Danilenko D.M., PhD (Biology), Deputy Director for Scientific Work, Head of the Department of Etiology and Epidemiology, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation;
Komissarov A.B., Head of the Laboratory of Molecular Virology, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 31.05.2022
 Принята к печати 06.08.2022

Received 31.05.2022
 Accepted 06.08.2022

EVALUATION OF THE EFFECTS IN THE *IN VITRO* SYSTEM OF SYNTHETIC THYMIC HEXAPEPTIDE ON THE EXPRESSION LEVELS OF NF- κ B, IFN α / β R AND CD119 NEUTROPHILIC GRANULOCYTES IN PATIENTS WITH CHRONIC HERPES VIRAL CO-INFECTIONS

I.V. Nesterova^{a,c}, E.O. Khalturina^b, V.N. Nelyubin^d, S.V. Khaidukov^e, G.A. Chudilova^c

^a The Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

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

^c Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

^d Moscow State University of Medicine and Dentistry Moscow, Russian Federation

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

Abstract. *Background.* Strategies used by herpes viruses with human cells are complex and multifaceted. On one hand, inborn defects in antiviral immune defense have been unveiled, which also affect interferon (IFN) system underlying development of chronic recalcitrant relapsing viral infections such as remittent respiratory viral infections, herpesvirus infections, and papillomavirus infections. On the other hand, numerous viruses are able to damage both immune system and IFN network. During inborn and acquired defects in IFN network, inborn or induced mutation in gene products involved in signaling cascades aimed at upregulating gene expression responsible for IFN production are observed. One of the strategies used by diverse viruses is altering some signaling pathways resulting in activated transcription factors including nuclear factor NF- κ B. However, antiviral mechanisms executed by neutrophilic granulocytes (NGs), particularly affecting NF- κ B expression have not been elucidated. Aim of the study: to study *in vitro* features of NF- κ B expression and number of neutrophilic granulocytes (NG) expressing membrane IFN α / β R and IFN γ R in patients with atypical chronic active herpes virus infections (AChA-HVI), followed by assessing an effect of arginyl-alpha-aspartyl-lysyl-valyl-tyrosyl-arginine — hexapeptide (HP), a synthetic analogue of the active center of the thymopoietin (active substance of drug “Imunofan”, Russia), on the expression of NG NF- κ B and IFN α / β R and IFN γ R. *Materials and methods.* We observed 25 patients of both sexes aged 23 to 64 years with AChA-HVI, manifested by chronic fatigue syndrome and cognitive disorders. Study design: stage 1 — clinical, ELISA, PCR methods, FC was used. Stage 2 — the *in vitro* experiment: 32 blood samples from 8 healthy adults and 375 blood samples from 25 patients with AChA-HVI were analyzed: % NG expressing NF- κ B, IFN α / β R, IFN γ R and the relevant MFI levels by using FC before and after incubation with HP. *Results.* Our study demonstrated low level (MFI) of NF- κ B expression in 100% NG associated with decreased % of NG expressing IFN α / β R and IFN γ R in all patients with AChA-HVI and low serum level for IFN α and IFN γ in comparison with healthy individuals. In the *in vitro* experiment there was shown that 100% of NG expressed NF- κ B after exposure to HP.

Адрес для переписки:

Халтурина Евгения Олеговна
125009, Россия, Москва, ул. Моховая, 11, стр. 10,
ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России.
Тел.: 8 (916) 650-15-14.
E-mail: jane_k@inbox.ru

Contacts:

Evgeniya O. Khalturina
125009, Russian Federation, Moscow, Mohovaya str., 11, bild. 10,
I.M. Sechenov First Moscow State Medical University.
Phone: +7 (916) 650-15-14.
E-mail: jane_k@inbox.ru

Для цитирования:

Нестерова И.В., Халтурина Е.О., Нелюбин В.Н., Хайдуков С.В., Чудилова Г.А. Оценка влияния синтетического тимического гексапептида в системе *in vitro* на уровни экспрессии NF- κ B, IFN α / β R и CD119 нейтрофильных гранулоцитов у пациентов с хроническими герпесвирусными коинфекциями // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 5. С. 850–858. doi: 10.15789/2220-7619-EOT-1928

Citation:

Nesterova I.V., Khalturina E.O., Nelyubin V.N., Khaidukov S.V., Chudilova G.A. Evaluation of the effects in the *in vitro* system of synthetic thymic hexapeptide on the expression levels of NF- κ B, IFN α / β R and CD119 neutrophilic granulocytes in patients with chronic herpes viral co-infections // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 5, pp. 850–858. doi: 10.15789/2220-7619-EOT-1928

However, only 48% patients (SG 2) restored NF- κ B expression level (MFI) to normal range and 52% of cases (SG 1) had no response. HP increased % of NG expressing IFN α / β R in SG 2 and increased % of NG expressing IFN γ R in SG 1. *Conclusions.* It was shown, that influence of HP “*in vitro*” has ambiguous effects on the expression of NF- κ B, % of NG expressing IFN α / β R and IFN γ R in patients with AChA-HVI. We assume that different NF- κ B response to HP is associated with inborn or secondary NF- κ B deficiency.

Key words: herpesvirus infections, interferon system, nuclear factor NF- κ B, neutrophilic granulocytes, transcription factors, hexapeptide.

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ СИНТЕТИЧЕСКОГО ТИМИЧЕСКОГО ГЕКСАПЕПТИДА В СИСТЕМЕ *IN VITRO* НА УРОВНИ ЭКСПРЕССИИ NF- κ B, IFN α / β R И CD119 НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМИ ГЕРПЕСВИРУСНЫМИ КОИНФЕКЦИЯМИ

И.В. Нестерова^{1,3}, Е.О. Халтурина², В.Н. Нелюбин⁴, С.В. Хайдуков⁵, Г.А. Чудилова³

¹ ФГАБОУ ВО Российский университет дружбы народов Министерства образования и науки России, Москва, Россия

² ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

³ ЦНИЛ ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Краснодар, Россия

⁴ ФГБОУ ВО Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова Минздрава России, Москва, Россия

⁵ ФНЦ ФГБУН Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, Россия

Резюме. Стратегии взаимодействия герпесвирусов с клетками организма человека весьма сложны и многогранны. С одной стороны, существуют врожденные дефекты противовирусной иммунной защиты, в том числе и системы интерферонов, на фоне которых развиваются хронические упорно рецидивирующие вирусные инфекции, такие как повторные респираторные вирусные, герпесвирусные, папилломавирусные инфекции. С другой стороны, многие вирусы сами способны повреждать как иммунную систему, так и систему интерферонов. При врожденных и приобретенных дефектах системы интерферонов наблюдается врожденная или индуцированная мутация генов молекул, участвующих в сигналинге, направленном на повышение экспрессии генов, ответственных за синтез IFN. Одной из стратегий вирусов является нарушение ряда клеточных сигнальных путей — факторов транскрипции, в том числе ядерного фактора NF- κ B. В настоящее время описана противовирусная активность НГ. При этом механизмы противовирусной защиты нейтрофильных гранулоцитов (НГ) и в частности особенности экспрессии NF- κ B в доступной нам литературе не освещены. Цель исследования: изучить особенности экспрессии ядерного фактора NF- κ B, мембранных рецепторов к IFN α и IFN γ на НГ у пациентов, страдающих атипичными хроническими активными герпесвирусными инфекциями (АХА-ГВИ), с последующей оценкой в эксперименте *in vitro* эффектов влияния на них синтетического аналога активного центра гормона тимопоэтина аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинин (гексапептид (ГП), Иммунофан, Россия). *Материалы и методы.* Под нашим наблюдением находилось 25 пациентов обоих полов в возрасте от 23 до 64 лет, страдающих АХА-ГВИ, манифестирующими синдромом хронической усталости и различными когнитивными расстройствами. Дизайн исследования: этап 1 включал комплекс традиционных методов (сбор анамнеза, методы физикального обследования, ОАК и пр.), дополнительно для детекции герпес-вирусных инфекций использовались методы серодиагностики (определение IgM VCA EBV, IgG VCA EBV, IgM CMV, IgG CMV IgM HSV1/2, IgG HSV1/2 методом ИФА). Для обнаружения генома вирусов в биоматериалах (кровь, слюна, моча, соскоб с миндалин и задней стенки глотки) был использован метод ПЦР-РВ. Этап 2 — эксперимент *in vitro*: изучено 32 образца крови от 8 условно здоровых человек и 375 образцов крови от 25 пациентов с АХА-ГВИ: определен процент НГ, экспрессирующих NF- κ B, IFN α / β R, IFN γ R и уровни их MFI с помощью проточной цитофлуориметрии до и после инкубации с ГП (гексапептидом). *Результаты.* В результате проведенного исследования у пациентов, страдающих АХА-ГВИ, был выявлен низкий уровень экспрессии (MFI) NF- κ B у 100% НГ, который сочетался со сниженным процентом НГ, экспрессирующих IFN α / β R и IFN γ R, и низким уровнем сывороточных IFN α и IFN γ по сравнению со здоровыми людьми. В эксперименте *in vitro* ГП оказывает неоднозначные вариативные эффекты влияния на экспрессию ядерного фактора NF- κ B и мембранных рецепторов IFN α / β R и IFN γ R НГ пациентов, страдающих АХА-ГВИ. Было показано, что 100% НГ экспрессировали NF- κ B после воздействия ГП. Но только 48% пациентов (ГИ2) восстановили уровень экспрессии NF- κ B (MFI) до нормального значения, а в 52% случаев (ГИ1) динамики не выявлено. В то же время ГП увеличил процент НГ, экспрессирующих IFN α / β R в ГИ2 и увеличил процент НГ, экспрессирующих IFN γ R в ГИ1. *Заключение.* Было показано, что ГП в эксперименте *in vitro* оказывает неоднозначное влияние на экспрессию NF- κ B, процент НГ, экспрессирующих IFN α / β R и IFN γ R у пациентов с АХА-ГВИ. Мы предполагаем, что различный ответ на влияние ГП связан с врожденным или вторичным дефицитом NF- κ B.

Ключевые слова: герпесвирусные инфекции, система интерферона, ядерный фактор NF- κ B, нейтрофильные гранулоциты, факторы транскрипции, гексапептид.

Introduction

Diseases caused by viral agents are one of the most urgent and difficult to solve in the modern medicine. Large DNA-containing enveloped viruses that can interact with various cells of the human body in several ways. Those viruses are causing the development of both acute infections (lytic pathway) and the formation of chronic, often atypical, active forms of infection. Viral genome integrates in different human cells that lead to the persistence of viruses.

Among those viruses, the most interesting is the Herpesviridae family that includes 8 representatives. The Epstein–Barr virus (EBV) is one of the most striking. The viruses of this family are characterized by the formation of both mono- and mixed infections, often with the addition of bacterial, fungal or mixed nature co-infections. The viral interaction strategies with human cells are very complex and multifaceted. On the one hand, there are congenital defects of the antiviral mechanisms of immune defense, including the interferon system [8, 22, 26, 30]. Those innate mistakes of antiviral immune defense lead to the development of recurrent and persistent viral infections, such as repeated respiratory viral infections, chronic herpes viral infections, papilloma-virus infections and so on.

On the other hand, many viruses themselves are capable to damage both the immune system and the interferon system. In both cases of innate or acquired defects of the interferon system, congenital or induced genes' mutation of the molecules involved in signaling pathway is observed. Today well known those genes' mutation: TLR3, interferon-regulating factors 3, 7, interferon receptors, interferon-stimulated genes, NF- κ B, etc. The existing of innate or secondary genes' mutations leads to a violation of the synthesis of IFN type I: IFN α and IFN β . One of the strategies of viruses is to disrupt a number of cellular signaling pathways — transcription factors, especially NF- κ B [2, 4, 11, 16, 25].

Transcription factors (TFs) are a large group of proteins that interact with DNA at specific regulatory regions (loci), which entails changing gene transcription (activation or inhibition) using domains transactivation or trans-repression [10, 40]. TFs are involved in the immunopathogenesis of a wide range of human diseases. The nuclear factor NF- κ B is one of the most important in those protein groups. For the first time in 1986, Sen and Baltimore discovered transcription factors of the NF- κ B family as specific for B cells [27]. Later it was shown, that the constitutive activation of NF- κ B triggers the expression of a huge array of genes associated with the regulation of the immune response, inflammation, including apoptotic resistance, migration and angiogenesis. In this constitutive activation the NF- κ B-sensitive genes TNF, IL-1, IL-6, IL-8 CXC-chemokine ligands are involved [24].

In addition, it is known that the activation of the nuclear factor NF- κ B is the main mechanism that implements the antiviral activity of the innate immunity. This mechanism can be triggered by various signals induced by the microenvironment. They activate cellular receptors and induce intracellular signaling, by activating the genes of molecules involved in signaling.

However, it should be noted that some of these activated genes, in turn, can target NF- κ B. In this case, there is another mechanism. For example, one of the main activated target genes of NF- κ B is I κ B system β , that blocks the activation of NF- κ B [9, 35].

In works Zhang J and Kim JC it was shown experimentally that the HSV-1 UL2 protein and ICP27 can counteract the activation of NF- κ B mediated by tumor necrosis factor α (TNF α) and I κ B α [15, 20, 33, 39]. At the same time, the works of other authors have demonstrated that proteins that are part of the structure of the virion of herpes viruses negatively affect various parts of the NF- κ B signaling cascade [1]. Those proteins can act through other mediators and signaling pathways leading to long-term, active expression of NF- κ B. According to the data, it has been shown that the insertion of EBV into neutrophilic granulocytes (NG) can induce the transition of NG to apoptosis and multidirectionally activate the intracellular signaling pathways, in particular, the cascade of the nuclear factor NF- κ B activation [3]. Currently, the antiviral activity of NG has been described. Upon that, the mechanisms of NG antiviral protection and, in particular, the features of NF- κ B expression are not covered in the literature.

At the same time, there is practically no data in the modern scientific literature on the features of NF- κ B expression in herpes virus co-infections, including atypical chronic active herpes viral co-infections (ACHA-HVI). Taking into account the information given above, there is an urgent need for further studies of an expression features of the nuclear factor NF- κ B NG in patients suffering from ACHA-HVI co-infections

Purpose of the study: to study in the *in vitro* system the features of the expression of nuclear factor NF- κ B and the expression of membrane receptors IFN α / β R and IFN γ (CD119) of neutrophilic granulocytes (NG) in patients suffering from ACHA-HVI, followed by an assessment of the effect of arginyl-alpha-aspartyl-lysyl-valyl-tyrosyl-arginine hexapeptide, a synthetic analogue of the active center of the hormone thymopoietin, on the expression of factor NF- κ B and the expression of membrane receptors IFN α / β R and IFN γ (CD119) of NG.

Materials and methods

We observed 25 patients of both sexes aged 23 to 64 years suffering from atypical chronic active herpes virus infections (ACHA-HVI), manifested by chronic fatigue syndrome and various cognitive disorders

(the main study group is MSG). This group of patients is characterized by a certain symptom complex. To assess the severity of clinical symptoms of CFS, we used a 5-point scale developed by us. The presence or absence of symptoms, depending on the severity of their manifestation, was evaluated in points from 0 to 5, where: 0 points — absence of symptoms; 1 point — minimal symptoms; 2 points — average severity of symptoms; 3 points — severe degree; 4 points — very severe degree; 5 points — critical severe degree. The control group (CG) consisted of 8 practically healthy individuals corresponding to gender and age.

Study design

Stage 1. In the complex of the study, in addition to traditional methods (collection of anamnesis, methods of physical examination, CBC, etc.), serodiagnostic methods were used to detect herpes virus infections (IgM VCA EBV, IgG VCA EBV, IgM CMV, IgG CMV IgM HSV1/2, IgG HSV1/2) using ELISA test systems RPA “Diagnostic Systems” (Russia). To detect the genome of viruses in biomaterials (blood, saliva, urine, scraping from the tonsils and the posterior pharyngeal wall), the PCR method of the “AmpliSens” test system (Russia) was used.

Stage 2. In the *in vitro* system, 32 blood samples from 8 apparently healthy adults and 375 blood samples from 25 patients with AChA-HVI were examined. The amount (%) of peripheral blood NG expressing the nuclear factor NF- κ B, membrane receptors for IFN α / β R, IFN γ (CD119) and the intensity of their expression according to MFI were estimated by flow cytometry using an FC 500 flow cytometer (Beckman Coulter, USA) (value of fluorescence intensity) before and after incubation with hexapeptide (name of the substance according to the nomenclature of international non-proprietary names — INN, ATX code: L03AX).

The study was approved by the Ethics Commission, and informed consent was obtained from all patients to participate in the study and to process personal data in accordance with the World Medical Association’s Declaration of Helsinki (WMA Declaration

of Helsinki — Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013).

For statistical processing of the data obtained, Microsoft Excel computer programs were used. The results were presented as the median (upper and lower quartile) Me [Q₁; Q₃], Mann–Whitney and Wilcoxon tests. The significance of the difference was determined at $p < 0.05$.

Results

When analyzing the clinical material, it was found that all patients of the main study group suffered from mixed AChA-HVI in 100% of cases. The dominant combinations were: EBV + CMV + HHV6 — 52%, EBV + HSV1 — 36%; EBV + CMV — 12% of cases. It is important to note that EBV was the predominant virus found in all patient’s groups. A number of clinical features of mixed AChA-HVI has been identified: a prolonged feeling of severe weakness, chronic fatigue, in addition, patients worried about sweating, intermittent pain in the throat, muscles and joints (fibromyalgia and arthralgia), headaches, low-grade fever, lymphadenopathy, sleep disturbance, decreased memory, attention, intelligence, less often — psychogenic depression. Often patients suffered from virus-associated recurrent ARVI, chronic repeated herpesviral infections (HSV1, HSV2), chronic CMV and HHV6 infections, chronic bacterial and fungal infections. Diseases associated with AChA-HVI were characterized by a recurrent course.

All these symptoms were assessed according to our 5-point scale (Table 1). The severity of symptoms on this scale was Me [Q₁; Q₃] — 44.5 [37.5; 51.5].

The diagnosis of AChA-HVI was confirmed by serodiagnostic methods, molecular genetic methods (PCR); in addition, violations of the induced IFN α production in 100,0% and a deficiency of the induced IFN γ production in 76,0% of cases were found. The patients of the main study group had a pronounced decrease in the induced production of IFN α to 85 [50; 120] ME/ml and IFN γ to 16 [4; 28] ME/ml.

Table 1. Assessment scale of clinical symptom severity for post-viral chronic fatigue syndrome

Symptoms	Score Me [Q ₁ ; Q ₃]
Long term low grade fever	4,0 [3,5; 4,5]
Throat pain and discomfort	4,0 [3,5; 4,5]
Increased sweatiness, sensitivity to cold	3,5 [2,5; 4,5]
Headache, migraine	4,0 [3,5; 4,5]
Regional lymphadenopathy	4,5 [4,0; 5,0]
Increased fatigue, a significant decrease in efficiency	5,0 [5,0; 5,0]
Neurological disorders (paraesthesia, synaesthesia, sensitivity disorders, low muscle tone, etc.)	4,5 [4,0; 5,0]
Decrease in memory processes, difficulty concentrating	3,0 [1,5; 4,5]
Headaches, joint pain, myalgia	3,5 [2,5; 4,5]
Sleep disorders (insomnia or increased drowsiness)	4,0 [3,5; 4,5]
Panic attacks, mood disorders, emotional lability, psychogenic depression etc.	4,5 [4,0; 5,0]
Total Score	44,5 [37,5; 51,5]

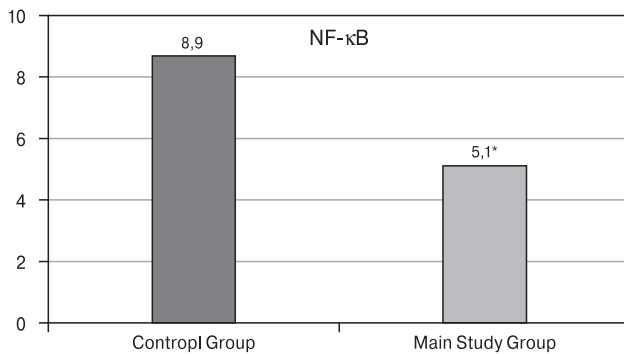


Figure 1. Expression levels of nuclear factor NF-κB in neutrophilic granulocytes of patients suffering from AChA-HVI and in control group (conditionally healthy individuals) according to MFI distribution
Note. *Differences from control group.

Analysis of the data obtained showed that in conditionally healthy individuals (control group), the number of NGs expressing nuclear factor NF-κB was 100%, while MFI, assessing the level of expression of nuclear factor NF-κB, was 8.9 [8.7; 10.1]. In addition, it was shown that in the main study group (MG), as in the control group, 100% of NG expressed the nuclear factor NF-κB. However, in comparison with CG, a significant decrease in the level of expression of NF-κB according to MFI was revealed to 5.1 [4.5; 6.5] ($p < 0.05$) (Fig. 1).

In addition, it was found that in patients of the control group, the number of NGs expressing membrane IFNα/βR was 4.55 [2.3; 7.2]% with MFI 1.19 [1.15; 1.22], and membrane CD119 (IFNγR) — 19.9 [14.3; 27.6]% with MFI 1.48 [1.1; 2.2]. In the main study group (MSG), the number of NGs expressing IFNα/βR was significantly reduced to 1.0 [0.6; 1.9]% ($p < 0.05$) with MFI 1.71 [1.61; 1.91], and the number of NG expressing CD119 (IFNγR) had an insignificant upward trend and amounted to 39.5 [28.7; 48.6]% with MFI 1.48 [1.35; 1.75] (Table 2).

An *in vitro* experiment was carried out in which the effect of HP on the expression of the nuclear factor NF-κB and the number of NGs expressing IFNα/βR and IFNγ was assessed in apparently healthy individuals and patients suffering from AChA-HVI.

It was found that under the influence of a hexapeptide (HP) in the MSG, the population of NG expressing the nuclear factor NF-κB is divided into two subgroups: Study Group 1 (SG 1) and Study Group 2 (SG 2). The levels of NF-κB expression were significantly differ in SG 1 and SG 2. In SG 2 a more high level of MFI NF-κB — 7.5 [6.9; 8.0] was detected than in SG 1, in which the level of MFI NF-κB was only 5.5 [5.4; 5.6] ($p < 0.01$). After HP influence the level of NF-κB NG expression according to MFI was 5.5 [5.4; 7.5] in the SG 1 and did not significantly differ from the decreased level of MFI NF-κB in the MG before HP exposure — MFI 5.1 [4.5; 6.5] ($p < 0.01$). Moreover, the level of MFI NF-κB NG expression in SG 2 increased after HP influence from 5.1 [4.5; 6.5] to 7.5 [6.9; 8.0] ($p < 0.01$). At the same time, it was significantly higher than it was been in SG 1 — 5.5 [5.4; 5.6] ($p < 0.05$) and didn't significantly change from the level of MFI NF-κB in the CG — 8.9 [8.7; 10.1] ($p < 0.05$) (Fig. 2).

Under the influence of hexapeptide (HP), the NG population in the MSG was divided into two groups (SG 1 and SG 2) according to the number of NGs expressing membrane IFNα/βR and IFNγ (CD119) (Fig. 3).

After influence of HP in SG 1 (52% of cases) an insignificant increasing of NG number (%) expressing membrane IFNα/βR from 1.0 [0.6; 1.9] to 1.65 [1.5; 1.8]% was revealed in comparison with the MG ($p > 0.05$). The expression level of surface membrane IFNα/βR NG according MFI did not change in comparison with the MG too ($p > 0.05$). Meanwhile there was a significant increasing in the number of level NG, expressing membrane CD119 (IFNγR) from 39.5 [28.7; 48.6]% to 56.0 [49.6; 58.2]%

Table 2. Comparative characteristics of the expressed nuclear factor NF-κB, membrane IFNα/βR and CD119 (IFNγR) neutrophilic granulocytes in apparently healthy individuals and patients with AChA-HVI

Before the <i>in vitro</i> influence of a hexapeptide						
	CD119 Me [Q ₁ ; Q ₂]		IFNα/βR Me [Q ₁ ; Q ₂]		NF-κB Me [Q ₁ ; Q ₂]	
	%NG	MFI	%NG	MFI	%NG	MFI
Control group n = 6	19,9 [14,3; 27,6]	1,48 [1,1; 2,2]	4,55 [2,3; 7,2]	1,19 [1,15; 1,22]	100	8,9 [8,7; 10,1]
Main study group n = 25	39,5* [28,7; 48,6]	1,48 [1,35; 1,75]	1* [0,6; 1,9]	1,71* [1,61; 1,91]	100	5,1* [4,5; 6,5]
Under the <i>in vitro</i> influence of a hexapeptide						
	CD119		IFNα/βR		NF-κB	
Study group 1 n = 13	56,0*♦ [49,6; 58,2]	1,68 [1,5; 1,9]	1,65* [1,5; 1,8]	1,7 [1,6; 2,0]	100	5,5* [5,4; 5,6]
Study group 2 n = 12	32,3*# [30,2; 48,1]	1,5 [1,3; 1,6]	3,81♦# [3,8; 4,2]	1,7 [1,6; 2,0]	100	7,5*♦# [6,9; 8,0]

Note. *Differences from control group; ♦differences from MSG (main study group); #differences SG 1 and SG 2 (study group 1 and study group 2).

($p < 0.05$) after exposure of HP. This fact indicates that the number NG, expressing membrane CD119 (IFN γ R) was increased by 1.42 times or by 41.7%. The expression level of surface membrane CD119 (IFN γ R) NG according MFI data did not change ($p > 0.05$).

At the same time after exposure of HP an ambiguous effect of HP on the levels of NG expressing membrane IFN α/β R and CD119 (IFN γ R) was revealed in the SG 2 (48% of cases). HP has influenced on the level of NG, expressing membrane IFN α/β R in SG 2, significantly increasing its number from 1.00 [0.6; 1.9]% in MG to 3.81 [3.8; 4.2]% in SG 2 ($p < 0.05$) and reached the NG level of CG ($p > 0.05$). At the same time after influence of HP the expression level according to MFI data of membrane IFN α/β R NG in SG 2 did not change in comparison with group CG and MG ($p_{1,2} > 0.05$).

There was an insignificant decreasing in comparison with MSG in the number of the NG (%), expressing membrane CD119 (IFN γ R) from 39.5 [28.7; 48.6]% to 32.3 [30.2; 48.1]% ($p > 0.05$). Meanwhile there was a significant increasing in the level of NG, expressing membrane CD119 (IFN γ R), from 19.9 [14.3; 27.6]% to 32.3 [30.2; 48.1]%, in comparison with CG ($p > 0.05$). After influence of HP the expression level according to MFI data of membrane CD119 (IFN γ R) NG in SG 2 did not change in comparison with group CG and MSG ($p_{1,2} > 0.05$).

Discussion

The problem of treating patients with chronic active herpes virus infections is still very far from being solved. Taking into account that EBV is present in all identified combinations of herpes-viral co-infections

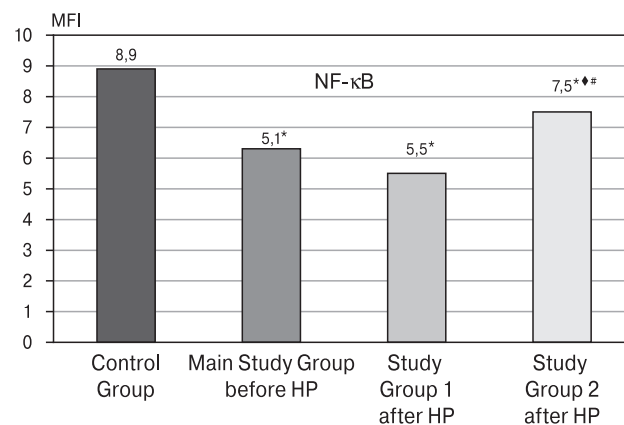


Figure 2 Comparison of the expression levels (MFI) for NF- κ B in neutrophilic granulocytes from patients with AChA-HVI before and after exposure to HP in *in vitro* experimental system

Note. *Differences from control group; #differences from MSG (main study group); #differences SG1 and SG2 (study group 1 and study group 2).

and is the dominant infection in the patients included in this study (AHI). Also it's important to consider its negative effect on the nuclear factor NF- κ B and membrane receptors IFN α/β R NG, CD119 (IFN γ R) expressing by NG.

According to the literature, EBV BGLF2 protein inhibits two key proteins STAT1 and STAT2, which are involved in the stage 2 signaling of type I IFN synthesis. In addition, BGLF2 recruits host cell enzymes to remove the phosphate group from STAT1, thereby inactivating its activity and redirecting STAT2 to degradation. It leads to defective ISG expression and disruption of type I IFN synthesis, and, consequently, to a decrease in IFN type I antiviral and immunomodula-

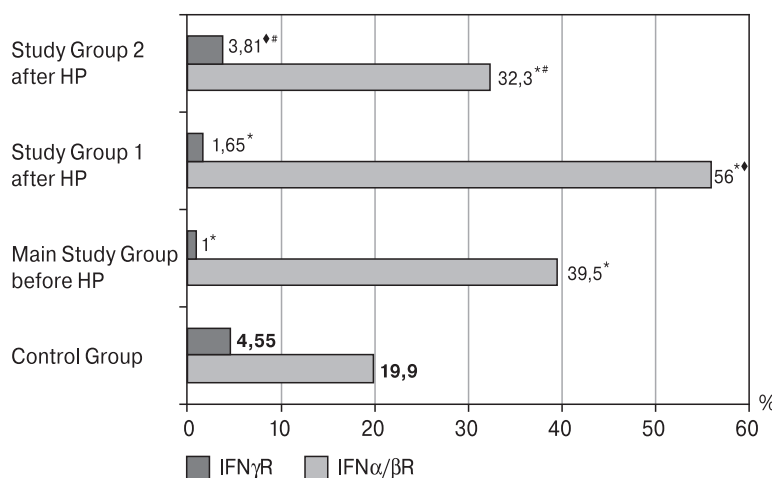


Figure 3. Count of NG expressing membrane receptors IFN α/β R and IFN γ (CD119) before and after HP exposure in patients suffering from AChA-HVI

Note. *Differences from control group; #differences from MSG (main study group); #differences SG1 and SG2 (study group 1 and study group 2).

tory activity [6, 7, 13, 14, 18, 19, 28, 29, 32, 33, 34, 37]. These data confirm the damaging effect of EBV, that causes the occurrence of secondary defects in the expression of not only NF- κ B, but also membrane receptors IFN α / β R NG, and do not contradict the results obtained by us during the present study.

It should be noted that earlier in the works of foreign authors the presence of congenital errors of immunity such as primary immunodeficiencies caused by mutations in the genes STAT1/STAT2, TLR3, UNC93B1, TICAM1, TBK1, IRF3, IRF7, IFNAR1, IFNAR2, which explains the deficiency of spontaneous and induced production of IFN I type was shown [17, 21, 23, 31, 36, 38]. In this regard, the likelihood of congenital disorders of the interferon system in patients with AChA-HVI (SG 1) is not excluded. It is confirmed by the lack of an adequate NF- κ B response to the effect of HP in the *in vitro* system and explains the occurrence of atypical herpes-viral co-infections.

On the other hand, according to our data and according to the literature, autoimmune diseases in parallel with atypical chronic active EBV infection can manifest in patients with a genetic predisposition. There is also evidence that chronic EBV infection can lead to an increase in the expression of the nuclear factor NF- κ B, which, in turn, can provoke the development of autoimmune diseases and tumor processes [5, 12]. It should be emphasized that we did not observe autoimmune disorders and tumor processes in patients of MG. At the same time we noted the leading syndrome of chronic fatigue, myalgia, arthralgia and the syndrome of minor cognitive disorders that did not exclude the presence of neuroinflammatory changes.

In conclusion, we would like to note that the results obtained in this study allow us to clarify the immunopathogenesis of atypical chronic active herpes virus co-infections associated with the prevalence of EBV infection. The data obtained on the positive effect of *in vitro* HP on the restoration of the nuclear factor NF- κ B expression level, as well as the expression of membrane receptors IFN α / β R NG in, presumably, secondary defects of the interferon system, accompanied by deficiency of type I and II IFNs. These results can serve as a basis for further development of the strategy and tactics of immunotherapy with using active substance HP (“Imunofan”, Russia) for restoration of the level of expression of NF- κ B NG with further reconstruction of secondary defects

of interferon system. This immunomodulatory drug based on the active substance HP may be used in future in clinical practice.

Conclusion

The data obtained made it possible to come to the main conclusions:

1. There is a violation of the nuclear factor NF- κ B expression associated with a decrease in the level of number NG expressing membrane receptors IFN α / β R and CD119 (IFN γ R) in all patients suffering from AChA-HVI with the deficiencies of a serum IFN α and IFN γ .

2. In the *in vitro* experiment, HP exhibited different effects of influences on the levels of nuclear factor NF- κ B expression (MFI) and the level of number NG expressing membrane IFN α / β R NG and membrane IFN γ R in patients with AChA-HVI:

– there were a significant restoration of the nuclear factor NF- κ B NG expression to the level of healthy individuals in NG of 48% patients with AChA-HVI (SG 2) and a significant increasing in the level of number NG expressing membrane IFN α / β R, while the level of number NG expressing IFN γ R has not changed;

– in 52% of AChA-HVI (SG 1) patients the level of NF- κ B NG expression and the level of number NG expressing IFN α / β R NG has not significantly changed, while there was a significant increasing in the level of number NG expressing of membrane IFN γ R.

3. Restoration of the expression of NF- κ B NG in 48% patients suffering from AChA-HVI under the influence of HP in the experiment may indicate secondary damage to the expression of NF- κ B that occurred under the damaging influences of herpes viral co-infections. The absence of an effect of HP on the level of expression NF- κ B in 52% patients with AChA-HVI evidences about deeper damages of NF- κ B expression, possibly due to congenital disorders expression of NF- κ B. However these assumptions require carrying out of further research.

4. These results may serve as a basis for further development of the strategy and tactics of immunomodulate therapy with using active substance HP of drug “Imunofan” (Russia) for restoration of secondary defects of expression of NF- κ B, the level of number NG, expressing membrane IFN α / β R, IFN γ R and for the reconstruction of normal functioning of the interferon system in patients with AChA-HVI.

References

1. Amici C., Belardo G., Rossi A., Santoro M.G. Activation of I kappa b kinase by herpes simplex virus type 1. A novel target for anti-herpetic therapy. *J. Biol. Chem.*, 2001, vol. 276, no. 31, pp. 28759–28766.
2. Caselli E., Fiorentini S., Amici C., Di Luca D., Caruso A., Santoro M.G. Human herpesvirus 8 acute infection of endothelial cells induces monocyte chemoattractant protein 1-dependent capillary-like structure formation: role of the IKK/NF- κ B pathway. *Blood*, 2007, vol. 109, no. 7, pp. 2718–2726. doi: 10.1182/blood-2006-03-012500
3. Charostad J., Nakhaie M., Dehghani A., Faghihloo E. The interplay between EBV and KSHV viral products and NF- κ B pathway in oncogenesis. *Infect. Agents Cancer*, 2020, vol. 15: 62. doi: 10.1186/s13027-020-00317-4

4. Chew T., Taylor K.E., Mossman K.L. Innate and adaptive immune responses to herpes simplex virus. *Viruses*, 2009, vol. 1, pp. 979–1002. doi: 10.3390/v1030979
5. De Jesus A.A., Hou Y., Brooks S. Distinct interferon signatures and cytokine patterns define additional systemic autoinflammatory diseases. *J. Clin. Invest.*, 2020, vol. 130, no. 4, pp. 1669–1682. doi: 10.1172/JCI129301
6. De Oliveira D.E., Ballon G., Cesarman E. NF- κ B signaling modulation by EBV and KSHV. *Trends Microbiol.*, 2010, vol. 18, no. 6, pp. 248–257.
7. Dell’Oste V., Gatti D., Giorgio A.G., Gariglio M., Landolfo S., De Andrea M. The interferon-inducible DNA-sensor protein IFI16: a key player in the antiviral response. *New Microbiol.*, 2015, vol. 38, no. 1, pp. 5–20.
8. Ehrlich E.S., Chmura J.C., Smith J.C., Kalu N.N., Hayward G.S. KSHV RTA abolishes NF- κ B responsive gene expression during lytic reactivation by targeting vFLIP for degradation via the proteasome. *PLoS One*, 2014, vol. 9, no. 3: e91359. doi: 10.1371/journal.pone.0091359
9. Gianni T., Leoni V., Campadelli-Fiume G. Type I interferon and NF-kappaB activation elicited by herpes simplex virus gH/gL via alphavbeta3 integrin in epithelial and neuronal cell lines. *J. Virol.*, 2013, vol. 87, no. 24, pp. 13911–13916.
10. Hatada E.N., Krappmann D., Scheidereit C. NF-kappaB and the innate immune response. *Curr. Opin. Immunol.*, 2000, vol. 12, pp. 52–58. doi: 10.1016/S0952-7915(99)00050-3
11. Hiscott J. Convergence of the NF-kappaB and IRF pathways in the regulation of the innate antiviral response. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2007, vol. 18, pp. 483–490.
12. Jiang J., Zhao M., Chang C., Wu H., Lu Q. Type I interferons in the pathogenesis and treatment of autoimmune diseases. *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, 2020, vol. 59, no. 2, pp. 248–272. doi: 10.1007/s12016-020-08798-2
13. Kalamvoki M., Roizman B. HSV-1 degrades, stabilizes, requires, or is stung by STING depending on ICP0, the US3 protein kinase, and cell derivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2014, vol. 111, pp. E611–E617. doi: 10.1073/pnas.1323414111
14. Kawai T., Takahashi K., Sato S., Coban C., Kumar H., Kato H., Ishii K.J., Takeuchi O., Akira S. IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat. Immunol.*, 2005, vol. 6, pp. 981–988. doi: 10.1038/ni1243
15. Kim J.C., Lee S.Y., Kim S.Y., Kim J.K., Kim H.J., Lee H.M., Choi M.S., Min J.S., Kim M.J., Choi H.S., Ahn J.K. HSV-1 ICP27 suppresses NF-kappaB activity by stabilizing IkappaBalpha. *FEBS Lett.*, 2008, vol. 582, no. 16, pp. 2371–2376. doi: 10.1016/j.febslet.2008.05.044
16. Le Negrato G. Viral interference with innate immunity by preventing NF-kappaB activity. *Cell Microbiol.*, 2012, vol. 14, no. 2, pp. 168–181. doi: 10.1111/j.1462-5822.2011.01720.x
17. Lepelley A., Martin-Niclós M.J., Le Bihan M., Mutations in COPA lead to abnormal trafficking of STING to the Golgi and interferon signaling. *J. Exp. Med.*, 2020, vol. 217, no. 11: e20200600. doi: 10.1084/jem.20200600
18. Low-Calle A.M., Prada-Arismendy J., Castellanos J.E. Study of interferon-beta antiviral activity against Herpes simplex virus type 1 in neuron-enriched trigeminal ganglia cultures. *Virus Res.*, 2014, vol. 180, pp. 49–58. doi: 10.1016/j.virusres.2013.12.022
19. Ma F., Li B., Liu S.Y., Iyer S.S., Yu Y., Wu A., Cheng G. Positive feedback regulation of type I IFN production by the IFN-inducible DNA sensor cGAS. *J. Immunol.*, 2015, vol. 194, pp. 1545–1554. doi: 10.4049/jimmunol.1402066
20. Marino-Merlo F., Papaiani E., Frezza C., Pedatella S., De Nisco M., Macchi B., Grelli S., Mastino A. NF- κ B-dependent production of ROS and restriction of HSV-1 infection in U937 monocytic cells. *Viruses*, 2019, vol. 11, no. 5: 428. doi: 10.3390/v11050428
21. Michalska A., Blaszczyk K., Wesoly J., Bluysen A positive feedback amplifier circuit that regulates interferon (IFN)-stimulated gene expression and controls type I and type II IFN responses. *Front. Immunol.*, 2018, vol. 9: 1135. doi: 10.3389/fimmu.2018.01135
22. O’Neill L.A., Bowie A.G. Sensing and signaling in antiviral innate immunity. *Curr. Biol.*, 2010, vol. 20, pp. R328–R333. doi: 10.1016/j.cub.2010.01.044
23. Okada S., Asano T., Moriya K., Boisson-Dupuis S. Human STAT1 gain-of-function heterozygous mutations: chronic mucocutaneous candidiasis and type I interferonopathy. *J. Clin. Immunol.*, 2020, vol. 40, no. 8, pp. 1065–1081. doi: 10.1007/s10875-020-00847-x
24. Poma P. NF- κ B and disease. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, vol. 21, no. 23: 9181. doi: 10.3390/ijms21239181
25. Roizman B., Whitley R.J. An inquiry into the molecular basis of HSV latency and reactivation. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2013, vol. 67, pp. 355–374. doi: 10.1146/annurev-micro-092412-155654
26. Santoro M.G., Rossi A., Amici C. NF-kappaB and virus infection: who controls whom. *EMBO J.*, 2003, vol. 22, pp. 2552–2560.
27. Sen R., Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*, 1986, vol. 46, no. 5, pp. 705–716.
28. Sun L., Wu J., Du F., Chen X., Chen Z.J. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science*, 2013, vol. 339, pp. 786–791. doi: 10.1126/science.1232458
29. Swiecki M., Omattage N.S., Brett T.J. BST-2/tetherin: structural biology, viral antagonism, and immunobiology of a potent host antiviral factor. *Mol. Immunol.*, 2013, vol. 54, pp. 132–139. doi: 10.1016/j.molimm.2012.11.008
30. Unterholzner L. The interferon response to intracellular DNA: why so many receptors? *Immunobiology*, 2013, vol. 218, pp. 1312–1321. doi: 10.1016/j.imbio.2013.07.007
31. Vahed H., Agrawal A., Srivastava R., Prakash S., Coulon P.A., Roy S., BenMohamed L. Unique type I interferon, expansion/survival cytokines, and JAK/STAT gene signatures of multifunctional herpes simplex virus-specific effector memory CD8⁺ TEM cells are associated with asymptomatic herpes in humans. *J. Virol.*, 2019, vol. 93, no. 4: e01882-18. doi: 10.1128/JVI.01882-18
32. Valentine R., Dawson C.W., Hu C., Shah K.M., Owen T.J., Date K.L., Maia S.P., Shao J., Arrand J.R., Young L.S., O’Neil J.D. Epstein–Barr virus-encoded EBNA1 inhibits the canonical NF- κ B pathway in carcinoma cells by inhibiting IKK phosphorylation. *Mol. Cancer*, 2010, vol. 9, no. 1: 1. doi: 10.1186/1476-4598-9-1
33. Van Lint A.L., Murawski M.R., Goodbody R.E., Severa M., Fitzgerald K.A., Finberg R.W., Knipe D.M., Kurt-Jones E.A. Herpes simplex virus immediate-early ICP0 protein inhibits Toll-like receptor 2-dependent inflammatory responses and NF-kappaB signaling. *J. Virol.*, 2010, vol. 84, pp. 10802–10811. doi: 10.1128/JVI.00063-10
34. Wang K., Ni L., Wang S., Zheng C. Herpes simplex virus 1 protein kinase US3 hyperphosphorylates p65/RelA and dampens NF-kappaB activation. *J. Virol.*, 2014, vol. 88, pp. 7941–7951. doi: 10.1128/JVI.03394-13

35. Wei H., Prabhu L., Hartley A.-V., Martin M., Sun E., Jiang G., Liu Y., Lu T. Methylation of NF- κ B and its role in gene regulation. In: Gene expression and regulation in mammalian cells. Transcription from general aspects. Ed. by F. Uchiyama. Ch. 14. 2018, pp. 291–306. doi: 10.5772/intechopen.72552
36. Wu D.X., Fu X.Y., Gong G.Z., Sun K.W., Gong H.Y., Novel HBV mutations and their value in predicting efficacy of conventional interferon. *Hepatobiliary Pancreat Dis. Int.*, 2017, vol. 16, no. 2, pp. 189–196. doi: 10.1016/s1499-3872(16)60184-4
37. Xing J., Ni L., Wang S., Wang K., Lin R., Zheng C. Herpes simplex virus 1-encoded tegument protein VP16 abrogates the production of beta interferon (IFN) by inhibiting NF-kappaB activation and blocking IFN regulatory factor 3 to recruit its coactivator CBP. *J. Virol.*, 2013, vol. 87, pp. 9788–9801. doi: 10.1128/JVI.01440-13
38. Yamashiro L.H., Wilson S.C., Morrison H.M. Interferon-independent STING signaling promotes resistance to HSV-1 in vivo. *Nat. Commun.*, 2020, vol. 11, no. 1: 3382. doi: 10.1038/s41467-020-17156-x
39. Zhang J., Wang S., Wang K., Zheng C. Herpes simplex virus 1 DNA polymerase processivity factor UL42 inhibits TNF-alpha-induced NF-kappaB activation by interacting with p65/RelA and p50/NF-kappaB1. *Med. Microbiol. Immunol.*, 2013, vol. 202, pp. 313–325.
40. Zhang Q., Lenardo M.J., Baltimore D. 30 years of NF- κ B: a blossoming of relevance to human pathobiology. *Cell*, 2017, vol. 168, no. 1–2, pp. 37–57. doi: 10.1016/j.cell.2016.12.012

Авторы:

Нестерова И.В., д.м.н., профессор, профессор кафедры аллергологии и иммунологии ФГАОУ ВО Российский университет дружбы народов МЗ РФ, Москва, Россия;
Халтурина Е.О., к.м.н., доцент, доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии им. А.А. Воробьева ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия;
Нелюбин В.Н., д.м.н., профессор Научно-исследовательского медико-стоматологического института Московского государственного медико-стоматологического университета им. А.И. Евдокимова, Москва, Россия;
Хайдуков С.В., д.б.н., старший научный сотрудник лаборатории углеводов ФНЦ ФГБУН Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия;
Чудилова Г.А., д.б.н., доцент кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики факультета повышения квалификации и профессиональной переподготовки специалистов ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет, г. Краснодар, Россия.

Authors:

Nesterova I.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Allergology and Immunology, Faculty of Continuing Medical Education, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation;
Khalturina E.O., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Microbiology, Virology and Immunology named after A.A. Vorobiev, Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation;
Nelyubin V.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Research Medical and Dental Institute, A.I. Evdokimov Moscow State Medical and Dental University, Moscow, Russian Federation;
Khaidukov S.V., PhD, MD (Biology), Senior Researcher, Carbohydrate Laboratory, Institute of Bioorganic Chemistry named after M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov RAS, Moscow, Russian Federation;
Chudilova G.A., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics, Faculty of Continuing Medical Education, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation.

Поступила в редакцию 16.04.2022
 Принята к печати 03.05.2022

Received 16.04.2022
 Accepted 03.05.2022

PREDICTIVE VALUE OF SPECIFIC CYTOKINES FOR LETHAL COVID-19 OUTCOME

N.A. Arsentieva^a, N.E. Liubimova^a, O.K. Batsunov^{a,b}, Z.R. Korobova^{a,b}, R.N. Kuznetsova^{a,b}, A.A. Rubinstein^b, O.V. Stanevich^b, A.A. Lebedeva^b, E.A. Vorobyov^b, S.V. Vorobyova^b, A.N. Kulikov^b, E.G. Gavrilo^b, D.E. Pevtsov^a, Yu.S. Polushin^b, I.V. Shlyk^b, A.A. Totolian^{a,b}

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

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

Abstract. In our study, we aimed to evaluate the significance of specific cytokines in blood plasma as predictive markers of COVID-associated mortality. *Materials and methods.* In plasma samples of 29 patients with PCR-confirmed COVID-19 we measured the concentrations of 47 molecules. These molecules included: interleukins and selected pro-inflammatory cytokines (IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17A/CTLA8, IL-17-E/IL-25, IL-17F, IL-18, IL-22, IL-27, IFN α 2, IFN γ , TNF α , TNF β /Lymphotoxin- α (LTA)); chemokines (CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , CCL7/MCP-3, CCL11/Eotaxin, CCL22/MDC, CXCL1/GRO α , CXCL8/IL-8, CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CX3CL1/Fractalkine); anti-inflammatory cytokines (IL-1Ra, IL-10); growth factors (EGF, FGF-2/FGF-basic, Flt-3 Ligand, G-CSF, M-CSF, GM-CSF, PDGF-AA, PDGFAB/BB, TGF α , VEGF-A); and sCD40L. We used multiplex analysis based on xMAP technology (Luminex, USA) using Luminex MagPix. As controls, we used plasma samples of 20 healthy individuals. Based on the results, we applied Receiver Operating Characteristic (ROC) analysis and Area Under Curve (AUC) values to compare two different predictive tests and to choose the optimal division point for disease outcome (survivors/non-survivors). To find optimal biomarker combinations, we used cytokines concentrations as dependent variables to grow a regression tree using JMP 16 Software. *Results.* Out of 47 studied cytokines/chemokines/growth factors, we picked four pro-inflammatory cytokines as having high significance in evaluation of COVID-19 outcome: IL-6, IL-8, IL-15, and IL-18. Based on the results received, we assume that the highest significance in terms of predicting the outcome of acute COVID-19 belongs to IL-6 and IL-18. *Conclusion.* Analyzing concentrations of IL-6 and IL-18 before administering treatment may prove valuable in terms of outcome prognosis

Key words: cytokines, decision trees, multiplex analysis, COVID-19, severity, interleukins.

ПРОГНОЗНАЯ ЗНАЧИМОСТЬ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ЦИТОКИНОВ В ОТНОШЕНИИ ЛЕТАЛЬНОГО ИСХОДА COVID-19

Арсентьева Н.А.¹, Любимова Н.Е.¹, Бацунов О.К.^{1,2}, Коробова З.Р.^{1,2}, Кузнецова Р.Н.^{1,2}, Рубинштейн А.А.², Станевич О.В.², Лебедева А.А.², Воробьев Е.А.², Воробьева С.В.², Куликов А.Н.², Гаврилова Е.Г.², Певцов Д.Э.², Полушин Ю.С.², Шлык И.В.², Тотолян А.А.^{1,2}

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

² Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Целью настоящего исследования была оценка значимости специфических цитокинов в плазме крови в качестве прогностических маркеров смертности, связанных с COVID-19. *Материалы и методы.* В образцах

Адрес для переписки:

Коробова Зоя Романовна
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.
Тел.: 8 (921) 400-26-83. E-mail: zoia-korobova@yandex.ru

Contacts:

Zoya R. Korobova
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 (921) 400-26-83. E-mail: zoia-korobova@yandex.ru

Для цитирования:

Арсентьева Н.А., Любимова Н.Е., Бацунов О.К., Коробова З.Р., Кузнецова Р.Н., Рубинштейн А.А., Станевич О.В., Лебедева А.А., Воробьев Е.А., Воробьева С.В., Куликов А.Н., Гаврилова Е.Г., Певцов Д.Э., Полушин Ю.С., Шлык И.В., Тотолян А.А. Прогнозная значимость специфических цитокинов в отношении летального исхода COVID-19 // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 5. С. 859–868. doi: 10.15789/2220-7619-PVO-2043

Citation:

Arsentieva N.A., Liubimova N.E., Batsunov O.K., Korobova Z.R., Kuznetsova R.N., Rubinstein A.A., Stanevich O.V., Lebedeva A.A., Vorobyov E.A., Vorobyova S.V., Kulikov A.N., Gavrilo E.G., Pevtsov D.E., Polushin Yu.S., Shlyk I.V., Totolian A.A. Predictive value of specific cytokines for lethal COVID-19 outcome // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 5, pp. 859–868. doi: 10.15789/2220-7619-PVO-2043

плазмы 29 пациентов с ПЦР-подтвержденным COVID-19 проводилось определение концентрации 47 молекул: интерлейкинов и ряда провоспалительных цитокинов (IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17A/CTLA8, IL-17-E/IL-25, IL-17F, IL-18, IL-22, IL-27, IFN α 2, IFN γ , TNF α , TNF β /лимфотоксин- α (LTA)); хемокинов (CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , CCL7/MCP-3, CCL11/эотаксин, CCL22/MDC, CXCL1/GRO α , CXCL8/IL-8, CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CX-3CL1/фракталкин); противовоспалительных цитокинов (IL-1Ra, IL-10); факторы роста (EGF, FGF-2/FGF-basic, Flt-3 Ligand, G-CSF, M-CSF, GM-CSF, PDGF-AA, PDGFAB/BB, TGF α , VEGF-A); и sCD40L. Для этого использовался мультиплексный анализ на основе технологии xMAP (Luminex, США) с на приборе Luminex MagPix. В качестве контроля использовались образцы плазмы 20 здоровых людей. Результаты исследования оценивались в ходе анализа операционных характеристик приемника (ROC) и значения площади под кривой (AUC) для сравнения двух разных прогностических тестов и выбора оптимальной точки разграничения для исхода заболевания (выжившие/невыжившие). Для поиска оптимальных комбинаций биомаркеров, в качестве зависимых переменных мы использовали концентрации цитокинов для построения дерева регрессии с применением программного обеспечения JMP 16. *Результаты.* Из 47 исследованных цитокинов/хемокинов/факторов роста мы выбрали четыре провоспалительных цитокина, имеющих большое значение для оценки исхода COVID-19: IL-6, IL-8, IL-15 и IL-18. На основании полученных результатов мы предполагаем, что наибольшую значимость с точки зрения прогнозирования исхода острого течения COVID-19 имеют IL-6 и IL-18. *Выводы.* Анализ концентраций IL-6 и IL-18 перед назначением лечения может быть важен с точки зрения оценки прогноза исхода COVID-19.

Ключевые слова: цитокины, деревья решений, мультиплексный анализ, COVID-19, тяжесть, интерлейкины.

Introduction

Novel coronavirus infection, later called COVID-19, started as an outbreak in December, 2019, and by March 2020 it had become a fully-grown pandemic [3]. The causative agent of COVID-19 is highly contagious; this infection's estimated mortality rate is 2%. It is caused by the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), an enveloped, single-stranded RNA-virus of the genus *Betacoronavirus* [8]. Its virions attack target organs and induce local and systemic inflammation [2].

The clinical manifestation of the novel coronavirus can be described as an acute respiratory tract infection, although symptoms may vary drastically in patients: from asymptomatic to critically severe, i.e., acute respiratory distress syndrome (ARDS) pneumonia. ARDS and respiratory failure are the main causes of death in patients with COVID-19 [21].

So far, there is no certain explanation for the different clinical presentations of COVID-19. There are many theories concerning its pathogenesis, but it is evident that the main reason behind the clinical course of the disease is actually the host immune system [2, 23].

There is a lot of data concerning critically ill patients developing a so-called "cytokine storm" featuring pathological hyperinflammatory reactions with heavy cytokine release. Cytokines are regulatory peptides produced by cells of the body; the cytokine system consists of nearly 200 polypeptides. Their uncontrolled release in response to infection is damaging for multiple organs and body systems, including the respiratory tract, which can lead to progression of ARDS. It would seem there is a connection between severity of the disease, viral replication, and "cytokine storm" [28]. Based on that, the goal of our

research was to evaluate the significance of specific cytokines as predictive markers of COVID-associated mortality.

Materials and methods

From May to December 2020, we studied 29 COVID-19 patients in the acute stage of the disease. Based on disease outcome, we divided them into two separate groups: survivors (n = 13), and non-survivors of COVID-19 (n = 16). As a control group, we chose healthy individuals (n = 20). The research was carried out at the Laboratory of Molecular Immunology, Saint Petersburg Pasteur Institute. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Saint Petersburg Pasteur Institute in accordance with the Declaration of Helsinki. All participants were informed of our study and willingly signed consent forms.

All patients were infected with the original Wuhan strain for the first time; no vaccines were available at the time of the study.

Overall, patients represented both sexes (58% male, 42% female), with ages from 31 to 83 (62.1 \pm 12.5). We divided them into: survivors (46% male, 54% female), aged from 31 to 77 (55.8 \pm 13.6); and non-survivors (69% male, 31% female), aged 45 to 83 years. Non-survivors' age median was 65 \pm 16.0, whereas for survivors it was 53 \pm 14.4. All patients were treated at the Pavlov First St. Petersburg State Medical University, a COVID-19 specialized hospital from May to July 2020. They were diagnosed with COVID-19 (U07.1), and the virus was identified via qualitative PCR (detection of SARS-CoV-2 RNA). Blood samples were taken in the acute phase of the disease at the time of admission (5–14 days from the first symptoms without any signs of recov-

ery). At hospital admission, 72.4% of individuals (21 patients) presented with a moderate course of the disease, while 27.6% (8 patients) presented with severe infection. Course of the disease was evaluated by administering doctors based on Russian Ministry of Healthcare guidelines on COVID-19 treatment.

All recovered patients presented moderate disease severity, while patients who did not survive developed either moderate or severe disease courses.

All patients developed typical COVID-induced changes (pneumonia) in lung tissues confirmed by CT-scan performed at the time of admission. Besides that, all of them presented fever, cough, joint and muscle pains, as well as blood oxygen saturation levels below 93 mm Hg and laboratory signs of inflammation such as higher WBC count and higher levels ESR, CRP compared to reference levels for their age and sex. They did not receive any treatment before administration to the hospital besides non-steroid anti-inflammatory drugs (Ibuprofen, Paracetamol, etc.) in small doses against fever and antiviral drugs (Umifenovirum) for 4 days or less. Some of the patients had underlying conditions, but we excluded patients with previous history of cancer, HIV, hepatitis, tuberculosis and lung pathology from the study, as well as chronic diseases in the acute stage.

Blood samples were taken at hospital admission, before initiation of therapy. We chose 20 healthy individuals living in Saint Petersburg as a control group (sex ratio: 35% male, 65% female) aged 25 to 65 years (44.1 ± 10.3). These individuals did not have any inflammatory diseases, nor did they have any apparent chronic illnesses in the acute phase. Their SARS-CoV-2 PCR detection tests were negative, and they did not have specific SARS-CoV-2 IgG plasma antibodies.

Sample preparation. We used peripheral blood as our study material. Blood samples were collected in vacuum tubes with EDTA anticoagulant reagent, followed by centrifugation (350g for 10 minutes). Plasma samples were transferred to cryotubes and frozen at -80°C before multiplex analysis.

Multiplex analysis. We measured the concentrations of 47 molecules in blood plasma: interleukins and selected pro-inflammatory cytokines (IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17A/CTLA8, IL-17-E/IL-25, IL-17F, IL-18, IL-22, IL-27, IFN α 2, IFN γ , TNF α , TNF β /Lymphotoxin- α [LTA]); chemokines (CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , CCL7/MCP-3, CCL11/Eotaxin, CCL22/MDC, CXCL1/GRO α , CXCL8/IL-8, CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CX3CL1/Fractalkine); anti-inflammatory cytokines (IL-1Ra, IL-10); growth factors (EGF, FGF-2/FGF-basic, Flt-3 Ligand, G-CSF, M-CSF, GM-CSF, PDGF-AA, PDGFAB/BB, TGF α , VEGF-A); and sCD40L. The study was conducted with multiplex analysis based on xMAP technology (Luminex, Austin,

USA) with the Milliplex HCYTA-60k-PX48 reagent kit (Billerica, MA, USA) according to manufacturer's instructions. Data analysis was performed in Luminex MAGPIX (Luminex, Austin, USA).

Data analysis and statistics. Statistical analyses were conducted with GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc.) and JMP 16.0 (SAS Institute Inc.). The data we received did not follow a normal distribution, so we used non-parametric statistical analysis methods. Between groups, we applied the Kruskal–Wallis test with Dunn's Multiple Comparison Test. We considered differences significant at $p < 0.05$. Median (Me) and interquartile range (Q_{25} – Q_{75}) were used as descriptive measures of metric data. We used receiver operating characteristic (ROC) analysis and calculated area under curve (AUC) values to compare two different predictive tests and to choose the optimal division point. To find optimal combinations of biomarkers, we used the decision tree building method with JMP 16.0 software.

Method limitations. As biological samples of our study we used plasma samples of patients with COVID-19 and without it. It must be noted that the number of participants in our study is relatively small (29 patients with COVID-19 and 20 controls). This may affect statistical analysis performed in this research. We also used only one detection method to measure cytokine levels in this study, since multiplex analysis technology provides a wider spectrum of possible markers to assess. There is a difference in sex ratio of healthy donors cohort.

Thus, interpretation of results of this study must be interpreted with the limitations listed above.

First, we analyzed the concentrations of 47 cytokines in the blood plasma of patients in the acute phase of COVID-19, relative to disease outcome, survivors and non-survivors (Table 1). In comparison with healthy donor controls, all patients with COVID-19 had elevated levels of: pro-inflammatory cytokines (IL-6, IL-7, IL-15, IL-18, IL-27, TNF α); CC-chemokines (CCL-2/MCP-1, CCL-3/MIP-1 α , CCL7/MCP-3, CCL22/MDC); CXC-chemokines (CXCL8/IL-8, CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10); anti-inflammatory cytokines (IL-1Ra, IL-10); growth factors (FGF-2/FGF-basic, G-CSF); and sCD40L.

Moreover, in those infected who later died due to COVID-19, we noted elevated levels of IL-1 α , CCL4/MIP-1 β , CX3CL1/Fractalkine, M-CSF, and TGF α . Our study shows that IFN α 2 levels are significantly higher in deceased group patients ($p < 0.05$), yet we did not find any differences in IFN γ concentrations between different groups. Analyzing differences in cytokine concentration based on disease outcome, we found 14-fold higher levels of CCL7/MCP-3 in deceased group patients compared to those who recovered ($p < 0.05$).

To identify potential markers of unfavorable COVID-19 outcome amongst 47 studied factors, we built ROC-curves for acute phase patients; these

were divided into two groups based on disease outcome (survivors and non-survivors). We received statistically significant differences for 12 cytokines, as shown in Table 2.

The largest AUC values were found for the following cytokines: IL-6, IL-15, IL-18, and CXCL8/IL-8 (Fig. 2)

ROC analysis results showed little significance when testing separate plasma cytokine levels to predict disease outcome. Instead, we used a decision tree building method for that purpose. Based on the results received, we established that combined detection of IL-18 and IL-6 is more valuable in terms of COVID-19 outcome prediction. For these two cytokines, parameters were: AUC 0.97; sensitivity 94%; and specificity 100%. From this analysis, we received the following threshold values for prediction of COVID-19 outcome: IL-18 — 81.6 pg/ml; and IL-6 — 23.5 pg/ml (Fig. 3).

Discussion

Regulation of the antiviral immune response is conducted by different factors, mainly cytokines and chemokines. In our study of COVID-19 patient plasma, we noticed higher levels of: proinflammatory cytokines (IL-6, IL-7, IL-15, IL-18, IL-27, TNF α); chemokines (CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , CCL7/MCP-3, CCL22/MDC, CXCL8/IL-8, CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10); anti-inflammatory cytokines (IL-1RA, IL-10); growth factors (FGF-2/FGF-basic, G-CSF); and sCD40L. Most of these factors play a role in virus-induced immune responses. Earlier this year, we proved that COVID-19 in the acute phase is followed by significantly higher levels of cytokines (both pro- and anti-inflammatory) in blood plasma [1]. This data further adds to previous findings of other researchers [9, 13, 14]. Age is a highly important factor for COVID-19 outcome,

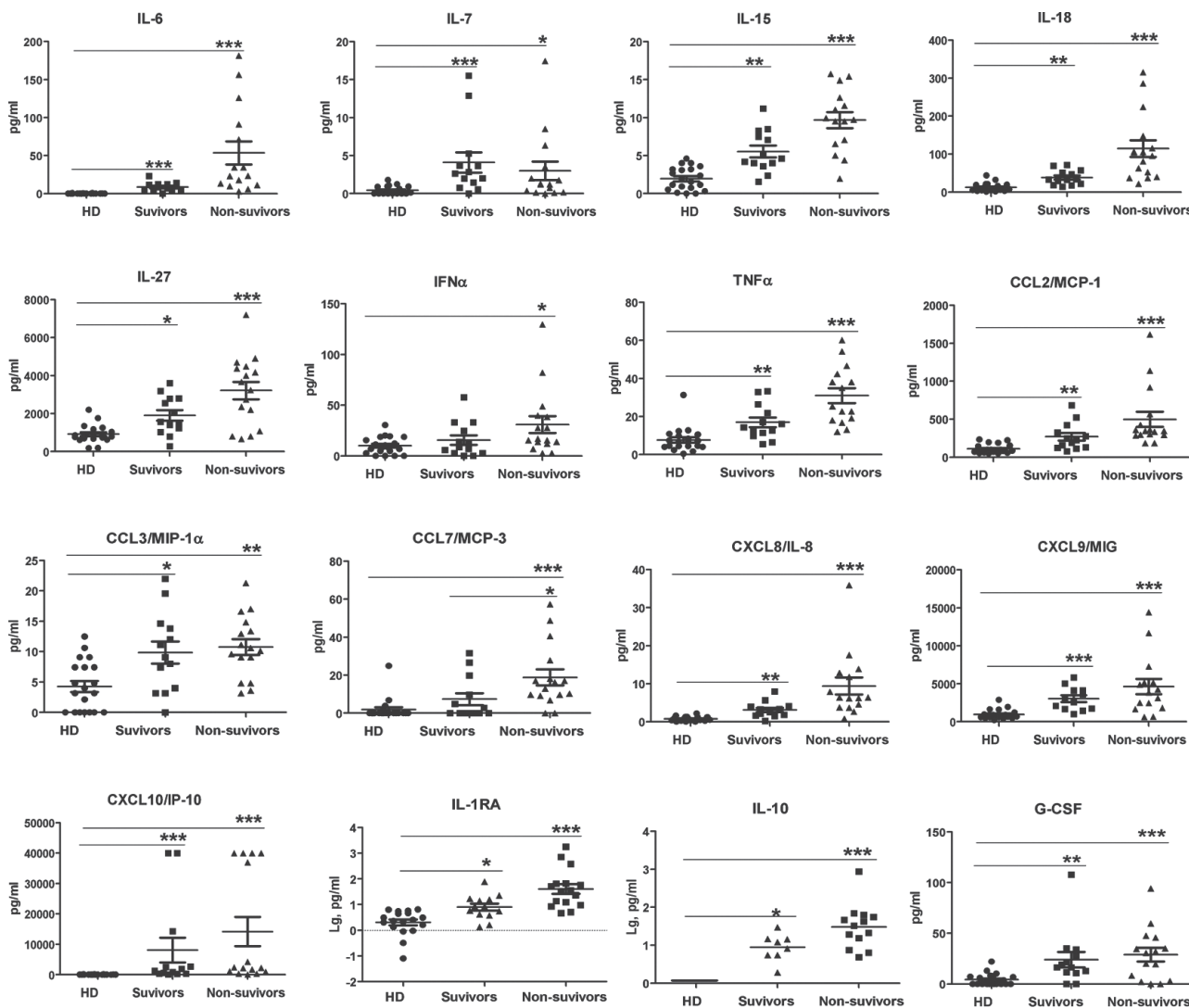


Figure 1. Plasma cytokine levels in patients with acute phase COVID-19 and healthy donors (HD)
 Note. COVID-19 patients are divided into two groups, depending on disease outcome: recovery (survivors), or death (non-survivors).

Table 1. Plasma cytokine concentrations in acute phase COVID-19 patients and healthy donors, Me (Q₂₅–Q₇₅)

Cytokine, pg/ml	Studied groups			p-value		
	Healthy donors (HD, n = 20)	COVID-19 survivors (n = 13)	COVID-19, non-survivors (n = 16)	HD vs non-survivors	HD vs survivors	non- survivors vs survivors
Interleukins and selected proinflammatory cytokines						
IL-1 α	0.87 (0.22–3.923)	1.68 (0–4.705)	4.475 (2.198–5.773)	< 0.05	ns	ns
IL-1 β	0.28 (0–2.798)	0.46 (0–4.925)	2.44 (0.44–5.193)	ns	ns	ns
IL-2	0 (0–0)	0 (0–0.005)	0 (0–0.3475)	ns	ns	ns
IL-3	0 (0–0)	0 (0–0)	0 (0–0)	ns	ns	ns
IL-4	0 (0–0)	0 (0–0.895)	0 (0–0.3625)	ns	ns	ns
IL-5	1.515 (0.905–2.283)	3.21 (1.515–6.31)	1.95 (1.373–4.203)	ns	ns	ns
IL-6	0 (0–0.17)	8.63 (3.55–12.21)	29.11 (11.92–117.3)	< 0.001	< 0.001	ns
IL-7	0.17 (0–0.92)	2.63 (1.1–4.47)	1.275 (0.22–5.653)	< 0.05	< 0.001	ns
IL-9	0 (0–5.32)	0 (0–10.35)	0 (0–3.06)	ns	ns	ns
IL-12 p40	10.56 (4.488–22.14)	15.02 (8.955–25.97)	19.85 (8.275–38.51)	ns	ns	ns
IL-12 p70	0 (0–0.5775)	0 (0–0.185)	0 (0–0.045)	ns	ns	ns
IL-13	6.12 (1.97–10.7)	12.45 (5.125–15.41)	10.26 (3.47–13.83)	ns	ns	ns
IL-15	1.765 (0.5925–3.19)	4.61 (3.795–7.88)	9.8 (6.678–14.34)	< 0.001	< 0.01	ns
IL-17A	0.125 (0–2.1)	0 (0–2.235)	1.4 (0.0625–3.55)	ns	ns	ns
IL-17E/IL-25	173.1 (0–469.4)	146.6 (37.81–335.4)	277.6 (143.2–415.5)	ns	ns	ns
IL-17F	0 (0–0)	0 (0–0)	0 (0–0)	not applicable		
IL-18	8.0 (4.898–19.7)	33.6 (20.15–54.31)	100.3 (43.47–140)	< 0.001	< 0.01	ns
IL-22	0 (0–0)	0 (0–0)	0 (0–0)	not applicable		
IL-27	821.9 (680.2–1141)	1568 (1130–2790)	3453 (1363–4463)	< 0.001	< 0.05	ns
IFN α 2	8.69 (3.258–17.85)	8.69 (2.72–28.93)	16.28 (12.6–39.63)	< 0.05	ns	ns
IFN γ	0 (0–0)	0 (0–21.99)	6.6 (0–35.75)	ns	ns	ns
TNF α	6.55 (4.078–10.29)	14.21 (10.57–24.12)	30.24 (18.3–45.56)	< 0.001	< 0.05	ns
TNF β /Lymphotoxin- α	1.725 (0.5825–3.015)	2.7 (1.12–5.005)	3.25 (1.553–5.12)	ns	ns	ns
CC-chemokines						
CCL2/MCP-1	89.49 (64.15–153.3)	223.4 (129.2–376.3)	346.7 (296.6–534.7)	< 0.001	< 0.05	ns
CCL3/MIP-1 α	3.585 (0–7.43)	9.1 (3.585–14.22)	10.38 (5.875–14.47)	< 0.01	< 0.05	ns
CCL4/MIP-1 β	10.08 (6.433–14.04)	12.15 (8.48–16.78)	19.35 (11.5–32.4)	< 0.05	ns	ns
CCL7/MCP-3	0 (0–0)	0 (0–14.79)	14.56 (9.29–25.48)	< 0.001	ns	< 0.05
CCL11/Eotaxin	31.3 (24.67–52.75)	40.32 (28.4–52.13)	44.59 (23.3–80.22)	ns	ns	ns
CCL22/MDC	557.3 (335.6–625.3)	254.3 (184.4–370.9)	230.7 (132.1–346.1)	< 0.01	< 0.05	ns

Table 1. Plasma cytokine concentrations in acute phase COVID-19 patients and healthy donors, Me (Q₂₅–Q₇₅) (continued)

Cytokine, pg/ml	Studied groups			p-value		
	Healthy donors (HD, n = 20)	COVID-19 survivors (n = 13)	COVID-19, non-survivors (n = 16)	HD vs non-survivors	HD vs survivors	non-survivors vs survivors
CXC-chemokines						
CXCL1/GROα	3.62 (1.208–11.26)	18.11 (9.705–40.96)	21.14 (5.225–24.81)	ns	< 0.05	ns
CXCL8/IL-8	0.655 (0.2875–1.195)	2.64 (1.73–4.04)	6.4 (3.993–13.64)	< 0.001	< 0.01	ns
CXCL9/MIG	710 (593.2–1164)	3165 (1703–4572)	4061 (1987–6741)	< 0.001	< 0.001	ns
CXCL10/IP-10	65.56 (48.53–95.57)	1294 (373.9–8508)	2364 (1022–40 000)	< 0.001	< 0.001	ns
CX3C-chemokines						
CX3CL1/Fractalkine	43.79 (26.08–58.62)	57.04 (26.74–76.45)	96.91 (57.45–114.6)	< 0.001	ns	ns
Anti-inflammatory cytokines						
IL-1RA	2.225 (0.915–4.598)	8.59 (4.02–16.3)	34.67 (10.3–66.61)	< 0.001	< 0.05	ns
IL-10	0 (0–0)	5.52 (0–13.23)	20.21 (5.278 – 53.36)	< 0.001	< 0.05	ns
Growth factors						
EGF	32.57 (5.27–68.8)	94.8 (51.95–152.2)	48.71 (16.5–89.99)	ns	< 0.05	ns
FGF-2/FGF-basic	18.09 (11.01–26.48)	55.35 (23.64–100.8)	38.94 (21.98–77.04)	< 0.05	< 0.01	ns
FLT-3L	8.42 (0.97–15.06)	2.72 (0.425–8.86)	9.08 (6.403–11.14)	ns	ns	ns
G-CSF	0 (0–7.45)	16.4 (11.22–30.94)	31.42 (4.313–47.35)	< 0.001	< 0.01	ns
M-CSF	7.645 (0–38.02)	102.1 (5.28–243.8)	158.5 (113.8–315.5)	< 0.001	ns	ns
GM-CSF	0 (0–0)	0 (0–0)	0 (0–0)	not applicable		
PDGF-AA	1073 (872–2487)	1739 (1220–2501)	1034 (659.7–2488)	ns	ns	ns
PDGF-AB/BB	22 946 (18 269–31 171)	25 599 (21 487–32 255)	23 641 (15 760–29 899)	ns	ns	ns
TGFα	0 (0–0)	0.96 (0–2.275)	2.985 (1.753–6.778)	< 0.001	ns	ns
VEGF-A	37.12 (18.25–102.9)	166.7 (57.85–324.5)	119.3 (30.22–250.9)	ns	< 0.05	ns
Other soluble ligands						
sCD40L	1079 (423.9–1871)	2883 (1281–5589)	3475 (2044–5838)	< 0.01	< 0.05	ns

Table 2. Cytokines showing the most statistically significant concentrations within our study

Cytokine	AUC	p-value	Cut off, pg/ml	Sensitivity, %	Specificity, %
IL-6	0.8389	0.002	12.8	85	75
IL-15	0.8101	0.0047	9.0	92	69
IL-18	0.8606	0.001	51.8	77	75
TNFα	0.8173	0.038	22.3	77	69
CCL2/MCP-1	0.7596	0.018	301.3	69	69
CCL7/MCP-3	0.7452	0.025	5.8	69	87
CXCL8/IL-8	0.8413	0.0018	4.3	85	75
CX3CL1/Fractalkine	0.7525	0.021	73.7	69	69
IL-1Ra	0.7764	0.012	9.1	62	81
IL-10	0.7524	0.021	15.0	92	62
FLT-3L	0.7284	0.037	7.9	77	75
TGFα	0.7500	0.023	2.1	69	69

elderly people are at risk of developing a more severe course of disease [18]. We have also performed analysis of cytokine levels in different cohorts based on the age, and found very little statistically significant difference. We noted elevation of TNF α in all cohorts — HD, survivors and non-survivors in patients above 50 ($p < 0.05$, $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively). Due to that, we excluded TNF α out of decision tree analysis.

However, despite an absence of statistically significant differences, median values for concentrations of specific factors (IL-6, IL-15, IL-18, IL-27, TNF α , CCL2/MCP-1, CXCL8/IL-8, CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, IL-1RA, IL-10, G-CSF, sCD40L) in non-survivors were higher than those in survivors. Moreover, deceased patients showed higher levels of IL-1 α , IFN α 2, CCL4/MIP-1 β , CX3CL1/Fractalkine, M-CSF and TGF α compared to controls, as noted in other reports [17].

Our data suggest activation of cytokine and chemokine systems in response to COVID-19, followed by systemic inflammation. On the other hand, elevation of cytokine concentrations in COVID-19 patient plasma points to development of a ‘cytokine storm’ causing organ damage; this may explain higher cytokine levels in patients who died of COVID. We noted higher levels of MCP-3, the only cytokine between cohorts of survivors and non-survivors showing significant differences between two groups. Based on the data discovered by previous researchers, this cytokine can, in fact, be a predictor for a cytokine

storm by itself [6]. However, we believe that single cytokine levels do not have enough prognostic value, and, therefore, there is a need for multiple factor-based evaluation. Such evaluation of the prognostic potential of cytokines based on disease outcome showed the significance of specific proinflammatory cytokines: IL-6, IL-15, IL-18, and CXCL8/IL-8.

IL-6. The IL-6 cytokine controls immune responses, cellular proliferation, and cellular differentiation. It is produced by different cell types: T-lymphocytes, macrophages, endothelial cells, fibroblasts, and monocytes. IL-6 targets B- and T-cells, basophiles, eosinophiles, and neutrophils. The effects of IL-6 on B-cells are mainly activation of differentiation and secretion of IgM, IgE, and IgA. However, it also controls activation, differentiation and survival of T-cells. This means that, after infection, cytokine storm induces activation and differentiation of T- and B-cells. IL-6 secretion causes antibody production by B-cells and increases auto-antibody formation. It also causes chronic inflammation and T-helper activation, potentially leading to autoimmune processes [22]. Diao et al. states that IL-6 levels correlate with severity of COVID-19. They also note elevation of this cytokine throughout the course of the disease with significantly lower levels after disease resolution, potentially marking depletion of IL-6 production and secretion [10]. In our study, patients with favorable COVID-19 outcomes presented moderate disease courses, while non-survivors, in 50% of cases, had severe infection. There

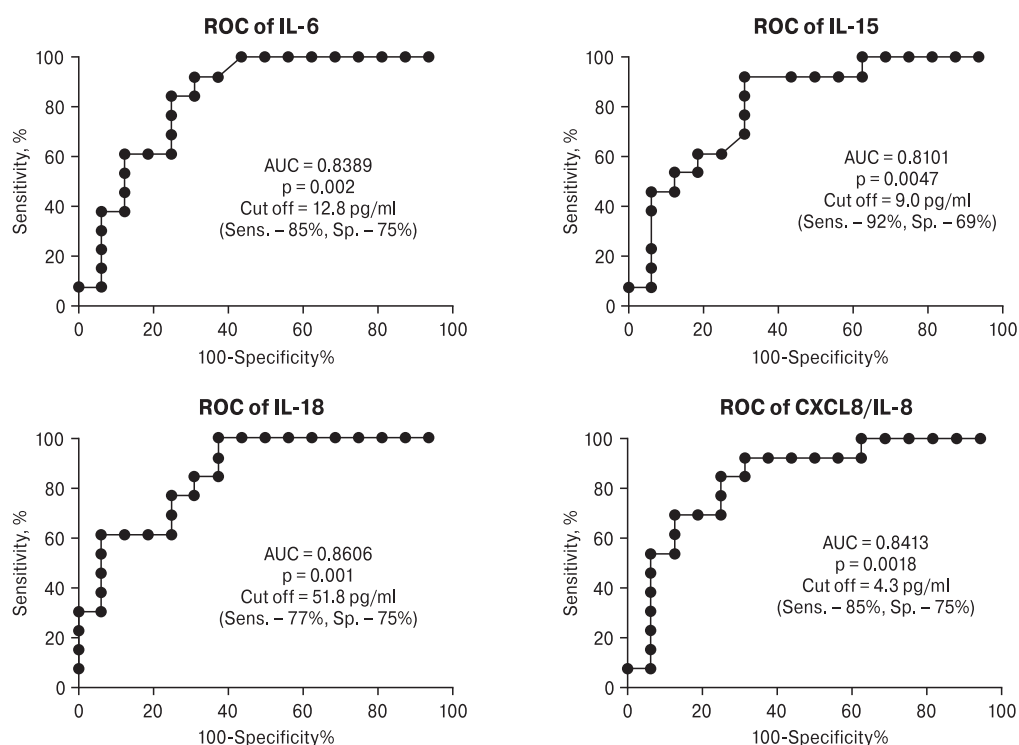


Figure 2. ROCs describing sensitivity and specificity for IL-6, IL-15, IL-18 and CXCL8/IL-8 comparison of patients with acute COVID-19 followed by different disease outcomes (recovery, death)

Note. AUC — area under curve; Sens. — sensitivity; Sp. — specificity.

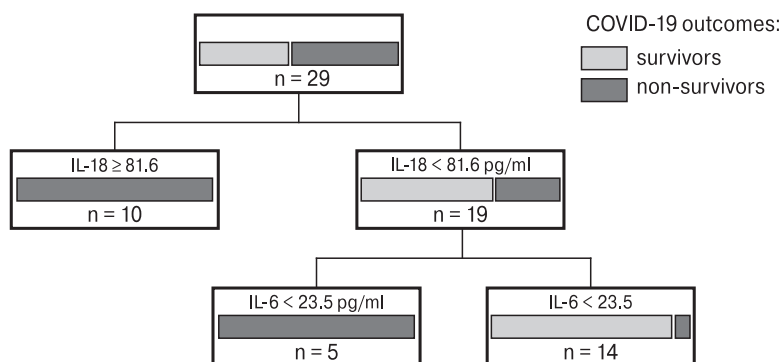


Figure 3. Decisions tree for division of patients with COVID-19 into two groups: survivors and non-survivors

is another study that shows a correlation between higher levels of IL-6 and severity of lung injury [16]. Findings throughout the world have pinpointed high blood plasma concentrations of IL-6 in patients with COVID-19 and suggest administration of anti-IL-6 drugs [19].

IL-15. A study conducted by Angioni R et al. shows the presence of higher IL-15 levels in patients with severe COVID-19 and longer hospital stays. IL-15 may stimulate a rise in NK-cell subpopulations in elderly people compared to youth. On the other hand, long exposure of NK-cells to circulating IL-15 may reduce their cytolytic activity, potentially causing their depletion [4]. There is also a correlation between IL-15 and CXCL8/IL-8 concentrations.

CXCL8. CXCL8 (also called IL-8) is involved in inflammatory responses and attracts immune cells to the inflammatory site of viral infections. CXCL8/IL-8 plays an important role in the initial control of airway infection due to its activity against neutrophils and monocytes [15]. The level of CXCL8/IL-8 in nasal secretions correlates with the severity of symptoms in acute respiratory tract infections [12]. In addition, CXCL8/IL-8 is a chemokine considered to be a potential prognostic biomarker of acute respiratory distress syndrome (ARDS) [11]. Previously, it was found that CXCL8/IL-8 levels are increased in both plasma and bronchoalveolar lavage fluid of ARDS patients [7].

IL-18. IL-18 belongs to the IL-1 cytokine family and plays roles in: innate and adaptive immunity; fibrosis; and hematopoiesis [5]. IL-18 regulates Th1 and Th2 differentiation [20]; it also stimulates naïve T-cells, CD8⁺ and NK cells to proliferate and to produce IFN γ [25]. Further, IL-18 promotes Th1 differentiation and increases NK-cell cytotoxicity by induction of Fas-ligand expression; this leads to destruction of infected cells through Fas-mediated apoptosis [26]. IL-18 can induce cytokine production in Th2, NK, and NKT-cells [27]. This makes IL-18 a unique type of cytokine: one that can stimulate various subpopulations of T and NK-cells. A study conducted by Satış et al. shows higher plasma levels of IL-18 in COVID-19 patients compared to healthy donors; the highest levels were noticed in patients with severe pneumonia. Those authors assert a correlation between disease outcome and IL-18 concentration [24].

Out of 47 studied factors, we found 4 pro-inflammatory cytokines having high significance in evaluation of COVID-19 outcomes: IL-6, CXCL8/IL-8, IL-15, and IL-18. The main significance, in terms of predicting the outcome of acute COVID-19, belongs to IL-6 and IL-18. The AUC value for these two cytokines is 0.97, with 94% sensitivity and 100% specificity. Analyzing concentrations of IL-6 and IL-18 before administering treatment may prove valuable in terms of outcome prognosis.

References

1. Арсентьева Н.А., Любимова Н.Е., Бацунов О.К., Коробова З.Р., Станевич О.В., Лебедева А.А., Воробьев Е.А., Воробьева С.В., Куликов А.Н., Лиознов Д.А., Шарапова М.А., Певцов Д.Э., Тотолян Арег А. Цитокины в плазме крови больных COVID-19 в острой фазе заболевания и фазе полного выздоровления // Медицинская иммунология. 2021. Т. 23, № 2. С. 311–326. [Arsentieva N.A., Liubimova N.E., Batsunov O.K., Korobova Z.R., Stanevich O.V., Lebedeva A.A., Vorobyov E.A., Vorobyova S.V., Kulikov A.N., Lioznov D.A., Sharapova M.A., Pevtsov D.E., Totolian Areg A. Plasma cytokines in patients with COVID-19 during acute phase of the disease and following complete recovery. *Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2021, vol. 23, no. 2, pp. 311–326. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-PCI-2312
2. Смирнов В.С., Тотолян Арег А. Некоторые возможности иммунотерапии при коронавирусной инфекции // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 3. С. 446–458. [Smirnov V.S., Totolian Areg A. Some opportunities for immunotherapy in coronavirus infection. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2020, vol. 10, no. 3, pp. 446–458. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-SPO-1470
3. Angioni R., Sánchez-Rodríguez R., Munari F., Bertoldi N., Arcidiacono D., Cavinato S., Marturano D., Zaramella A., Realdon S., Cattelan A., Viola A., Molon B. Age-severity matched cytokine profiling reveals specific signatures in COVID-19 patients. *Cell. Death Dis.*, 2020, vol. 11, no. 11: 957. doi: 10.1038/s41419-020-03151-z

4. Arend W.P., Palmer G., Gabay C. IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. *Immunol. Rev.*, 2008, vol. 223, pp. 20–38. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00624.x
5. BMJ's Coronavirus (COVID-19) Hub. URL: <https://www.bmj.com/coronavirus> (27.09.2022)
6. Chen L., Wang G., Tan J., Cao Y., Long X., Luo H., Tang Q., Jiang T., Wang W., Zhou J. Scoring cytokine storm by the levels of MCP-3 and IL-8 accurately distinguished COVID-19 patients with high mortality. *Signal Transduct. Target. Ther.*, 2020, vol. 5, no. 1: 292. doi: 10.1038/s41392-020-00433-y
7. Coperchini F., Chiovato L., Croce L., Magri F., Rotondi M. The cytokine storm in COVID-19: An overview of the involvement of the chemokine/chemokine-receptor system. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2016, vol. 53, pp. 25–32. doi: 10.1016/j.cytogfr.2020.05.003
8. Costela-Ruiz V.J., Illescas-Montes R., Puerta-Puerta J.M., Ruiz C., Melguizo-Rodríguez L. SARS-CoV-2 infection: the role of cytokines in COVID-19 disease. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2020, vol. 54, pp. 62–75. doi: 10.1016/j.cytogfr.2020.06.001
9. 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
10. García-Laorden M.I., Lorente J.A., Flores C., Slutsky A.S., Villar J. Biomarkers for the acute respiratory distress syndrome: how to make the diagnosis more precise. *Ann. Transl. Med.*, 2017, vol. 5, no. 14: 283. doi: 10.21037/atm.2017.06.49
11. Henriquez K.M., Hayney M.S., Xie Y., Zhang Z., Barrett B. Association of interleukin-8 and neutrophils with nasal symptom severity during acute respiratory infection. *J. Med. Virol.*, 2015, vol. 87, no. 2, pp. 330–337. doi: 10.1002/jmv.24042
12. Huang C., Wang Y., Li X., Ren L., Zhao J., Hu Y., Zhang L., Fan G., Xu J., Gu X., Cheng Z., Yu T., Xia J., Wei Y., Wu W., Xie X., Yin W., Li H., Liu M., Xiao Y., Gao H., Guo L., Xie J., Wang G., Jiang R., Gao Z., Jin Q., Wang J., Cao B. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*, 2020, vol. 395, no. 10223, pp. 497–506. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5
13. Kox M., Waalders N.J.B., Kooistra E.J., Gerretsen J., Pickkers P. Cytokine levels in critically ill patients with COVID-19 and other conditions. *JAMA*, 2020, vol. 324, no. 15, pp. 1565–1567. doi: 10.1001/jama.2020.17052
14. Küng E., Coward W.R., Neill D.R., Malak H.A., Mühlemann K., Kadioglu A., Hilty M., Hathaway L.J. The pneumococcal polysaccharide capsule and pneumolysin differentially affect CXCL8 and IL-6 release from cells of the upper and lower respiratory tract. *PLoS One*, 2014, vol. 9, no. 3: e92355. doi: 10.1371/journal.pone.0092355
15. Lu R., Zhao X., Li J., Niu P., Yang B., Wu H., Wang W., Song H., Huang B., Zhu N., Bi Y., Ma X., Zhan F., Wang L., Hu T., Zhou H., Hu Z., Zhou W., Zhao L., Chen J., Meng Y., Wang J., Lin Y., Yuan J., Xie Z., Ma J., Liu W.J., Wang D., Xu W., Holmes E.C., Gao G.F., Wu G., Chen W., Shi W., Tan W. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*, 2020, vol. 395, no. 10224, pp. 565–574. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30251-8
16. Lucas C., Wong P., Klein J., Castro T.B.R., Silva J., Sundaram M., Ellingson M.K., Mao T., Oh J.E., Israelow B., Takahashi T., Tokuyama M., Lu P., Venkataraman A., Park A., Mohanty S., Wang H., Wyllie A.L., Vogels C.B.F., Earnest R., Lapidus S., Ott I.M., Moore A.J., Muenker M.C., Fournier J.B., Campbell M., Odio C.D., Casanovas-Massana A.; Yale IMPACT Team, Herbst R., Shaw A.C., Medzhitov R., Schulz W.L., Grubaugh N.D., Dela Cruz C., Farhadian S., Ko A.I., Omer S.B., Iwasaki A. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nature*. 2020, vol. 584, no. 7821, pp. 463–469. doi: 10.1038/s41586-020-2588-y
17. Luo H., Liu S., Wang Y., Phillips-Howard P.A., Ju S., Yang Y., Wang D. Age differences in clinical features and outcomes in patients with COVID-19, Jiangsu, China: a retrospective, multicentre cohort study. *BMJ Open*, 2020, vol. 10, no. 10: e039887. doi: 10.1136/bmjopen-2020-039887
18. Luo X.H., Zhu Y., Mao J., Du R.C. T cell immunobiology and cytokine storm of COVID-19. *Scand. J. Immunol.*, 2021, vol. 93, no. 3: e12989. doi: 10.1111/sji.12989
19. Nakanishi K., Yoshimoto T., Tsutsui H., Okamura H. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annu. Rev. Immunol.*, 2001, vol. 19, pp. 423–474. doi: 10.1146/annurev.immunol.19.1.423
20. Parasher A. COVID-19: current understanding of its pathophysiology, clinical presentation and treatment. *Postgrad. Med. J.*, 2021, vol. 97, no. 1147, pp. 312–320. doi: 10.1136/postgradmedj-2020-138577
21. Qian S., Gao Z., Cao R., Yang K., Cui Y., Li S., Meng X., He Q., Li Z. Transmissible gastroenteritis virus infection up-regulates FcRn expression via nucleocapsid protein and secretion of TGF- β in porcine intestinal epithelial cells. *Front. Microbiol.*, 2020, vol. 10: 3085. doi: 10.3389/fmicb.2019.03085
22. Rodriguez L., Brodin P. Unraveling the immune response in severe COVID-19. *J. Clin. Immunol.*, 2020, vol. 40, no. 7, pp. 958–959. doi: 10.1007/s10875-020-00849-9
23. Satış H., Özger H.S., Aysert Yıldız P., Hızıl K., Gulbahar Ö., Erbaş G., Aygencel G., Guzel Tunccan O., Öztürk M.A., Dizbay M., Tufan A. Prognostic value of interleukin-18 and its association with other inflammatory markers and disease severity in COVID-19. *Cytokine*, 2021, vol. 137: 155302. doi: 10.1016/j.cyto.2020.155302
24. Takeda K., Tsutsui H., Yoshimoto T., Adachi O., Yoshida N., Kishimoto T., Okamura H., Nakanishi K., Akira S. Defective NK cell activity and Th1 response in IL-18-deficient mice. *Immunity*, 1998, vol. 8, no. 3, pp. 383–90. doi: 10.1016/S1074-7613(00)80543-9
25. Tsutsui H., Matsui K., Kawada N., Hyodo Y., Hayashi N., Okamura H., Higashino K., Nakanishi K. IL-18 accounts for both TNF- α - and Fas ligand-mediated hepatotoxic pathways in endotoxin-induced liver injury in mice. *J. Immunol.*, 1997, vol. 159, no. 8, pp. 3961–3967.
26. Vecchié A., Bonaventura A., Toldo S., Dagna L., Dinarello C.A., Abbate A. IL-18 and infections: Is there a role for targeted therapies? *J. Cell. Physiol.*, 2021, vol. 236, no. 3, pp. 1638–1657. doi: 10.1002/jcp.30008
27. Wang J., Jiang M., Chen X., Montaner L.J. Cytokine storm and leukocyte changes in mild versus severe SARS-CoV-2 infection: review of 3939 COVID-19 patients in China and emerging pathogenesis and therapy concepts. *J. Leukoc. Biol.*, 2020, vol. 108, no. 1, pp. 17–41. doi: 10.1002/jlb.3covr0520-272r
28. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. URL: <https://covid19.who.int> (27.09.2022)

Авторы:

Арсентьева Н.А., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Любимова Н.Е., к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Бацинов О.К., младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; старший лаборант кафедры иммунологии ГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Коробова З.Р., лаборант-исследователь лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; старший лаборант кафедры иммунологии ГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Кузнецова Р.Н., к.м.н., врач-аллерголог-иммунолог медицинского центра ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; доцент кафедры иммунологии ГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Рубинштейн А.А., студент 6 курса ГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Станевич О.В., врач-инфекционист отдела эпидемиологии клиник ГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Лебедева А.А., врач-терапевт стационарного отделения скорой медицинской помощи ГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Воробьев Е.А., врач-нефролог, ассистент кафедры нефрологии ГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Воробьева С.В., врач-терапевт, ассистент кафедры пропедевтики внутренних болезней ГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Куликов А.Н., д.м.н., профессор, зав. кафедрой пропедевтики внутренних болезней ГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Гаврилова Е.Г., к.м.н., врач анестезиолог-реаниматолог высшей категории, доцент кафедры анестезиологии и реаниматологии ГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Певцов Д.Э., руководитель отделения переливания крови, врач-трансфузиолог НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой ГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Полушин Ю.С., академик РАН, д.м.н., профессор, зав. кафедрой анестезиологии и реанимации ГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Шлык И.В., д.м.н., профессор, зам. главного врача отделения неотложной помощи ГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Тотолян А.А., академик РАН, д.м.н., профессор, директор ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; зав. кафедрой иммунологии ГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Arsentieva N.A., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Liubimova N.E., PhD (Biology), Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Batsunov O.K., Junior Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation; Senior Laboratory Assistant, Department of Immunology, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;

Korobova Z.R., Investigator (Biologist), Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation; Senior Laboratory Assistant, Department of Immunology, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;

Kuznetsova R.N., PhD (Medicine), Allergologist-Immunologist, Medical Center of St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation; Associate Professor, Department of Immunology, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;

Rubinstein A.A., 6th year Student, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;

Stanevich O.V., Infectious Disease Physician, Department of Epidemiology of Clinics, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;

Lebedeva A.A., Physician, Emergency Department, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;

Vorobyov E.A., Nephrologist, Assistant Professor, Department of Nephrology, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;

Vorobyova S.V., Physician, Assistant Professor, Department of Propaedeutics of Internal Diseases, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;

Kulikov A.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Propaedeutics of Internal Diseases, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;

Gavrilova E.G., PhD (Medicine), Anesthesiologist-Resuscitator of the Highest Category, Assistant Professor, Resuscitation and Anaesthesiology Department, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;

Pevtsov D.E., Transfusiologist, Head of the Blood Transfusion Department, Raisa Gorbacheva Memorial Research Institute of Children Oncology, Hematology and Transplantation, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;

Polushin Yu.S., RAS Full Member, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Resuscitation and Anaesthesiology Department, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;

Shlyk I.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Deputy Head Physician, Emergency Department, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;

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

ASSOCIATIONS BETWEEN SERUM LEVELS OF C3, C4, AND TOTAL CLASSICAL COMPLEMENT ACTIVITY IN COVID-19 PATIENTS AT THE TIME OF ADMISSION AND CLINICAL OUTCOME

A. Razi, A. Azimian, R. Arezumand, A. Solati, H.N. Ahmadabad

North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran

Abstract. In the present study, we investigated the association between complement system status at the time of admission and clinical outcomes in COVID-19 patients. This single-center study was carried out with sixty-one adult patients with COVID-19 who were hospitalized at Imam Hassan Hospital of North Khorasan University of Medical Sciences (Bojnurd, Iran) with less than three days passage since onset of COVID-19 symptoms. Twenty-three healthy volunteers with demographic features similar to the patient group (matched by age and gender) were included in the study as a control group. Patient information including demographic information, demographic data, clinical characteristics, and clinical outcomes were obtained from electronic medical records. Of 61 hospitalized patients with COVID-19, 28 (47.54%) were female, and the average age was 48.7 ± 8.8 years. The healthy control group included 23 cases (11 (47.8%) female, 12 (52.1%) males, mean age 46.4 ± 4.4 years). Twenty-one of the 61 patients (34.4%) were admitted to the ICU, and sixteen of them (26.2%) died. Thirty-three (54.10%) patients with COVID-19 were hospitalized for less than 7 days, and 28 (45.90%) of them were hospitalized for ≥ 7 days. Our results show that length of hospital stay in the no-ICU group was significantly lower than the ICU admission or death groups (6.49 ± 0.24 vs. 8.85 ± 1.59 and 10.53 ± 1.80 , $p = 0.0002$). The levels of C3, C4, and CH50 were determined through the immunoturbidimetric method and single-radial-haemolysis plates, respectively, on serum samples obtained from patients at the time of admission or those in the control group. Our results indicate that C3, C4 and CH50 levels were markedly lower in COVID-19 patients than in the control group. We also found that complement parameter levels in COVID-19 patients who died or were admitted to ICU were significantly lower than in non-ICU COVID-19 patients. In general, it seems that serum level of C3, C4, and CH50 at admission may predict disease progression or adverse clinical outcome in COVID-19 patients.

Key words: COVID-19, complement system, clinical outcome, intensive care unit, discharge, mortality.

СВЯЗЬ УРОВНЯ СЫВОРОТОЧНЫХ С3, С4 И ОБЩЕЙ АКТИВНОСТИ КЛАССИЧЕСКОГО ПУТИ АКТИВАЦИИ КОМПЛЕМЕНТА У ПАЦИЕНТОВ С COVID-19 ПРИ ГОСПИТАЛИЗАЦИИ С КЛИНИЧЕСКИМ ИСХОДОМ

Рази А., Азимян А., Арезуманд Р., Солати А., Ахмадабад Х.Н.

Северо-Хорасанский университет медицинских наук, г. Боджнурд, Иран

Резюме. В статье представлены результаты оценки зависимости клинического исхода у пациентов с COVID-19 от состояния системы комплемента на момент госпитализации. В одноцентровое исследование были

Адрес для переписки:

Хасан Намдар Ахмадабад
Иран, г. Боджнурд, Медицинский университет Северного Хорасана.
Тел.: +98-5831513047. Факс: +98-5831513001
E-mail: namdar360@gmail.com

Contacts:

Hasan Namdar Ahmadabad
Iran, Bojnurd, North Khorasan University of Medical Sciences.
Tel.: +98-5831513047. Fax: +98-5831513001.
E-mail: namdar360@gmail.com

Для цитирования:

Рази А., Азимян А., Арезуманд Р., Солати А., Ахмадабад Х.Н. Связь уровня сывороточных С3, С4 и общей активности классического пути активации комплемента у пациентов с COVID-19 при госпитализации с клиническим исходом // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 5. С. 869–874. doi: 10.15789/2220-7619-ABS-1925

Citation:

Razi A., Azimian A., Arezumand R., Solati A., Ahmadabad H.N. Associations between serum levels of C3, C4, and total classical complement activity in COVID-19 patients at the time of admission and clinical outcome // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 5, pp. 869–874. doi: 10.15789/2220-7619-ABS-1925

This work was supported by the North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran (grant No. 1399/P/990001).

включены госпитализированные в больницу имама Хасана Северо-Хорасанского университета медицинских наук (Боджнурд, Иран) взрослые пациенты с COVID-19 ($n = 61$), у которых с момента появления симптомов COVID-19 прошло менее трех дней. Контрольную группу составили 23 здоровых добровольца, сходных по возрасту и полу с основной группой. Информация о пациентах, включая данные о возрасте, половой принадлежности, особенностях клинического течения и исходах заболевания, была получена из электронных медицинских карт. Из числа госпитализированных с COVID-19 пациентов 47,54% составляли женщины (28 из 61), средний возраст пациентов — $48,7 \pm 8,8$ года. В контрольную группу вошли 23 человека (11 (47,8%) женщин и 12 (52,1%) мужчин), средний возраст — $46,4 \pm 4,4$ года. Двадцать один из 61 пациента (34,4%) был направлен в отделение интенсивной терапии (ОИТ), из них шестнадцать (26,2%) умерли. Продолжительность госпитализации 33 (54,1%) пациентов с COVID-19 составила < 7 дней, 28 (45,9%) пациентов находились в стационаре ≥ 7 дней. Показано, что продолжительность пребывания в стационаре в группе пациентов, не нуждавшихся в оказании медицинской помощи в ОИТ, была значительно ниже, чем в группах пациентов, помещенных в ОИТ, или умерших ($6,49 \pm 0,24$ против $8,85 \pm 1,59$ и $10,53 \pm 1,8$ соответственно, $p = 0,0002$). Уровни C3, C4 определяли иммунотурбидиметрическим методом, уровень CH50 — одномерным радиальным гемолизом. Материалом для исследований служили образцы сыворотки, полученные от пациентов при поступлении в стационар и от лиц контрольной группы. Установлено, что у пациентов с COVID-19 уровни C3, C4 и CH50 были существенно ниже, чем у лиц контрольной группы, а у пациентов ОИТ и умерших — ниже, чем у пациентов с COVID-19, не нуждавшихся в терапии в условиях ОИТ. Таким образом, возможно, что уровень сывороточных C3, C4 и CH50 при поступлении может являться прогностическим фактором дальнейшего течения заболевания и развития неблагоприятных клинических исходов у пациентов с COVID-19.

Ключевые слова: COVID-19, система комплемента, клинический результат, отделение интенсивной терапии, выписка, смертность.

Introduction

More than a year after its emergence, COVID-19, the disease caused by SARS-CoV-2, continues to plague the world and dominate our daily lives [2]. Patients with COVID-19 may develop symptoms such as fever, dry cough, pharyngeal pain, tiredness, abdominal pain, diarrhea, conjunctivitis, muscle fatigue, or pneumonia; some are left with serious side effects or even die [14]. Previous studies have reported that 14.1–33.0% of COVID-19 patients are prone to develop into severe cases, and the mortality rate of critical cases is 61.5%, increasing sharply with age and underlying comorbidities [22, 23]. In more severe cases of COVID-19, patients can develop acute respiratory distress syndrome (ARDS), leading to a worse prognosis [9]. Deregulated activation of multiple adaptive and innate immune pathways (including T cell activation, cytokine expression from macrophages and neutrophils, the complement system, and several procoagulant and thrombogenic pathways) is believed to fuel a hyperinflammatory state that drives ARDS and may lead to multiple organ injury and finally death in COVID-19 [13, 19].

The complement system is a key part of the innate immune system which plays an important role in defense against foreign pathogens such as viruses but, in addition to being an important part of the immune defense system, it plays a critical role in promoting the inflammatory process that leads to organ dysfunction [21]. Although several studies have been carried out on the complement system in COVID-19 and its relationship with clinical outcomes [5, 6, 8,

12, 25], they did not indicate a clear protective or adverse effect of this system. Dheiret al. in a retrospective study showed there is no significant difference, in terms of C3 and C4 levels, in both ICU and non-ICU COVID-19 patients [5]. They suggested that measurement of C3 and C4 levels cannot be used to show severity disease [5].

Controversially, Ghazavi et al. found that the levels of C3 and C4 in non-severe COVID-19 patients were significantly higher than in severe-COVID-19 patients [8]. A previous study by Fang et al. also indicated decreased complement C3 levels are associated with poor prognosis in COVID-19 patients [6]. Java and colleagues claimed that the role of the complement system in COVID-19 patients is time dependent, wherein complement activation in the first week of infection can serve as a “friend”, and its activation in the second or third weeks of infection can be a “foe” [12]. Zinellu et al., in a systematic review, concluded that lower concentrations of C3 and C4 are significantly associated with higher COVID-19 severity and mortality [25]. They suggested that additional studies are required to determine whether measurement of complement components can be useful to predict adverse clinical consequences in COVID-19 patients [25].

Therefore, we conducted a study to assess the association between complement system status at the time of admission and clinical outcomes (e.g., length of stay, ICU admission, discharge, mortality) in COVID-19 patients. Understanding this association will help us elucidate the role of the complement system for prediction of the risk of developing critical COVID-19.

Materials and methods

Study design and participants. This single-center study was carried out with sixty-one adult patients with COVID-19 who were hospitalized at Imam Hassan Hospital of North Khorasan University of medical sciences (Bojnourd, Iran) from April 20 to August 5, 2021 with less than three days passage since the onset of COVID-19 symptoms. All patients with a positive RT-PCR test for SARS-CoV-2 and common CT imaging findings associated with COVID-19 were included in the study. Patients also had no history of SARS-CoV-2 infection or COVID-19 vaccination.

Available data suggest that patients with mild-to-moderate COVID-19 remain infectious no longer than three days after symptom onset. Recent evidence indicates that age and comorbidities could possibly confound the association between complement system status and clinical events [16]. Therefore, we adjusted for sex, age and comorbidities. Twenty-three healthy volunteers with demographic features similar to the patient group (matched by age and gender) were included in the study as a control group.

Data collection and assessment of serum complement levels and activity. We obtained demographic data, exposure history, chronic medical histories, clinical symptoms or signs, clinical outcomes, and hospitalization duration from electronic medical records. We also collected serum samples from PCR-confirmed COVID-19 patient samples sent to Imam Hasan Hospital laboratory on the first day of admission for analysis of serum levels of C3, C4, and total classical complement activity (CH50 assay) present in the serum. We also collected blood samples from the healthy controls with a negative PCR-test for COVID-19. Blood samples were centrifuged immediately, and serum was obtained and frozen at -70°C until use.

Serum C3 and C4 concentrations were determined using kits from Roche Diagnostics (Indianapolis, IN, USA) according to the immunoturbidimetric method [18]. The CH50 test was evaluated using single-radial-haemolysis plates (Biogen, Iran) as described elsewhere [18]. All values were compared to the normal ranges which were reported as: 89–187 mg/dL for C3; 10–40 mg/dL for C4; and 70–130 mm for CH50.

Statistical analysis. All statistical analyses were carried out using GraphPad Prism 5.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Data distribution was analyzed by a Kolmogorov-Smirnov test. According to the results of the normality test, a one-way ANOVA followed by Dunn's or Tukey's post-hoc test, or a non-parametric Kruskal-Wallis test, were used for statistical comparisons. Analyses were adjusted for age, sex and comorbidities. Data were expressed as mean \pm standard deviation (SD). Values of $p < 0.05$ (*) were considered significant.

Results

Demographic data and clinical characteristics. Of 61 hospitalized patients with COVID-19, 28 (47.54%) were female, and the average age was 48.7 ± 8.8 years. The most commonly self-reported symptoms at onset of illness were fever ($n = 41$ [67.2%]), cough ($n = 39$ [63.9%]), fatigue or myalgia ($n = 19$ [31.4%]), diarrhea ($n = 9$ [14.7%]), or headache ($n = 6$ [9.8%]). Twenty-six (42.6%) patients had comorbidities, including cardiovascular disease ($n = 10$ [38.4%]), diabetes ($n = 6$ [23.0%]), hypertension ($n = 7$ [26.9%]), chronic kidney disease ($n = 3$ [11.5%]), and endocrine system diseases ($n = 2$ [7.6%]). The healthy control group included 23 cases (11 (47.8%) female, 12 (52.1%) males, mean age 46.4 ± 4.4 years).

Twenty-one of the 61 patients (34.4%) were admitted to the ICU, and sixteen of them (26.2%) died. Thirty-three (54.10%) patients with COVID-19 were hospitalized for less than 7 days, and 28 (45.90%) of them were hospitalized for ≥ 7 days. Our results show that length of hospital stay in the non-ICU group was significantly lower than in the ICU admission or death groups (6.49 ± 0.24 vs. 8.85 ± 1.59 and 10.53 ± 1.80 , $p = 0.0002$).

C3, C4, and CH50 levels in COVID-19 patients and the healthy control group. As shown in Table, serum C3 and C4 concentrations and CH50 assay were markedly lower in COVID-19 patients than in the healthy control group. Further statistical analysis showed that serum levels of C3, C4, and CH50 in the non-ICU admission group were statistically higher than in the death and ICU admission groups. We did not observe a significant difference in C3, C4, and CH50 levels between ICU admission and death groups of COVID-19 patients ($p > 0.05$).

We also analyzed the relationship between C3, C4, and CH50 levels in COVID-19 patients and hospital length of stay. As shown in Figure, serum levels of C3, C4, and CH50 at the time of admission in COVID-19 patients who were hospitalized for 7 or more days were statistically lower than in COVID-19 patients who were hospitalized less than 7 days ($p < 0.05$).

Discussion

The complement system efficiently recognizes and eliminates viral pathogens via several mechanisms including: opsonization of viruses; lysing of virus-infected cells; induction of an antiviral immunoinflammatory state; boosting of virus-specific immune responses; and directly neutralizing cell-free viruses [1]. On the other hand, complement activation in viral infections may play a critical role in pathogenesis, clinical manifestation, and disease severity [3, 10].

Several reports have shown that the concentration of complement components, and serum complement

Table. Comparison of serum C3, C4 and CH50 levels at the time of admission between COVID-19 patients with different clinical outcomes and the healthy control group

Lab Variable	Healthy Control	No-ICU Admission	ICU Admission	Death	P value
C3, mg/dl	137.1±25.82	98.76±19.09	72.62±13.92	71.63±14.28	< 0.0001
C4, mg/dl	28.50±6.25	24.46±5.87	17.71±6.96	18.79±5.44	< 0.0001
CH50, mm	94.43±13.66	91.58±17.89	77.24±12.66	78.50±7.64	0.007

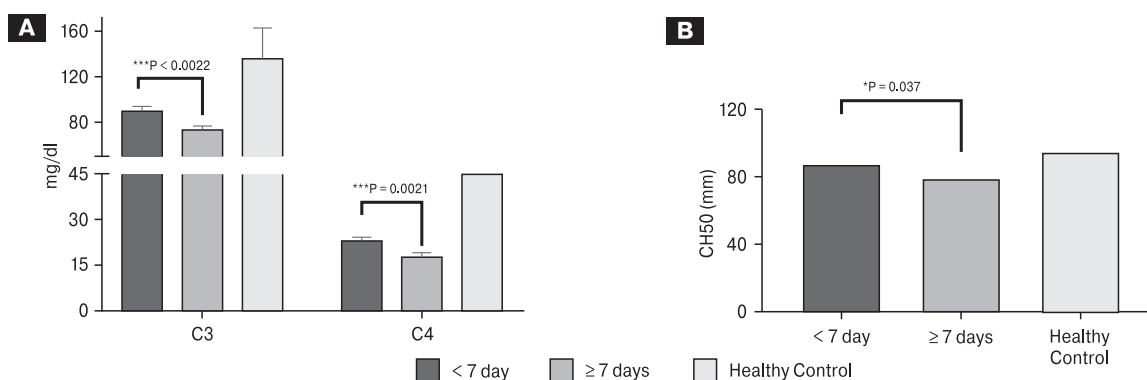
activity, change in the COVID-19 patients. However, they did not definitively determine whether measurement of complement components or serum complement activity can be useful to predict adverse clinical outcomes in COVID-19 patients. Therefore, this study was designed to assess the relationship between serum levels of C3, C4, and total classical complement activity in COVID-19 patients at the time of admission and clinical outcomes. The results of this study indicate that serum levels of C3 and C4 and CH50 assay were markedly lower in COVID-19 patients than in the healthy control group. The most interesting finding was that serum levels of C3, C4, and total classical complement activity in COVID-19 patients who died or were ICU admitted were significantly lower than in COVID-19 patients who were not ICU admitted.

Conversely, Keshavarz and colleagues showed that serum levels of the C3 and C4 factors have no significant change between patients and healthy individuals [15]. In another study, Zhang et al. showed that complement C3 cannot predict disease progression [24]. Our findings are also contrary to that of Dheirs et al. who found there was no significant difference in terms of C3 and C4 levels in both ICU and non-ICU COVID-19 patients [5]. Henry et al. have also shown that complement hyperactivation failed to predict progression to severe COVID-19 [11]. In addition, they also showed that there are no significant differences in total classical complement activity (or CH50 level) at the time of admission between COVID-19 patients with different clinical outcomes [11]. These inconsistencies

may be due to differences in study design, limited sample size, characteristics of COVID-19 patients, time between the onset of symptoms and obtaining the blood sample, or confounders.

However, this study supports the findings from previous observations [6, 8, 15]. Fang et al. in a retrospective cohort study investigated C3 levels in COVID-19 patients [6]. They showed that C3 levels in the non-survival group were significantly lower than in the survival group; they concluded that decreased complement C3 levels are associated with poor prognosis in COVID-19 patients [6]. The finding also match earlier findings by Ghazavi et al., which showed that C3 and C4 levels were markedly decreased in severe COVID-19 patients in comparison with non-severe COVID-19 patients [8]. In agreement with our data, Keshavarz et al. indicated that mean CH50 activity level in COVID-19 patients is significantly reduced compared to healthy individuals [15].

The decreased levels of C3 and C4 in COVID-19 patients (in comparison to the healthy group), and significant differences between the non-ICU admission group and the death and ICU admission groups, may be explained by the fact that hyperactivation of the complement system leads to proteolytic cleavage of the key complement molecules C3 and C4, leading to cleavage products including C3a, C3b, C4a, and C4b. These may trigger severe inflammatory responses in numerous organs [4]. In support of this possibility, Brandon and colleagues have demonstrated that C3a and the C3a/C3 ratio are significantly elevated in severe COVID-19 patients

**Figure. Comparison of hospital stay length in COVID-19 patients with serum levels of C3, C4 and CH50 at the time of admission**

Note. Data are mean±SD. *p < 0.05 was considered statistically significant.

presenting to the emergency department compared to mild or moderate severity COVID-19 patients [11]. On the other hand, Fletcher-Sandersjö et al. suggested that overactivation of the complement cascade in COVID-19 patients is associated with activation of coagulation systems and consequent severe complications [7]. It is possible, therefore, that overproduction of C3a and C4a following complement hyperactivation is associated with adverse outcomes in patients with SARS-CoV-2 infection through activation of the coagulation cascade and thrombus formation.

Taken together, these results suggest that the levels of complement C3, C4, and CH50 at admission may predict disease progression and adverse clinical outcome in patients with SARS-CoV-2 infection. These findings may be somewhat limited by several confounders, such as different viral strains, sociodemographic factors, and various types of drug therapy during hospitalization [17, 20]. Thus, we suggest that future studies include: investigation of alteration of C3 and C4 at different stages of the disease; determination of the relationship between serum levels of C3 and C4 and inflammatory biomarkers; and design of clinical trials with complement inhibitors, such as a C3 inhibitor.

References

1. Agrawal P., Nawadkar R., Ojha H., Kumar J., Sahu A. Complement evasion strategies of viruses: an overview. *Front. Microbiol.*, 2017, vol. 8, pp. 1117. doi: 10.3389/fmicb.2017.01117
2. Baric R.S. Emergence of a highly fit SARS-CoV-2 variant. *N. Engl. J. Med.*, 2020, vol. 383, no. 27, pp. 2684–2686. doi: 10.1056/NEJMcibr2032888
3. Bjornson A.B., Mellencamp M.A., Schiff G.M. Complement is activated in the upper respiratory tract during influenza virus infection. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1991, vol. 143, no. 5, pp. 1062–1066. doi: 10.1164/ajrccm/143.5_Pt_1.1062
4. Bosmann M., Ward P.A. Role of C3, C5 and anaphylatoxin receptors in acute lung injury and in sepsis. In: Current Topics in Innate Immunity I.I. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol. 946. Eds.: J. Lambris, G. Hajishengallis. *New York: Springer*, 2012, vol. 946, pp. 147–159. doi: 10.1007/978-1-4614-0106-3_9
5. Dheir H., Sipahi S., Yaylaci S., Koroğlu M., Erdem A.F., Karabay O. Is there relationship between SARS-CoV-2 and the complement C3 and C4? *Turk. J. Med. Sci.*, 2020, vol. 50, no. 4, pp. 687–688. doi: 10.3906/sag-2004-336
6. Fang S., Wang H., Lu L., Jia Y., Xia Z. Decreased complement C3 levels are associated with poor prognosis in patients with COVID-19: a retrospective cohort study. *Int. Immunopharmacol.*, 2020, vol. 89 (Pt A): 10707. doi: 10.1016/j.intimp.2020.10707
7. Fletcher-Sandersjö A., Bellander B.-M. Is COVID-19 associated thrombosis caused by overactivation of the complement cascade? A literature review. *Thromb. Res.*, 2020, vol. 194, pp. 36–41. doi: 10.1016/j.thromres.2020.06.027
8. Ghazavi A., Mosayebi G., Keshavarzian N., Rabiemajid S., Ganji A. Reduction of inflammatory C3 and C4 complement proteins in severe COVID-19 patients. *Preprint (Version 1) available at Research Square*. 2020. 13 p. doi: 10.21203/rs.3.rs-127493/v1
9. Gibson P.G., Qin L., Puah S.H. COVID-19 acute respiratory distress syndrome (ARDS): clinical features and differences from typical pre-COVID-19 ARDS. *Med. J. Aust.*, 2020, vol. 213, no. 2, pp. 54–56. doi: 10.5694/mja2.50674
10. Gralinski L.E., Sheahan T.P., Morrison T.E., Menachery V.D., Jensen K., Leist S.R., Whitmore A., Heise M.T., Baric R.S. Complement activation contributes to severe acute respiratory syndrome coronavirus pathogenesis. *mBio*, 2018, vol. 9, no. 5: e01753-18 doi: 10.1128/mBio.01753-18
11. Henry B.M., Szerguyk I., de Oliveira M.H.S., Lippi G., Benoit J.L., Vikse J., Benoit S.W. Complement levels at admission as a reflection of Coronavirus Disease 19 (COVID-19) severity state. *J. Med. Virol.*, 2021, vol. 93, no. 9, pp. 5515–5522. doi: 10.1002/jmv.27077
12. Java A., Apicelli A.J., Liszewski M.K., Coler-Reilly A., Atkinson J.P., Kim A.H., Kulkarni H.S. The complement system in COVID-19: friend and foe? *JCI Insight*, 2020, vol. 5, no. 15: e140711. doi: 10.1172/jci.insight.140711
13. Jayarangaiah A., Kariyanna P.T., Chen X., Jayarangaiah A., Kumar A. COVID-19-associated coagulopathy: an exacerbated immunothrombosis response. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.*, 2020, vol. 26: 1076029620943293. doi: 10.1177/1076029620943293
14. Jimenez-Cebrian A.M., Castro-Mendez A., García-Podadera B., Romero-Galisteo R., Medina-Alcántara M., Garcia-Paya I., Páez-Moguer J., Córdoba-Fernández A. Clinical manifestations of COVID-19 in the feet: a review of reviews. *J. Clin. Med.*, 2021, vol. 10, no. 10: 2201. doi: 10.3390/jcm10102201
15. Keshavarz F., Ghalamfarsa F., Javdansirat S., Hasanzadeh S., Azizi A., Sabz G., Salehi M., Ghalamfarsa G. Patients with COVID-19 have significantly reduced CH50 activity. *Virusdisease*, 2021, vol. 32, no. 4, pp. 681–689. doi: 10.1007/s13337-021-00710-6

Acknowledgments

This work was supported by the North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran. The authors thank the members of the Department of Pathobiology and Medical Laboratory Sciences, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran for their technical assistance. We would also like to thank the clinical staff of Imam Hassan Hospital for assisting us in this research project.

Ethics approval

The study was performed based on an informed consent and was approved by the Ethics Committee of North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnourd, Iran (IR.NKUMS.REC.1399.021).

Informed consent

Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

16. Kristensen M.K., Hansen M.B., Madsen M.B., Hansen C.B., Pilely K., Hyldegaard O., Garred P. Complement activation is associated with mortality in patients with necrotizing soft-tissue infections — a prospective observational study. *Front. Immunol.*, 2020, vol. 11: 17. doi: 10.3389/fimmu.2020.00017
17. Lippi G., Henry B.M., Hoehn J., Benoit S., Benoit J. Validation of the Corona-Score for rapid identification of SARS-CoV-2 infections in patients seeking emergency department care in the United States. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2020, vol. 8, no. 12, pp. e311–e113. doi: 10.1515/cclm-2020-1121
18. McPherson R.A., Pincus M.R. Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods. *Elsevier Health Sciences*, 2021. 1618 p. URL: <https://www.elsevier.com/books/henrys-clinical-diagnosis-and-management-by-laboratory-methods/mcpherson/978-0-323-67320-4> (10.02.2022)
19. Melenotte C., Silvin A., Goubet A.G., Lahmar I., Dubuisson A., Zumla A., Raoult D., Merad M., Gachot B., Hénon C., Solary E., Fontenay M., André F., Maeurer M., Ippolito G., Piacentini M., Wang F.S., Ginhoux F., Marabelle A., Kroemer G., Derosa L., Zitvogel L. Immune responses during COVID-19 infection. *Oncoimmunology*, 2020, vol. 9, no. 1: 1807836. doi: 10.1080/2162402X.2020.1807836
20. Qureshi A.I., Baskett W.I., Huang W., Shyu D., Myers D., Lobanova I., Naqvi S.H., Thompson V.S., Shyu C.R. Effect of race and ethnicity on in-hospital mortality in patients with COVID-2019. *Ethn. Dis.*, 2021, vol. 31, no. 3, pp. 389–398. doi: 10.18865/ed.31.3.389
21. Raghunandan S., Josephson C.D., Verkerke H., Linam W.M., Ingram T.C., Zerra P.E., Arthur C.M., Stowell S.R., Briones M., Chonat S. Complement inhibition in severe COVID-19 acute respiratory distress syndrome. *Front. Pediatr.*, 2020, vol. 8: 616731. doi: 10.3389/fped.2020.616731
22. Shakeri H., Azimian A., Ghasemzadeh-Moghaddam H., Safdari M., Haresabadi M., Daneshmand T., Namdar Ahmadabad H. Evaluation of the relationship between serum levels of zinc, vitamin B12, vitamin D, and clinical outcomes in patients with COVID-19. *J. Med. Virol.*, 2022, vol. 94, no. 1, pp. 141–146. doi: 10.1002/jmv.27277
23. Xu W., Sun N.N., Gao H.N., Chen Z.Y., Yang Y., Ju B., Tang L.L. Risk factors analysis of COVID-19 patients with ARDS and prediction based on machine learning. *Sci. Rep.*, 2021, vol. 11, no. 1: 2933. doi: 10.1038/s41598-021-82492-x
24. Zhang Z., Li X., Zhang W., Shi Z.-L., Zheng Z., Wang T. Clinical features and treatment of 2019-nCoV pneumonia patients in Wuhan: report of a couple cases. *Virol. Sin.*, 2020, vol. 35, no. 3, pp. 330–336. doi: 10.1007/s12250-020-00203-8
25. Zinellu A., Mangoni A.A. Serum complement C3 and C4 and COVID-19 severity and mortality: a systematic review and meta-analysis with meta-regression. *Front. Immunol.*, 2021, vol. 12: 696085. doi: 10.3389/fimmu.2021.696085

Авторы:

Рази А., д.м.н., доцент, преподаватель кафедры урологии, больница имама Али, Северо-Хорасанский университет медицинских наук, г. Боджнурд, Иран;

Азимян А., д.м.н., доцент, преподаватель кафедры патобиологии и лабораторных наук медицинского факультета Северо-Хорасанского университета медицинских наук, г. Боджнурд, Иран;

Арезуманд Р., д.м.н., ассистент, преподаватель кафедры патобиологии и лабораторных наук медицинского факультета Северо-Хорасанского университета медицинских наук, г. Боджнурд, Иран;

Солати А., д.ф.н., доцент, преподаватель кафедры английского языка медицинского факультета Северо-Хорасанского университета медицинских наук, г. Боджнурд, Иран;

Ахмадабад Х.Н., д.м.н., доцент, преподаватель кафедры патобиологии и лабораторных наук медицинского факультета Северо-Хорасанского университета медицинских наук, г. Боджнурд, Иран.

Authors:

Razi A., PhD, MD (Medicine), Assistant Professor, Faculty Member, Department of Urology, Imam Ali Hospital, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran;

Azimian A., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Faculty Member, Department of Pathobiology and Laboratory Sciences, School of Medicine, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran;

Arezumand R., PhD, MD (Medicine), Assistant Professor, Faculty Member, Department of Pathobiology and Laboratory Sciences, School of Medicine, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran;

Solati A., PhD, MD (Philosophy), Associate Professor, Faculty Member, Department of English Language, School of Medicine, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran;

Ahmadabad H.N., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Faculty Member, Department of Pathobiology and Laboratory Sciences, School of Medicine, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran.

Поступила в редакцию 08.04.2022

Отправлена на доработку 15.05.2022

Принята к печати 27.06.2022

Received 08.04.2022

Revision received 15.05.2022

Accepted 27.06.2022

АНАЛИЗ ДОКУМЕНТИРОВАННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ СЫВОРОТОК КРОВИ БОЛЬНЫХ, ПОДОЗРИТЕЛЬНЫХ НА ЗАБОЛЕВАНИЕ ЛЕПТОСПИРОЗАМИ, В РЕАКЦИИ МИКРОАГГЛЮТИНАЦИИ

А.П. Самсонова^{1,2}, Е.М. Петров¹, О.В. Савельева¹, А.Е. Иванова¹, Н.Е. Шарапова¹

¹ ФГБУ НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия

² ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Резюме. Лептоспирозы занимают одно из ведущих мест среди зоонозов по широте распространения природных и хозяйственных очагов, а также тяжести клинического течения инфекции и частоте летальных исходов. Относительно низкие показатели заболеваемости в отдельных регионах, как правило, обусловлены неудовлетворительным состоянием дифференциальной диагностики, в том числе недостаточным объемом лабораторных исследований. Лептоспиры характеризуются выраженным фенотипическим и генотипическим полиморфизмом, что оказывает влияние на особенности эпидемиологии и клинической симптоматики лептоспирозов. Поэтому лабораторные методы являются важными в эпидемиологическом надзоре и диагностике лептоспирозов. Серологические методы, и прежде всего реакция микроагглютинации (РМА), в настоящее время сохраняют ведущую роль в исследовании различных аспектов лептоспирозной инфекции. С целью изучения вклада представителей различных серогрупп лептоспир в этиологическую структуру заболеваемости лептоспирозами на протяжении почти 60 лет мы проанализировали архивные данные о результатах исследования в РМА сывороток крови больных, подозрительных на заболевание лептоспирозами, которые содержались в лабораторных журналах за 1962–2020 гг. Показано, что чаще всего у больных обнаруживались антитела к антигенам лептоспир серогрупп *Grippityphosa* (25,1%), что связано с наличием широкого круга резервуарных животных-хозяев и устойчивостью лептоспир этой серогруппы к неблагоприятным воздействиям факторов окружающей среды. В то же время следует отметить, что в разные временные периоды в сыворотках крови больных преобладали антитела к лептоспирам разных серогрупп, что во многих случаях совпадало с вкладом этих возбудителей в этиологическую структуру заболеваемости. Например, в современных условиях «мировым трендом» является доминирование в этиологической структуре лептоспирозов возбудителей серогруппы *Sejroe*, что также продемонстрировал по ряду лет и проведенный нами анализ.

Адрес для переписки:

Самсонова Анна Петровна
123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, 18,
ФГБУ НИЦ эпидемиологии и микробиологии
им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России.
Тел.: 8 (499) 190-57-91 (служебн.); 8 (915) 143-46-30 (моб.).
E-mail: lepto@gamaleya.org

Contacts:

Anna P. Samsonova
123098, Russian Federation, Moscow, Gamaleya str., 18,
National Research Center for Epidemiology and Microbiology
named after N.F. Gamaleya.
Phone: +7 (499) 190-57-91 (office); +7 (915) 143-46-30 (mobile).
E-mail: lepto@gamaleya.org

Для цитирования:

Самсонова А.П., Петров Е.М., Савельева О.В., Иванова А.Е., Шарапова Н.Е. Анализ документированных результатов исследования сывороток крови больных, подозрительных на заболевание лептоспирозами, в реакции микроагглютинации // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 5. С. 875–890. doi: 10.15789/2220-7619-ATD-1758

Citation:

Samsonova A.P., Petrov E.M., Savelyeva O.V., Ivanova A.E., Sharapova N.E. Analyzing the documented results by using microscopic agglutination test to examine sera from patients suspected of leptospirosis // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 5, pp. 875–890. doi: 10.15789/2220-7619-ATD-1758

Работа выполнена в рамках Госзадания № 056-00119-21-01 на 2021 год и плановый период 2022 и 2023 гг.

The work was performed under Government Order No. 056-00119-21-01 for 2021 and the planning period of 2022 and 2023.

Полученные данные могут быть использованы в эпидемиологическом надзоре за лептоспирозной инфекцией, в том числе в прогнозировании возможных вспышек, а также при разработке новых подходов к диагностике, лечению и профилактике лептоспирозов.

Ключевые слова: лептоспиры, лептоспирозы, природные очаги лептоспирозов, хозяйственные очаги лептоспирозов, реакция микроагглютинации, серогруппа.

ANALYZING THE DOCUMENTED RESULTS BY USING MICROSCOPIC AGGLUTINATION TEST TO EXAMINE SERA FROM PATIENTS SUSPECTED OF LEPTOSPIROSIS

Samsonova A.P.^{a,b}, Petrov E.M.^a, Savelyeva O.V.^a, Ivanova A.E.^a, Sharapova N.E.^a

^a N.F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

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

Abstract. Leptospirosis holds one of the leading places among zoonoses due to the breadth of distribution of natural and economic foci, as well as the severity of the clinical manifestation and mortality rate. A relatively low incidence rate in some regions is usually accounted for by unsatisfactory level of differential diagnostics, including insufficient coverage by diagnostic tests. *Leptospira* are characterized by marked phenotypic and genotypic polymorphisms, affecting epidemiological features and clinical manifestation of leptospirosis. Therefore, laboratory methods are important tool for epidemiological surveillance and diagnostics of leptospirosis. Serological methods primarily the microscopic agglutination test (MAT) currently remain the leading tool in investigating leptospirosis. To study a near 60 year-long contribution of various leptospira serogroups to etiological pattern of leptospirosis, we have analyzed archived MAT serum data from patients suspected of leptospirosis retrieved from our laboratory journals during from the years 1962 to 2020. It was shown that antibodies to the *Grippityphosa* serogroup (25.1%) were found most often in patients, which might be associated with the wide range of reservoir host animals and resistance of this leptospira serogroup to environmental factors. At the same time, it should be noted that at different periods antibodies to various leptospira serogroups prevailed in the sera of patients, and in many cases this data matched with the contribution of these pathogens to the etiological morbidity pattern. In particular, dominance of pathogens of the *Sejroe* serogroup is currently the “global trend” in the etiological pattern of leptospirosis that was also observed by us at some years. The data obtained might be useful for epidemiological surveillance of leptospirosis infection, including predicting potential outbreaks, as well as for developing approaches to its diagnostics, treatment and prevention.

Key words: *Leptospira*, leptospirosis, natural leptospirosis foci, economic leptospirosis foci, microagglutination test, serogroup.

Лептоспирозы в настоящее время продолжают оставаться одними из самых распространенных в мире природноочаговых зоонозов [5, 6, 31, 41, 43]. Они занимают одно из ведущих мест по широте распространения природных и антропоургических очагов, по тяжести клинического течения инфекций, частоте осложнений, отдаленных клинических последствий и летальных исходов [5, 6, 13, 19, 43, 44, 46]. Некоторые авторы вообще считают, что лептоспирозы по своему медицинскому, социальному и экономическому значению занимают второе место после группы пищевых зоонозов (например, Симонова Е.Г., 2019, личное сообщение). Наиболее высокий уровень эпидемического проявления очагов лептоспирозов характерен для стран субтропического и тропического климатических поясов, где периодически возникают вспышки, охватывающие сотни тысяч людей [55]. Вероятность внезапного осложнения эпидобстановки многократно возрастает в условиях чрезвычайных ситуаций, связанных со стихийными бедствиями (наводнения, ураганы, землетрясения и др.). Широкое распространение природных и антропоургических очагов лептоспирозов связывают

с достаточно обширным спектром резервуарных хозяев патогенных лептоспир и восприимчивых к ним видов животных [2, 3, 21, 36], а также с высокой степенью биоразнообразия этих возбудителей [7, 9, 36, 42].

В России за последние 20 лет имеется тенденция к значительному снижению количества зарегистрированных случаев заболевания лептоспирозами. В последние 10 лет в России относительный показатель колеблется от 0,09 до 0,43 на 100 тыс. населения [5, 6]. Это может быть связано не только с истинным снижением заболеваемости, но и с недостатками дифференциальной клинической и лабораторной диагностики [5, 6]. По этой причине многие авторы не только в развивающихся, но и в экономически развитых странах относят лептоспирозы к группе «незамечаемых» («neglected») инфекционных болезней [6, 44, 48]. Беспокойство вызывает также нарастание доли тяжелых, с высокой летальностью случаев лептоспирозов как в России, так и в зарубежных странах [1, 6, 13, 43, 46].

При ряде инфекций, возбудители которых представляют собой гетерогенную группу микроорганизмов, вклад представителей различ-

ных таксономических групп (видов, серогрупп, сероваров, и др.) в этиологическую структуру заболеваемости может различаться, что, в свою очередь, является одной из причин наблюдаемых различий в эпидемиологии и клинических особенностях этих заболеваний. Поэтому в ряде случаев требуются дифференцированные подходы к диагностике, лечению и профилактике лептоспирозов.

Представителей лептоспир отличает выраженное фенотипическое и генотипическое разнообразие, определяющее их способности колонизировать многочисленные места обитания. Среди лептоспир выявлены как свободноживущие (сапрофитные) формы, обитающие в почве, пресной и морской воде, так и паразитические, патогенные для человека и животных [2, 3, 7, 21, 22, 32, 33, 36]. Практически с начала прошлого века было известно о наличии гетерогенности лептоспирозов, когда были выявлены возбудители болезни Васильева–Вейля и водной лихорадки, причем эти болезни различались между собой прежде всего по эпидемиологическим и клиническим особенностям [3, 32]. Следует отметить, что наблюдаются некоторые особенности в зависимости от географического региона (основные хозяева-животные и некоторые клинические симптомы) [2]. На основании результатов изучения антигенной структуры лептоспир была разработана серологическая классификация лептоспирозов, где основной таксономической единицей является серовар [3, 21]. При этом было выделено 6 типов лептоспирозов, возбудителями которых являлись лептоспиры определенных сероваров, причем в конце 50-х — начале 60-х гг. их считали отдельными видами [3]. К настоящему времени известно более 250 сероваров патогенных лептоспир, которые различаются по хозяйной (гостальной) специфичности, органотропности, способности к продолжительному существованию во внешней среде, а также по другим признакам, значимым в клинко-эпидемиологическом контексте [5, 7, 36, 42]. Серовары объединены в более чем 30 серогрупп. Серогруппы не считаются официальной таксономической единицей, но определение серогрупп лептоспир важно для идентификации источников и путей передачи возбудителей, в диагностике и планировании мер профилактики, в том числе и в разработке новых вакцин [21, 40]. Серогруппы могут в разной степени различаться по эпидемиологическим и клиническим особенностям [3, 21, 22, 33]. Установлена достаточно четкая гостальная специфичность между лептоспирами определенных серогрупп и животными — хозяевами этих возбудителей [21, 35], что имеет важное эпидемиологическое и диагностическое значение [39]. Представители серогрупп *Icterohaemorrhagiae* и *Canicola*, чаще,

чем другие лептоспиры, вызывают тяжелые формы заболевания, летальность при которых достигает 20% и более [6, 10, 19]. Согласно официальным документам [20], с клинической точки зрения различия в манифестации лептоспирозов довольно нечеткие и часто носят количественный характер, исключая иктерогеморрагический лептоспироз [16]. Тем не менее, выявлены различия в патогенезе лептоспирозов, вызванных представителями различных серогрупп лептоспир (характер желтухи — паренхиматозная, гемолитическая или смешанная, наличие или отсутствие тропизма к органам и тканям нервной системы, показатели персистенции возбудителей на разных стадиях заболевания и др.) [6, 10, 19, 27, 28, 42]. Например, Raoult высевал лептоспир серогруппы *Icterohaemorrhagiae* в течение более 90 дней с момента начала заболевания [54], а при заболеваниях, вызванных лептоспирами серогруппы *Grippotyphosa*, наблюдается вторая волна лептоспиремии на 3-й неделе заболевания, хотя в классическом понимании лептоспирозной инфекции возбудитель находится в крови больных как правило в течение первой недели с момента заболевания. Благодаря использованию ПЦР были выявлены различия в сроках персистенции лептоспир различных серогрупп в органах экспериментальных животных и крови больных [10, 27, 28]. На основании полученных результатов нами был сделан вывод, что неврологические осложнения и отдаленные клинические последствия лептоспирозов могут быть связаны с персистенцией возбудителей в органах центральной и периферической нервной системы [10, 27].

Мировые данные по заболеваемости людей и животных указывают на повсеместное распространение, а также выраженное эпидемиологическое и эпизоотологическое проявление (в том числе и на территории России) лептоспирозов, возбудители которых относятся к трем видам лептоспир, согласно генетической классификации на основании нуклеотидных последовательностей 16S рПНК [47, 51]: *L. interrogans* (серовары *copenhageni*, *icterohaemorrhagiae*, *canicola*, *pomona*), *L. kirschneri* (*grippotyphosa*, *mozdok*), *L. borgpetersenii* (*tarassovi*, *harjo*) [5, 6]. В природных очагах представители этих сероваров участвуют в формировании смешанных инфекций у животных: у грызунов — *saxkoebing-grippotyphosa*, у КРС — *hardjo-tarassovi*, у свиней — *pomona-tarassovi*, у собак — *canicola-tarassovi* [3, 6, 28]. Особую опасность в отношении угрозы распространения новых возбудителей представляет группа экзотических высоковирулентных лептоспир (*lai*, *huanuco* и др.), антигены которых не представлены в диагностических тест-системах и вакцинных препаратах [6].

В настоящее время на основании клинической важности выделяют только иктерогеморагический лептоспироз, а клинические рекомендации по лечению лептоспирозов являются общими для всех лептоспирозов [20]. Тем не менее, ряд авторов (Ананьина Ю.В., Лебедев В.В., Токаревич Н.К., Стоянова Н.А.) в последние 20 лет подчеркивали актуальность и важность изучения гетерогенности, в том числе и серогрупповой, возбудителей и роли представителей разных таксонов в эпидемиологии и клинике лептоспирозов, что, в свою очередь, может иметь значение в разработке новых методов диагностики и профилактики этой группы инфекций [6, 17, 48].

Возникает предположение о некоторой взаимосвязи эпидемиологической и эпизоотологической ситуации в стране или отдельных регионах и серогрупповой структуры заболеваемости людей лептоспирозами, как в течение длительных периодов, так и на их отдельных отрезках. Проведенные в последние годы аналогичные исследования как в России (например, в Краснодарском крае в 2018 г., Ярославской области в 2020 г.), так и за рубежом (например, в Польше в 2018 г.) [4, 12, 15, 23, 25, 26, 37, 38, 45] охватывали или небольшие периоды времени, или небольшое число больных. Поэтому целью данной работы является изучение вклада представителей различных серогрупп лептоспир в этиологическую структуру заболеваемости лептоспирозами на протяжении примерно 60 лет на основании анализа архивных записей в лабораторных журналах о результатах исследования в реакции микроагглютинации (РМА) сывороток крови больных, подозрительных на заболевание лептоспирозами, в период 1962–2020 гг.

Материалы и методы

Проанализированы результаты исследования в реакции микроагглютинации (РМА) с эталонными диагностическими штаммами лептоспир сывороток крови от 4773 больных, подозрительных на заболевание лептоспирозами, которые содержались в лабораторных журналах за 1962–2020 гг. В РМА выявляются антитела-агглютинины против антигенов лептоспир, в данном случае — эталонных диагностических штаммов. Большинство больных проживало в Москве и Московской области, а также в других областях ЦФО (Смоленская, Калужская и др.). В отдельные периоды времени авторы данной статьи лично участвовали в постановке РМА с сыворотками крови больных и оценке полученных результатов: Петров Е.М. (1966–2020 гг.), Савельева О.В. (1984–2020 гг.), Самсонова А.П. (1989–1996 гг.). РМА прово-

дили согласно методическим указаниям [39]. Статистическую обработку полученных результатов проводили согласно руководствам [11, 18].

Результаты

Результаты исследования полового и возрастного составов пациентов на основании данных, содержащихся в лабораторных журналах, представлены в табл. 1 и 2. Среди обследованных пациентов было 2593 (54,33%) мужчин и 1351 (28,31%) женщин. В 840 (17,25%) случаях пол пациентов в журнале не указан, а определить его по фамилии не представляется возможным без полного указания имени и отчества (были указаны только инициалы). Дети моложе 14 лет составляли 724 (15,17%) обследованных пациентов, взрослые — 2400 (50,28%), у 1649 (34,55%) пациентов возраст не был указан.

Положительные результаты РМА с эталонными диагностическими штаммами лептоспир были получены при исследовании сывороток крови 1632 (34,19%) больных. В этой группе больных 965 (59,13%) положительных результатов РМА приходилось на мужчин, 359 (22,0%) — женщин, 308 (18,9%) — на лиц, чей пол не был указан. На группу детей моложе 14 лет приходится 213 (13,05%) положительных результатов РМА, взрослых — 890 (54,53%), лиц без указания возраста — 529 (32,41%).

Серогрупповая структура положительных результатов представлена в табл. 3. Для удобства анализа полученные данные, начиная с 1970 г., были разбиты на пятилетние отрезки и просуммированы, как представлено в табл. 4. Данные за период 1962–1969 гг. были сведены в одну группу, так как за некоторые месяцы записи отсутствовали, и суммарное количество больных в отдельные годы было низким, а данные за 2020 г. позднее были присоединены к группе 2015–2019 гг.

Как видно из представленных в табл. 4 результатов, доминирующими возбудителями заболевания лептоспирозами за весь исследованный период являются лептоспир серогрупп *Grippotyphosa* (25,1% случаев), *Hebdomadis/Sejroe* (16,3%) и *Icterohaemorrhagiae* (9,9%). Представители серогруппы *Grippotyphosa* доминировали также на протяжении периодов 1970–1989 и 2000–2009 гг. В 1962–1969 гг. они (13,5%) уступали только представителям серогрупп *Pomona* (29,7%) и *Tarassovi* (14,9%), в 1995–1999 гг. — *Sejroe* (5,6–57,3%).

Представительство лептоспир серогруппы *Hebdomadis/Sejroe* в общем пуле положительных результатов составляет 16,3% (второе место после *Grippotyphosa*). Тенденцию к росту вклада лептоспир этой серогруппы в заболеваемость можно отметить еще с конца 80-х гг., а с 1990 г.

Таблица 1. Гендерный состав обследованных больных

Table 1. Gender composition of the examined patients

Год Year	Всего Total		Мужчины Men		Женщины Women		Не указано Not indicated	
	все all	+	все all	+	все all	+	все all	+
1962	21	8	12	3	4	2	5	3
1963	83	31	55	21	23	6	5	4
1964	91	6	54	3	32	2	5	1
1965	44	4	14	2	18	1	12	1
1966	13	3	2	1	6	1	5	1
1967	33	15	9	2	24	13	0	–
1968	4	4	2	2	1	1	1	1
1969	12	3	6	2	3	0	3	1
1970	42	16	27	11	8	3	7	2
1971	12	7	6	4	5	2	1	1
1972	41	14	26	6	12	6	3	2
1973	108	18	30	5	35	10	43	3
1974	113	58	68	35	30	12	15	11
1975	107	41	58	15	16	6	33	20
1976	71	21	53	17	12	3	6	1
1977	386	139	225	104	142	27	19	8
1978	168	67	105	40	39	16	24	11
1979	172	30	112	18	33	7	27	5
1980	214	86	128	59	59	13	27	14
1981	405	185	272	122	80	38	53	25
1982	121	24	69	15	33	6	19	3
1983	31	13	14	3	6	2	11	8
1984	69	31	40	21	25	8	4	2
1985	41	14	17	9	10	5	14	0
1986	83	20	25	7	13	3	45	10
1987	205	55	87	18	66	12	52	25
1988	218	84	117	51	62	14	39	19
1989	294	71	136	32	130	32	28	7
1990	45	13	32	10	7	1	6	2
1991	40	6	24	3	7	0	9	3
1992	57	25	32	11	12	5	13	9
1993	123	43	40	18	16	4	67	21
1994	97	28	54	19	22	5	21	4
1995	50	15	32	9	10	2	8	4
1996	39	11	27	8	11	3	1	0
1997	126	42	62	22	37	8	27	12
1998	81	15	49	11	28	3	4	1
1999	53	6	18	5	26	1	9	0
2000	72	37	35	19	30	12	7	6
2001	161	76	109	59	29	8	23	9
2002	38	11	19	7	14	3	5	1
2003	67	40	39	23	8	1	20	16
2004	82	37	38	17	27	12	17	8
2005	80	4	37	3	25	1	18	0
2006	20	3	10	3	8	0	2	0
2007	35	5	18	4	13	1	4	0
2008	46	11	17	4	23	4	6	3
2009	21	3	11	3	8	0	2	0
2010	29	6	14	4	10	0	5	2

Окончание таблицы 1. Гендерный состав обследованных больных

Table 1. Gender composition of the examined patients (continued)

Год Year	Всего Total		Мужчины Men		Женщины Women		Не указано Not indicated	
	все all	+	все all	+	все all	+	все all	+
2011	20	8	11	5	5	1	4	2
2012	26	17	10	10	5	4	11	3
2013	29	7	9	5	7	2	13	0
2014	20	8	11	4	4	2	4	2
2015	16	9	9	6	4	1	3	2
2016	15	11	4	3	9	8	2	0
2017	26	21	14	10	6	6	6	5
2018	23	21	18	17	2	2	3	2
2019	23	22	15	14	6	6	2	2
2020	11	3	6	1	5	2	0	–
Всего Total	4773	1632	2593	965	1351	359	828	308
% от всех % of all	100	34,19	54,33		28,31		17,35	
% от положительных результатов % of positive results		100		59,13		22,00		18,87
% положительных результатов в своей группе % of positive results in relevant group				37,22		26,57		37,20

Примечание. «0» — отсутствие положительных результатов РМА; «—» — РМА не проводилась.
Note. “0” — no positive RMA results; “—” — RMA was not performed.

по настоящее время лептоспиры этой группы занимают первое-второе место в общей структуре заболеваемости (15,4–57,3%).

Следует отметить значительный вклад в этиологическую структуру заболеваемости лептоспирозами представителей серогруппы *Icterohaemorrhagiae* (9,9%, третье место).

Представители серогруппы *Pomona* в общем пуле занимают четвертое место (9,3%). Они являлись доминирующими только в 60-х гг. прошлого века (29,7%).

Представительство лептоспир серогруппы *Australis* в общем пуле составляет 9,1%. Тенденция к росту вклада лептоспир этой серогруппы в заболеваемость наблюдалась в период 1970–1979 гг. (4,1–14,2%), а также начиная с 2000 г.

Представительство лептоспир серогруппы *Javanica* в общем пуле составляет 4,0%. В период 1980–1984 гг. (13,9%) лептоспиры этой серогруппы уступали только лептоспирам серогруппы *Grippityphosa* (34,5%). В остальные периоды их вклад был меньше (0–3,3%).

Представительство лептоспир серогруппы *Canicola* в общем пуле составляет 3,25%. Следует отметить значительный рост вклада этих лептоспир в этиологическую структуру заболеваемости в период 1990–1994 гг. (20,9%), они уступали только лептоспирам серогруппы *Sejroe* (32,2%).

В остальные годы вклад лептоспир этой серогруппы в заболеваемость был меньше (0–6,7%).

Вклад лептоспир серогрупп *Autumnalis* (1,7%), *Bataviae* (2,1%) в заболеваемость, за исключением некоторых периодов, является незначительным. Лептоспиры серогрупп *Ballum*, *Pyrogenes* и *Cynopteri* с 1991 г. исключены из панели эталонных диагностических штаммов лептоспир, которые используются на территории России для постановки РМА [39].

В 13,5% исследованных сывороток имели место положительные результаты РМА с лептоспирами нескольких серогрупп с одинаковыми титрами из-за наличия перекрестных реакций, поэтому однозначно определить серогрупповую принадлежность возбудителей заболевания у этих больных не представляется возможным (отсутствие результатов постановки РМА в другие сроки с момента заболевания, в ряде случаев эти сроки не указаны).

Обсуждение

Долголетнее доминирование в этиологической структуре заболеваемости лептоспирозами на территории России представителей серогруппы *Grippityphosa* можно объяснить, с одной стороны, наличием достаточно широкого кру-

Таблица 2. Возрастной состав обследованных больных
 Table 2. Age composition of the patients examined

Год Year	Дети до 14 лет Children under 14 years old		15–24 года 15–24 years old		25–34 года 25–34 years old		35–44 года 35–44 years old		45–54 года 45–54 years old		55–64 года 55–64 years old		65+ лет 65+ years old		Возраст не указан Age not specified		Итого всех Total of all
	все all	+	все all	+	все all	+	все all	+	все all	+	все all	+	все all	+	все all	+	
1962	12	4	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	9	4	21
1963	19	8	16	5	14	1	6	2	0	0	-	2	0	26	15	83	
1964	30	3	4	0	9	2	2	0	0	0	-	0	0	45	1	91	
1965	9	3	3	0	5	0	7	0	6	0	0	3	0	11	1	44	
1966	1	0	1	0	1	0	3	2	2	0	0	1	0	3	1	13	
1967	5	2	3	1	6	4	6	2	6	3	3	3	0	2	0	33	
1968	0	-	1	1	0	-	0	-	0	0	-	0	-	3	3	4	
1969	0	-	1	0	3	1	2	1	0	0	-	0	0	5	1	12	
1970	1	0	12	5	3	2	5	1	6	3	3	3	0	11	5	42	
1971	2	2	1	1	3	1	2	1	1	1	1	1	0	2	1	12	
1972	4	1	11	1	5	1	6	3	2	1	4	1	0	9	6	41	
1973	14	0	3	0	12	1	17	5	20	4	8	6	1	33	2	108	
1974	20	19	14	9	9	7	9	6	7	3	1	1	0	53	13	113	
1975	8	2	15	7	29	12	21	8	11	4	5	3	1	17	5	107	
1976	3	2	16	5	14	3	14	6	8	3	1	0	0	15	2	71	
1977	197	65	51	19	38	12	21	15	13	3	2	1	2	62	24	386	
1978	9	5	35	11	29	11	21	8	24	8	9	5	3	38	18	168	
1979	12	0	37	6	49	7	17	6	14	4	8	3	2	33	4	172	
1980	15	6	28	12	44	20	32	23	23	14	10	5	2	60	6	214	
1981	23	5	84	41	98	49	36	23	49	23	19	9	7	89	32	405	
1982	5	0	16	3	24	3	22	5	13	5	6	3	6	29	3	121	
1983	0	-	5	0	4	2	2	0	1	0	4	0	0	15	11	31	
1984	4	3	7	4	12	7	7	5	9	7	2	0	0	28	5	69	
1985	1	0	6	3	6	2	4	2	4	1	2	1	0	18	5	41	
1986	1	0	5	1	14	5	13	6	12	4	4	1	0	34	3	83	
1987	14	4	14	8	16	3	17	7	15	5	7	2	1	121	25	205	
1988	6	1	32	5	28	10	26	11	33	19	16	6	2	75	31	218	
1989	165	41	23	6	36	6	18	6	7	3	5	0	3	37	9	294	
1990	1	0	5	2	9	3	9	3	2	1	5	2	1	13	2	45	
1991	3	0	1	0	2	0	7	2	8	1	2	0	1	16	3	40	
1992	0	-	1	0	5	0	1	0	5	1	1	1	0	44	23	57	

Окончание таблицы 2. Возрастной состав обследованных больных

Table 2. Age composition of the patients examined (continued)

Год Year	Дети до 14 лет Children under 14 years old		15–24 года 15–24 years old		25–34 года 25–34 years old		35–44 года 35–44 years old		45–54 года 45–54 years old		55–64 года 55–64 years old		65+ лет 65+ years old		Возраст не указан Age not specified		Итого всех Total of all
	все all	+	все all	+	все all	+	все all	+	все all	+	все all	+	все all	+	все all	+	
1993	12	5	6	3	6	5	9	4	5	2	3	1	0	0	82	23	123
1994	2	1	6	1	3	2	5	2	3	1	2	2	1	2	74	18	97
1995	4	0	1	1	4	1	4	1	2	1	0	-	0	0	35	11	50
1996	4	1	1	0	2	0	6	1	2	1	4	0	0	1	19	8	39
1997	31	13	5	1	11	4	12	1	2	0	4	0	0	0	61	23	126
1998	2	0	3	0	3	1	3	1	3	2	0	-	0	0	67	11	81
1999	6	1	2	0	7	0	2	0	6	0	1	0	0	0	29	5	53
2000	8	3	8	2	5	2	4	2	5	0	1	0	1	1	40	27	72
2001	30	8	20	7	12	3	12	0	12	7	2	0	3	3	70	48	161
2002	5	0	2	0	5	1	5	1	1	0	7	4	1	0	12	5	38
2003	0	-	3	1	5	2	4	1	3	1	3	1	3	0	46	34	67
2004	2	0	15	6	8	3	18	8	9	5	6	2	5	2	19	11	82
2005	9	1	13	0	15	0	12	0	9	1	5	1	1	0	16	1	80
2006	3	0	6	0	2	0	2	1	5	2	1	0	0	0	1	0	20
2007	2	0	2	0	5	2	4	0	2	0	3	1	2	0	15	2	35
2008	6	2	8	2	9	3	4	0	4	0	5	2	2	1	8	1	46
2009	4	1	2	0	2	0	1	0	2	0	1	1	2	0	7	1	21
2010	3	0	1	0	1	0	2	1	2	2	3	1	0	0	17	2	29
2011	1	0	0	-	1	0	1	1	1	1	0	-	1	1	15	5	20
2012	1	0	2	1	3	1	0	-	2	2	1	0	0	0	17	13	26
2013	2	0	2	1	2	2	2	0	0	-	3	1	0	0	18	3	29
2014	3	1	1	0	3	2	0	-	0	-	0	-	2	0	10	5	20
2015	0	-	1	1	0	-	3	3	4	2	1	1	1	1	6	1	16
2016	0	-	0	-	3	0	0	-	2	2	7	7	2	2	1	0	15
2017	0	-	4	3	8	7	2	1	4	4	3	2	1	1	4	3	26
2018	0	-	2	2	5	4	1	1	5	5	4	3	4	2	2	2	23
2019	0	-	2	2	6	6	5	4	1	1	3	3	4	2	2	2	23
2020	0	-	1	0	3	1	4	1	1	0	2	1	0	0	0	-	11
Всего Total	724	213	570	190	666	227	480	194	398	163	209	87	76	29	1649	529	4773

Примечание. Те же, что и для табл. 1.
Note is the same as for Table 1.

Таблица 3. Серогрупповой состав положительных результатов реакции микроагглютинации

Table 3. Serogroup composition of positive microagglutination reaction data

Год Year	Серогруппа/Serogroup														Всего Total
	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	<i>Javanica</i>	<i>Canicola</i>	<i>Ballum</i>	<i>Pyrogenes</i>	<i>Cynopteri</i>	<i>Autumnalis</i>	<i>Australis</i>	<i>Pomona</i>	<i>Grippityphosa</i>	<i>Hebdomadis-Sejroe</i>	<i>Bataviae</i>	<i>Tarassovi</i>	Перекрестные реакции Cross-reactions	
1962	0	0	0	0	0	0	0	0	5	1	1	0	1	0	8
1963	1	2	0	0	0	0	0	0	12	4	4	0	8	0	31
1964	1	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	2	0	6
1965	0	0	0	0	0	1	0	0	3	0	0	0	0	0	4
1966	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	3
1967	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	6	15
1968	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	0	0	4
1969	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	3
1970	2	0	0	0	0	0	1	1	1	4	4	0	0	3	16
1971	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	1	2	7
1972	0	0	0	0	0	0	0	2	3	3	1	2	0	3	14
1973	1	1	0	0	1	0	0	2	6	3	1	1	0	2	18
1974	1	2	0	0	0	0	0	7	11	23	2	1	2	9	58
1975	0	0	2	0	0	2	3	2	5	16	4	1	1	5	41
1976	0	1	0	0	0	1	0	0	5	7	0	0	1	5	21
1977	6	0	3	0	0	3	8	9	30	24	12	8	4	32	139
1978	6	0	0	6	0	5	0	17	5	10	2	0	0	16	67
1979	9	0	0	0	0	4	1	1	5	6	2	0	0	2	30
1980	17	5	0	1	0	6	1	10	2	27	4	2	0	11	86
1981	13	41	2	2	0	11	7	7	6	45	13	1	0	37	185
1982	1	0	0	0	0	2	0	5	1	10	5	0	0	0	24
1983	1	1	0	0	0	0	0	3	1	5	0	0	0	2	13
1984	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30	1	0	0	0	31
1985	0	0	0	0	0	0	1	3	0	7	0	2	0	1	14
1986	5	2	2	0	0	1	0	1	1	3	0	1	0	4	20
1987	6	1	0	0	0	2	0	14	10	6	6	0	0	10	55
1988	0	0	2	0	0	1	0	0	8	60	9	1	1	2	84
1989	11	5	1	0	11	2	3	1	14	8	4	0	1	10	71
1990	0	0	1	0	0	0	0	0	1	8	2	0	0	1	13
1991	1	0	0	-	-	-	0	0	0	0	5	0	0	0	6
1992	1	1	12	-	-	-	0	0	0	0	8	2	0	1	25
1993	7	0	8	-	-	-	0	0	0	0	17	4	4	3	43
1994	2	0	3	-	-	-	0	1	0	14	5	0	0	3	28
1995	3	0	0	-	-	-	0	0	0	0	9	0	0	3	15
1996	0	0	2	-	-	-	0	1	2	3	3	0	0	0	11
1997	8	0	0	-	-	-	0	0	0	1	27	1	4	1	42
1998	0	0	4	-	-	-	0	0	0	1	8	0	1	1	15
1999	2	0	0	-	-	-	0	0	0	0	4	0	0	0	6
2000	4	0	0	-	-	-	3	4	1	12	6	0	0	7	37
2001	3	2	2	-	-	-	0	0	2	41	20	0	0	6	76
2002	0	0	2	-	-	-	0	1	1	1	4	0	0	2	11
2003	30	0	1	-	-	-	0	0	1	2	2	0	0	4	40
2004	1	0	0	-	-	-	0	18	0	3	9	0	0	6	37
2005	0	0	0	-	-	-	0	4	0	0	0	0	0	0	4

Окончание таблицы 3. Серогрупповой состав положительных результатов реакции микроагглютинации
 Table 3. Serogroup composition of positive microagglutination reaction data (continued)

Год Year	Серогруппа/Serogroup														Всего Total
	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	<i>Javanica</i>	<i>Canicola</i>	<i>Ballum</i>	<i>Pyrogenes</i>	<i>Cynopteri</i>	<i>Autumnalis</i>	<i>Australis</i>	<i>Pomona</i>	<i>Grippotyphosa</i>	<i>Hebdomadis-Sejroe</i>	<i>Bataviae</i>	<i>Tarassovi</i>	Перекрестные реакции Cross-reactions	
2006	0	0	0	-	-	-	0	0	0	0	2	0	0	1	3
2007	0	0	0	-	-	-	0	2	1	0	1	0	0	1	5
2008	4	0	0	-	-	-	0	0	0	6	1	0	0	0	11
2009	0	0	0	-	-	-	0	0	1	0	0	1	0	1	3
2010	0	1	1	-	-	-	0	2	0	0	2	0	0	0	6
2011	0	0	1	-	-	-	0	1	0	1	5	0	0	0	8
2012	1	0	0	-	-	-	0	2	1	2	9	0	0	2	17
2013	0	0	0	-	-	-	0	0	1	2	4	0	0	0	7
2014	0	0	0	-	-	-	0	1	0	3	3	0	0	1	8
2015	1	0	0	-	-	-	0	0	0	0	2	0	0	6	9
2016	0	1	1	-	-	-	0	3	2	0	3	0	0	1	11
2017	1	0	0	-	-	-	0	9	0	1	8	1	0	1	21
2018	4	0	1	-	-	-	0	3	0	1	9	0	1	2	21
2019	0	0	2	-	-	-	0	3	1	0	12	1	0	3	22
2020	0	0	0	-	-	-	0	0	0	1	1	0	0	1	3
Итого Total	161	66	53	9	12	41	28	148	151	410	266	35	32	220	1632
%	9,87	4,04	3,25	0,55	0,74	2,51	1,72	9,07	9,25	25,12	16,30	2,14	1,96	13,48	100,00

Примечание. С 1991 г. представители серогрупп *Ballum*, *Pyrogenes*, *Cynopteri* были исключены из панели эталонных диагностических штаммов лептоспир и в последующие годы в постановке РМА не использовались.

Note. Since 1991, serogroups *Ballum*, *Pyrogenes*, *Cynopteri* have been excluded from the panel of reference diagnostic strains of *Leptospira* and in subsequent years were not used in RMA.

га резервуарных животных-хозяев (грызуны, крупный и мелкий рогатый скот, лошади и др.), а с другой — устойчивостью лептоспир этой серогруппы к неблагоприятным воздействиям окружающей среды вплоть до возможности перезимовывать в воде открытых водоемов в межсезонный период [3, 7, 8, 21, 36].

Доминирование лептоспир серогруппы *Sejroe* в настоящее время является мировым трендом [4, 13, 30]. Большинство авторов [4, 5, 14, 16, 17] связывают это в основном с двумя факторами. Первым объяснением является более интенсивный, чем в предыдущие годы, рост численности и изменение ареалов грызунов — хозяев возбудителей природноочаговых инфекций [7, 13, 23, 31, 33]. Продолжается воздействие на природные очаги при интенсивной хозяйственной деятельности людей, что приводит к антропогенной трансформации ландшафтов (эрозия почв, образование оврагов, радиационное и химическое загрязнение) [16]. Освоение лесопокрытых территорий в промышленных, сельскохозяйственных и рекреационных целях

привело к значительному замещению исходно-коренных (хвойных и широколиственных) формаций вторичными мелколиственными, а также к фрагментации ранее монолитных лесных территорий и глобальному омоложению лесов, изменениям фитоценозов, что в свою очередь приводит к изменениям кормовой базы для животных и созданию благоприятных условий для воспроизводства мелких млекопитающих. Важный вклад в репродуктивную активность этих животных и расширение их ареалов вносят изменения климатических условий, прежде всего повышение среднегодовой температуры приземного слоя атмосферы [16, 17]. Эти климатические изменения увеличивают число лет с благоприятными условиями для зимовки мелких млекопитающих и для их размножения. Следует напомнить, что лептоспиры сероваров *hebdomadis/sejroe*, в 40-х гг. XX в. относимых к возбудителям лептоспироза VI типа, были впервые обнаружены в странах Восточной Азии (Япония) и на Дальнем Востоке [3, 32], где из-за более мягкой зимы случаи заболевания леп-

тоспирозами часто были не в «классический» сезон. Правда, в дальнейшем лептоспирозы этих сероваров (50–60-е гг. XX в.) чаще всего обнаруживались в странах Западной и Восточной Европы (Германия, Нидерланды, Дания, Польша, Чехословакия) [3]. Поэтому «глобальное потепление» создает более благоприятные условия окружающей среды для более широкого распространения лептоспир этой серогруппы.

Вторым фактором, обеспечивающим доминирование лептоспир серогруппы *Sejroe* в этиологической структуре лептоспирозов, является развитие интеграционных процессов в условиях глобализации экономики. Расширение торгово-экономического сотрудничества, со-

временные быстрые средства транспортировки сельскохозяйственных и животных-компаньонов (в том числе и диких), продуктов питания и кормов, в том числе и продуктов животного и растительного происхождения, ликвидируют прежние географические барьеры для переноса возбудителей болезней человека и животных за пределы эндемичных территорий в страны, где они либо отсутствуют, либо имеют ограниченное распространение [4, 6, 8, 24, 31, 52]. При перемещении между странами в рамках экономических и таможенных союзов (ЕС, ЕАЭЗ) карантинного досмотра на границах стран — членов этих союзов не происходит, что повышает риск заноса возбудителей на новые

Таблица 4. Серогрупповой состав положительных результатов реакции микроагглютинации за пятилетние временные отрезки

Table 4. Serogroup composition of positive microagglutination reaction data for five-year intervals

Год Year	Серогруппа Serogroup													Всего Total	
	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	<i>Javanica</i>	<i>Canicola</i>	<i>Ballum</i>	<i>Pyrogenes</i>	<i>Cynopteri</i>	<i>Autumnalis</i>	<i>Australis</i>	<i>Pomona</i>	<i>Grippityphosa</i>	<i>Hebdomadis-Sejroe</i>	<i>Bataviae</i>	<i>Tarassovi</i>		Перекрестные реакции Cross-reactions
1962–1969	9	2	0	0	0	1	0	3	22	10	5	5	11	6	74
%	12,2	2,7	0,0	0,0	0,0	1,4	0,0	4,1	29,7	13,5	6,8	6,8	14,9	8,1	100
1970–1974	4	3	0	0	1	0	1	16	21	33	8	4	3	19	113
%	3,5	2,7	0,0	0,0	0,9	0,0	0,9	14,2	18,6	29,2	7,1	3,5	2,7	16,8	100
1975–1979	21	1	5	6	0	15	12	30	50	63	20	9	6	60	298
%	7,0	0,3	1,7	2,0	0,0	5,0	4,0	10,1	16,8	21,1	6,7	3,0	2,0	20,1	100
1980–1984	32	47	2	3	0	19	8	25	10	117	23	3	0	50	339
%	9,4	13,9	0,6	0,9	0,0	5,6	2,4	7,4	2,9	34,5	6,8	0,9	0,0	14,7	100
1985–1989	22	8	5	0	11	6	4	19	33	84	19	4	2	27	244
%	9,0	3,3	2,0	0,0	4,5	2,5	1,6	7,8	13,5	34,4	7,8	1,6	0,8	11,1	100
1990–1994	11	1	24	–	–	–	0	1	1	22	37	6	4	8	115
%	9,6	0,9	20,9	–	–	–	0,0	0,9	0,9	19,1	32,2	5,2	3,5	7,0	100
1995–1999	13	0	6	–	–	–	0	1	2	5	51	1	5	5	89
%	14,6	0,0	6,7	–	–	–	0,0	1,1	2,2	5,6	57,3	1,1	5,6	5,6	100
2000–2004	38	2	5	–	–	–	3	23	5	59	41	0	0	25	201
%	18,9	1,0	2,5	–	–	–	1,5	11,4	2,5	29,4	20,4	0,0	0,0	12,4	100
2005–2009	4	0	0	–	–	–	0	6	2	6	4	1	0	3	26
%	15,4	0,0	0,0	–	–	–	0,0	23,1	7,7	23,1	15,4	3,8	0,0	11,5	100
2010–2014	1	1	2	–	–	–	0	6	2	8	23	0	0	3	46
%	2,2	2,2	4,3	–	–	–	0,0	13,0	4,3	17,4	50,0	0,0	0,0	6,5	100
2015–2020	6	1	4	–	–	–	0	18	3	3	35	2	1	14	87
%	6,9	1,1	4,6	–	–	–	0,0	20,7	3,4	3,4	40,2	2,3	1,1	16,1	100
Всего Total	161	66	53	9	12	41	28	148	151	410	266	35	32	220	1632
%	9,9	4,0	3,2	0,6	0,7	2,5	1,7	9,1	9,3	25,1	16,3	2,1	2,0	13,5	100

Примечание. То же, что и для табл. 3.

Note is the same as for Table 3.

территории. Лептоспиры относятся к возбудителям группы высокого риска в отношении вероятности трансграничного перемещения, так как представители более чем 130 родов животных могут служить их потенциальными носителями [4, 6, 52].

Доминирующее положение лептоспир серогруппы *Icterohaemorrhagiae* в отдельные годы можно в какой-то степени объяснить наличием значительного количества сывороток больных, поступивших из Краснодарского края, где лептоспиры этой серогруппы на протяжении многих лет и вплоть до настоящего времени являются ведущими в этиологической структуре заболеваемости лептоспирозами [1, 10, 13, 19]. Так, например, в 2003 г. из 67 исследованных сывороток крови больных 38 (57%) поступили из Краснодарского края, причем среди всех 30 сывороток, положительных в РМА с лептоспирами серогруппы *Icterohaemorrhagiae*, 27 (90%) были из Краснодарского края. В то же время в другие годы доля сывороток из Краснодарского края варьировала от 2 до 6%. В ряде случаев, где доля образцов сывороток крови, поступивших в лабораторию, была значительной (например, 26% в 1988 г.), положительных результатов в РМА с лептоспирами серогруппы *Icterohaemorrhagiae* не было. В последние годы отмечается снижение их вклада в этиологическую структуру заболеваемости [13] в этом регионе. С одной стороны, это может быть связано с общемировым трендом доминирования лептоспир серогруппы *Sejroe*, а с другой — с общим снижением заболеваемости лептоспирозами в данном регионе по причине активной вакцинации больших контингентов людей в условиях стихийных бедствий (наводнения). Для специфической профилактики лептоспирозов у людей с 1999 г. используется концентрированная корпускулярная поливалентная вакцина, разработанная Ростовским НИИ микробиологии и паразитологии [40]. К 2006 г. этой вакциной было привито 500 тыс. человек в 24 субъектах Российской Федерации, причем 80% привитых приходится на ЮФО [6]. Это способствовало снижению заболеваемости лептоспирозами на территории этого округа почти в 3 раза: в 1997 г. на долю ЮФО приходилось 71% случаев лептоспирозов, а в 2011 г. — 25% (Ананьина Ю.В., личное сообщение).

В 60–70-х гг. XX в. в ряде регионов нашей страны среди заболевших лептоспирозом до 95% могло приходиться на лиц, связанных с уходом за сельскохозяйственными животными или с их убоем и производством продуктов животного происхождения. Например, в Ленинградской области доля таких больных составляла 73,3% [14]. Поэтому понятны причины доминирования лептоспир серогрупп

Pomona и *Tarassovi*. В конце 70-х — начале 80-х гг. в связи с ростом популярности отдыха на природе и дачных участках среди больных лептоспирозом началось повышение доли городских жителей и, соответственно, больных лептоспирозом *Grippotyphosa* [14].

Как следует из названия, лептоспиры серогруппы *Australis* были впервые выделены на Австралийском континенте, где их хозяевами были различные виды местных крыс, в том числе и сумчатые (большие и малые бандикоты) [3]. На территории нашей страны лептоспиры этой серогруппы выделялись чаще от ежей (Московская область), реже от свиней [3]. Рост числа случаев лептоспироза *Australis* в начале этого века был отмечен в том числе и нами [30]. В Московской области (в основном в Ступинском районе) было зарегистрировано несколько случаев лептоспироза этой этиологии, в том числе и летальных, у людей, занимавшихся разведением ежей на продажу в качестве животных-компаньонов [30].

Как следует из названия, лептоспиры серогруппы *Javanica* были впервые выделены на острове Ява, где их основными резервуарными хозяевами являлись черные крысы [3]. На территории нашей страны единственными специфическими хозяевами лептоспир этой серогруппы являются насекомоядные — землеройки [35]. В то же время во влажных природных условиях может происходить передача лептоспир от землероек неспецифическим хозяевам, прежде всего обыкновенным полевкам и полевкам-экономкам [35]. От этих грызунов возможно заражение домашнего скота и людей. Однако считается, что лептоспиры серогруппы *Javanica* практически не играют роли в заболеваемости людей, хотя можно сослаться, хотя бы как на казуистику, на описанный нами случай обнаружения лептоспир этой серогруппы в головном мозге больного лептоспирозом [30].

Резкое возрастание процента больных, у которых обнаружены антитела к лептоспирам серогруппы *Canicola* в период 1990–1994 гг., совпадает с ростом числа случаев лептоспироза этой этиологии в указанные годы прежде всего в крупных городах (Москва, Санкт-Петербург) [23, 33, 34]. Многие авторы связывают это с увеличением числа бродячих собак — основных хозяев лептоспир этой серогруппы в городах [24, 30, 33, 34]. В Санкт-Петербурге этому вопросу даже посвятили специальное заседание мэрии.

Представители серогрупп *Autumnalis* и *Bataviae* в данное время не играют серьезной роли в общей структуре заболеваемости лептоспирозами, а лептоспиры серогрупп *Ballum*, *Pyrogenes* и *Cynopteri* с 1991 г. исключены из набора эталонных диагностических штаммов лептоспир, который используется на территории России [39].

Наличие сравнительно большой доли сывороток, положительных в РМА, где наблюдаются перекрестные реакции между антигенами лептоспир нескольких серогрупп (13,5%), с одной стороны, может свидетельствовать о недостатках в проведении диагностики, а с другой — о возможности смешанной лептоспирозной инфекции при заражении в смешанных природных очагах [3].

Следует отметить, что, по данным литературы, в других регионах РФ [4, 12, 15, 23, 25, 26, 37, 38] этиологическая структура лептоспирозов может отличаться от представленной в данной работе, где основной контингент больных представлен жителями Москвы и Московской области. В качестве примера мы провели анализ серогрупповой структуры лептоспирозов на территории региона Москвы и Московской области по данным результатов РМА за последние 5 лет (2016–2020 гг.). За этот период были исследованы сыворотки крови от 98 больных, из них 59 (60%) — жители данного региона. Всего получено 78 положительных результатов РМА, из них 40 (51%) приходится на больных из региона Москвы и Московской области. Процент положительных результатов РМА в общей группе больных и пациентов из данного региона составляет соответственно 80 и 68. Показано, что различия между этими показателями являются статистически значимыми ($p < 0,10$). При исследовании сывороток крови всех больных положительные результаты получены в РМА со штаммами серогрупп *Icterohaemorrhagiae* — 5, *Javanica* — 1, *Canicola* — 4, *Australis* — 18, *Pomona* — 3, *Grippotyphosa* — 3, *Sejroe* — 33, *Bataviae* — 2, *Tarassovi* — 1, перекрестнореагирующие — 8, а жителей Москвы и Московской области, соответственно, 3, 1, 1, 12, 2, 1, 15, 1, 0,4. Следует отметить, что в обеих группах, во-первых, положительные результаты РМА наблюдаются чаще всего со штаммами серогрупп *Sejroe* (42 и 40% соответственно), *Australis* (23 и 30% соответственно) и *Icterohaemorrhagiae* (6 и 8% соответственно), а во-вторых, наблюдается достаточное число случаев перекрестных реакций с лептоспирами нескольких серогрупп (по 10%).

Можно сделать предположение, что различия между представителями различных серогрупп лептоспир по признакам, значимым в клинико-эпидемиологическом контексте, связаны как с различными сочетаниями (наборами) факторов патогенности, так и с особенностями структуры молекул отдельных факторов [7, 13, 29, 41, 48]. Более того, многие гены, кодирующие факторы патогенности у лептоспир, не имеют гомологов в других бактериальных видах [7, 13, 43]. Данные, полученные при секвенировании полных геномов патогенных и сапрофитических лептоспир, а также их отдельных генов [49, 50, 53], обеспечивают основу для сравнения представителей различных таксономических групп.

Дальнейший прогресс в изучении лептоспирозов, как и ряда других природноочаговых инфекций, может быть достигнут при совместном использовании возможностей молекулярно-генетических и эколого-популяционных исследований [17, 48].

Заключение

Таким образом, нами показано, что в отдельные временные периоды происходит изменение вкладов лептоспир отдельных серогрупп в этиологическую структуру заболеваемости лептоспирозами людей. Более глубокое изучение этого вопроса может способствовать оптимизации диагностики (разработке новых методов, внесению изменений в панель эталонных диагностических штаммов лептоспир) и специфической профилактики лептоспирозов.

Соблюдение этических норм

В рамках данной работы эксперименты с животными и людьми не проводились. Сыворотки крови больных поступали в лабораторию из других лечебно-профилактических учреждений.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы/References

1. Авдеева М.Г., Городин В.Н., Пронин М.Г. Лептоспироз: осложнения, причины смерти и патоморфогенез // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2015. Т. 20, № 3. С. 36–46. [Avdeeva M.G., Gorodin V.N., Pronin M.G. Leptospirosis: complications, causes of death and pathomorphogenesis. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni = Epidemiology and Infectious Diseases*, 2015, vol. 20, no. 3, pp. 36–46. (In Russ.)]
2. Ананьин В.В., Карасева Е.В. Лептоспирозы. В кн.: География природно-очаговых болезней человека в связи с задачами их профилактики. Под ред. члена-корр. РАМН проф. Петришевой П.А. и члена-корр. РАМН проф. Олсуфьева Н.Г. М.: Медицина, 1969. С. 56–94. [Ananyin V.V., Karaseva E.V. Leptospiroses. In: Geography of natural focal human diseases in relation to the tasks of their prevention. Eds.: P.A. Petrishcheva, N.G. Olsuf'ev. *Moscow: Medicine*, 1969, pp. 56–94. (In Russ.)]
3. Ананьин В.В., Карасева Е.В. Природная очаговость лептоспирозов. М.: Медгиз, 1961. 290 с. [Ananyin V.V., Karaseva E.V. Natural focal of leptospirosis. *Moscow: Medgiz*, 1961. 290 p. (In Russ.)]

4. Ананьина Ю.В. 1.8. Лептоспирозы. В кн.: Покровский В.И., Онищенко Г.Г., Черкасский Б.Л. Эволюция инфекционных болезней в России в XX веке. Руководство для врачей. М.: Медицина, 2003. С. 167–183. [Ananyina Ju.V. 1.8. Leptospirosis. In: Pokrovsky V.I., Onishchenko G.G., Cherkassky B.L. Evolution of infectious diseases in Russia in the XX century. A guide for physicians. Moscow: Medicine, 2003, pp. 167–183. (In Russ.)]
5. Ананьина Ю.В. 7.6. Лептоспирозы. В кн.: Брико Н.И., Онищенко Г.Г., Покровский В.В. Руководство по эпидемиологии инфекционных болезней. М.: МИА, 2019. Т. 2. С. 104–115. [Ananyina Ju.V. 7.6. Leptospirosis. In: Briko N.I., Onishchenko G.G., Pokrovsky V.V. Guidelines for the epidemiology of infectious diseases. Moscow: MIA, 2019, vol. 2, pp. 104–115. (In Russ.)]
6. Ананьина Ю.В. Лептоспирозы людей и животных: тенденции распространения и проблемы профилактики // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2010. № 2 (51). С. 13–16. [Ananyina Ju.V. Human and animal leptospiroses: prevalence trends and preventive measures. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni = Epidemiology and Infectious Diseases*, 2010, no. 2 (51), pp. 13–16. (In Russ.)]
7. Ананьина Ю.В. Паразитические и свободноживущие лептоспиры // Зоологический журнал. 2010. Т. 89, № 1. С. 48–49. [Ananyina Ju.V. Parasitic and free-living Leptospira (Leptospiraceae): ecological and genetic features. *Zoologicheskij zhurnal = Zoological Journal*, 2010, vol. 89, no. 1, pp. 48–49. (In Russ.)]
8. Ананьина Ю.В. Природно-очаговые бактериальные зоонозы: современные тенденции эпидемического проявления // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2002. № 6. С. 86–90. [Ananyina Ju.V. Bacterial zoonoses with natural focality: current trends in epidemic manifestation. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2002, no. 6, pp. 86–90. (In Russ.)]
9. Ананьина Ю.В., Самсонова А.П. Межвидовое и внутривидовое разнообразие лептоспир: молекулярно-генетические и экологические аспекты // Вестник Российской академии медицинских наук. 2000. № 1. С. 18–21. [Ananyina Ju.V., Samsonova A.P. Interspecific and intraspecific diversity of leptospira: molecular genetic and ecological aspects. *Vestnik Rossijskoi akademii meditsinskikh nauk = Herald of the Russian Academy of Sciences*, 2000, no. 1, pp. 18–21. (In Russ.)]
10. Ананьина Ю.В., Самсонова А.П., Лебедев В.В., Петров Е.М., Есипов Е.Н. Генодиагностика острой и персистентной лептоспирозной инфекции // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2002. № 4. С. 23–26. [Ananyina Ju.V., Samsonova A.P., Lebedev V.V., Petrov E.M., Esipov E.N. Genodiagnosics of acute and persistent leptospirosis infection. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2002, no. 4, pp. 23–26. (In Russ.)]
11. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Госуд. изд-во медицинской литературы, 1962. 180 с. [Ashmarin I.P., Vorobiev A.A. Statistical methods in microbiological research. Leningrad: State Publishing House of Medical Literature, 1962. 180 p. (In Russ.)]
12. Бренева Н.В., Балахонов С.В., Алленов А.В., Борзов В.П., Громова Т.В., Демьянова Н.А., Медведева Н.В. Клинико-эпидемиологические особенности лептоспирозов в Сибири и на Дальнем Востоке // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2018. № 3. С. 62–67. [Breneva N.V., Balakhonov S.V., Allenov A.V., Borzov V.P., Gromova T.V., Demyanova N.A., Medvedeva N.V. Clinical and epidemiological features of leptospirosis in Siberia and the Far East. *Infeksionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie = Infectious Diseases: News, Views, Education*, 2018, no. 3, pp. 62–67. (In Russ.)]
13. Горodin В.Н., Мойсова Д.Л., Бахтина В.А., Зотов С.В. Тренды современного лептоспироза // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2018, Т. 23, № 2. С. 93–100. [Gorodin V.N., Moissova D.L., Bakhtina V.A., Zotov S.V. Trends of contemporary leptospirosis (review of literature). *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni = Epidemiology and Infectious Diseases*, 2018, vol. 23, no. 2, pp. 93–100. (In Russ.)] doi: 10.18821/1560-9529-2018-23-2-93-100
14. Дайтер А.Б. Природно-очаговые инфекции в урбанизированных ландшафтах // Паразитология. 1985. Т. 19, № 3. С. 169–175. [Daiter A.B. Natural focal infections in urbanized landscapes. *Parazitologiya = Parasitology*, 1985, vol. 19, no. 3, pp. 169–175. (In Russ.)]
15. Жукова Л.И., Рафеев Г.К., Никишина Т.Ф., Лешева Г.А., Мкртчян Т.О., Ванюков А.А., Куккоев С.П. Клинико-эпидемиологическая характеристика лептоспироза в Краснодарском крае в многолетней динамике // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2010. № 6. С. 15–20. [Zhukova L.I., Rafeyenko G.K., Nikishina T.F., Leshcheyeva G.A., Mkrтчян M.O., Vanyukov A.A., Kukkojev S.P. Long-term trends in the clinical and epidemiological characteristics of leptospirosis in the Krasnodar territory. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni = Epidemiology and Infectious Diseases*, 2010, no. 6, pp. 15–20. (In Russ.)]
16. Захаров И.А. Экологическая генетика и современные проблемы биосферы // Успехи современной биологии. 2020. Т. 140, № 2. С. 107–115. [Zakharov I.A. Ecological genetics and modern problems of biosphere. *Uspekhi sovremennoi biologii = Advances in Current Biology*, 2020, vol. 140, no. 2, pp. 107–115. (In Russ.)] doi: 10.31857/S0042132420020118
17. Коренберг Э.И. Природная очаговость инфекций: современные проблемы и перспективы исследований // Зоологический журнал. 2010, Т. 89, № 1. С. 5–17. [Korenberg E.I. Natural focus of infections: current problems and research prospects. *Zoologicheskij zhurnal = Zoological Journal*, 2010, vol. 89, no. 1, pp. 5–17. (In Russ.)]
18. Лакин В.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. 296 с. [Lakin V.F. Biometrics. Moscow: Higher School, 1990. 296 p. (In Russ.)]
19. Лебедев В.В., Авдеева М.Г., Шубич Ю.В., Ананьина Ю.В., Турьянов И.Х., Лучшев В.И. Иктерогеморрагический лептоспироз. Краснодар: Советская Кубань, 2001. 208 с. [Lebedev V.V., Avdeeva M.G., Shubich Yu.V., Ananina Yu.V., Turyanov I.Kh., Luchshev V.I. Icterohemorrhagic leptospirosis. Krasnodar: Soviet Kuban, 2001. 208 p. (In Russ.)]
20. Лебедев В.В., Авдеева М.Г., Горodin В.Н., Мойсова Д.Л., Ананьина Ю.В., Сологуб Т.В., Мартынов В.А., Лиознов Д.А., Антонова Т.В., Лучшев В.И., Самсонова А.П., Шестакова И.В. Лептоспироз у взрослых. Национальные клинические рекомендации. М.: Национальное Научное Общество Инфекционистов, 2014. 96 с. [Lebedev V.V., Avdeeva M.G., Gorodin V.N., Moissova D.L., Ananina Ju.V., Sologub T.V., Martynov V.A., Lioznov D.A., Antonova T.V., Luchshev V.I., Samsonova A.P., Shestakova I.V. Leptospirosis in adults. National clinical guidelines. Moscow: National Scientific Society of Infectionists, 2014. 96 p. (In Russ.)]
21. Лептоспирозы людей и животных. Под ред. Ананьина В.В. М.: Медицина, 1971. 352 с. [Leptospirosis in humans and animals. Ed. V.V. Ananyin. Moscow: Medicine, 1971. 352 p. (In Russ.)]

22. Лесников С.М., Токаревич К.Н. Лептоспирозы. М.: Медицина, 1982. 152 с. [Lesnikov S.M., Tokarevich K.N. Leptospirosis. Moscow: Medicine, 1982. 152 p. (In Russ.)]
23. Майорова С.О., Стоянова Н.А., Токаревич Н.К., Федуняк И.П. Клинико-эпидемиологические особенности лептоспирозной инфекции в Санкт-Петербурге // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2007. № 1. С. 12–14. [Mayorova S.O., Stoyanova N.A., Tokarevich N.K., Fedunyak I.P. Clinical and epidemiological features of leptospirosis infection in St. Petersburg. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni = Epidemiology and Infectious Diseases*, 2007, no. 1, pp. 12–14. (In Russ.)]
24. Малахов Ю.А., Панин А.Н., Соболева Г.Л. Лептоспироз животных. Ярославль: ДиаПресс, 2001. 584 с. [Malakhov Yu.A., Panin A.N., Soboleva G.L. Leptospirosis of animals. Yaroslavl: DiaPress, 2001. 584 p. (In Russ.)]
25. Маненкова Г.М., Родина Л.В., Тимошков В.В., Голованова В.П. Эпидемиология и эпизоотология лептоспирозов в Московском мегаполисе // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2003. № 1. С. 32–35. [Manenkova G.M., Rodina L.V., Timoshkov V.V., Golovanova V.P. Epidemiology and epizootology of leptospirosis in Moscow megapolice. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2003, no. 1, pp. 14–18. (In Russ.)]
26. Самарина И.В., Котенев Е.С., Ковальчук И.В., Поздняков П.М., Чеботарева Е.Н., Куличенко А.Н. Эпидемиолого-эпизоотологическая обстановка по лептоспирозам в Ставропольском крае // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2014. № 1. С. 14–18. [Samarina I.V., Kotenev E.S., Kovalchuk I.V., Pozdnyakov P.M., Chebotareva E.N., Kulichenko A.N. Epidemiological and epizootological on leptospiroses in Stavropol region. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni. Aktual'nye voprosy = Epidemiology and Infectious Diseases. Current Items*, 2014, no. 4, pp. 14–18. (In Russ.)]
27. Самсонова А.П., Аксенов М.Ю., Гаровникова Ю.С., Савельева О.В., Ананьина Ю.В., Гинцбург А.Л. Метод полимеразной цепной реакции в изучении гостальной персистенции патогенных лептоспир // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 1994. № 1. С. 19–23. [Samsonova A.P., Aksenov M.Yu., Garovnikova Yu.S., Savelyeva O.V., Ananyina Ju.V., Gintsburg A.L. The method of polymerase chain reaction in the study of the guest persistence of pathogenic leptospira. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya = Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 1994, no. 1, pp. 19–23. (In Russ.)]
28. Самсонова А.П., Петров Е.М., Вышивкина Н.В., Ананьина Ю.В. Новый методический подход к изучению персистенции лептоспир при смешанной лептоспирозной инфекции // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2003. № 4. С. 37–39. [Samsonova A.P., Petrov E.M., Vyshivkina N.V., Ananyina Ju.V. A new methodological approach to studying the persistence of leptospira in mixed leptospirosis infection. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2003, no. 4, pp. 37–39. (In Russ.)]
29. Самсонова А.П., Петров Е.М., Аляпкина Ю.С., Земская М.С., Ананьина Ю.В. Распространенность гена, кодирующего липопротеин наружной мембраны (LipL32) у лептоспир различных таксонов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2006. № 4. С. 29–32. [Samsonova A.P., Petrov E.M., Alyapkina Yu.S., Zemskaya M.S., Ananyina Yu.V. Prevalence of the gene encoding the outer membrane lipoprotein LIPL32 in leptospires of different taxons. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2006, no. 4, pp. 29–32. (In Russ.)]
30. Самсонова А.П., Петров Е.М., Савельева О.В., Шарапова Н.Е. Роль лабораторных методов в эпидемиологических исследованиях и диагностике лептоспирозов // Клиническая лабораторная диагностика. 2021. Т. 66, № 4. С. 61. [Samsonova A.P., Petrov E.M., Savelyeva O.V., Sharapova N.E. Role of laboratory methods in epidemiological researches and leptospirosis diagnostics. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2021, vol. 66, iss. 4, p. 61. (In Russ.)]
31. Соболева Г.Л., Ананьина Ю.В., Непоклонова И.В. Актуальные вопросы лептоспироза людей и животных // Российский ветеринарный журнал. 2017. № 8. С. 14–18. [Soboleva G.L., Ananyina Y.V., Nepoklonova I.V. Actual problems of human and animal leptospirosis. *Rossiyskiy veterinarnyy zhurnal = Russian Veterinary Journal*, 2017, no. 8, pp. 13–17. (In Russ.)]
32. Терских В.И. Лептоспирозы людей и животных М.: Медгиз, 1945. 108 с. [Terskiikh V.I. Leptospirosis of humans and animals. Moscow: Medgiz, 1945. 108 p. (In Russ.)]
33. Терских В.И., Коковин И.Л. Лептоспирозные заболевания людей. М.: Медицина, 1964. 268 с. [Terskiikh V.I., Kokovin I.L. Leptospirotic diseases of people. Moscow: Medicine, 1964. 268 p. (In Russ.)]
34. Токаревич Н.К., Стоянова Н.А. Эпидемиологические аспекты антропогенного влияния на эволюцию лептоспирозов // Инфекция и иммунитет. 2011. Т. 1, № 1. С. 67–76. [Tokarevich N.K., Stoyanova N.A. Epidemiological aspects of anthropogenic influence to leptospirosis evolution. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2011, vol. 1, no. 1, pp. 67–76. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2011-1-67-76
35. Хляп Л.А. Землеройки (Soricidae) как хозяева возбудителей бактериальных природноочаговых болезней человека // Зоологический журнал. 1989. Т. LXVIII, вып. 3. С. 89–98. [Khlyap L.A. Shrews (Soricidae) as hosts of pathogens of human natural focal bacterial diseases. *Zoologicheskij zhurnal = Zoological Journal*, 1989, vol. LXVIII, no. 3, pp. 89–98. (In Russ.)]
36. Чернуха Ю.Г., Ананьина Ю.В. Специфичность взаимоотношений паразит-хозяин в природно-очаговых системах. В кн.: Проблемы инфектологии. Под ред. С.В. Прозоровского. М.: Медицина, 1992. С. 330–335. [Chernukha Ju.G., Ananina Yu.V. The specificity of the parasite-host relationship in natural focal systems. In: Problems of Infectology. Moscow: Medicine, 1992, pp. 330–335. (In Russ.)]
37. Чупрунова С.В., Алешковская Е.С., Ситников И.Г., Зайцева Л.Л., Шалепо Е.В. Эпидемиологические особенности лептоспирозов в Ярославской области // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2018, Т. 8, № 4. С. 24–29. [Chuprunova S.V., Aleshkovskaya E.S., Sitnikov I.G., Zaitseva L.L., Shalepo E.V. Epidemiological features of leptospirosis in the Yaroslavl Region. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni. Aktual'nye voprosy = Epidemiology and Infectious Diseases. Current Items*, 2018, vol. 8, no. 4, pp. 24–29. (In Russ.)] doi: 10.18565/epidem.2018.4.24-29
38. Чупрунова С.В., Алешковская Е.С., Ситников И.Г. Клинические особенности лептоспирозов в Ярославской области // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2020. Т. 10, № 4. С. 57–62. [Chuprunova S.V., Aleshkovskaya E.S., Sitnikov I.G. Clinical features of leptospirosis in the Yaroslavl Region. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni. Aktual'nye voprosy = Epidemiology and Infectious Diseases. Current Items*, 2020, vol. 10, no. 4, pp. 57–62. (In Russ.)] doi: 10.18565/epidem.2020.10.4.57-62

39. Эпидемиология, диагностика и профилактика заболеваний людей лептоспирозами. Методические указания МУ 3.1.1128. М.: Минздрав России, 2002. 44 с. [Epidemiology, diagnosis and prevention of human diseases with leptospirosis. Methodical instructions MU 3.1.1128. Moscow: Ministry of Health of Russia, 2002. 44 p. (In Russ.)]
40. Яговкин Э.А., Костина Н.И., Вачаев Б.Ф., Романцова Т.П., Кондратенко В.Ф., Бунин И.Е., Гольденштейн З.А., Ананьина Ю.В. Совершенствование иммунобиологических противолептоспирозных препаратов. Экспериментальное изучение новой концентрированной очищенной вакцины против иктерогеморрагического лептоспироза для иммунизации людей // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1990. № 2. С. 47–51. [Yagovkin E.A., Kostina N.I., Vachaev B.F., Romantsova T.P., Kondratenko V.F., Bunin I.E., Goldenshtein Z.A., Ananyina Yu.V. Improvement of immunobiological preparation against leptospirosis. Experimental study of a new vaccine against icterohemorrhagic leptospirosis for humans. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 1990, no. 2, pp. 47–51. (In Russ.)]
41. Adler B. Leptospira and leptospirosis. *Vet. Microbiol.*, 2016, vol. 140, no. 3–4, pp. 287–296. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.03.012
42. Ananyina Yu.V., Petrov E.M., Samsonova A.P., Zemskaya M.S., Shaginyan I.A. Ecological and genetic diversity within the Leptospiraceae family: implication for epidemiology. In: *Molecular Biology of Spirochetes. IOS Press. Science series, 2006, pp. 200–207.*
43. Costa F., Hagan J.E., Calcagno J., Kane M., Torgerson P., Martinez-Silveira M.S. Global morbidity and mortality of leptospirosis: a systematic review. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2015, vol. 9, no. 9, pp. 1–19. doi: 10.1371/journal.pntd.0003898
44. Cutler S.J., Fooks F.R., van der Poel H.M. Public health threat of new, reemerging and neglected zoonoses in the industrial world. *Emerg. Infect. Dis.*, 2010, vol. 16, no. 1, pp. 1–7. doi: 10.3201/eid1601.081467
45. Fiecek B., Lewandowska G., Rogulska U., Chmielewski T. Leptospirosis in Poland in the years 2014–2017 — characteristics of infections and epidemiological surveillance data. *Przegl. Epidemiol.*, 2018, vol. 72, no. 3, pp. 303–312. doi: 10.32394/pe.72.3.7
46. Gouveia E.L., Metcalfe J., de Carvalho A.L.F., Aires T.S., Villasboas Bisneto J.C., Queirroz A. Leptospirosis-associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome. *Emerg. Infect. Dis.*, 2008, vol. 14, pp. 505–508. doi: 10.3201/eid1403.071064
47. Hookey J.V. Detection of Leptospiraceae by amplification of 16S ribosomal DNA. *FEMS Microbiol. Lett.* 1992, vol. 90, pp. 267–274. doi: 10.1016/0378-1097(92)90659-c
48. Ko A.I., Goarant C., Picardeau M. Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2009, no. 7, pp. 736–747. doi: 10.1038/nrmicro2208
49. Nascimento A.L.T.O., Ko A.L., Martins E.A.L., Monteiro-Vitorello C.B., Ho P.L. Comparative genomics of two Leptospira interrogans serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. *J. Bacteriol.*, 2004, vol. 186, no. 7, pp. 2164–2172. doi: 10.1128/JB.186.7.2164-2172.2004
50. Nascimento A.L.T.O., Verjovski-Almeida S., Van Sluys M.A., Monteiro-Vitorello C.B. Genome features of Leptospira interrogans serovar Copenhageni. *Brazil. J. Med. Biol. Res.*, 2004, vol. 37, pp. 459–478. doi: 10.1590/s0100-879x2004000400003
51. Paster B.J., Dewhirst F.E., Weisburg W.G., Tordoff L.A., Frazer G.J. Phylogenetic analysis of the Spirochetes. *J. Bacteriol.*, 1991, vol. 173, no. 19, pp. 6101–6109. doi: 10.1128/jb.173.19.6101-6109.1991
52. Pavlin B.I., Scholorgel L.V., Daszak P. Risk of importing zoonotic diseases through wildlife trade. *Emerg. Infect. Dis.*, 2009, vol. 15, no. 11, pp. 1721–1726. doi: 10.3201/eid1511.090419
53. Picardeau M., Bulach D.M., Bouchier C. Sequence of the saprophyte Leptospira biflexa provides insights into the evolution of Leptospira and the pathogenesis of leptospirosis. *PLoS One*, 2008, vol. 3, no. 2: 1607. doi: 10.1371/journal.pone.0001607
54. Raoult D., Jenndel P., Kongier Y., Noilloux M., Angler C. Leptospire a L. icterohaemorrhagiae avec encephalite grave et hémoculture positive de la maladie. *Med. Malad. Infect.*, 1982, vol. 12, no. 5, pp. 292–294. doi: 10.1016/S0399-077X(82)80032-2
55. Terpstra W.J. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. Geneva: World Health Organization and International Leptospirosis Society, 2003. 110 p.

Авторы:

Самсонова А.П., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории лептоспирозов ФГБУ Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия;
Петров Е.М., научный сотрудник лаборатории лептоспирозов ФГБУ Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия;
Савельева О.В., научный сотрудник лаборатории лептоспирозов ФГБУ Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия;
Иванова А.Е., лаборант-исследователь лаборатории лептоспирозов ФГБУ Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия;
Шарапова Н.Е., к.б.н., руководитель лаборатории лептоспирозов ФГБУ Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия.

Authors:

Samsonova A.P., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Leptospirosis, N.F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;
Petrov E.M., Researcher, Laboratory of Leptospirosis, N.F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;
Savelyeva O.V., Researcher, Laboratory of Leptospirosis, N.F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;
Ivanova A.E., Clinical Research Assistant, Laboratory of Leptospirosis, N.F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;
Sharapova N.E., PhD (Biology), Head of the Laboratory of Leptospirosis, N.F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 29.06.2021
 Отправлена на доработку 03.11.2021
 Принята к печати 29.12.2021

Received 29.06.2021
 Revision received 03.11.2021
 Accepted 29.12.2021

SEROPREVALENCE OF TICK-BORNE DISEASES IN THE NORTHWEST FEDERAL DISTRICT OF THE RUSSIAN FEDERATION

N.K. Tokarevich^a, O.V. Blinova^a, N.A. Stoyanova^a, R.R. Baimova^a, E.A. Siuziumova^a, V.I. Lomonosova^a, A.A. Tronin^b, R.V. Buzinov^c, O.V. Sokolova^c, B.R. Gnativ^d, L.V. Buts^e, L.A. Bubnova^f, O.S. Safonova^f, A.I. Stankevich^g, E.L. Kalinina^h, R. Vikseⁱ, A.K. Andreassenⁱ

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

^b Scientific Research Centre for Ecological Safety of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences (SPC RAS), St. Petersburg, Russian Federation

^c Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare in Arkhangelsk Oblast, Arkhangelsk, Russian Federation

^d Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare in the Republic of Komi, Syktyvkar, Russian Federation

^e Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare in Leningrad Oblast, St. Petersburg, Russian Federation

^f Center of Hygiene and Epidemiology in the Karelia Republic, Petrozavodsk, Russian Federation

^g Center of Hygiene and Epidemiology in Pskov Oblast, Pskov, Russian Federation

^h Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare in Pskov Oblast, Pskov, Russian Federation

ⁱ Norwegian Institute of Public Health, Oslo, Norway

Abstract. *Introduction.* Knowledge about tick-borne disease (TBD) distribution is necessary to improve prevention, whereas detection of human serum IgG antibodies against relevant pathogens is a method for monitoring TBD prevalence in local population. The study objective was to estimate seroprevalence of IgG antibodies against tick-borne encephalitis virus (TBEV), *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Coxiella burnetii*, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Ehrlichia chaffeensis/E. muris* in healthy residents from the five territories of the Northwestern Federal District of the Russian Federation (Arkhangelsk Oblast, Leningrad Oblast, Pskov Oblast, the Republic of Komi and the Republic of Karelia). *Materials and methods.* In 2017–2019, a total of 1244 serum samples from healthy residents, not vaccinated against TBDs or other flavivirus-caused infections was studied by ELISA. *Results.* 21.7% of the sera samples contained IgG antibodies against a single TBD pathogen, whereas 2.1% showed signs of coinfection with two or more pathogens. The most common were IgG antibodies against TBEV (5 territories, 12.2%), followed by *Borrelia burgdorferi sensu lato* (5 territories, 3.5%), *C. burnetii* (4 territories, 2.9%), *Anaplasma phagocytophilum* (3 territories, 1.6%), *E. chaffeensis/E. muris* (5 territories, 1.5%). The IgG antibodies were more common in men (55.2%) than in women (44.8%), being found virtually evenly in age-independent manner (from juniors under 18 to seniors over 60). *Conclusion.* The results of this first comprehensive serosurveillance study in the Northwestern Federal District of the Russian Federation assessing serum IgG antibodies against tick-borne diseases in-

Адрес для переписки:

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

Contacts:

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

Для цитирования:

Токаревич Н.К., Блинова О.В., Стоянова Н.А., Бaimова Р.Р., Сюзюмова Е.А., Ломоносова В.И., Тронин А.А., Бузинов Р.В., Соколова О.В., Гнатив Б.Р., Буц Л.В., Бубнова Л.А., Сафонова О.С., Станкевич А.И., Калинина Е.Л., Виксе Р., Андреассен А.К. Серопревалентность клещевых заболеваний в Северо-Западном федеральном округе Российской Федерации // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 5. С. 891–901. doi: 10.15789/2220-7619-SOT-1953

Citation:

Tokarevich N.K., Blinova O.V., Stoyanova N.A., Baimova R.R., Siuziumova E.A., Lomonosova V.I., Tronin A.A., Buzinov R.V., Sokolova O.V., Gnativ B.R., Buts L.V., Bubnova L.A., Safonova O.S., Stankevich A.I., Kalinina E.L., Vikse R., Andreassen A.K. Seroprevalence of tick-borne diseases in the Northwest Federal District of the Russian Federation // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 5, pp. 891–901. doi: 10.15789/2220-7619-SOT-1953

dicating a wide distribution of such pathogens. Moreover, infections caused by *C. burnetii*, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Ehrlichia chaffeensis*/*E. muris* might be highly underdiagnosed.

Key words: seroprevalence, antibodies, tick-borne encephalitis, Lyme disease, human granulocytic anaplasmosis, human monocytic ehrlichiosis, Q fever, European North of Russia.

СЕРОПРЕВАЛЕНТНОСТЬ КЛЕЩЕВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ В СЕВЕРО-ЗАПАДНОМ ФЕДЕРАЛЬНОМ ОКРУГЕ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Токаревич Н.К.¹, Блинова О.В.¹, Стоянова Н.А.¹, Баймова Р.Р.¹, Сюсюмова Е.А.¹, Ломоносова В.И.¹, Тронин А.А.², Бузинов Р.В.³, Соколова О.В.³, Гнатив Б.Р.⁴, Буц Л.В.⁵, Бубнова Л.А.⁶, Сафонова О.С.⁶, Станкевич А.И.⁷, Калинина Е.Л.⁸, Виксе Р.⁹, Андреассен А.К.⁹

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

² Научно-исследовательский центр экологической безопасности Российской академии наук, Санкт-Петербургский федеральный исследовательский центр Российской академии наук (НИЦ РАН), Санкт-Петербург, Россия

³ Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Архангельской области, г. Архангельск, Россия

⁴ Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Республике Коми, г. Сыктывкар, Россия

⁵ Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Ленинградской области, Санкт-Петербург, Россия

⁶ ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии Республики Карелия, г. Петрозаводск, Россия

⁷ ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в Псковской области, г. Псков, Россия

⁸ Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Псковской области, г. Псков, Россия

⁹ Норвежский институт общественного здравоохранения, Осло, Норвегия

Резюме. *Введение.* Знание распространения клещевых заболеваний необходимо для улучшения их профилактики, а выявление IgG-антител к их возбудителям в сыворотках крови человека является методом мониторинга распространенности клещевых заболеваний среди местного населения. Цель исследования: изучение серопревалентности практически здорового населения Архангельской, Ленинградской, Псковской, областей, Республик Коми и Карелии, расположенных на европейском Севере России, в отношении вируса КЭ, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Coxiella burnetii*, *Anaplasma phagocytophilum* и *Ehrlichia chaffeensis*/*E. muris*. *Материалы и методы.* Всего было исследовано 1244 сыворотки крови практически здоровых лиц, постоянно проживающих на данной территории, не вакцинированных против клещевого энцефалита и других инфекций, вызываемых флавивирусами, профессия которых не связана с риском заражения клещевыми инфекциями. Сыворотки крови доноров исследовали методом ELISA. *Результаты.* Установлено, что в 21,7% образцах исследованных сывороток, полученных от жителей всех анализируемых территорий, обнаружены антитела класса IgG к возбудителям различных инфекций, передающихся клещами, в том числе в 26 пробах — одновременно к двум и более патогенам. В сыворотках жителей республик Коми и Карелия, а также Ленинградской области выявлены антитела ко всем исследованным антигенам, в сыворотках жителей Архангельской области — антитела к вирусу клещевого энцефалита, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *C. urnetiid* и *E. chaffeensis*/*E. muris* а в сыворотках жителей Псковской области — антитела к вирусу клещевого энцефалита, *Borrelia burgdorferi sensu lato* и *E. chaffeensis*/*E. muris*. У мужчин IgG-антитела к клещевым инфекциям определялись чаще (55,2%), чем у женщин (44,8%). IgG-антитела к клещевым инфекциям были определены практически равномерно у жителей всех возрастов от детского (до 18 лет) до пожилого (старше 60 лет). *Обсуждение.* Представленные результаты первого комплексного обследования жителей европейского Севера России на наличие в их сыворотках крови IgG-антител к клещевым инфекциям, свидетельствует о широком распространении этих инфекций и, вероятно, о существенной гиподиагностике инфекций, вызываемых *C. urnetiid*, *Anaplasma phagocytophilum* и *Ehrlichia chaffeensis*/*E. muris*.

Ключевые слова: серопревалентность, антитела, клещевой энцефалит, болезнь Лайма, гранулоцитарный анаплазмоз человека, моноцитарный эрлихиоз человека, Ку-лихорадка, Европейский Север России.

Introduction

TBDs are among important drivers of habitat quality, public and herd health, as well as the epidemiological safety of the local population [5]. Recent social changes and stronger anthropogenic impacts on abiotic components of landscapes may contrib-

ute to the evolution of those infections [1, 24]. In this regard, any advance in understanding of TBDs real distribution within a territory is of great importance for prevention of these diseases.

TBD incidence rate is an important factor that defines prophylaxis volume and methods within an administrative unit. However, it does not always re-

flect to a full degree the real spread of TBD, since that depends much on the awareness of the local population, their health seeking behavior, availability and quality of medical care, qualification of medical personnel, availability of laboratory diagnostics, etc. There is a high risk of underdiagnosis since most of the human TBDs appear as subclinical forms [5]. Many patients are asymptomatic or experience mild symptoms and, as a rule, do not seek medical help, thus reducing the reported incidence rate. However, the absence of pronounced symptoms does not exclude the probability of chronic TBD course, resulting in disability or even fatal outcome [1, 8, 24, 48]. Knowledge of TBDs actual distribution is necessary to improve its effective prevention in the area. The detection of IgG antibodies to TBD pathogens in blood sera of humans is a method for indicating the real level of infection in the local population.

Among all TBDs it is TBE that poses the most socially important problem in the Russian Federation, being diagnosed in 46 subdivisions. At least 1508 cases of TBE were reported in 2018, including 153 in children under 14. TBE incidence rate was 1.3 per 100 thousand inhabitants; in 98% of cases the disease developed after tick bites. Twenty two cases of TBE were fatal; i.e. the infection case fatality rate was 0.7% [8].

In 1996–2017, in Komi, in the European North of Russia, the TBE case fatality rate was 2.3% [28].

The incidence of both TBE and LD remains rather high in Northwestern Federal District of the Russian Federation (NWFDRF) [1, 3, 10, 12, 49]. For example, from 2006–2017 in Komi, the average TBE incidence rate ran to 1.4, while that of LD was 0.8 [1].

HGA, HME and Q fever are practically not recorded in the European north of Russia, although in some cases they are responsible for irreversible damage to the internal organs and disability of patients [5].

The choice of territories under study of human sera derives from the northward spread of ixodid ticks in the European north of Russia [10]. Such expansion in the tick's geographic range contributes to favorable conditions for TBDs distribution.

The objective of our work was to study the seroprevalence of IgG antibodies against TBEV, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Coxiella burnetii*, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Ehrlichia chaffeensis/E. muris* in the healthy population of NWFDRF: in the Arkhangelsk Oblast (AO), Leningrad Oblast (LO), Pskov Oblast (PO), Republic of Komi and Republic of Karelia. The purpose was to study the variation in seroprevalence of these indicators in different territories and whether there are age and gender differences.

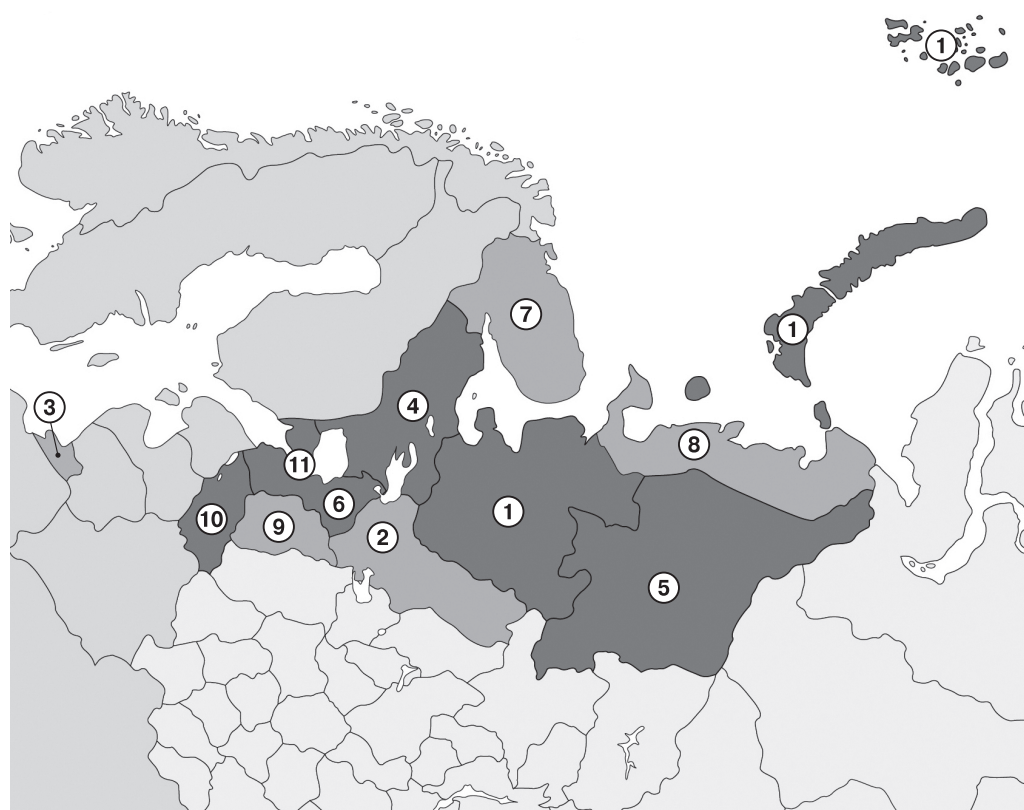


Figure. Administrative divisions of the Northwestern Federal District

Note. 1 — Arkhangelsk Oblast, 2 — Vologda Oblast, 3 — Kaliningrad Oblast, 4 — Republic of Karelia, 5 — Komi Republic, 6 — Leningrad Oblast, 7 — Murmansk Oblast, 8 — Nenets Autonomous District, 9 — Novgorod Oblast, 10 — Pskov Oblast, 11 — St. Petersburg. The surveyed divisions (1, 4, 5, 6, 10) are highlighted in dark grey.

Table 1. Distribution of donors by gender, by age, and by territory of residence

Territory of residence	Number of donors	Gender		Age (years)					
		Male	Female	< 18	18–29	30–39	40–49	50–59	> 60
Republic of Komi	659	246	413	3	62	108	126	150	210
Republic of Karelia	292	148	144	0	35	109	95	45	8
AO	103	24	79	5	12	16	23	19	28
PO	98	42	56	0	21	23	35	17	2
LO	92	36	56	50	18	24	0	0	0
Total	1244	496	748	58	148	280	279	231	248

Materials and methods

The blood serum of healthy donors was sampled in 5 administrative divisions of NWFDRF: Komi, Karelia, AO, LO, PO. The territory of NWFDRF involves numerous islands, however, all samples were collected in mainland territory only. Figure shows a map of NWFDRF with the designation of its administrative units.

Blood was sampled in 2018–2019 after informed voluntary consent of donors and based on their personal data (Table 1). The inclusion criteria were as follows: good health at study entry; no professional risk of TBD acquisition; no history of vaccination against TBD and/or other infections caused by flaviviruses; no manifest forms of TBD; no diseases or conditions that affect the results of serological studies; residence in the territory under study and no trips out of it for several years at least.

Blood was sampled from the cubital vein into vacuum tubes, followed by centrifugation (10 min,

3000 rpm), freezing and storage of sera at -70°C . Subsequent transportation of the material was carried out in compliance with the “cold chain”. All sera samples were analyzed by ELISA with commercial test systems for detection of:

- IgG antibodies to TBEV – “VectoVKE-IgG” (CJSC “Vector-Best”, Novosibirsk),
- IgG antibodies to *Borrelia burgdorferi sensu lato* – “LimeBest” (CJSC “Vector-Best”, Novosibirsk),
- IgG antibodies to *Coxiella burnetii*, “Anti-Q” (Pasteur Institute, St. Petersburg),
- IgG antibodies to *Anaplasma phagocytophilum* – “GACH-ELISA-IgG” (LLC “Omnix”, St. Petersburg),
- IgG antibodies to *Ehrlichia chaffeensis/E. muris* – “MECH-IFA-IgG” (LLC “Omnix”, St. Petersburg).

All sera samples were tested according to the manufacturer’s manuals. The test results were classified as positive, negative, or borderline according

Table 2. IgG antibodies to TBD pathogens in sera of NWFDRF residents

Territory of residence	Number of samples	IgG-antibody-positive samples (number of positive/seroprevalence, %)						
		Antibody-positive to any TBD pathogens	Tick-borne encephalitis virus	<i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i>	<i>C. burnetii</i>	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	<i>E. chaffeensis/E. muris</i>	Antibodies against 2 or more TBD pathogens
Republic of Komi	659	149/22.6	83/12.6	21/3.2	23/3.5	15/2.3	7/1.1**	15/2.3
Republic of Karelia	292	59/20.2	38/13.0	9/3.1	9/3.1	1/0.3	2/0.7	5/1.7
AO	103	15/14.6	7/6.8	2/1.9*	1/1.0	0	5/4.9**	1/1.0
PO	98	19/19.4	11/11.2	5/5.1	0	0	3/3.1	2/2.0
LO	92	28/30.4	13/14.1	6/6.5*	3/3.3	4/4.3	2/2.2	3/3.3
Total	1244	270/21.7	152/12.2	43/3.5	36/2.9	20/1.6	19/1.5	26/2.1

Note. When comparing the seroprevalence rates of IgG antibodies against TBD pathogens significant differences were found: *in relation to *Borrelia burgdorferi sensu lato* in AO and LO: the corresponding value of Fisher’s criterion is 1.651 (while for $p = 0.01$ the critical value is 1.450); **in relation to *E. chaffeensis/E. muris* in Komi and AO: the corresponding Fisher’s criterion is 2.244 (while the critical value for $p = 0.01$ is 1.450).

to the instructions enclosed in the diagnostic systems. Considering the probability of false positive results due to the common antigenic sites of some antigens, any borderline results were regarded as negative. In addition, for a more objective assessment of the results on TBEV, all sera containing IgG antibodies to TBEV according to VectoVKE-IgG system (CJSC Vector-Best, Novosibirsk, Russia) were simultaneously studied using the test system Enzygnost® Anti-TBE/FSME Virus (IgG) (Siemens Healthcare, GmbH, Marburg, Germany), both with specificity 99.5% according to the manufacturer's manual.

The distribution of our sera donors by gender, age and territory of residence is shown in Table 1.

Results

In this study 1244 sera samples were tested for TBD pathogens. The parallel studies of 152 sera samples analysed for IgG antibodies to TBEV by VectoVKE-IgG were confirmed by Enzygnost® Anti-TBE Virus (IgG). The results of detection of IgG antibodies to the TBD pathogens *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Coxiella burnetii*, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Ehrlichia chaffeensis/E. muris* are shown in Table 2.

From the 1244 studied sera samples IgG antibodies to TBD pathogens were detected in 270 (21.7%), where 26 (2.1%) samples contained antibodies to more than one pathogen. The overall seroprevalence was highest in LO (30.4%), then followed by Komi (22.6%), Karelia (20.2%), PO (19.4%) and AO (14.6%). IgG antibodies to all five TBD pathogens (TBEV, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *C. burnetii*, *Anaplasma phagocytophilum* and *E. chaffeensis/E. muris*) were found in sera samples from Komi, Karelia and LO. In AO we revealed antibodies to four (TBEV, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *C. burnetii* and *E. chaffeensis/E. muris*), while in PO only to three of them (TBEV, *Borrelia burgdorferi sensu lato* and *E. chaffeensis/E. muris*).

The number of samples from each territory was not sufficient to conclude on statistically significant differences in frequency of antibodies to the pathogens in this study.

However, from Table 2 the seroprevalence of IgG antibodies to TBEV and *Borrelia burgdorferi sensu lato* was 2.1 and 3.4 times higher in LO than in AO, respectively, while in Komi, Karelia and PO the percent of antibody-positive samples for these pathogens essentially did not differ, except for a slightly higher prevalence of *Borrelia* in PO and LO. In other territories the seroprevalence of IgG antibodies to TBEV did not vary significantly.

The highest seroprevalence to *A. phagocytophilum* was recorded in LO, to *E. chaffeensis/E. muris* the highest prevalence was detected in AO, and for *C. burnetii* IgG antibody seroprevalence in Karelia, Komi and LO was nearly the same.

IgG antibodies to all studied TBD pathogens were detected more often in men (55.2%) than in women (44.8%). The difference is especially demonstrated for IgG antibodies to TBEV where seroconversion was 15.7% in men, while only 9.9% in women.

In our study IgG antibodies to TBD did not depend considerably on the donor's age, being nearly the same for juniors (< 18 years) and seniors (> 60 years). However, IgG antibodies to *B. burgdorferi sensu lato* and *A. phagocytophilum* were detected in juniors somewhat more often than in seniors. IgG antibodies to *Coxiella burnetii* were highest in seniors (> 50 years), while IgG antibodies to *Borrelia* and *Anaplasma*, on the contrary, were highest in the youngest group (< 18 years) (see Table 3).

Discussion

Ixodid ticks are among the most important vectors of human TBDs, including TBE, LD, HGA and HME [4, 30]. The epidemiological profiles of those TBDs are nearly similar. Therefore, in the majority of cases IgG antibodies against TBEV, *B. burgdorferi sensu lato*, *A. phagocytophilum*, and *E. chaffeensis/E. muris* are indicative of frequent exposure to infected ticks within the studied territories. Seroprevalence is indicative of both the activity in TBD natural foci and the risk of infection in the local population [5]. On the contrary, the probability of catching Q fever directly from ixodid ticks is insignificant [25]; therefore, the IgG antibodies against

Table 3. Age distribution of donors with IgG antibodies to TBD pathogens

TBD pathogen	IgG antibody-positive/all donors; percent of antibody-positive (%)						
	< 18 n = 58	18–29 n = 148	30–39 n = 280	40–49 n = 279	50–59 n = 231	> 60 n = 248	Total n = 1244
TBEV	6/10.3%	19/12.8%	39/13.9%	39/14.0%	24/10.4%	25/10.1%	152/12.2%
<i>B. burgdorferi sensu lato</i>	4/6.9%	3/2.0%	11/3.9%	8/2.9%	8/3.5%	9/3.6%	43/3.5%
<i>A. phagocytophilum</i>	3/5.2%	2/1.4%	1/0.4%	4/1.4%	4/1.7%	6/2.4%	20/1.6%
<i>E. chaffeensis/E. muris</i>	2/3.4%	5/3.4%	1/0.4%	4/1.4%	3/1.3%	4/1.6%	19/1.5%
<i>C. burnetii</i>	1/1.7%	4/2.7%	5/1.8%	6/2.2%	9/3.9%	11/4.4%	36/2.9%

C. burnetii are more indicative of Q fever anthro-pogenic foci activity. The role of ixodid ticks in the *C. burnetii* distribution is largely due to the infection of wild, agricultural and domestic animals. In addition, these blood-sucking arthropods infected with *C. burnetii* feed on migratory birds that transfer the infection to virgin territories [17, 52].

Here we present our first comprehensive sero-survey of humans in five administrative units of the NWFDRF for the presence of IgG antibodies against TBEV, *B. burgdorferi sensu lato*, *A. phagocytophilum* and *E. chaffeensis/E. muris* and *C. burnetii*. The results indicate that the proportion of TBD-infected populations in different territories varies.

Our results on the seroprevalence of IgG anti-body to TBEV in AO (6.8%) and in Komi (12.6%) are close to those reported earlier (7.9% and 13.7%, respectively) [10, 51]. The index varies much de-pending on the territory under study. E.g., in the south of AO, it reached 20.9% [10]. Seroprevalence being the result of a permanent dynamic process depends both on the activity of TBD natural foci and the frequency of humans' exposure. An illustrative example is the increased seroprevalence of IgG anti-bodies to TBEV in the population of Komi be-tween 2001 and 2013 from 3.5% to 13.7%, prob-ably due to climatic changes [49], that favor both northward expanding of tick geographic ranges and exposure of local inhabitants to infected tick bites [51]. An increase in TBEV seroprevalence is typical not only for the North of Russia; a simi-lar trend has been observed in some regions of the Czech Republic [35].

Here we studied the seroprevalence of IgG anti-bodies to TBEV in the healthy population of the Northwestern Russia, while researchers in Europe focus mostly on occupationally-risk groups. However, in many European countries the reported TBEV-seroprevalence in high risk occupationally exposed groups is much less (e.g., only 2.3% in France [43]), than that of healthy donors in NWFDRF, where the seroprevalence is 12.2%. Serosurveillance of 1213 healthy donors in Western Norway showed little to no TBEV prevalence among local residents [31]. Similar results were obtained from a survey of healthy do-nors in other areas (Vestfold and Telemark coun-ties) in Norway. Only 0.4% of them had antibodies to TBEV [36, 38].

Our findings on seroprevalence of IgG antibod-ies to *B. burgdorferi sensu lato*. In NWFDRF (3.5%) do not differ much from those reported in other European countries. E.g., in Belgium *B. burgdor-feri sensu lato* seroprevalence in a healthy population of blood donors was 2.6–2.9% [21].

HGA must be classified as an emerging in-fection in NWFDRF. HGA was first diagnosed in 1990 in Wisconsin (USA) in a patient with a tick bite history and severe febrile illness [18]. However, under-diagnosis of HGA is typical for many coun-

tries, including USA [40]. The incidence of human HGA cases in Europe is lower (estimated under 300) than reported from the USA, where a steady increase has been reported since 2001, with more than 15,000 accumulated cases until 2015 [16]. HGA cases have now been reported from Austria, Croatia, France, Italy, Latvia, the Netherlands, Norway, Poland, Slovenia, Spain, and Sweden [37, 39]. There is an incongruence between human seroprevalence and observed clinical cases that might arise from incomplete diagnosis, or a high rate of asymptomatic infections [41]. In Russia, as well as in other European countries, HGA is rarely registered. In many territories of Russia, where ticks infected with *A. phagocytophilum* were found, HGA is not diagnosed [9]. A similar situ-ation is observed in NWFDRF, where *A. phago-cytophilum* was also found in ticks [26], and HGA is not diagnosed in humans either. It is possible that HGA patients are given a different diagno-sis, for example, "Flu" or "fever of unknown etio-logy." The discrepancy between the relatively high seroprevalence rates for *A. phagocytophilum* (4.3% in LO), and the lack of diagnosis of this infection in humans in NWFDRF, revealed by us, is prob-ably due to the wide spread of asymptomatic forms of this disease and the imperfection of its diag-nosis [41]. Despite the obviously ubiquitous pres-ence of *A. phagocytophilum* in ticks and various wild and domestic animals in the European North of Russia [26], the reported HGA clinical cases are very rare, and territories with *A. phagocytophilum*-infected ticks are much more numerous than those with a few registered HGA cases [41]. However, in S.P. Botkin hospital in St. Petersburg antibod-ies to HGA were detected in 16 of 934 tick-bitten febrile patients, while no other antibodies to TBD pathogens (TBEV or *B. burgdorferi sensu lato*) were found. In two of these 16 patients an increase in IgG antibodies to *A. phagocytophilum* was re-corded which, along with the clinical picture and pre-existing tick bites, made it possible to diag-nose HGA. In Europe rather high HGA seropreval-ence rate was detected in TBE-suspected patients: 30.96% in Belgium [20], 25% in Slovakia [34], 16.28% in donors in Norway [31], 11.4–28% in Sweden [40, 46], and 3.5–9.4% in Poland [19, 53]. According to our findings the average level of HGA seroprevalence in the healthy popula-tion of NWFDRF was 1.6% (though 4.3% in LO) that is less than in most of the European countries mentioned above. This comparatively low sero-prevalence, on the one hand, may stem from lower *A. phagocytophilum* prevalence in the territories un-der study; on the other hand, it may be due to dif-ferent methods of antibodies detection and differ-ences in the surveyed contingents. To detect IgG antibodies to *A. phagocytophilum* in Europe the IFA assay was mostly applied to survey "occupational

risk” groups, while here we used ELISA and applied it in healthy donors without “occupational risk”. However, in our opinion, even the relatively low figures for *A. phagocytophilum* seroprevalence in LO, Komi and Karelia substantiate the need to examine tick-bitten febrile patients for the presence of antibodies to *A. phagocytophilum*.

HME, despite its clinical resemblance to HGA, is characterized by more severe course and a higher mortality rate [24]. HME is widespread in the southeastern, southern, central, and mid-Atlantic parts of the United States. In 2015, *E. chaffeensis* infection was reported in 35 states, with most numerous cases in Missouri, Arkansas, New York, and Virginia. In the European Union, *E. chaffeensis* is not subject to registration [37], however, HME cases have been reported in Serbia [15], Czech Republic, Denmark, Sweden, and other countries [28], but those findings are fragmentary. In the Russian regions diagnosis of HME cases are rare compared to detection of *E. chaffeensis/E. muris* in ticks [1]. However, our earlier serological studies revealed the HME occurrence in the North-West of Russia: e.g., in the healthy population of St. Petersburgs outskirts the seroprevalence of IgG antibodies to *E. chaffeensis/E. muris* was 4.4% [50].

In this study the seroprevalence of IgG antibodies to *E. chaffeensis/E. muris* in average was 1.5%. It was revealed in all territories under study and varied from 0.7% (in Karelia) to 4.9% (AO). Those findings are consistent with an earlier communication on detection of IgG antibodies to *E. chaffeensis/E. muris* in the sera of 23.3% of febrile patients hospitalized in Arkhangelsk city after tick bites [50].

Q fever is diagnosed in humans and animals, and its natural or household foci are identified practically all over the world, with the possible exception for New Zealand [14]. Not all countries have mandatory registration of Q fever incidence, however, the infection is usually diagnosed where appropriate research is carried out [33]. In Europe, Q fever is regularly notified in many countries, e.g., in Bulgaria, France and Germany [27]. The largest known Q fever outbreak reported to date involved approximately 4,000 human cases (25 fatal) and occurred during 2007–2010 in the Netherlands [22, 25, 44]. In the NWFDRF, a large outbreak of Q fever was recorded at the end of 20th century [2].

In our study, IgG antibodies to *C. burnetii* were detected in all studied territories, with the exception for PO, while in Karelia, Komi and LO it was rather high (> 3%).

However, Q fever is not diagnosed in NWFDRF in recent years, and only one Q fever case was diagnosed in LO in 2017–2019.

Among the reasons for Q fever under-diagnosis is the difficulty of its clinical recognition due to pronounced polymorphism of the disease manifestations and the absence of pathognomonic symptoms.

Significant under-diagnosis of Q fever causes irrational treatment, resulting in chronicity. Chronic Q fever is a very frequent outcome of the disease. For example, in the south of France 5–8% of all endocarditis cases are caused by *C. burnetii* [48]. Such development of the disease in humans is often fatal [42].

Comparison of IgG antibody seroprevalence in LO (3.3%) with the same long-term indicator in the city of St. Petersburg (0.4%) [6] lends indirect support to the view that ixodid ticks play a relatively small role in *C. burnetii* infection in humans. The overwhelming majority of St. Petersburg residents annually spend their recreation time in LO and tick-bitten by ixodid ticks [12]. However, the IgG antibody seroprevalence in the city residents is much lower than in the LO population, because a larger part of the LO population tend to temporary be in contact with animals at livestock enterprises or private farms compared to city residents.

In our study, IgG antibodies to TBDs were detected in humans of various ages, from children (< 18 years) to the elderly (> 60 years). Similar findings are available for Russia as a whole [7]. The age dependence of seroprevalence was insignificant.

The most significant gender differences in seroprevalence rates were related to TBE.

In men, the seroprevalence of IgG antibodies to TBEV exceeded that in women, probably to a certain extent due to their exposure to ticks during traditional out-of-doors occupations (fishing, hunting, hiking, etc.).

Analysis of modern literature on infections transmitted by ixodid ticks suggests that any disease resulting from tick bites should be considered as a potential mixed infection. Coinfection of two or more pathogens during the disease development complicates the diagnosis of mixed infections [4]. It was found that in northwestern Russia, mixed infection without pronounced clinical manifestations occurs 7.6 times more often than with the development of the clinical picture of diseases [11, 13]. In our study, antibodies to two or more pathogens were detected in 2.1% of sera samples, and as a rule, those were IgG antibodies to TBEV and *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Our findings do not allow us to determine whether people were infected with those two pathogens simultaneously or from different tick bites. Although, considering the pathogens ability to persist in a human body, it can be assumed that individuals with coinfections may have a greater risk of chronicity.

When testing sera by the ELISA methods one cannot completely exclude the possibility of false-positive results. To minimize this risk in our study we interpreted the borderline results as negative, and similar results from two different test systems in parallel was required to conclude that a sample was positive.

However, for our purpose, the absolute figures are less important than the variation in seroprevalence of those indicators in different territories, and in persons of different ages and gender.

Conclusions

A sizable portion (on average 21.7%) of NWFDRF population is infected with TBD pathogens. The percent of infected population varies significantly depending on the territory. The presence of IgG antibodies to TBD pathogens in the sera of humans in the absence of reported incidence is indicative of underdiagnosis of those TBDs. The discrepancy between our findings on seroprevalence and the reported TBDs prevalence is largely due to the absence of pathognomonic symptoms in these diseases, its mild, asymptomatic clinical course in some cases, and insufficient laboratory diagnostics. Significant underdiagnosis of TBDs as a consequence of irrational treatment results in chronic course and lethality, therapeutic misconception, erroneous ideas about the real distribution of TBDs and the lack of proper alertness of medical staff to those diseases.

References

- Гнатив Б.Р., Токаревич Н.К. Результаты многолетнего мониторинга клещевого вирусного энцефалита и клещевого боррелиоза в Республике Коми // *Инфекция и иммунитет*. 2021. Т. 11, № 4. С. 707–722. [Gnativ B.R., Tokarevich N.K. Long-term monitoring of tick-borne viral encephalitis and tick-borne borreliosis in the Komi Republic. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2021, vol. 11, no. 4, pp. 707–722. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-ROL-1299
- Дайтер А.Б., Рыбакова Н.А., Токаревич Н.К., Самитова В.И., Лимин Б.В. Эпидемиологическая проекция внутристадных очагов лихорадки Ку // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 1988. Т. 11. С. 51–56. [Daïter A.B., Rybakova N.A., Tokarevich N.K., Samitova V.I., Limin B.V. An epidemiologic projection of foci of Q fever within herds. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 1988, vol. 11, pp. 51–56. (In Russ.)]
- Карташов М.Ю., Микрюкова Т.П., Кривошеина Е.И., Кузнецов А.И., Глушкова Л.И., Корабельников И.В., Егорова Ю.И., Терновой В.А., Локтев В.Б. Генотипирование возбудителей клещевого энцефалита и лихорадки Кемерово в таежных клещах, собранных в Республике Коми // *Инфекция и иммунитет*. 2020. Т. 10, № 1. С. 159–166. [Kartashov M.Yu., Mikryukova T.P., Krivosheina E.I., Kuznetsov A.I., Glushkova L.I., Korabel'nikov I.V., Egorova Yu.I., Ternovoi V.A., Loktev V.B. Genotyping of tick-borne encephalitis and Kemerovo viruses in taiga ticks collected in the Komi Republic. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2020, vol. 10, no. 1, pp. 159–166. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-GOT-1147
- Конькова-Рейдман А.Б., Злобин В.И. Клинический полиморфизм иксодовых клещевых боррелиозов (микст-инфекция с клещевым энцефалитом) на территории Южно-Уральского региона России // *Сибирский медицинский журнал*. 2011. № 1. С. 17–19. [Kon'kova-Reidman A.B., Zlobin V.I. Clinical polymorphism of Ixodes tick-borne borrelioses (mixed infection with tick-borne encephalitis) on the territory of South-Ural Region of Russia. *Sibirskij medicinskij zurnal (Irkutsk) = Siberian Medical Journal (Irkutsk)*, 2011, vol. 1, pp. 17–19. (In Russ.)]
- Коренберг Э.И., Помелова В.Г., Осин Н.С. Природноочаговые инфекции, передающиеся иксодовыми клещами / Под ред. А.Л. Гинцбурга и В.Н. Злобина. М.: Наука, 2013. 464 с. [Korenberg E.I., Pomelova V.G., Osin N.S. Infections with natural focality transmitted by ixodid ticks. Eds: A.L. Ginzburg, V.N. Zlobin. *Moscow: Nauka*, 2013. 463 p. (In Russ.)]
- Краева Л.А., Токаревич Н.К., Лаврентьева И.Н., Рошина Н.Г., Кафтырева Л.А., Кунилова Е.С., Курова Н.Н., Стоянова Н.А., Антипова А.Ю., Сварваль А.В., Зуева Е.В., Порин А.А., Рогачева Е.В., Желтакова И.Р., Хамитова И.В., Тимофеева Е.В., Беспалова Г.И. Инфицированность трудовых мигрантов из Средней Азии и постоянных жителей Санкт-Петербурга возбудителями различных инфекционных заболеваний и восприимчивость к ним // *Инфекция и иммунитет*. 2018. Т. 8, № 1. С. 61–70. [Kraeva L.A., Tokarevich N.K., Lavrentyeva I.N., Roshchina N.G., Kaftyreva L.A., Kuniilova E.S., Kurova N.N., Stoyanova N.A., Antipova A.Yu., Svarval A.V., Zueva E.V., Porin A.A., Rogacheva E.V., Zheltakova I.R., Khamitova I.V., Timofeeva E.V., Bepalova G.I. Infection of labour migrants from Central Asia and residents of St. Petersburg and their susceptibility to various infectious diseases. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2018, vol. 8, no. 1, pp. 61–70. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2018-1-61-70
- Никитин А.Я., Андаев Е.И., Носков А.К., Пакскина Н.Д., Яценко Е.В., Веригина Е.В., Балахонов С.В. Особенности эпидемиологической ситуации по клещевому вирусному энцефалиту в Российской Федерации в 2017 г. и прогноз ее развития на 2018 г. // *Проблемы особо опасных инфекций*. 2018. Т. 1. С. 44–49. [Nikitin A.Ya., Andaev E.I., Noskov A.K., Pakskina N.D., Yatsenko E.V., Verigina E.V., Balakhonov S.V. Features of the epidemiological situation on tick-borne viral encephalitis in the Russian Federation in 2017 and forecast of its development in 2018. // *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2018. T. 1. S. 44–49.]

Men are infected with TBDs more often than women. However, people, starting from children (< 18 years old) to the elderly (> 60 years old) were found to be infected with TBD pathogens almost evenly irrespective of age. Infection with two or more TBD pathogens was detected in 2.1% of the surveyed humans.

The detection of IgG antibodies to TBD pathogens in the northern territories, where TBDs never had been diagnosed, confirms indirectly the northward expansion of tick habitats [10, 46, 51]. Similar expansion of ixodid tick habitats has also been observed in other countries of the Northern Europe [32, 45, 47]. Of particular concern is the health of the indigenous population of the North, who historically had never been exposed to ticks and more vulnerable to tick-borne infections [29].

Acknowledgments

The project has been partially funded by the Norwegian Ministry of Health and Care services, Barents Program, Project number B1710.

- Pakskina N.D., Yatsmenko E.V., Verigina E.V., Balakhonov S.V. Peculiarities of the epidemiological situation on tick-borne viral encephalitis in the Russian Federation in 2017 and the forecast for 2018. *Problemy osobo opasnykh infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2018, vol. 1, pp. 44–49. (In Russ.) doi: 10.21055/0370-1069-2018-1-44-49
8. Носков А.К., Андаев Е.И., Никитин А.Я., Пакскина Н.Д., Яцменко Е.В., Веригина Е.В., Толмачева М.И., Балахонov С.В. Заболеваемость клещевым вирусным энцефалитом в субъектах Российской Федерации. Сообщение 1: Эпидемиологическая ситуация по клещевому вирусному энцефалиту в 2018 г. и прогноз на 2019 г. // Проблемы особо опасных инфекций. 2019. Т. 1. С. 74–80. [Noskov A.K., Andaev E.I., Nikitin A.Ya., Pakskina N.D., Yatsmenko E.V., Verigina E.V., Tolmacheva M.I., Balakhonov S.V. Tick-borne viral encephalitis morbidity rates in the constituent entities of the Russian Federation. Communication 1. Epidemiological situation on tick-borne viral encephalitis in 2018 and forecast for 2019. *Problemy osobo opasnykh infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2019, vol. 1, pp. 74–80. (In Russ.) doi: 10.21055/0370-1069-2019-1-74-80
 9. Проворова В.В., Краснова Е.И., Хохлова Н.И., Савельева М.А., Филимонова Е.С., Кузнецова В.Г. Старые и новые клещевые инфекции в России // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2019. Т. 8, № 2. С. 102–112. [Provorova V.V., Krasnova E.I., Khokhlova N.I., Savel'eva M.A., Filimonova E.S., Kuznetsova V.G. Tissue infections in Russia. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie = Infectious Diseases: News, Opinions, Training*, 2019, vol. 8, no. 2, pp. 102–112. (In Russ.) doi: 10.24411/2305-3496-2019-12013
 10. Соколова О.В., Чашин В.П., Попова О.Н., Бузинов Р.В., Пасынкова М.М., Гудков А.Б. Эпидемиологические особенности распространения клещевого вирусного энцефалита в Архангельской области // Экология человека. 2017. Т. 24, № 4. С. 12–19. [Sokolova O.V., Chashchin V.P., Popova O.N., Buzinov R.V., Pasynkova M.M., Gudkov A.B. Epidemiological character of tick-borne viral encephalitis extension in the Arkhangelsk Region. *Ekologiya cheloveka = Human Ecology*, 2017, vol. 4, pp. 12–19. (In Russ.) doi: 10.33396/1728-0869-2017-4-12-19
 11. Субботина Н.С., Доршакова Н.В., Петрова А.В. Эпидемиологическая характеристика клещевого энцефалита в Северо-Западном регионе России // Экология человека. 2007. № 7. С. 15–19. [Subbotina N.S., Dorshakova N.S., Petrova A.V. Epidemiological characteristic of tick-borne encephalitis in North-West region of Russia. *Ekologiya cheloveka = Human Ecology*, 2007, vol. 7, pp. 15–19. (In Russ.)
 12. Сюзюмова Е.А., Тельнова Н.В., Шапарь А.О., Асланов Б.И., Стоянова Н.А., Токаревич Н.К. Эколого-эпидемиологическая характеристика клещевого энцефалита в Санкт-Петербурге // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 3. С. 533–542. [Suziumova E.A., Telnova N.V., Shapar A.O., Aslanov B.I., Stoyanova N.A., Tokarevich N.K. Ecological and epidemiological characteristics of tick-borne encephalitis in St. Petersburg. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2020, vol. 10, no. 3, pp. 533–542. (In Russ.) doi: 10.15789/2220-7619-EAE-924
 13. Усков А.Н., Байгеленов К.Д., Бургасова О.А., Гринченко Н.Е. Современные представления о диагностике клещевых инфекций // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). 2008. Т. 7. С. 148–152. [Uskov A.N., Baygelenov K.D., Burgasova O.A., Grintchenko N.E. Present view on diagnostics of tick-borne infections. *Sibirskij medicinskij zhurnal (Irkutsk) = Siberian Medical Journal (Irkutsk)*, 2008, vol. 7, pp. 148–152. (In Russ.)
 14. Angelakis E., Raoult D. Q Fever. *Vet. Microbiol.*, 2010, vol. 140, no. 3–4, pp. 297–309. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.07.016
 15. Arsić B., Gligić A., Ristanović E., Lako B., Potkonjak A., Perunčić M., Pavlović M. A case of human monocytic ehrlichiosis in Serbia. *Srp. Arh. Celok. Lek.*, 2014, vol. 142, no. 1–2, pp. 79–82. doi: 10.2298/sarh1402079a
 16. Bakken J.S., Dumler J.S. Human granulocytic anaplasmosis. *Infect. Dis. Clin. North Am.*, 2015, vol. 29, no. 2, pp. 341–355. doi: 10.1016/j.idc.2015.02.007
 17. Berthová L., Slobodník V., Slobodník R., Olekšák M., Sekeyová Z., Svitálková Z., Kazimírová M., Špitalská E. The natural infection of birds and ticks feeding on birds with Rickettsia spp. and Coxiella burnetii in Slovakia. *Exp. Appl. Acarol.*, 2016, vol. 68, no. 3, pp. 299–314. doi: 10.1007/s10493-015-9975-3
 18. Chen S.M., Dumler J.S., Bakken J.S., Walker D.H. Identification of a granulocytotropic Ehrlichia species as the etiologic agent of human disease. *J. Clin. Microbiol.*, 1994, vol. 32, no. 3, pp. 589–595. doi: 10.1128/jcm.32.3.589-595.1994
 19. Chmielewska-Badora J., Moniuszko A., Żukiewicz-Sobczak W., Zwoliński J., Piątek J., Pancewicz S. Serological survey in persons occupationally exposed to tick-borne pathogens in cases of co-infections with Borrelia burgdorferi, Anaplasma phagocytophilum, Bartonella spp. and Babesia microti. *Ann. Agric. Environ. Med.*, 2012, vol. 19, no. 2, pp. 271–274.
 20. Cochez C., Ducoffre G., Vandenvelde C., Luyasu V., Heyman P. Human anaplasmosis in Belgium: a 10-year seroepidemiological study. *Ticks Tick Borne Dis.*, 2011, vol. 2, pp. 156–159. doi: 10.1016/j.ttbdis.2011.06.004
 21. De Keukeleire M., Vanwambeke S.O., Cochez C., Heyman P., Fretin D., Deneys V., Luyasu V., Kabamba B., Robert A. Seroprevalence of Borrelia burgdorferi, Anaplasma phagocytophilum, and Francisella tularensis infections in Belgium: results of three population-based samples. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 2017, vol. 17, no. 2, pp. 108–115. doi: 10.1089/vbz.2016.1954
 22. De Rooij M.M., Borlée F., Smit L.A., de Bruin A., Janse I., Heederik D.J., Wouters I.M. Detection of Coxiella burnetii in ambient air after a large Q fever outbreak. *PLoS One*, 2016, vol. 11, no. 3: e0151281. doi: 10.1371/journal.pone.0151281
 23. Dumler J.S., Dotevall L., Gustafson R., Granström M. A population-based seroepidemiologic study of human granulocytic ehrlichiosis and Lyme borreliosis on the west coast of Sweden. *J. Infect. Dis.*, 1997, vol. 175, no. 3, pp. 720–722. doi: 10.1093/infdis/175.3.720
 24. Dumler J.S., Madigan J.E., Pusterla N., Bakken J.S. Ehrlichioses in humans: epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and treatment. *Clin. Infect. Dis.*, 2007, vol. 45, suppl. 1: S45–51. doi: 10.1086/518146
 25. Eldin C., Mélenotte C., Mediannikov O., Ghigo E., Million M., Edouard S., Mege J.L., Maurin M., Raoult D. From Q fever to Coxiella burnetii infection: a paradigm change. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2017, vol. 30, no. 1, pp. 115–190. doi: 10.1128/CMR.00045-16
 26. Eremeeva M.E., Oliveira A., Moriarity J., Robinson J.B., Tokarevich N.K., Antyukova L.P., Pyanyh V.A., Emeljanova O.N., Ignatjeva V.N., Buzinov R., Pyankova V., Dasch G.A. Detection and identification of bacterial agents in Ixodes persulcatus

- Schulze ticks from the north western region of Russia. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 2007, vol. 7, no. 3, pp. 426–436. doi: 10.1089/vbz.2007.0112
27. Georgiev M., Afonso A., Neubauer H., Needham H., Thiery R., Rodolakis A., Roest H., Stark K., Stegeman J., Vellema P., van der Hoek W., More S. Q fever in humans and farm animals in four European countries, 1982 to 2010. *Euro Surveill.*, 2013, vol. 18, no. 8: 20407.
 28. Gratz N.G., World Health Organization. The vector-borne human infections of Europe: their distribution and burden on public health. *Copenhagen: WHO Regional Office for Europe*, 2004. 144 p.
 29. Hedlund C., Blomstedt Y., Schumann B. Association of climatic factors with infectious diseases in the Arctic and subarctic region — a systematic review. *Glob. Health Action*, 2014, vol. 7: 24161. doi: 10.3402/gha.v7.24161
 30. Heyman P., Cochez C., Hofhuis A., van der Giessen J., Sprong H., Porter S.R., Losson B., Saegerman C., Donoso-Mantke O., Niedrig M., Papa A. A clear and present danger: tick-borne diseases in Europe. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.*, 2010, vol. 8, no. 1, pp. 33–50. doi: 10.1586/eri.09.118
 31. Hjetland R., Henningson A.J., Vainio K., Dudman S.G., Grude N., Ulvestad E. Seroprevalence of antibodies to tick-borne encephalitis virus and Anaplasma phagocytophilum in healthy adults from western Norway. *Infect. Dis. (Lond.)*, 2015, vol. 47, no. 1, pp. 52–56. doi: 10.3109/00365548.2014.959044
 32. Jaenson T.G., Hjertqvist M., Bergstrom T., Lundkvist A. Why is tick-borne encephalitis increasing? A review of the key factors causing the increasing incidence of human TBE in Sweden. *Parasit Vectors*, 2012, vol. 5: 184. doi: 10.1186/1756-3305-5-184
 33. Kazar J. Coxiella burnetii infection. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2005, vol. 1063, pp. 105–114. doi: 10.1196/annals.1355.018
 34. Kocianová E., Košťanová Z., Štefanidesová K., Špitalská E., Boldiš V., Hučková D., Stanek G. Serologic evidence of Anaplasma phagocytophilum infections in patients with a history of tick bite in central Slovakia. *Wien Klin. Wochenschr.*, 2008, vol. 120, pp. 427–431. doi: 10.1007/s00508-008-1000-y
 35. Kříž B., Kott I., Daniel M., Vráblík T., Beneš Č. Impact of climate changes on the incidence of tick-borne encephalitis in the Czech Republic in 1982–2011. [In Czech.] *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.*, 2015, vol. 64, pp. 24–32.
 36. Larsen A.L., Kanestrøm A., Bjørland M., Andreassen A., Soleng A., Vene S., Dudman S.G. Detection of specific IgG antibodies in blood donors and tick-borne encephalitis virus in ticks within a non-endemic area in southeast Norway. *Scand. J. Infect. Dis.*, 2014, vol. 46, no. 3, pp. 181–184. doi: 10.3109/00365548.2013.865140
 37. Madison-Antenucci S., Kramer L.D., Gebhardt L.L., Kauffman E. Emerging tick-borne diseases. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2020, vol. 33, no. 2: e00083-18. doi: 10.1128/CMR.00083-18
 38. Marvik A., Tveten Y., Pedersen A.-B., Stiasny K., Andreassen A.K., Grude N. Low prevalence of tick-borne encephalitis virus antibodies in Norwegian blood donors. *Infect. Dis.*, 2021, vol. 53, no. 1, pp. 44–51. doi: 10.1080/23744235.2020.1819561
 39. Matei I.A., Estrada-Peña A., Cutler S.J., Vayssier-Taussat M., Varela-Castro L., Potkonjak A., Zeller H., Mihalca A.D. A review on the eco-epidemiology and clinical management of human granulocytic anaplasmosis and its agent in Europe. *Parasit. Vectors*, 2019, vol. 12: 599. doi: 10.1186/s13071-019-3852-6
 40. Mendell N.L., Reynolds E.S., Blanton L.S., Hermance M.E., Londoño A.F., Hart C.E., Quade B.R., Esterly A.T., Hendrix C.B., Teel P.D., Bouyer D.H., Thangamani S. Detection of Rickettsiae, Borreliae, and Ehrlichiae in ticks collected from Walker County, Texas, 2017–2018. *Insects*, 2019, vol. 10, no. 10: 315. doi: 10.3390/insects10100315
 41. Nordberg M. Tick-borne infections in humans: aspects of immunopathogenesis, diagnosis and co-infections with Borrelia burgdorferi and Anaplasma phagocytophilum. *Sweden: Linköping University*, 2012.
 42. Raoult D., Tissot-Dupont H., Foucault C., Gouvernet J., Fournier P.E., Bernit E., Stein A., Nesri M., Harle J.R., Weiller P.J. Q fever 1985–1998. Clinical and epidemiologic features of 1,383 infections. *Medicine*, 2000, vol. 79, no. 2, pp. 109–123. doi: 10.1097/00005792-200003000-00005
 43. Rigaud E., Jaulhac B., Garcia-Bonnet N., Hunfeld K.P., Féménia F., Huet D., Goulvestre C., Vaillant V., Deffontaines G., Abadia-Benoist G. Seroprevalence of seven pathogens transmitted by the Ixodes ricinus tick in forestry workers in France. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2016, vol. 22, no. 8: 735.e1-9. doi: 10.1016/j.cmi.2016.05.014
 44. Schimmer B., Dijkstra F., Vellema P., Schneeberger P.M., Hackert V., ter Schegget R., Wijkmans C., van Duynhoven Y., van der Hoek W. Sustained intensive transmission of Q fever in the south of the Netherlands, 2009. *Euro Surveill.*, 2009, vol. 14, no. 19: 19210. doi: 10.2807/ese.14.19.19210-en
 45. Skarpaas T., Golovljova L., Vene S., Ljøstad U., Sjørnsen H., Plyusnin A., Lundkvist A. Tick borne encephalitis virus, Norway and Denmark. *Emerg. Infect. Dis.*, 2006, vol. 12, pp. 1136–1138. doi: 10.3201/eid1207.051567
 46. Skarpaas T., Sundøy A., Bruu A.L., Vene S., Pedersen J., Eng P.G., Csángó P.A. Skogflåttencefalitt i Norge [Tick-borne encephalitis in Norway]. *Tidsskrift for den Norske lægeforening: tidsskrift for praktisk medicin, ny raekke*, 2002, vol. 122, no. 1, pp. 30–32.
 47. Süß J. TBE — a short overview on epidemiological status in Europe. *ISW-TBE: Vienna, Austria, 2012; Feb. 2–3*.
 48. Tissot Dupont H., Raoult D., Brouqui P., Janbon F., Peyramond D., Weiller P.J., Chicheportiche C., Nezri M., Poirier R. Epidemiologic features and clinical presentation of acute Q fever in hospitalized patients: 323 French cases. *Am. J. Med.*, 1992, vol. 93, no. 4, pp. 427–434. doi: 10.1016/0002-9343(92)90173-9
 49. Tokarevich N., Stoyanova N., Gnativ B., Kazakovtsev S., Blinova O., Revich B. Seroprevalence of tick-borne diseases in the population of the European North of Russia. *Med. Safety Glob. Health*, 2017, vol. 6: 132. doi:10.4172/2574-0407.1000132
 50. Tokarevich N., Stoyanova N., Gracheva L., Shulaykina I., Kulikov A., Kozarenko A. Lyme Borreliosis and other Tick-borne diseases. *10th Int. Conference. Vienna, Austria, 2005, p. 48*.
 51. Tokarevich N., Tronin A., Gnativ B., Revich B., Blinova O., Evengard B. Impact of air temperature variation on the ixodid ticks habitat and tick-borne encephalitis incidence in the Russian Arctic: the case of the Komi Republic. *Int. J. Circumpolar Health*, 2017, vol. 76, no. 1: 1298882. doi: 10.1080/22423982.2017.1298882
 52. Tokarevich N.K., Panferova Y.A., Freylikhman O.A., Blinova O.V., Medvedev S.G., Mironov S.V., Grigoryeva L.A., Tretyakov K.A., Dimova T., Zaharieva M.M., Nikolov B., Zehindjiev P., Najdenski H. Coxiella burnetii in ticks and wild birds. *Ticks & Tick Borne Dis.*, 2019, vol. 10, no. 2, pp. 377–385. doi: 10.1016/j.ttbdis.2018.11.020

53. Walory J., Bukowska B., Grzesiowski P., Czarnecka I., Paluchowska E., Zabielski S., Grzywocz A. Występowanie przeciwciał przeciw Anaplasma phagocytophilum, Babesia microti i Borrelia burgdorferi u dorosłych z północno-wschodnich rejonów Polski [Prevalence of antibodies against Anaplasma phagocytophilum, Babesia microti i Borrelia burgdorferi in adults in North-Eastern Poland]. *Polski merkuriusz lekarski: organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego*, 2005, vol. 19, no. 114, pp. 754–757.
54. Wittesjö B., Bjöersdorff A., Eliasson I., Berglund J. First long-term study of the seroresponse to the agent of human granulocytic ehrlichiosis among residents of a tick-endemic area of Sweden. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2001, vol. 20, no. 3, pp. 173–178. doi: 10.1007/s100960100463

Авторы:

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

Блинова О.В., к.х.н., младший научный сотрудник лаборатории зооантропонозных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

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

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

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

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

Тронин А.А., д.г.-м.н., директор Санкт-Петербургского научно-исследовательского центра экологической безопасности РАН, Санкт-Петербург, Россия;

Бузинов Р.В., д.м.н., доцент, зам. директора по развитию Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Архангельской области, г. Архангельск, Россия;

Соколова О.В., зам. начальника отдела эпидемиологического надзора Управления Роспотребнадзора по Архангельской области, г. Архангельск, Россия;

Гнатив Б.Р., зам. начальника отдела эпидемиологического надзора Управления Роспотребнадзора по Республике Коми, г. Сыктывкар, Россия;

Буц Л.В., начальник отдела эпидемиологического надзора Управления Роспотребнадзора по Ленинградской области, Санкт-Петербург, Россия;

Бубнова Л.А., зав. эпидемиологическим отделом ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Карелия, г. Петрозаводск, Россия;

Сафонова О.С., биолог ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Карелия, г. Петрозаводск, Россия;

Станкевич А.И., зав. отделом эпидемиологии Центра гигиены и эпидемиологии в Псковской области, г. Псков, Россия;

Калинина Е.Л., начальник отдела эпидемиологического надзора Управления Роспотребнадзора по Псковской области, г. Псков, Россия;

Виксе Р., доктор наук, старший научный сотрудник Норвежского института общественного здравоохранения, Осло, Норвегия;

Андреассен А.К., доктор наук, профессор, старший научный сотрудник Норвежского института общественного здравоохранения, Осло, Норвегия.

Authors:

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

Blinova O.V., PhD (Chemistry), Junior Researcher, Laboratory of Zoonoses, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

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

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

Siuzumova E.A., Junior Researcher, Laboratory of Zoonoses, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Lomonosova V.I., Junior Researcher, Laboratory of Zoonoses, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Tronin A.A., PhD, MD (Geology and Mineralogy), Director, Scientific Research Center for Ecological Safety, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation;

Buzinov R.V., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Deputy Director for Development, Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare in Arkhangelsk Region, Arkhangelsk, Russian Federation;

Sokolova O.V., Deputy Head of Epidemiological Surveillance Department, Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare in Arkhangelsk Oblast, Arkhangelsk, Russian Federation;

Gnativ B.R., Deputy Head of Epidemiological Surveillance Department of Rosпотребнадзор Office for the Republic of Komi, Syktvykar, Russian Federation;

Buts L.V., Head of Epidemiological Surveillance Department, Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare in Leningrad Oblast, St. Petersburg, Russian Federation;

Bubnova L.A., Head of the Epidemiology Department, Center of Hygiene and Epidemiology in the Karelia Republic, Petrozavodsk, Russian Federation;

Safonova O.S., Biologist, Center of Hygiene and Epidemiology in the Karelia Republic, Petrozavodsk, Russian Federation;

Stankevich A.I., Head of Epidemiology Department, Center for Hygiene and Epidemiology in Pskov Oblast, Pskov, Russian Federation;

Kalinina E.L., Head of the Epidemiological Surveillance Department, Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare in Pskov Oblast, Pskov, Russian Federation;

Vikse R., D.Sci., Senior Researcher, Norwegian Institute of Public Health, Oslo, Norway;

Andreassen A.K., D.Sci., Professor, Senior Researcher, Norwegian Institute of Public Health, Oslo, Norway.

A HERD IMMUNITY TO RUBELLA VIRUS IN SELECTED GEOGRAPHICAL REGIONS

I.N. Lavrentieva^a, M.A. Bichurina^a, A.Yu. Antipova^a, J. Camara^b, M. Hoang^c,
M.D. Bancevic^d, N.V. Zheleznova^a, S.A. Egorova^a, A.A. Totolian^a

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

^b Gamal Abdel Nasser University, Conakry, Republic of Guinea

^c Pasteur Institute of Ho Chi Minh City, Ho Chi Minh City, Vietnam

^d Institute for Virology, Vaccine and Sera “TORLAK”, Belgrade, Serbia

Abstract. Since 2017, the incidence rate of rubella in the Russian Federation has been below 1 case per million total population. In addition, no circulation of endemic strains of the rubella virus is recorded evidencing about achieving infection elimination phase. In modern conditions, it is important to constantly monitor the level of herd immunity to the rubella virus to identify epidemically significant population groups, especially in countries lacking rubella vaccination or featured with insufficient disease control. Purpose: to study herd immunity to the rubella virus in selected countries in Eurasia and Africa. *Materials and methods.* Between 2018 and 2021, 15,594 samples of blood sera were tested for IgG and IgM antibodies to the rubella virus from subjects of different ages obtained from regional measles and rubella surveillance centers in the Northwestern Federal District (NWFD) of the Russian Federation, the Republic of Serbia, South Vietnam, and the Republic of Guinea. The “Anti-Rubella Virus ELISA (IgM)” and “Anti-Rubella Virus ELISA (IgG)” (Euroimmun, Germany) test kits were used. Statistical data processing was carried out using the MS Excel, Prizm 5.0 (GraphPad Software Inc.), and Statistica 8.0 (StatSoft Inc.) software package. *Results.* During the observation period (2018–2020) the population seroprevalence of the to the rubella virus in the NWFD of the Russian Federation was 96.6–97.7% and fluctuated slightly both in separate years and among individual age groups evidencing about high coverage of rubella vaccination. In the Republic of Serbia conducting two-fold immunization against rubella the overall seroprevalence rate was lower than in the Russian Federation and comprising 86.8%. The minimum number of IgG-positive sera was recorded in the 2–4-year-old age group pointing to the shortcomings of routine vaccination. In South Vietnam, children aged 1–3 years (41.9%) predominated among those recovering from rubella, i.e. the age cohort that should be protected by vaccination at the age of 18 months. No rubella vaccination is carried out in Guinea. The total proportion of seropositive individuals was 75%; herd immunity to the rubella virus was established mainly among children and adolescents, reaching 90% only in the older age group. 30% of unprotected subjects of the most active reproductive age were identified among the females surveyed in Guinea. *Conclusion.* Insufficient herd immunity to the rubella virus, identified in a number of countries, may contribute to the maintenance of the infectious process and the spread of infection. Globalization contributes to the virus importation into regions being at the stage of measles and rubella elimination. The results obtained suggest about a need to continue efforts aimed at maintaining epidemiological wellbeing regarding rubella in diverse countries of the world.

Key words: rubella, herd immunity, vaccination, Russian Federation, Republic of Serbia, South Vietnam, Republic of Guinea.

Адрес для переписки:

Лаврентьева Ирина Николаевна
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера.
Тел.: 8 (812) 232-94-11 (служебн.).
E-mail: pasteur.lawr@mail.ru

Contacts:

Irina N. Lavrentieva
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 (812) 232-94-11 (office).
E-mail: pasteur.lawr@mail.ru

Для цитирования:

Лаврентьева И.Н., Бичурина М.А., Антипова А.Ю., Камара Ж., Хоанг М., Банчевич М.Д., Железнова Н.В., Егорова С.А., Тотолян А.А. Коллективный иммунитет к вирусу краснухи в некоторых географических регионах // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 5. С. 902–908. doi: 10.15789/2220-7619-AHI-2015

Citation:

Lavrentieva I.N., Bichurina M.A., Antipova A.Yu., Camara J., Hoang M., Bancevic M.D., Zheleznova N.V., Egorova S.A., Totolian A.A. A herd immunity to rubella virus in selected geographical regions // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 5, pp. 902–908. doi: 10.15789/2220-7619-AHI-2015

КОЛЛЕКТИВНЫЙ ИММУНИТЕТ К ВИРУСУ КРАСНУХИ В НЕКОТОРЫХ ГЕОГРАФИЧЕСКИХ РЕГИОНАХ

Лаврентьева И.Н.¹, Бичурина М.А.¹, Антипова А.Ю.¹, Камара Ж.², Хоанг М.³, Банчевич М.Д.⁴, Железнова Н.В.¹, Егорова С.А.¹, Тотолян А.А.¹

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

² Университет имени Гамал Абдель Насера, г. Конакри, Гвинейская Республика

³ Институт Пастера в Хошимине, г. Хошимин, Вьетнам

⁴ Институт вирусологии, вакцин и сывороток «Торалак», г. Белград, Сербская Республика

Резюме. Начиная с 2017 г. в Российской Федерации показатель заболеваемости краснухой находится на уровне ниже 1 случая на 1 млн населения. Также отсутствует циркуляция эндемичных штаммов вируса краснухи. Это свидетельствует о достижении фазы элиминации инфекции. В современных условиях важным является постоянный мониторинг уровня коллективного иммунитета к вирусу краснухи для выявления эпидемически значимых групп населения, особенно в странах, где вакцинация против краснухи не проводится или контроль недостаточен. Цель исследования: изучение коллективного иммунитета к вирусу краснухи в ряде стран Евразии и Африки. *Материалы и методы.* В период с 2017 по 2021 г. на IgG- и IgM-антитела к вирусу краснухи исследовано 15 594 образца сывороток крови лиц разного возраста, полученные из региональных центров по надзору за корью и краснухой в СЗФО РФ, Республике Сербия, в Южном Вьетнаме, в Гвинейской Республике. Использовали ИФА тест-наборы «Anti-Rubella Virus ELISA IgM» и «Anti-Rubella Virus ELISA (IgG)» (Euroimmun, Германия). Статистическая обработка результатов проводилась с помощью пакета программ MS Excel, Prizm 5.0 (GraphPadSoftware Inc.), Statistica 8.0 (StatSoft Inc.). *Результаты.* В СЗФО РФ за период наблюдения серопревалентность населения к вирусу краснухи составляла 96,6–97,7% и колебалась незначительно как по отдельным годам, так и среди отдельных возрастных групп, что свидетельствует о высоком охвате вакцинацией против краснухи. В Республике Сербия общий показатель серопревалентности оказался ниже, чем в РФ, и составил 86,8%. Наименьшее количество IgG-положительных сывороток регистрировали в возрастной группе 2–4 года, что говорит о недостатках плановой вакцинации. В Южном Вьетнаме среди переболевших краснухой преобладали дети в возрасте 1–3 года (41,9%), то есть та группа, которая должна быть максимально защищена плановой прививкой против краснухи в 18 месяцев. В Гвинее специфическая профилактика краснухи не проводится. Общая доля серопозитивных лиц составила 75%, коллективный иммунитет к вирусу краснухи формировался, в основном, среди детей и подростков, достигая 90% лишь в старшей возрастной группе. Среди обследованных женщин Гвинеи выявлено 30% незащищенных лиц наиболее активного репродуктивного возраста. *Заключение.* Недостаточный уровень коллективного иммунитета к вирусу краснухи, выявленный в ряде стран, может способствовать распространению инфекции, а условия глобализации — импортированию вируса в регионы, находящиеся на этапе элиминации кори и краснухи. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости продолжения усилий, направленных на поддержание эпидемиологического благополучия в отношении краснухи в разных странах мира.

Ключевые слова: краснуха, коллективный иммунитет, вакцинопрофилактика, Российская Федерация, Республика Сербия, Южный Вьетнам, Гвинейская Республика.

Introduction

The Strategic Program for Measles and Congenital Rubella Prevention was developed by the WHO in 2002, and in 2004 it also included the rubella elimination target [17, 18]. Postnatal rubella is a mild infectious disease, predominantly of childhood, characterized by a maculopapular rash and an unexpressed syndrome of general intoxication. Congenital rubella infection is a severe systemic lesion of organs and tissues with intrauterine fetal damage in a pregnant woman sick with rubella.

In 1999, about 800 000 cases of rubella were reported in Europe. By 2008, their number dropped to 18 000. Such a significant decrease in the spread of infection in the region was primarily due to rubella vaccination campaigns in the Russian Federation and CIS countries [14]. However, against the background of a general reduction in incidence in 2009, there was a large outbreak in the Republic of Bosnia and Herzegovina (523 cases). A large number of rubella

cases in 2015–2020 were reported in several countries in East, South-East and South Asia, as well as in the WHO African Region [1, 3, 5, 13, 16, 19, 21].

Rubella cases continued to decline in countries in the WHO European Region in 2020–2021. In 2020, 184 cases were detected in only 15 out of 53 states. The largest number of cases was registered in Poland, Ukraine, Germany, Turkey and Italy [15]. In 2021, 102 cases of rubella were registered in Europe, with 7136 cases of rubella in the world. It is likely that COVID-19 prevention and control measures taken in 2020–2021, and above all the complete or partial lockdown that took place in many countries, contributed to a further decrease in the number of reported rubella cases.

In the Russian Federation, an increase in the number of people vaccinated against rubella, both through routine immunization and the supplementary immunization campaign conducted in 2006–2007 as part of the “National Health” project, contributed to a sharp decrease in the incidence of this infection. As a result of the measures taken, the number of peo-

Table 1. 2018 to 2020 detection of rubella virus-specific IgG antibodies in the NWFD population

Years	Total sera tested	Including anti-rubella IgG+	
		abs.	share (%) M±m
2018	4989	4827	96.9±0.28
2019	4780	4639	97.05±0.24
2020	3772	3644	96.61±0.29
Total	13 541	1310	96.9±0.15

ple vaccinated against rubella increased by more than 15 million. This not only significantly reduced the incidence of rubella, but also prevented the occurrence of new cases of congenital rubella syndrome (CRS) [8, 14]. Since 2017, the rubella incidence rate in Russia has been below 1 case per million population. There was also no circulation of endemic strains of the rubella virus. All this testifies to the achievement of the rubella elimination phase in Russia [14].

At the same time, during the COVID-19 pandemic, routine vaccination against a number of infections, including measles and rubella, may have been disrupted due to the increased number of medical exemptions. In addition, there was an interruption or temporary suspension of epidemiological surveillance due to the diversion of medical staff and other resources to counter the COVID-19 pandemic. Achieving optimal coverage ($\geq 95\%$) with two doses of measles and rubella-containing vaccine at all subnational levels (provinces, regions, districts), along with addressing gaps in population immunity, is considered critical by experts from different countries and WHO experts [9, 15, 16, 18].

In modern conditions of globalization, it is important to constantly monitor the level of herd immunity to pathogens of certain infections, including the rubella virus, in order to identify epidemically significant population groups [6, 7, 11, 20]. It is especially important to organize such monitoring in countries where rubella vaccination is not conducted, or control by methods of specific prophylaxis is not sufficient. Such studies help limit the spread of rubella into WHO regions at the measles and rubella elimination stage. The purpose of this study was to study herd immunity to the rubella virus in selected countries in Eurasia and Africa.

Materials and methods

A total of 15 594 blood serum samples from individuals aged 3 months to 82 years, obtained in the period from 2017 to 2021, were studied. Samples were provided by virological laboratories of the regional measles and rubella surveillance centers in the Northwestern Federal District (NWFD) of the Russian Federation, in the Republic of Serbia, in South Vietnam, and in the Republic of Guinea. Samples obtained from apparently healthy individuals ($N = 15\ 272$) of different ages were tested for IgG antibodies to the rubella virus. Samples obtained from patients ($N = 322$) of different ages with general infectious syndrome and maculopapular rash were tested for IgM antibodies to the rubella virus.

To determine IgM antibodies to the rubella virus, the “Anti-Rubella Virus ELISA (IgM)” diagnostic

kit (Euroimmun, Germany) was used. For determination of IgG antibodies, the “Anti-Rubella Virus ELISA (IgG)” diagnostic kit (Euroimmun, Germany) was used according to manufacturer instructions. Statistical processing of results was carried out using the MS Excel, Prizm 5.0 (GraphPad Software Inc.), and Statistica 8.0 (StatSoft Inc.) software packages. Parametric and nonparametric methods were used. The probability value $p < 0.05$ was designated as the threshold for the significance of differences [12].

Results

Study of herd immunity to rubella virus within the framework of vaccine-based infection prevention

Among the regions included in the study, rubella vaccination is conducted in the Russian Federation, the Republic of Serbia, and the Socialist Republic of Vietnam [2, 4, 14]. In Russia and Serbia, routine vaccination includes two vaccinations: for children aged 12 months and six years old in Russia; and for children 15 months and 7 years old in Serbia. Vaccination in both countries is carried out by combined vaccines, including measles and rubella components. In Vietnam, the National Immunization Schedule includes one rubella vaccination for children aged 18 months.

In Russia's NWFD in 2018–2020, the proportion of seropositive individuals, out of 13 511 examined patients, was 96.9% and fluctuated slightly over three years (Table 1).

The intensity of immunity to the rubella virus in a population cohort in the NWFD aged 3 to 49 years (divided into six age groups) was determined in total over three years of observation (Table 2). Among those surveyed aged 4 to 29, including four age groups, significant fluctuations in the proportion of persons immune to the rubella virus were not detected.

The differences between the number of seropositive individuals under the age of 29 and those of older age (30–49 years) were statistically significant ($p < 0.05$). The proportion of those protected from rubella in the older age group was considerably lower (95.27%) than among children and young adults (97.0–98.0%), as well as compared with the average seroprevalence (96.9%).

In the Republic of Serbia, 1400 blood sera of apparently healthy individuals (aged 2 to 76 years, divided into four age groups) were examined for the presence of IgG antibodies to the rubella virus in the period 2018–2019 (Table 3).

In the first group (2–4 years), the smallest number of IgG-positive sera (72.0%) was recorded in relation to the other three age groups (89.0–90.0%). The differences were statistically significant ($p < 0.05$). Among 8–14 year-old children, adolescents and 15–49 year-old adults, seroprevalence increased to 87.2–89.0%, reaching a maximum (90.8%) in people aged 50 years and older.

When studying the intensity of immunity to the rubella virus (Table 4), it was found that a low level of anti-rubella IgG antibodies (11.0–50.0 IU/ml) was generally determined in 41.8% of the examined, main-

ly in the age groups of 8–14 (49%) and 15–25 (57.3%) year-old. Presumably, these are post-vaccination antibodies. High antibody titers (> 150 IU/ml), indicating a recent illness, were detected in 18.9% of the examined, mainly among people over 50 years old.

In the Socialist Republic of Vietnam, rubella vaccination is also included in the National Calendar. As mentioned earlier, children at the age of 18 months should be vaccinated once.

In this study, 322 blood sera from the serum bank of the Virology Laboratory of the Measles and Rubella Surveillance Center in South Vietnam were used. Sera were received in 2020–2021 from patients with exanthemic manifestations of the infectious process, aged from 3 months to 63 years (divided into 5 age groups). In accordance with the protocol adopted in the laboratory, sera were tested only for IgM antibodies to rubella virus. The obtained results are presented in Table 5. In 9.7% of the studied sera, virus-specific IgM antibodies were detected. Cases of the disease were unevenly distributed between the groups, with a significant predominance of children aged 1–3 years (41.9%) and 7–14 years (22.6%) in the overall structure of cases.

Children of preschool and primary school age (7–14 years old) form the second most important group. Among adolescents from 15 years old and adults, single cases of the disease were recorded.

Study of herd immunity to rubella virus in the absence of vaccination

Among the countries included in the study, the Republic of Guinea is a region where routine rubella vaccination is not conducted; herd immunity is formed in the conditions of natural infectious spread. Herd immunity to the rubella virus was determined by the presence of IgG antibodies in the blood sera of apparently healthy residents of the capital of Guinea, Conakry, in 2017–2018. The results are presented in Table 6.

The fewest blood serum samples ($n = 42$) were obtained from persons under 20 years of age due to the difficulty of obtaining clinical samples from apparently healthy children and adolescents in Guinea.

In the first four age groups (up to 50 years of age), the proportion of seropositive patients did not differ significantly and ranged from 71.4 to 75.0%, rising to 95% only in the age group of 50 years and older.

When determining seroprevalence among women ($n = 109$), it turned out that in general the proportion of those seropositive to the rubella virus was 80.7%. This is somewhat higher than in the popula-

Table 2. Detection of rubella virus-specific IgG antibodies in different age groups of the NWFD population (2018–2020)

Age group (years)	Total sera tested	Including anti-rubella IgG+	
		abs.	share (%) $M \pm m$
3–4	2632	2579	98.0 \pm 0.27
9–10	3133	3069	97.0 \pm 0.30
16–17	2859	2754	96.33 \pm 0.35
25–29	1957	1896	97.2 \pm 0.37
30–35	1745	1669	95.6 \pm 0.49
40–49	1191	1128	94.7 \pm 0.65
Total	13 511	13 094	96.9 \pm 0.15

Table 3. Detection of rubella virus-specific IgG in different age groups of the population of the Republic of Serbia

Age (years)	Number of persons surveyed	Including anti-rubella IgG+	
		abs.	share (%) $M \pm m$
2–4	200	144	72.0 \pm 3.2
8–14	200	178	89.0 \pm 1.6
15–49	400	349	87.2 \pm 1.6
≥ 50	600	545	90.8 \pm 1.2
Total	1400	1216	86.8 \pm 0.9

tion as a whole, apparently due to closer contact with female children. The proportion of seropositive patients ranged from 70% (20–29 years old) to 86% (40–49 years old). It is important to emphasize that among the surveyed young women (20–29 years old), about a third were seronegative to the rubella virus.

Discussion

Rubella is an infection controlled by means of specific prophylaxis.

The WHO proposal to include rubella in the measles elimination program is based on the fact that rubella is less contagious than measles. In most countries, combination vaccines are in use that include a rubella-containing component [16, 17, 18, 19]. Thus, the elimination of rubella can be achieved during the implementation of the measles elimination program. It should be taken into account that the rubella elimination strategy is based primarily on achieving and maintaining a high level ($> 95\%$) of routine vaccination coverage as a means of creating strong herd immunity.

Table 4. Intensity of rubella virus-specific humoral immunity in the population of Serbia by age group

Age (years)	Number of persons surveyed	Including anti-rubella IgG level (IU/ml)				
		< 11.0	11.0–50.0	$> 50.0-100.0$	$> 100.0-150.0$	> 150.0
		abs./%	abs./%	abs./%	abs./%	abs./%
2–4	200	56/28.0	66/32.5	27/13.5	17/8.5	35/17.5
8–14	200	22/11.0	98/49.0	40/20.0	18/9.0	22/11.0
15–25	200	30/4.9	115/57.3	12/5.0	15/7.5	29/14.4
≥ 50	400	81/20.2	140/35.0	44/11.0	32/8.0	103/25.7
Total	1000	189/18.9	418/41.8	123/12.3	82/8.2	189/18.9

Table 5. Age-related distribution of rubella cases in South Vietnam

Age, years	Total subjects examined	Including IgM+		Proportion of cases in the age group out of total number
		Abs.	Proportion, %	
< 1	165	4	2.4	12.9
1–3	74	13	17.6	41.9
4–6	15	2	13.3	6.5
7–14	38	8	18.4	22.6
15–29	10	3	30.0	9.7
30–39	7	1	14.3	3.2
40 and >	12	3	8.1	3.2
Total	322	31	9.7	100

In Russia, during the observation period (2018–2020), rubella virus seroprevalence among the NWFD population was 96.6–97.7%; it fluctuated slightly both in specific years and among specific age groups. However, the proportion of those protected from rubella in the older age group was significantly lower (95.27%) than among children and young adults (97.0–98.0%), as well as compared with the average seropositivity (96.9%).

Perhaps these differences are due to the fact that within the framework of the National Project “Health” (2007), girls and women aged 15–17 and 18–25 were subject to revaccination against rubella. Males were not immunized, which could affect the overall level of IgG-positive sera among older age groups. In general, the consistently high seroprevalence rates identified in this study in Russia’s Northwestern Federal District indicate a high vaccination coverage against rubella and the effectiveness of specific infection prevention, both being part of routine and additional immunization of the population.

In the Republic of Serbia, overall seroprevalence was significantly lower than in Russia and amounted to 86.8%. At the same time, the smallest number of IgG-positive sera (72.0%) was recorded in the first age group (2–4 years). Further, the proportion of seropositive persons consistently increased with age, reaching a maximum (90.8%) in persons aged 50 years and older. Such an age distribution of persons protected from infection is more typical for the forma-

Table 6. Detection of rubella virus-specific IgG antibodies in different age groups of the population of the Republic of Guinea

Age, years	Examined individuals	Anti-rubella IgG+, abs.	Anti-rubella IgG+, %M±m
< 20	42	30	71.4±6.97
20–29	143	102	71.3±3.78
30–39	64	48	75.0±5.41
40–49	42	31	73.8±6.78
≥ 50	40	38	95.0±3.45
Total	331	249	75.2±2.37

tion of herd immunity in the conditions of the natural spread of rubella. The smallest proportion of young children (2–4 years) protected from infection indicates the disadvantages of rubella vaccination. This is confirmed by a low intensity of immunity, mainly in the age groups of 8–14 (49%) and 15–25 (57.3%) years. Such low intensity is among people who should have received not only the first, but also the booster vaccination against rubella. The insufficient level of immunization coverage with the MMR vaccine, which includes the rubella component, was revealed by us earlier when studying humoral immunity to the measles virus among the population of Serbia [2, 10].

A similar trend was found in South Vietnam when analyzing rubella cases that occurred in 2019–2020. Among those who recovered, children aged from 1 to 3 (41.9%) predominated, which represent the age cohort that should be protected by vaccination as much as possible. The second age group, where a large number of cases were observed, is represented by children of primary and secondary school age (22.6%). Thus, it can be assumed that herd immunity to rubella in Vietnam is most actively formed due to the involvement of children and adolescents in the infectious process. Consequently, routine rubella vaccination that children 18 months of age are subject to in Vietnam does not provide adequate control of the infection.

In the Republic of Guinea, unlike the other regions included in this study, there is no specific prophylaxis for rubella. It was of undoubted interest to estimate the herd immunity formation in the population as a whole, as well as in a socially significant group (women of reproductive age), under the conditions of natural spread of rubella.

The proportion of seropositive individuals, both under 20 years and in the range from 20 to 49 years old, was 73% and increased to 95% only in the age group of 50 and older. That is, herd immunity to the rubella virus in Guinea is formed mainly among children and adolescents and remains at the same level in the population. The exception is the elderly, where a higher proportion of seropositive individuals is apparently due to their closer contact with children in families. At the same time, 30% of unprotected people of the most active reproductive age were identified among the examined women; this indicates the potential for their becoming infected during pregnancy and the birth of children with congenital rubella infection. In general, under conditions of natural distribution, 75.2% of the examined persons had IgG antibodies to the rubella virus, which corresponds to the characteristics of the infection as a widespread disease with low contagiousness.

Conclusion

This study shows that vaccination has a significant impact on the formation of immunity to the rubella virus. In Russia, where for a long period of time there has been a high coverage of the population with prophylactic rubella vaccinations, seroprevalence rates

remain high, significantly exceeding 95% of persons protected from the infection in all surveyed age groups. This is illustrated by the example of such a large region as the Northwestern Federal District.

Indirectly, through identified cases of rubella infection, one can judge the insufficient coverage of routine rubella vaccination in South Vietnam. The infectious process in this region is developed mainly among children who should have received a routine rubella vaccination according to their age.

In Serbia, where double rubella immunization is carried out, there seem to be shortcomings and failures of routine vaccination as well. This is evidenced by low seroprevalence in various age groups, especially in children between 2 and 4 years (who should be protected by rubella vaccination).

The smallest proportion of seropositive individuals was registered in Guinea, which is associated with the lack of specific rubella prophylaxis and its low contagiousness. Under these conditions, women of reproductive age represent the most vulnerable group of the population, among whom up to 30% of persons susceptible to infection with the rubella virus have been identified.

The insufficient level of herd immunity to rubella, identified in a number of regions included in this study, may contribute to maintenance of the infectious process and spread of infection. Conditions of globalization contribute to virus importation into regions at the stage of measles and rubella elimination. This indicates the need for continued efforts for maintaining the epidemiological freedom from rubella in different countries of the world.

References

1. Антипова А.Ю., Бичурина М.А., Лаврентьева И.Н. К вопросу о реализации программы элиминации кори в странах Западно-Тихоокеанского региона ВОЗ // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 4. С. 465–472. [Antipova A.Yu., Bichurina M.A., Lavrentieva I.N. Implementation of the World Health Organization Western Pacific regional plan of action for measles elimination. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2018, vol. 8, no. 4, pp. 465–472. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2018-4-465-472
2. Бичурина М.А., Филипович-Вигньевич С.Б., Антипова А.Ю., Банчевич М.Д., Лаврентьева И.Н. Популяционный иммунитет к вирусам кори и краснухи у населения Республики Сербия // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 1. С. 171–176. [Bichurina M.A., Filipović-Vignjević S., Antipova A.Yu., Bančević M., Lavrentieva I.N. A herd immunity to measles and rubella viruses in the population of the Republic of Serbia. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2021, vol. 11, no. 1, pp. 171–176. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-ТТО-1496
3. Камара Дж., Антипова А.Ю., Бичурина М.А., Зарубаев В.В., Магассуба Н'Ф., Лаврентьева И.Н. Осуществление программы элиминации кори в Африканском регионе ВОЗ // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 3–4. С. 449–456. [Samara J., Antipova A.Yu., Bichurina M.A., Zarubaev V.V., Magassouba N., Lavrentieva I.N. Implementation of the program of measles elimination in the who African Region. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2019, vol. 9, no. 3–4, pp. 449–456. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-449-456
4. Корь и краснуха на территориях Северо-Западного федерального округа на этапе их элиминации: аналитический обзор. СПб.: ФБУН НИИЭМ имени Пастера, 2020. 48 с. [Measles and rubella in the territories of the North-Western Federal District at the stage of their elimination: an analytical review. *St. Petersburg: St. Petersburg Pasteur Institute*, 2020. 48 p. (In Russ.)]
5. Корь. Информационный бюллетень ВОЗ № 286. Февраль 2015. [Measles. WHO information bulletin No. 286. 2015.] URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs286/ru>
6. Лаврентьева И.Н., Бичурина М.А., Антипова А.Ю., Камара Ж., Магассуба Н'Ф., Егорова С.А., Тотолан Арег А. Корь в Гвинейской Республике в 2019–2020 гг.: эпидемические особенности и популяционный иммунитет // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 6. С. 1179–1184. [Lavrentieva I.N., Bichurina M.A., Antipova A.Yu., Samara J., Magassouba N'F., Egorova S.A., Totolian Areg A. 2019–2020 measles in the Republic of Guinea: epidemic features and herd immunity. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2021, vol. 11, no. 6, pp. 1179–1184. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-MIT-1739
7. Мамаева Т.А., Железнова Н.В., Бичурина М.А., Наумова М.А., Говорухина М.В., Топтыгина А.П. Оценка возрастной структуры больных корью с первичным и вторичным иммунным ответом за период 2010–2016 гг. в Российской Федерации // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 4. С. 717–728. [Mamaeva T.A., Zheleznova N.V., Bichurina M.A., Naumova M.A., Govorukhina M.V., Toptygina A.P. Evaluation of age-related distribution of measles cases with primary and secondary immune response in Russian Federation, 2010–2016. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2020, vol. 10, no. 4, pp. 717–728. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-EOA-1407
8. Смердова М.А., Топтыгина А.П., Андреев Ю.Ю., Сенникова С.В., Зеткин А.Ю., Клыкова Т.Г., Беляков С.И. Гуморальный и клеточный иммунитет к антигенам вирусов кори и краснухи у здоровых людей // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 3–4. С. 607–611. [Smerdova M.A., Toptygina A.P., Andreev Yu.Yu., Sennikova S.V., Zetkin A.Yu., Klykova T.G., Belyakov S.I. Humoral and cellular immunity to measles and rubella virus antigens in healthy subjects. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2019, vol. 9, no. 3–4, pp. 607–611. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-607-611
9. Сонис А.Г., Гусякова О.А., Гильмиярова Ф.Н., Ерещенко А.А., Игнатова Н.К., Кузьмичева В.И., Бородина И.А., Ненякин С.С. Характеристика напряженности противокорьевого иммунитета в зависимости от возраста // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 2. С. 375–380. [Sonis A.G., Gusyakova O.A., Gilmiyarova F.N., Ereshchenko A.A., Ignatova N.K., Kuzmicheva V.I., Borodina I.A., Nenjakin S.S. Pattern of resilient age-related measles immunity. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2020, vol. 10, no. 2, pp. 375–380. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-POR-1173
10. Стоилькович В., Бичурина М.А., Лаврентьева И.Н., Филипович-Вигньевич С., Банчевич М., Железнова Н.В., Антипова А.Ю. Подъем заболеваемости корью в Республике Сербия и на Северо-Западе России в 2017–2018 годах // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 4. С. 729–734. [Stoiljkovic V., Bichurina M.A., Lavrentieva I.N., Filipovic-Vignjevic S.,

- Bancevic M., Zheleznova N.V., Antipova A.Yu. Rise in 2017–2018 measles morbidity in Serbia and Northwest Russia. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2020, vol. 10, no. 4, pp. 729–734. (In Russ.) doi: 10.15789/2220-7619-RIM-1342
11. Топтыгина А.П., Смердова М.А., Наумова М.А., Владимировна Н.П., Мамаева Т.А. Влияние особенностей популяционного иммунитета на структуру заболеваемости корью и краснухой // *Инфекция и иммунитет*. 2018. Т. 8, № 3. С. 341–348. [Topytygina A.P., Smerdova M.A., Naumova M.A., Vladimirova N.P., Mamaeva T.A. Influence of population immunity peculiarities on the structure of measles and rubella prevalence. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2018, vol. 8, no. 3, pp. 341–348. (In Russ.) doi: 10.15789/2220-7619-2018-3-341-348
 12. Хамитова И.В., Останкова Ю.В., Антипова А.Ю., Семенов А.В., Лаврентьева И.Н. Молекулярно-генетическая характеристика изолятов парвовируса В19, циркулирующих на территории Северо-Западного федерального округа // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2018. № 6. С. 55–66. [Khamitova I.V., Ostankova Yu.V., Antipova A.Yu., Semenov A.V., Lavrentieva I.N. Molecular-genetic characteristics of Parvovirus B19 isolates circulating in the North-Western federal district. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2018, no. 6, pp. 55–61. (In Russ.) doi: 10.36233/0372-9311-2018-6-55-61
 13. Централизованная информационная система по инфекционным заболеваниям (ЦИСИЗ). [Centralized information system for infectious diseases (CISID)]. URL: <http://data.euro.who.int/cisid>
 14. Чехляева Т.С., Цвиркун О.В., Тураева Н.В., Ерохов Д.В., Баркинхоева Л.А., Тихонова Н.Т. Оценка статуса элиминации краснухи в Российской Федерации в 2019 г. // *Инфекция и иммунитет*. 2022. Т. 12, № 1. С. 85–94. [Chekhlyeva T.S., Tsvirkun O.V., Turaeva N.V., Erokhov D.V., Barkinkhoyeva L.A., Tikhonova N.T. Assessing the 2019 rubella elimination status in the Russian Federation. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2022, vol. 12, no. 1, pp. 85–94. (In Russ.) doi: 10.15789/2220-7619-ATR-1663
 15. Эпидемиологическая оценка отдельных заболеваний, предотвращаемых вакцинацией // *Эпидемиологическая справка ВОЗ*. 2020. № 1. 13 с. [Epidemiological assessment of individual diseases prevented by vaccination. WHO Epidemiological Report, 2020, no. 1, 13 p. (In Russ.)] URL: https://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0006/434364/EpiBrief-1-2020-rus.pdf
 16. Orenstein W.A., Cairns L., Hinman A., Nkowane B., Olivé J.M., Reingold A.L. Measles and rubella global strategic plan 2012–2020 midterm review report: background and summary. *Vaccine*, 2018, vol. 36, suppl. 1, pp. A35–A42. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.10.065
 17. WHO. Eliminating measles and rubella and preventing congenital rubella infection: WHO European Region strategic plan 2005–2010. *Copenhagen: WHO, 2005. 34 p.*
 18. WHO. Global vaccine action plan 2011–2020. *Geneva: WHO, 2013. 148 p.*
 19. WHO. Immunization dashboard. URL: <https://immunizationdata.who.int> (01.09.2022)
 20. WHO. Manual for the laboratory-based surveillance of measles, rubella, and congenital rubella syndrome, 3rd edition. *Geneva: WHO, 2018. URL: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/immunization/vpd_surveillance/lab_networks/measles_rubella/manual/chapter-1.pdf*
 21. WHO. The Global Health Observatory (WHO datadase). URL: <https://www.who.int/data/gho>

Авторы:

Лаврентьева И.Н., д.м.н., зав. лабораторией экспериментальной вирусологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Бичурина М.А., д.м.н., зав. вирусологической лабораторией центра по элиминации кори и краснухи ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Антипова А.Ю., к.б.н., научный сотрудник лаборатории экспериментальной вирусологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Камара Ж., научный сотрудник лаборатории геморрагических лихорадок Университета Гамалы Абдель Насера, г. Конакри, Гвинейская Республика;
Хоанг М., научный сотрудник отдела микробиологии и иммунологии Института имени Пастера в г. Хошимин, г. Хошимин, Вьетнам;
Банцевич М.Д., д.м.н., специалист в области медицинской микробиологии, зав. национальной референс-лабораторией по кори и краснухе, Институт вирусологии, вакцин и сывороток «Торлак», Белград, Сербия;
Железнова Н.В., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории вирусных гепатитов ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Егорова С.А., д.м.н., зам. директора по инновациям ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Тотolian А.А., академик РАН, д.м.н., профессор, директор ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Lavrentieva I.N., PhD, MD (Medicine), Head of the Laboratory of Experimental Virology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Bichurina M.A., PhD, MD (Medicine), Head of the Virological Laboratory of the Measles and Rubella Elimination Center, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Antipova A.Yu., PhD (Biology), Researcher, Laboratory of Experimental Virology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Camara J., Researcher, Laboratory of Hemorrhagic Fevers, Gamal Abdel Nasser University, Conakry, Republic of Guinea;
Hoang M., Researcher, Department of Microbiology and Immunology, Ho Chi Minh Pasteur Institute, Ho Chi Minh City, Vietnam;
Bancevic M.D., PhD, MD (Medicine), Specialist in Medical Microbiology, Head of National Reference Laboratory for Measles and Rubella, Institute of Virology, Vaccine and Sera “Torlak”, Belgrade, Serbia;
Zheleznova N.V., PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Viral Hepatitis, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Egorova S.A., PhD, MD (Medicine), Deputy Director for Innovation, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Totolian A.A., RAS Full Member, PhD, MD (Medicine), Professor, Director of St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation.

СОПОСТАВЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ СОСТОЯНИЯ ПОПУЛЯЦИОННОГО ИММУНИТЕТА К ВИРУСУ КРАСНУХИ У НАСЕЛЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ И РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

О.В. Цвиркун^{1,2}, Е.О. Самойлович³, Н.Т. Тихонова¹, А.Г. Герасимова¹,
Н.В. Тураева¹, М.А. Ермолович³, Г.В. Семейко³

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

² ФГАОУ ВО Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

³ Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии, Минск, Республика Беларусь

Резюме. Для подтверждения прогресса на пути к элиминации краснухи используются показатели охвата иммунизацией и результаты серологических исследований. При этом наиболее объективным методом оценки коллективного иммунитета является серологическое исследование. Целью данной работы явилось сопоставление результатов исследования состояния популяционного иммунитета к вирусу краснухи у населения Республики Беларусь и Российской Федерации, использующих разные вакцины и разные подходы к организации и подбору контингента для обследования — скрининг и мониторинг. Лабораторные исследования по определению антител класса IgG к вирусу краснухи осуществлялись в 2019 г. методом ИФА иммуноферментной тест-системой «Эколаб» (Россия). Анализу подвергались результаты исследования сывороток крови 701 человека в возрасте 2–45 лет из всех 7 регионов Республики Беларусь (скрининговое исследование) и 55 082 человек в 85 субъектах Российской Федерации в возрасте 3–49 лет (мониторинг). Оценку результатов осуществляли по трем возрастным группам — дети, взрослые, все население используя пороговый уровень серопозитивных лиц 83–85%, достаточный для предотвращения трансмиссии вируса. Антигенный состав краснушного компонента в моно- и комплексной вакцине, которые применяются, соответственно, в Российской Федерации и Республике Беларусь, идентичен, что позволяет сравнивать состояние популяционного иммунитета населения к вирусу краснухи в этих странах без учета влияния вакцинного штамма. Исследования показали, что при использовании разных вакцинных препаратов и подходов к организации серологического обследования и в Республике Беларусь, и в Российской Федерации во всех возрастных группах были выявлены специфические IgG к вирусу краснухи на достаточно высоком уровне — более 90%. Доля серопозитивных к краснухе в целом по стране составляет 95,44% в Республике Беларусь и 97,14% в Российской Федерации. Более того, уровень специфических антител остается высоким, несмотря на низкий показатель заболеваемости и отсутствие бустер-эффекта в обеих странах. Среднегрупповая концентрация антител у серопозитивных во всех возрастных группах была достаточно

Адрес для переписки:

Цвиркун Ольга Валентиновна
125212, Россия, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10,
ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии
им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора.
Тел.: 8 (495) 452-18-09.
E-mail: o.tsvirkun@gabrigh.ru

Contacts:

Olga V. Tsvirkun
125212, Russian Federation, Moscow, Admiral Makarov str., 10,
G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology
and Microbiology.
Phone: +7 (495) 452-18-09.
E-mail: o.tsvirkun@gabrigh.ru

Для цитирования:

Цвиркун О.В., Самойлович Е.О., Тихонова Н.Т., Герасимова А.Г.,
Тураева Н.В., Ермолович М.А., Семейко Г.В. Сопоставление результатов
исследования состояния популяционного иммунитета к вирусу
краснухи у населения Республики Беларусь и Российской Федерации //
Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 5. С. 909–918. doi: 10.15789/2220-
7619-COT-1832

Citation:

Tsvirkun O.V., Samoilovich E.O., Tikhonova N.T., Gerasimova A.G.,
Turaeva N.V., Ermolovich M.A., Semeiko G.V. State of anti-rubella virus
population immunity in the Republic of Belarus and Russian Federation //
Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022,
vol. 12, no. 5, pp. 909–918. doi: 10.15789/2220-7619-COT-1832

высокой и превышала минимальную защитную концентрацию (11 МЕ/мл) в 10 и более раз. Полученные данные свидетельствуют о правомерности использования серологического исследования коллективного иммунитета при краснухе как рутинного или серомониторинга, так периодического или скринингового исследования.

Ключевые слова: краснуха, иммунитет, серопревалентность, популяция, мониторинг, скрининг.

STATE OF ANTI-RUBELLA VIRUS POPULATION IMMUNITY IN THE REPUBLIC OF BELARUS AND RUSSIAN FEDERATION

Tsvirkun O.V.^{a,b}, Samoilovich E.O.^c, Tikhonova N.T.^a, Gerasimova A.G.^a, Turaeva N.V.^a, Ermolovich M.A.^c, Semeiko G.V.^c

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

^b Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

^c Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Republic of Belarus

Abstract. To confirm a progress towards the rubella elimination, immunization coverage indicators and the results of serological studies are used. At the same time, the most objective method of assessing collective immunity is a serological examination. The purpose of this work was to compare the results of assessing state of population immunity against rubella virus in the Republic of Belarus and the Russian Federation using various vaccines and different approaches to study organization and cohort selection — screening and monitoring. 2019 laboratory studies to determine IgG antibodies against rubella virus were carried out by ELISA method of the unified enzyme immunoassay system “Ecolab” (Russia). The serum study results of 701 subjects aged 2–45 years from all the 7 regions of the Republic of Belarus (screening study) and 55 082 subjects aged 3–49 years (monitoring) from 85 regions of the Russian Federation were analyzed. The results were evaluated in three age groups — children, adults, total cohort by using a threshold level of 83–85% seropositive individuals sufficient to prevent virus transmission. The antigenic composition of the rubella component in the mono- and complex vaccines respectively used in the Russian Federation and the Republic of Belarus is identical, which allows to compare the state of population immunity against rubella virus therein without taking into account an influence of the vaccine strain. Studies have shown that while using varying vaccine preparations and approaches to organization of serological examination, both in the Republic of Belarus and the Russian Federation, rubella virus-specific IgG level was detected at rather high level in all age groups comprising more than 90%. The portion of rubella seropositive subjects in entire country was 95.44% in the Republic of Belarus and 97.14% in the Russian Federation. Moreover, the level of specific antibodies remains high, despite the low incidence rate and absence of booster effect in both countries. The mean group antibody concentration in seropositive patients in all age groups was quite high and exceeded the minimum protective concentration (11 IU/ml) by 10 or more times. The data obtained indicate the legitimacy of using a serological study of collective rubella immunity as a routine or seromonitoring as well as periodic or screening investigation.

Key words: rubella, immunity, seroprevalence, population, monitoring, screening.

Введение

Для подтверждения прогресса на пути к элиминации краснухи используются показатели охвата иммунизацией и результаты серологических исследований состояния специфического иммунитета у детей и взрослых. Наиболее объективным методом оценки коллективного иммунитета является серологическое исследование. Всемирная организация здравоохранения рассматривает серологическое обследование как сбор и тестирование образцов сыворотки крови определенной популяции для определения (выявления) антител против данного этиологического агента в качестве прямого измерения иммунитета населения [15] и как мероприятие, проводимое регулярно или периодически, призванное дополнить данные рутинного эпидемиологического надзора.

Организация и проведение серологических исследований состояния специфического им-

мунитета населения к вирусу краснухи существенно отличаются в разных странах. В основе этих отличий лежат, прежде всего, экономические возможности, уровень заболеваемости, цели исследования, тактика и кратность проведения мероприятия. Но всегда эти исследования являются выборочными. При этом при проведении исследования используются как специально собранные для этих целей сыворотки, так и сыворотки, собранные ранее для других целей и хранящиеся в биобанках. Для оценки полученных результатов большое значение имеет наличие необходимой сопроводительной медицинской и демографической информации.

Оценка состояния иммунитета населения к вирусу краснухи может быть организована как компонент государственной системы эпидемиологического надзора на постоянной основе в индикаторных группах населения, с соблюдением определенных принципов отбора контингента — так называемый серологи-

ческий мониторинг (Российская Федерация). Введение серомониторинга иммунитета в систему надзора не только позволяет оценивать иммунологическую эффективность проводимой вакцинации, обследуя индикаторные группы вакцинированных и ревакцинированных против краснухи, но и контролировать качество прививочной работы.

Оценить состояние иммунитета населения к вирусу краснухи возможно и организовав периодические, нерегулярные, когортные исследования, частота проведения которых определяется эпидемиологической ситуацией (как правило, они проводятся один раз в 5 и более лет). Формирование контингента для обследования, стратифицированного по возрасту, осуществляется по принципу случайной выборки (то есть в число включенных в исследование лиц войдут как привитые, так и непривитые лица, отражая реальное их распределение в популяции) (Республика Беларусь). В данной статье такого рода исследования были отнесены к скрининговым в отличие от мониторинговых исследований, которые проводятся в Российской Федерации ежегодно.

Независимо от выбранного подхода к проведению серологических исследований для получения объективной информации о состоянии популяционного иммунитета чрезвычайно важным является репрезентативность исследуемой выборки. Исследование серопревалентности имеет важное значение для оценки эффективности программ иммунизации и разработки мероприятий по предупреждению вспышек инфекционного заболевания. Но при этом нужно признать, что выборочные серологические исследования состояния специфического иммунитета могут содержать в себе погрешность, обусловленную ошибкой метода лабораторного исследования, ошибкой подбора контингента, отсутствием репрезентативности и другими. Для интерпретации полученных результатов важно учитывать чувствительность и специфичность используемых тест-систем, а также отсутствие возможности идентифицировать различия между поствакцинальными и постинфекционными антителами класса G.

Антигенный состав краснушного компонента в моно- и комплексной вакцине, которые соответственно применяются в Российской Федерации и Республике Беларусь, идентичен — вирус краснухи, полученный из живого аттенуированного штамма Wistar RA 27/3, не менее 1000 ТЦД₅₀ [5], что позволяет сравнивать состояние популяционного иммунитета населения к краснухе в этих странах без учета влияния вакцинного штамма.

Целью данной работы явилось сопоставление результатов исследования состояния по-

пуляционного иммунитета к вирусу краснухи у населения Республики Беларусь и Российской Федерации, использующих разные подходы к организации и подбору контингента для обследования — скрининг и мониторинг.

Материалы и методы

Для проведения исследования популяционного иммунитета к краснухе в Республике Беларусь была определена кластерная, многоступенчатая выборка (с учетом географического принципа и возрастных групп). Возрастные группы обследуемых лиц (2–5, 6–15, 16–23, 24–32 и 33–45 лет) определяли в соответствии с национальной историей иммунизации — лица в возрасте 2–5 лет подлежали однократной плановой вакцинации комплексной вакциной корь-паротит-краснуха (КПК), в возрасте 6–15 и 16–23 лет — двукратной вакцинации вакциной КПК, в возрасте 24–32 лет — иммунизации краснушной моновакциной в кампанию вакцинации в 2006 г., лица в возрасте 33 лет и старше не подлежали вакцинации. Определение размера выборки проводили с учетом численности населения Республики Беларусь с допустимой ошибкой $\pm 5\%$ и уровнем достоверности 95%. За ожидаемый уровень серопревалентности на основании ранее полученных данных [3] был принят уровень не ниже 90%. В соответствии с произведенными расчетами минимальное репрезентативное число включенных в исследование по каждой возрастной группе должно составлять не менее 139 человек, то есть 695 с учетом 5 возрастных групп [9]. На наличие IgG-антител к вирусу краснухи выполнено скрининговое исследование сывороток крови 701 человека в возрасте 2–45 лет из всех 7 регионов республики: из Брестской области — 97 проб, из Витебской — 98, из Гомельской — 97, из Гродненской — 99, из Минской — 103, из Могилевской — 99 и из Минска — 108 сывороток). Подбор лиц для обследования проводили методом случайной выборки. Взятие сывороток крови осуществлялось в апреле 2019 г. в соответствии с приказом Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 360 от 25.03.2019 г. «Об оценке состояния популяционного иммунитета» и при получении письменного согласия каждого из обследуемых на проведение этого исследования. Образцы сывороток крови с соблюдением холодовой цепи были доставлены в Республиканскую лабораторию по диагностике кори и краснухи (РНПЦ эпидемиологии и микробиологии), аккредитованную ВОЗ как национальная лаборатория по кори и краснухе, где хранились при -20°C до проведения исследования.

В России оценка состояния иммунитета населения к вирусу краснухи осуществляет-

ся ежегодно в соответствии с МУ 3.1.2943-11 «Организация и проведение серологического мониторинга состояния коллективного иммунитета к инфекциям, управляемым средствами специфической профилактики (дифтерия, столбняк, коклюш, корь, краснуха, эпидемический паротит, полиомиелит, гепатит В)». Исследования проводятся для оценки качества иммунопрофилактики, поэтому контингент для обследования подбирается с документальным подтверждением факта вакцинации в возрастных группах 3–4 года, 9–10, 15–17, 25–29, 30–35 лет. Только лица в возрасте 40–49 лет обследуются без учета прививочного анамнеза для определения стабильности иммуноструктуры среди взрослого населения.

Лабораторные исследования проводятся в лицензированных лабораториях ФБУЗ Центров гигиены и эпидемиологии в субъектах РФ, куда доставляются образцы сывороток крови с соблюдением холодовой цепи. Выборочный контроль серонегативных сывороток осуществляется в аккредитованных ВОЗ лабораториях региональных центров (РЦ) и Национальный научно-методический центр по надзору за корью и краснухой.

Результаты исследования, полученные в регионах, анализировались по 10 РЦ: Московский, Санкт-Петербургский, Нижегородский, Пермский, Республики Башкортостан, Ростовский, Новосибирский, Красноярский, Приморский, Амурский.

В 2019 г. в 85 субъектах РФ на наличие IgG-антител к вирусу краснухи обследовано 47 221 человек, привитых против краснухи, из них детей в возрасте 3–4 года — 8968, 9–10 лет — 9126 человек, подростков 16–17 лет — 9773, взрослых 25–29 лет — 10 048, 30–35 лет — 9080. Кроме того, обследованы взрослые 40–49 лет — 7861 человек, без учета прививочного анамнеза. Всего обследовано 55 082 человека.

Выборочно был проанализирован уровень среднегрупповой концентрации IgG-антител к вирусу краснухи у 1968 человек на территориях, где регистрировались и не регистрировались случаи краснухи в 2018–2019 гг.

Как в Российской Федерации, так и в Республике Беларусь антитела класса IgG к вирусу краснухи определяли с использованием иммуноферментной тест-системы «Эколаб» (Россия). Концентрацию антител рассчитывали в соответствии с инструкцией производителя в МЕ/мл, пороговой концентрацией считали 10 МЕ/мл, что соответствовало рекомендациям ВОЗ [16]. Сыворотки крови с выявленными антителами в концентрации менее 8 МЕ/мл рассматривались как негативные, в концентрации от 8 до 10 МЕ/мл — как сомнительные, в концентрации более 10 МЕ/мл — как позитивные.

Оценку результатов осуществляли с помощью порогового уровня в 83–85% серопозитивных лиц [13], достаточного для предотвращения трансмиссии вируса, по трем группам населения: дети, взрослые, все население.

В целях получения сопоставимых данных, результаты анализировались по возрастам, территориям второго административного уровня и уровню антител IgG к вирусу краснухи. Использованы методы описательной статистики: определение стандартной ошибки средней (m), расчет 95% доверительного интервала (ДИ) (по методу Клоппера–Пирсона). Оценка достоверности различий проводилась по t -критерию Стьюдента. Различия считались существенными при $t > 2,0$. Также рассчитывалась ошибка репрезентативности для среднего значения групповой концентрации IgG-антител.

Учитывая отсутствие статистически значимых различий в показателях серопозитивных лиц среди мужчин и женщин в исследованиях популяционного иммунитета к вирусу краснухи по данным научной литературы [7, 11], гендерные различия в наших исследованиях не учитывались.

Результаты

Проведенные исследования на наличие IgG-антител к вирусу краснухи у 701 жителя Республики Беларусь показали, что антитела в защитной концентрации имели 669 (95,44%) человек (табл. 1).

Анализ территориального распределения результатов свидетельствовал о том, что доля иммунных к краснухе лиц во всех областях страны составила более 90%: от $93,88 \pm 2,42\%$ в Витебской области до $96,91 \pm 2,06\%$ в Брестской области. Согласно принятой международной практике уровень иммунитета к краснухе 83–85% считается достаточным для предотвращения трансмиссии вируса [4].

Анализ возрастного распределения показал, что доля серопозитивных лиц во всех 5 возрастных группах была выше 90%, то есть достигала необходимого порогового значения (табл. 2).

Уровень серопозитивности был наиболее высоким у детей 2–5 лет (98,46%), недавно получивших вакцинацию вакциной КПК. Далее он несколько снижался с возрастом, несмотря на проведенную в 6 лет ревакцинацию, составив $97,12\%$ у детей в возрасте 6–15 лет и $92,39\%$ — в возрасте 16–23 года. В возрастной группе 24–32 года, куда вошли лица, вакцинированные моновакциной в возрасте 11–19 лет в рамках кампании вакцинации против краснухи в 2006 г., выявлен достаточно высокий уровень серопозитивных (95,21%). В возрастной группе 33–45 лет показатель серопревалентности составил 96,53%.

Анализ напряженности популяционного иммунитета показывает, что во всех возрастных группах среднегрупповая концентрация антител у серопозитивных была достаточно высокой и превышала минимальную защитную концентрацию (11 МЕ/мл) в 10 и более раз. Высокая концентрация поствакцинальных антител (215,81 МЕ/мл) отмечалась в возрастной группе 2–5 лет, далее в отсутствие естественного бустирования циркулирующим вирусом она постепенно снижалась, составляя 128,08–149,26 МЕ/мл среди лиц 6–23 лет. В старших возрастных группах отмечалось повышение среднегрупповой концентрации антител, косвенно свидетельствуя о том, что в этих группах антитела имели преимущественно постинфекционный характер. Выявленные среди 701 обследованного 32 человека, не имевшие антител к вирусу краснухи, относились к различным возрастным группам (1 — 2–5 лет, 3 — 6–15 лет, 14 — 16–23 года, 4 — 24–32 года, 7 — 33–45 лет). Хотя число выявленных серонегативных лиц в целом невелико, подавляющее большинство их относится к детородному возрасту, что свидетельствует о существующем риске инфицирования во время беременности и целесообразности проведения исследования IgG к краснухе при планировании беременности.

В Российской Федерации доля серопозитивных к краснухе в целом по стране составляет 97,14%, а в разрезе региональных центров этот показатель колеблется от 95,61% (Красноярский РЦ) до 98,62% (Пермский РЦ) (табл. 3).

Последующий ежегодный анализ специфического иммунитета к краснухе в разных возрастных группах населения (табл. 4) показал стабильно высокий уровень серопревалентности. Так, доля серопозитивных колебалась от 95,9% (в группе взрослых 30–35 лет) до 98,4% (в группе двукратно привитых школьников). Следует отметить, что в возрастной группе взрослых 1970–1979 гг. рождения (40–49 лет), не охваченных вакцинацией, показатель серопозитивных оказался достаточно высоким — 96,1%, полагаем, что за счет ранее перенесенной краснухи.

Таблица 1. Популяционный иммунитет населения к краснухе в регионах Республики Беларусь, 2019 г.

Table 1. A 2019 population rubella immunity in the regions of the Republic of Belarus

Область Region	Число обследованных Number of tested	Доля серопозитивных, % Proportion of seropositive, %	95% ДИ 95% CI
Брестская Brest	97	96,91	95,15–98,67
Витебская Vitebsk	98	93,88	91,46–96,3
Гомельская Gomel	97	96,91	95,15–98,67
Гродненская Grodno	99	95,96	93,98–97,94
Минск City of Minsk	108	94,44	92,24–96,64
Минская Minsk	103	94,17	91,86–96,48
Могилевская Mogilev	99	95,96	93,98–97,94
РБ RB	701	95,44	94,65–96,23

Следует отметить стабильно высокие (более 95%) показатели серопозитивных к вирусу краснухи в разных возрастных группах населения в России при ежегодных серологических обследованиях.

Для более объективной оценки напряженности популяционного иммунитета мы выбрали территорию, где в течение последних лет не регистрировались случаи краснухи, и территорию, где случаи заболевания регистрировались регулярно, преимущественно среди взрослого населения. Всего было проанализировано 1968 результатов серологического исследования сывороток крови по уровню IgG-антител (табл. 4).

Таблица 2. Популяционный иммунитет к краснухе в возрастных группах населения Республики Беларусь, 2019 г.

Table 2. 2019 Population rubella immunity in age groups, Republic of Belarus

Возраст, лет Age, years	Число обследованных Number of tested subjects	Доля серопозитивных, % Proportion of seropositive subjects, %	95% ДИ 95% CI	Среднегрупповая концентрация антител, МЕ/мл Mean group antibody concentration, IU/ml
2–5	65	98,46	95,4–99,99	215,81±30,37
6–15	104	97,12	93,84–99,9	128,08±13,35
16–23	184	92,39	88,49–96,29	149,26±17,54
24–32	146	95,21	91,67–98,75	245,42±18,91
33–45	202	96,53	93,95–99,11	238,82±16,92
2–45	701	95,44	93,86–97,02	197,82±8,65

Таблица 3. Популяционный иммунитет населения к краснухе в разрезе региональных центров Российской Федерации, 2019 г.

Table 3. 2019 Population rubella immunity by regional centers of the Russian Federation

Региональные центры Regional centers	Число обследованных Number of tested subjects	Доля серопозитивных, % Proportion of seropositive subjects, %	95% ДИ 95% CI
Московский Moscow	12 990	96,82	96,67–96,97
СПб SPb	4780	97,01	96,76–97,26
Нижегородский Nizhny Novgorod	3118	96,53	96,20–96,86
Пермский Perm	4232	98,62	98,44–98,80
Башкортостан Bashkortostan	3936	97,50	97,25–97,75
Ростовский Rostov	8141	95,92	95,70–96,14
Новосибирский Novosibirsk	8013	98,34	98,20–98,48
Красноярский Krasnoyarsk	4354	95,61	95,30–95,92
Приморский Primorsky	4017	97,94	97,71–98,17
Амурский Amur	1501	97,91	97,54–98,28
РФ RF	55 082	97,14	97,07–97,21

Во всех возрастных группах среднегрупповая концентрация антител в 8–10 раз превышала минимальную концентрацию (11 МЕ/мл) у серопозитивных. Самая высокая концентрация IgG-антител к вирусу краснухи (115,25 МЕ/мл) наблюдалась у вакцинированных детей 3–4 лет. В возрастных группах 9–10, 16–17 и 25–29 лет среднегрупповая концентрация антител к вирусу краснухи снижалась до 88–90 МЕ/мл. В группе непривитых взрослых 30–35 и 40–49 лет уровень специфических антител был несколько выше — 92–104 МЕ/мл, вероятно за счет переболевания краснухой ранее. Мы не выявили линейного снижения концентрации противокраснушных антител с возрастом.

Сравнение результатов исследований популяционного иммунитета к краснухе, полученных в 2019 г. при серологическом мониторинге в Российской Федерации и скрининге — в Республике Беларусь, показали сопоставимые результаты, свидетельствующие о высоком уровне серопревалентности, способном предупредить эндемичную трансмиссию вируса краснухи (рис.).

Обсуждение

В Республике Беларусь, с численностью населения страны 9,5 млн человек, внедрение вакцинации с использованием трехвалентной вакцины КПК (с 1996 г. — однократная прививка, с 2000 г. — двукратная: в 12 месяцев и 6 лет) при охвате вакцинацией более 97% существенно снизило заболеваемость краснухой [2, 4]. Однако еще в начале 2000-х гг. ежегодно выявлялось несколько тысяч заболевших этой инфекцией. Показатель заболеваемости колебался от 69,09 на 100 тыс. населения в 2001 г. до 24,39 на 100 тыс. населения в 2006 г. В 2005–2006 гг. наряду с пла-

Таблица 4. Популяционный иммунитет к краснухе в возрастных группах населения Российской Федерации, 2019 г.

Table 4. 2019 Population rubella immunity in age groups, Russian Federation

Возраст, лет Age, years	Число обследованных Number of tested subjects	Доля серопозитивных, % Proportion of seropositive subjects, %	95% ДИ 95% CI	Выборочная проверка территорий по уровню IgG Random inspection of territories by IgG level	
				Число обследованных Number of tested subjects	Среднегрупповая концентрация антител, МЕ/мл Mean group antibody concentration, IU/ml
3–4	8968	97,2	97,03–97,37	240	115,25±26,0
9–10	9126	98,4	98,38–98,42	293	88,71±10,69
16–17	9773	97,5	97,34–97,66	295	89,90±22,66
25–29	10 048	96,7	96,52–96,86	382	88,55±23,04
30–35	9080	95,9	95,7–96,1	383	104,25±20,50
40–49	7861	96,1	95,9–96,2	375	92,15±19,89
Всего	55 082	97,1	97,03–97,17	1968	96,47±19,46

новой вакцинацией детей 12 месяцев и 6 лет была проведена кампания дополнительной иммунизации девочек и мальчиков в возрасте 11–19 лет (1987–2005 г. рожд.) моновалентной вакциной против краснухи, в рамках которой было привито 1 022 247 человек (что составило более 10% от всего населения страны). Проведенные мероприятия кардинальным образом отразились на заболеваемости, и, начиная с 2007 г., в Республике Беларусь ежегодно регистрировались единичные завозные случаи (менее 1 на 1 млн населения), вызванные вирусом краснухи различных генетических вариантов [4], или краснуха не регистрировалась вовсе (2010, 2016, 2018, 2019 гг.). Европейской региональной комиссией по верификации элиминации кори и краснухи Республика Беларусь отнесена к числу стран, где эти обе инфекции элиминированы.

В Российской Федерации вакцинация моновалентной вакциной против краснухи в 12 месяцев и ревакцинация детей в 6 лет введена в календарь профилактических прививок в 1997 г. Однако массовое использование специфической профилактики в борьбе с краснухой началось в 2001 г., когда поставки вакцинного препарата стали осуществляться стабильно, что позволило существенно увеличить охват прививками детского населения. В России охват вакцинацией против краснухи детей в возрасте одного года поддерживается на уровне не менее 95% с 2006 г., охват ревакцинацией на этом уровне детей в возрасте 6 лет — с 2008 г. Увеличение числа привитых против краснухи произошло также за счет дополнительной компании 2006–2007 гг. в рамках Национального проекта «Здоровье», когда было привито более 11,5 млн детей, подростков (без учета гендерного различия) и женщин в возрасте 18–25 лет, что способствовало снижению заболеваемости. С 2007 г. в Национальный календарь профилактических прививок и в календарь профилактических прививок по эпидемическим показаниям введена вакцинация женщин в возрасте от 18 до 25 лет (включительно) не болевших, непривитых и привитых однократно. В этой возрастной группе также реализуется двукратная тактика иммунизации.

В 2014 г. в России достигнут целевой показатель элиминации инфекции — менее 1 случая на 1 млн населения, который сохраняется до настоящего времени: ежегодно регистрируется от 3 до 38 случаев краснухи [1]. С 2017 г. Россия входит в число стран, имеющих статус территорий, элиминировавших краснуху.

О сохраняющемся стабильно высоком уровне популяционного иммунитета к вирусу краснухи у населения Республики Беларусь и Российской Федерации свидетельствуют результаты сравнительного анализа показателей иммунитета, полученных в 2019 г. и в предыдущие годы.

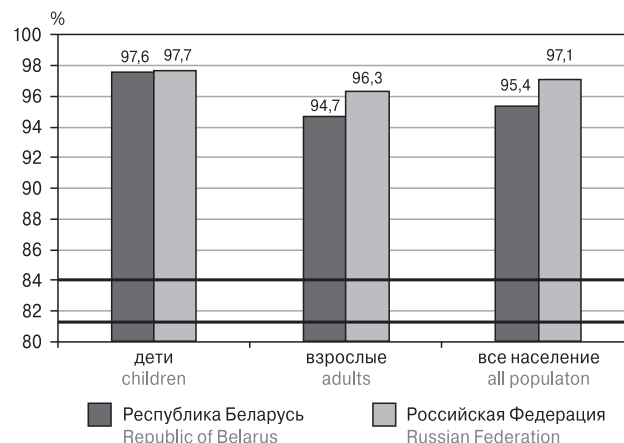


Рисунок. Доля серопозитивных к краснухе среди детей и взрослых в Республике Беларусь и Российской Федерации в 2019 г.

Figure. The 2019 proportion of rubella seropositive subjects among children and adults in the Republic of Belarus and the Russian Federation

Примечание. На рисунке красной линией обозначен диапазон серопревалентности к вирусу краснухи (83–85%) для предупреждения устойчивой передачи инфекции. В группу детей входят лица до 15 лет, взрослые — 16 и старше.

Note. The red line denote a range of seroprevalence against rubella virus (83–85%) to prevent sustained infection transmission. The group of children includes subjects under 15, adults — 16 and older years old.

Так, изучение популяционного иммунитета к краснухе в Республике Беларусь в 2011 г. с использованием иммуноферментной тест-системы производства «Диапроф» (Украина), показало, что IgG-антитела к вирусу краснухи в условно-защитной и защитной концентрациях имели 709 из 756 (93,8±0,9%) обследованных. Показатель серопозитивных достиг рекомендованного порогового уровня 84–88% во всех регионах страны (колебался от 89,3% в Минской области до 96,6% в Могилевской области) и во всех исследованных группах населения (колебался от 89,1% в возрастной группе 20–29 лет до 100% в возрастных группах 11–14 и 40–60 лет). Сравнение данных, полученных в 2019 г., с результатами изучения популяционного иммунитета к краснухе, выполненного в 2011 г., свидетельствует о том, что, несмотря на отсутствие бустер-эффекта циркулирующим вирусом краснухи при низком уровне заболеваемости, иммунитет продолжает оставаться на достаточно высоком уровне (93,8±0,9% — в 2011 г., 95,44±0,79 — 2019 г.), подтверждая высокую эффективность плановой иммунизации детей 12 мес. и 6 лет с использованием вакцины КПК и правильно выбранную в 2006 г. тактику проведения дополнительной компании вакцинации лиц 11–19 лет обоего пола.

Результаты серологического мониторинга состояния специфического иммунитета населения к вирусу краснухи в России, полученные в 2019 г., сравнивали с данными 2012 г., поскольку вышеуказанные индикаторные возрастные группы для серологического контроля были введены в практику здравоохранения нормативно-распорядительными документами только в 2011 г., при этом метод исследования и тест-система были аналогичными применяемым в 2019 г., что позволяет сравнивать и сопоставлять полученные результаты. Следует лишь отметить, что с учетом истории вакцинопрофилактики краснухи в России, контингент обследованных в 2012 г. имел свои особенности: лица в возрасте 30–35 лет, то есть 1977–1982 гг. рождения, как и в возрасте 40–49 лет, 1963–1972 гг. рождения, не были привиты против краснухи, и, следовательно, уровень серопозитивных характеризовал состояние постинфекционного иммунитета к вирусу краснухи. Доля серопозитивных в этих группах в 2012 г. составляла $96,1\% \pm 0,028$ и $97,4\% \pm 0,036$ и свидетельствовала о встрече с вирусом краснухи ранее, когда заболеваемость регистрировалась на уровне 200–250 на 100 тыс. населения. В возрастных группах 3–4 лет (привитые однократно), 9–10 и 15–17 лет (привитые двукратно) показатели серопревалентности были практически одинаковыми — $97,1\% \pm 0,02$; $97,2\% \pm 0,02$ и $96,9\% \pm 0,02$ соответственно, подтверждая данные литературы о высокой эффективности однократной вакцинации против краснухи [2]. Полученные в 2019 г. результаты не имели существенных отличий от результатов 2012 г. с той лишь разницей, что взрослые 30–35 лет уже были представлены привитым против краснухи контингентом — 95,9% иммунных лиц. Постинфекционный иммунитет в группе лиц 40–49 лет по-прежнему оставался достаточно высоким — 96,1%.

В целом среди обследованных на краснуху в 2012 г. было выявлено $96,81\% \pm 0,01$ серопозитивных, что практически не отличается от показателя, полученного в 2019 г., — $97,14\% \pm 0,07$. Колебания доли серопозитивных к вирусу краснухи были статистически не значимы как в разрезе региональных центров, так и в сравниваемые годы. Если в 2012 г. этот показатель колебался от 95,2% (Ростовский РЦ) до 97,9% (Красноярский РЦ), то в 2019 г. — от 95,6% (Красноярский РЦ) до 98,6% (Пермский РЦ).

Благодаря одинаковой тактике плановой иммунизации детского населения (в 12 месяцев и 6 лет) получены сопоставимые результаты оценки состояния иммунитета населения к вирусу краснухи в Республике Беларусь и Российской Федерации — 97,6 и 97,7% соответственно. Несмотря на разные подходы к организации исследования и подбору контингента, некоторые различия в показателях серопревалент-

ности в группе взрослых, вакцинированных против краснухи (в РБ — 94,7%, в РФ — 96,3%), также как и разница в показателях серопозитивных лиц среди всего населения (95,4 и 97,1% соответственно) были статистически не значимы.

В возрастных группах населения, где популяционный иммунитет формировался за счет перенесенной ранее инфекции (в Республике Беларусь это группа 33–45 лет, в России — 40–49 лет), доля серопозитивных была практически одинаковой и составила 96,5 и 96,2% соответственно, свидетельствуя о сходном уровне распространения краснухи на обеих территориях в довакцинальный период.

Сравнение данных, полученных в Республике Беларусь в 2019 г., с результатами изучения популяционного иммунитета к краснухе, выполненного 8 лет назад, в 2011 г., свидетельствует о том, что, несмотря на отсутствие бустерного эффекта циркулирующим вирусом краснухи, иммунитет продолжает оставаться на достаточно высоком уровне ($93,8\% \pm 0,9\%$ — в 2011 г., $95,44\% \pm 0,79$ — 2019 г.). В России эти показатели составили $96,8\% \pm 0,01\%$ в 2019 г. и $97,1\% \pm 0,07\%$ — в 2012 г., что подтверждает высокую эффективность использования тактики плановой иммунизации и проведения дополнительных прививочных кампаний. Все эти мероприятия привели к созданию иммунной прослойки высокого уровня среди детей, подростков и молодых взрослых, что весьма важно, поскольку снижает число источников инфекции и возможность встречи с вирусом краснухи беременных женщин, и предупреждает возможность развития врожденной патологии плода.

В процессе исследования были получены результаты, которые сопоставимы с результатами других исследователей в разных странах мира [6, 7, 8, 10, 11, 12, 14]. Оценка авторами полученных результатов проводилась в соответствии с существующей политикой вакцинации в каждой стране.

Сопоставление среднего уровня концентрации IgG к вирусу краснухи в разных возрастных группах в Республике Беларусь и России показали отсутствие линейной тенденции снижения среднего уровня антител с возрастом. Так, в Республике Беларусь анализируемый показатель колебался от 128,08 МЕ/мл в группе 6–15 лет до 215,81 МЕ/мл — в группе детей 2–5 лет. В группе взрослых средний уровень концентрации антител выявлялся на уровне, превышающем 230 МЕ/мл. В России колебания составили от 115,25 МЕ/мл в группе детей 3–4 лет, до 88,55 МЕ/мл в группе взрослых 25–29 лет. Самый высокий средний уровень концентрации IgG-антител у взрослых — 104,25 МЕ/мл был выявлен в группе взрослых 30–35 лет. Все это подтверждает результаты исследований, которые убедительно показали отсутствие корреляции

между возрастом и уровнем специфических антител, что свидетельствует об отсутствии проблемы ослабления иммунитета против краснухи в популяции в настоящее время [8].

Заключение

Таким образом, результаты изучения состояния специфического иммунитета к краснухе детского и взрослого населения, выполненного в 2019 г., показали, что при использовании разных вакцинных препаратов и подходов к организации этого исследования и в Республике Беларусь, и в Российской Федерации во всех возрастных группах были выявлены специфические IgG к вирусу краснухи на достаточно высоком уровне — более 90%, при этом уровень специфических антител остается высоким, несмотря на низкий показатель заболеваемости в обеих странах и отсутствие бустер-эффекта. Это подтверждает высокую эффективность плановой иммунизации детей 12 мес. и 6 лет и правильно выбранную тактику проведения дополнительных мероприятий — кампаний вакцинации отдельных возрастных групп (11–19 лет обоего пола в Республике Беларусь в 2006 г. и 1–17 лет обоего пола, женщин 18–25 лет в России), а также свидетельствует об эпидемическом благополучии в отношении данной инфекции и подтверждает факт элиминации краснухи, поскольку достигнутый уровень серопревалентности является достаточным для предотвращения трансмиссии вируса. Плановая иммунизация декретированных контингентов и дополнительные мероприятия по иммунизации привели к созданию иммунной прослойки

высокого уровня среди детей, подростков и молодых взрослых. Достоверность полученных результатов подтверждается репрезентативностью выборки для исследования по количеству и качеству. Так, отбор обследуемых осуществлялся на всех административных территориях обеих стран. Возрастные группы выбраны в соответствии с национальной историей иммунизации.

Полученные результаты исследования серопревалентности к вирусу краснухи были сопоставимы — 95,44% в Республике Беларусь и 97,14% в России, что свидетельствует о правомерности использования как рутинного серологического исследования коллективного иммунитета, или серомониторинга, так и периодического, или скринингового, исследования. Основным условием остается соблюдение репрезентативности выборки по количеству и качественным характеристикам обследуемых групп (возраст, административно-территориальное распределение и др.).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарность

Авторы выражают признательность сотрудникам и руководителям РЦ по надзору за корью и краснухой за помощь в проведении анализа, вирусологам ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в субъектах Российской Федерации за проведение серологических исследований.

Список литературы/References

1. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2019 году: Государственный доклад. [On the state of sanitary and epidemiological welfare of the population in the Russian Federation in 2019: state report. (In Russ.)] URL: https://www.rosпотребнадзор.ru/upload/iblock/8e4/gosdoklad-za-2019_seb_29_05.pdf (03.11.2021)
2. Самойлович Е.О. Надзор за вакциноуправляемыми инфекциями в Республике Беларусь: соответствие международным стандартам // Здравоохранение. 2014. № 6. С. 7–11. [Samoilovich E.O. Surveillance of vaccine-preventable infections in the Republic of Belarus: compliance with international standards. *Zdravookhranenie = Healthcare*, 2014, no. 6, pp. 7–11. (In Russ.)]
3. Самойлович Е.О., Свирчевская Е.Ю., Ермолович М.А., Семейко Г.В. Популяционный иммунитет к краснухе в Республике Беларусь в 2011 г. // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. Минск: ГУ РНМБ, 2012. Вып. 5. С. 261–264. [Samoilovich E.O., Svirchevskaya E.Yu., Yermolovich M.A., Semeiko G.V. Herd immunity to rubella in the Republic of Belarus in 2011. In: Modern problems of human infectious pathology: collection of scientific works. *Minsk: RSML*, 2012. Iss. 5, pp. 261–264. (In Russ.)]
4. Семейко Г.В., Самойлович Е.О., Ермолович М.А., Свирчевская Е.Ю. Краснуха в Республике Беларусь в 2016–2019 гг. // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр.; под ред. В.А. Горбунова. Минск: СтройМедиаПроект, 2019. Вып. 12. С. 74–77. [Semeiko G.V., Samoilovich E.O., Yermolovich M.A., Svirchevskaya E.Yu. Rubella in the Republic of Belarus in 2016–2019. Modern problems of human infectious pathology: collection of scientific works. Ed. V.A. Gorbunov. *Minsk: StroyMediaProekt*, 2019. Iss. 12, pp. 74–77. (In Russ.)]
5. Таточенко В.К., Озерецковский Н.А. Вакцинопрофилактика-2018: справочник. 13-е изд., расширенное. М.: ООО «МСД Фармасьютикалс», 2018. 268 с. [Tatochenko V.K., Ozeretskovsky N.A. Vaccinoprophylaxis-2018, handbook, 13th ed., expanded. *Moscow: LLC "MSD Pharmaceuticals"*, 2018. 268 p. (In Russ.)]
6. Bianchi F.P., De Nitto S., Stefanizzi P., Larocca A.M.V., Germinario C.A., Tafuri S. Immunity to rubella: an Italian retrospective cohort study. *BMC Public Health*, 2019, vol. 19, no. 1: 1490. doi: 10.1186/s12889-019-7829-3
7. Borràs E., Campins M., Esteve M., Urbiztondo L., Broner S., Bayas J.M., Costa J., Domínguez A.; Working Group for the Study of the Immune Status in Healthcare Workers. Are healthcare workers immune to rubella? *Hum. Vaccin. Immunother.*, 2014, vol. 10, no. 3, pp. 686–691. doi: 10.4161/hv.27498

8. Coppeta L., Ferrari C., Iannuzzi I., D'Alessandro I., Balbi O., Pietroiusti A., Trabucco Aurilio M. Rubella immunity among Italian female healthcare workers: a serological study. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2020, vol. 17, no. 21: 7992. doi: 10.3390/ijerph17217992
9. Crooke S.N., Haralambieva I.H., Grill D.E., Ovsyannikova I.G., Kennedy R.B., Poland G.A. Seroprevalence and durability of rubella virus antibodies in a highly immunized population. *Vaccine*, 2019, vol. 37, no. 29, pp. 3876–3882. doi: 10.1016/j.vaccine.2019.05.049
10. Dean A.G., Sullivan K.M., Soe M.M. OpenEpi: open source epidemiologic statistics for public health, Version. URL: <http://www.OpenEpi.com>
11. Fine P.E.M., Mulholland K., Scott J.A., Edmunds W.J. Community protection. In: Plotkin's Vaccines. Eds.: Orenstein W., Offit P., Edwards K.M., Plotkin S. Elsevier, 2018, pp. 1512–1531. doi: 10.1016/C2013-0-18914-3
12. Haralambieva I.H., Ovsyannikova I.G., Kennedy R.B., Goergen K.M., Grill D.E., Chen M.H., Hao L., Icenogle J., Poland G.A. Rubella virus-specific humoral immune responses and their interrelationships before and after a third dose of measles-mumps-rubella vaccine in women of childbearing age. *Vaccine*, 2020, vol. 38, no. 5, pp. 1249–1257. doi: 10.1016/j.vaccine.2019.11.004
13. Hyde T.B., Kruszon-Moran D., McQuillan G.M., Cossen C., Forghani B., Reef S.E. Rubella immunity levels in the United States population: has the threshold of viral elimination been reached? *Clin. Infect. Dis.*, 2006, vol. 43, suppl. 3, pp. S146–S150. doi: 10.1086/505947
14. Ogawa T., Inoue T., Kasahara K., Konishi M., Mikasa K. Impact of vaccination on measles, mumps, and rubella antibody titers in Japanese healthcare workers: an observational study. *PLoS One*, 2020, vol. 15, no. 3: e0230329. doi: 10.1371/journal.pone.0230329
15. World Health Organization. Guidance on conducting serosurveys in support of measles and rubella elimination in the WHO European Region. Copenhagen, 2013. 19 p. URL: https://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0011/236648/Guidance-on-conducting-serosurveys-in-support-of-measles-and-rubella-elimination-in-the-WHO-European-Region.pdf (15.10.2021)
16. World Health Organization. Manual for the laboratory-based surveillance of measles, rubella, and congenital rubella syndrome. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2018. 18 p. URL: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/immunization/vpd_surveillance/lab_networks/measles_rubella/manual/chapter-1.pdf?sfvrsn=f7f1fc1d_2&download=true (20.11.2020)

Авторы:

Цвиркун О.В., д.м.н., руководитель эпидемиологического отдела ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия; доцент кафедры инфекционных болезней с курсами эпидемиологии и фтизиатрии ФГАОУ ВО Российский университет дружбы народов, Москва, Россия;

Самойлович Е.О., д.м.н., профессор, зав. лабораторией вакциноуправляемых инфекций ГУ Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь;

Тихонова Н.Т., д.б.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории цитокинов ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Герасимова А.Г., к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории профилактики вирусных инфекций ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Тураева Н.В., к.м.н., руководитель лаборатории профилактики вирусных инфекций ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Ермолович М.А., д.м.н., главный научный сотрудник лаборатории вакциноуправляемых инфекций ГУ Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь;

Семейко Г.В., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории вакциноуправляемых инфекций ГУ Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь.

Authors:

Tsvirkun O.V., PhD, MD (Medicine), Head of the Epidemiology Department, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation; Associate Professor, Department of Infectious Diseases with Courses in Epidemiology and Phthisiology, The Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation;

Samoilovich E.O., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Vaccine Preventable Diseases, Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Belarus;

Tikhonova N.T., PhD, MD (Biology), Professor, Head Researcher, Laboratory of Cytokines, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Gerashimova A.G., PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Viral Infections Prophylaxis, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Turaeva N.V., PhD (Medicine), Head of the Laboratory for Viral Infections Prevention, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Ermolovich M.A., PhD, MD (Medicine), Head Researcher, Laboratory of Vaccine Preventable Diseases, Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Belarus;

Semeiko G.V., PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Vaccine Preventable Diseases, Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Belarus.

Поступила в редакцию 26.11.2021
Отправлена на доработку 14.01.2022
Принята к печати 28.07.2022

Received 26.11.2021
Revision received 14.01.2022
Accepted 28.07.2022

ПОЛУЧЕНИЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭРИТРОЦИТАРНОГО АНТИГЕННОГО МЕЛИОИДОЗНОГО ДИАГНОСТИКУМА ПРИ АНАЛИЗЕ ПРОБ СЫВОРОТОК ОТ ЛИЦ ИЗ ЭНДЕМИЧНЫХ ПО МЕЛИОИДОЗУ ПРОВИНЦИЙ ХА ЗАНГ, ЛАНГШОН И КУАНГНИНЬ СОЦИАЛИСТИЧЕСКОЙ РЕСПУБЛИКИ ВЬЕТНАМ

Д.Л. Терешко¹, И.В. Новицкая¹, И.Б. Захарова¹, Чиен Д.², А.Н. Кузнецов²,
М.Я. Кулаков¹, А.А. Будченко¹, В.Г. Пушкар¹, Д.В. Виктор¹, А.В. Топорков¹

¹ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Волгоград, Россия

² Совместный Российско-Вьетнамский Тропический научно-исследовательский и технологический центр, г. Ханой, Социалистическая Республика Вьетнам

Резюме. Мелиоидоз — особо опасная инфекция с эндемичным распространением, вызванная грамотрицательным микроорганизмом II группы патогенности *Burkholderia pseudomallei*. В эндемичных странах мелиоидоз занимает одно из ведущих мест по летальности после ВИЧ, туберкулеза и — в последние годы — COVID-19. Естественные экологические ниши возбудителя находятся в зонах тропического и субтропического климата, прежде всего в Юго-Восточной Азии и Австралии, где во влажной почве и воде в определенном температурном диапазоне окружающей среды поддерживается его существование как вида. Однако в настоящее время все более часто случаи мелиоидоза регистрируют вне эндемичных территорий, что подчеркивает актуальность совершенствования средств и методов лабораторной диагностики этой болезни как для государств, расположенных в зоне природных очагов, так и для стран в случае завоза на их территорию этой малоизвестной для местного здравоохранения инфекции. В таких странах, включая РФ, население не имеет естественного иммунитета к возбудителю, в связи с чем эта инфекция приобретает еще большую клиническую и эпидемиологическую значимость. В Волгоградском научно-исследовательском противочумном институте сконструирован эритроцитарный антигенный мелиоидозный диагностикум для РНГА, позволяющий выявлять присутствие мелиоидозных антител в сыворотках крови. Препарат получен на основе биологического носителя — эритроцитов барана, сенсибилизированных выделенными белковыми антигенными комплексами *B. pseudomallei*. Высокие аналитические характеристики диагностикума были подтверждены на моде-

Адрес для переписки:

Терешко Дмитрий Леонидович
400131, Россия, г. Волгоград, ул. Голубинская, 7,
ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский
противочумный институт Роспотребнадзора.
Тел.: 8 (8442) 37-37-74; 8 937 082-93-11 (моб.).
E-mail: dltereshko@gmail.com

Contacts:

Dmitrii L. Tereshko
400131, Russian Federation, Volgograd, Golubinskaya str., 7,
Volgograd Plague Control Research Institute.
Phone: +7 (8442) 37-37-74; +7 937 082-93-11 (mobile).
E-mail: dltereshko@gmail.com

Для цитирования:

Терешко Д.Л., Новицкая И.В., Захарова И.Б., Чиен Д., Кузнецов А.Н.,
Кулаков М.Я., Будченко А.А., Пушкар В.Г., Виктор Д.В., Топорков А.В.
Получение и использование эритроцитарного антигенного
мелиоидозного диагностикума при анализе проб сывороток от лиц
из эндемичных по мелиоидозу провинций Ха Занг, Лангшон и Куангнинь
Социалистической Республики Вьетнам // Инфекция и иммунитет.
2022. Т. 12, № 5. С. 919–928. doi: 10.15789/2220-7619-OAU-1933

Citation:

Tereshko D.L., Novitskaya I.V., Zakharova I.B., Trien D., Kuznetsov A.N.,
Kulakov M.Ya., Budchenko A.A., Pushkar V.G., Viktorov D.V., Toporkov A.V.
Obtaining and using erythrocyte antigenic melioidosis diagnostic agent in the
analysis of serum samples from melioidosis-endemic provinces Ha Giang,
Lang Son and Quang Ninh of the Socialist Republic of Vietnam // Russian
Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12,
no. 5, pp. 919–928. doi: 10.15789/2220-7619-OAU-1933

© Терешко Д.Л. и соавт., 2022

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-OAU-1933>

лях сывороток иммунизированных и переболевших экспериментальных животных. С помощью полученного набора реагентов проведено изучение уровня антител к возбудителю мелиоидоза в образцах сывороток крови жителей 3-х провинций Вьетнама (Ха Занг, Лангшон и Куангнинь), а также — в качестве контрольной группы — жителей Волгоградской области. В пробах, полученных из неэндемичного региона, не более чем в 25% случаях были зарегистрированы титры РНГА, не превышающие разведение 1:10, что обусловлено, по-видимому, кросс-реактивностью сывороточных иммуноглобулинов. Положительные пробы в образцах сывороток клинически здоровых жителей провинций Ха Занг, Лангшон и Куангнинь в титре 1:10 выявлены в 71,5%, в разведениях 1:20—1:80 — в 28,5% наблюдений. С нашей точки зрения, диагностическую значимость, отражающую напряженность противомелиоидозного иммунитета населения, имеет установленный в РНГА титр сывороточных антител 1:80.

Ключевые слова: мелиоидоз, *Burkholderia pseudomallei*, иммунодиагностика, популяционный иммунитет, РНГА, антигенный эритроцитарный диагностикум, Социалистическая Республика Вьетнам.

OBTAINING AND USING ERYTHROCYTE ANTIGENIC MELIIDOSIS DIAGNOSTIC AGENT IN THE ANALYSIS OF SERUM SAMPLES FROM MELIIDOSIS-ENDEMIC PROVINCES HA GIANG, LANG SON AND QUANG NINH OF THE SOCIALIST REPUBLIC OF VIETNAM

Tereshko D.L.^a, Novitskaya I.V.^a, Zakharova I.B.^a, Trien D.^b, Kuznetsov A.N.^b, Kulakov M.Ya.^a, Budchenko A.A.^a, Pushkar V.G.^a, Viktorov D.V.^a, Toporkov A.V.^a

^a *Volgograd Plague Control Research Institute, Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare, Volgograd, Russian Federation*

^b *Joint Russian-Vietnamese Tropical Research and Technology Center, Hanoi, Socialist Republic of Vietnam*

Abstract. Melioidosis is a particularly dangerous infection with endemic distribution caused by the Gram-negative microorganism from the pathogenicity group II *Burkholderia pseudomallei*. In endemic countries, melioidosis holds one of the leading places in mortality rate after HIV, tuberculosis and, in recent years, COVID-19. The natural ecological pathogen niches are located in tropical and subtropical climate zones, primarily in Southeast Asia and Australia, where its existence as a species is maintained in moist soil and water in a certain temperature environmental range. However, at present, more and more often cases of melioidosis are registered outside endemic territories, which emphasizes the relevance of improving the means and methods of laboratory diagnostics of this disease both for countries located in the zone of natural foci as well as for local healthcare of the countries after importation of this poorly known infection into their territory. In such countries, including the Russian Federation, the population has no natural immunity to the pathogen, and therefore this infection acquires even greater clinical and epidemiological significance. In the Volgograd Plague Control Research Institute, an erythrocyte antigenic melioidosis diagnostic agent for IHA was designed allowing to detect the presence of serum melioidosis antibodies. The diagnostic agent was obtained on the basis of a biological carrier — ram erythrocytes sensitized with isolated protein antigenic complexes of *B. pseudomallei*. The high analytical characteristics of the diagnostic agent were confirmed on sera models of immunized and recovering experimental animals. Using the obtained set of reagents, the level of serum antibodies against the causative agent of melioidosis was studied in residents from the 3 provinces of Vietnam (Ha Giang, Lang Son and Quang Ninh), as well as in control group composed of residents of the Volgograd region. In samples obtained from a non-endemic region, not more than 25% of cases contained IHA titers at lower than 1:10 dilution, which is apparently due to cross-reactivity of serum immunoglobulins. Positive serum samples from clinically healthy residents of Ha Giang, Lang Son and Quang Ninh provinces were at a titer of 1:10 detected in 71.5%, in dilutions of 1:20—1:80 — in 28.5% of cases. Thus, we believe that serum antibody titer of 1:80 established in the IHA results, has a diagnostic significance, reflecting the intensity of the anti-melioidosis populational immunity.

Key words: melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*, immunodiagnostics, population immunity, IHA, erythrocyte antigenic diagnostic agent, Socialist Republic of Vietnam.

Введение

Эндемичные инфекции занимают особое место в структуре общей заболеваемости, так как их распространение тесно связано с персистенцией возбудителей в определенных зонах и поддержанием там природных очагов, представляющих для населения планеты постоянную эпидемиологическую опасность.

Мелиоидоз (болезнь Уитмора, пневмоэнтерит и др.) — особо опасная инфекция, границы эндемичности которой, согласно последним данным,

охватывают зону между 30-ми параллелями северной и южной широт всех континентов [1]. Традиционно мелиоидоз считают заболеванием, наиболее характерным для стран Южной и Юго-Восточной Азии, в частности, Вьетнама, что, по-видимому, обусловлено особенностями географического положения этой местности, главная из которых — рекордно длинная (более 3,5 тыс. км) узкая береговая линия, что оказывает мощнейшее влияние на климат страны, подверженной действию муссонов, цунами, наводнений и других природных катаклизмов, сопровождаю-

щихся обилием осадков и грязевых потоков. С учетом широт, в границах которых расположен Вьетнам, высокая влажность и среднегодовой температурный диапазон от +26 до +33°C представляют собой основные факторы, формирующие климатические условия этого региона. Не случайно другие названия мелиоидоза — «Вьетнамская лихорадка» и «Вьетнамская часовая бомба замедленного действия». Известно, что у участников войны во Вьетнаме мелиоидоз мог проявиться даже спустя десятилетия после возвращения из эндемичного региона [10].

Как правило (до 85% случаев) при мелиоидозе наблюдают острое начало, нередко с септикопиемией [18], которая без своевременного этиотропного лечения часто заканчивается фатально. Пик заболеваемости отмечают в период дождей [14], преимущественно среди фермеров и сельских жителей, возделывающих рис [6, 12], что подтверждает основную роль контактного пути передачи инфекции [11]. Однако иные пути возможного инфицирования — алиментарный, ингаляционный, половой — не исключают случаев заболевания и среди других категорий населения.

Возбудителем мелиоидоза является *Burkholderia pseudomallei* — микроорганизм II группы патогенности, характеризующийся чрезвычайно высоким уровнем генетически детерминированной резистентности к антибиотикам и обладающий способностью в течение длительного времени персистировать в макроорганизме, избегая уничтожения системой иммунитета [1].

В природных условиях *B. pseudomallei* формирует естественные ниши в глубоких слоях влажных почв, насыщенных грунтовыми водами, где, наряду с другими родственными почвенными буркхольдериями, такими как *B. cepacia* и *B. thailandensis*, входит в состав биоценоза тропического и субтропического пояса [15, 17].

Следует отметить, что ранее считавшийся сапрофитическим вид *B. thailandensis* так же, как и *B. pseudomallei*, способен вызывать тяжелую инфекцию с септическими проявлениями, особенно у больных с нарушением иммунного статуса [13].

Возможные многообразные контакты людей, проживающих в эндемичном регионе, с широко представленными в окружающей среде буркхольдериями приводят к формированию у населения естественной иммунной прослойки, то есть популяционного иммунитета, обусловленного накоплением в сыворотках специфических иммуноглобулинов. В ряде случаев это может происходить без манифестации инфекции. И действительно, работами зарубежных авторов показана потенциальная возможность обнаружения мелиоидозных антител в сыворотках крови здоровых лиц [7]. Однако при этом авторы рекомендуют учитывать случаи возможных положительных реакций сывороточных антител, обусловленных перекрестной реактивностью *B. pseudomallei* и *B. thailandensis* [10].

В целом, уровень сывороточных иммуноглобулинов может служить относительным показателем как распространенности возбудителя в эндемичной зоне, так и его контагиозности.

Для выявления антител в сыворотках применяют различные методы иммуноанализа, одним из которых, включенным в принятые в Российской Федерации схемы экспресс-диагностики мелиоидоза (МУ 4.2.2787-10), является реакция непрямой гемагглютинации (РНГА). РНГА представляет собой один из наиболее доступных и простых методов иммуноанализа, позволяющих в течение нескольких часов без использования специального оборудования получить точные, воспроизводимые и хорошо визуализируемые данные.

В зависимости от используемого препарата с помощью РНГА осуществляют выявление в исследуемых образцах либо антигенов, либо антител. В последнем случае РНГА позволяет провести оценку состояния естественного популяционного иммунитета у населения, проживающего в эндемичном регионе, в частности, в провинциях Ха Занг, Ланшон и Куангнинь Социалистической Республики Вьетнам.

В рамках работы, проводимой Совместным Российско-Вьетнамским Тропическим научным-исследовательским и технологическим центром, нами поставлена цель разработать эритроцитарный антигенный мелиоидозный диагностикум и определить возможность его использования для выявления мелиоидозных антител с помощью РНГА при изучении образцов сывороток населения отдельных провинций Вьетнама как зоны эндемичного распространения *B. pseudomallei*.

Материалы и методы

В качестве биологической основы диагностикума для РНГА использовали эритроциты, полученные из дефибринированной крови барана и суспендированные в 0,15 М растворе NaCl до концентрации по объему 8%. Эритроциты были формализированы (3% формалин в соотношении 1:1, 37°C, 20 ч при постоянном перемешивании), танизированы (танин 1:40 000, соотношение 1:1, 37°C, 15 мин), после чего отмыты путем центрифугирования (1500 об/мин, 3-кратно по 15 мин) и подвергнуты прогреванию (45°C, 30 мин).

Антигенный комплекс, предназначенный для сенсибилизации эритроцитов, получали из ацетовысушенных и дезинтегрированных («Artek sonic dismembrator model 150», 100 Вт, 20 кГц — 1 мин, 5х, на льду) клеток штамма *B. pseudomallei* 107, представленного в лаборатории Коллекционных штаммов ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. После центрифугирования взвеси клеток (6000 об/мин — 25 мин)

к надосадку добавляли 1:1 насыщенный раствор сульфата аммония $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и оставляли для высаливания (18 ч, 4°C). Осадок отделяли центрифугированием (6000 об/мин — 25 мин), ресуспендировали в 0,15 М растворе NaCl, очищали от солей путем диализа, концентрировали, изучали методом электрофореза в ПААГ с додецилсульфатом натрия (Laemmli U.K., 1970), после чего использовали в работе. Содержание белка в препарате определяли спектрофотометрически (NanoPhotometer P 300, Implen, Германия) по отношению к стандартному 1% раствору БСА при длине волны 280 нм. Подбор дозы сенситина проводили в диапазоне концентраций 250–1500 мкг/мл.

Сенсибилизацию эритроцитов полученным антигенным комплексом осуществляли в соответствии с его оптимальной сенсибилизирующей дозой [5].

Готовый препарат разливали в ампулы по 1 мл, замораживали до -70°C , затем подвергали лиофилизации в протективной среде (1% НКС, 15% реополиглобулина, 7,5% сахарозы в дистиллированной воде) по 10-ступенчатой программе, в ходе которой в течение 24 ч и более снижение вакуума от 0,3 до 0,1 (ГПа) сопровождалось плавным подъемом температуры полка десублиматора от -70°C до комнатной температуры [4]. После окончания процесса высушивания ампулы запаивали и вскрывали непосредственно перед началом исследования, добавляя к лиофилизату 1 мл 0,15 М хлорида натрия, содержащего с целью стабилизации препарата формалин в конечной концентрации 1%.

Изучение аналитических характеристик диагностикума до и после его высушивания проводили на моделях гомо- и гетерологичных гипериммунных сывороток, сывороток экспериментально зараженных животных, а также образцов сывороток человека из произвольной выборки лиц, проживающих на эндемичных территориях трех провинций Вьетнама (Ха Занг, Лангшон, Куангнинь) и вне их.

Все образцы сывороток для исследования в РНГА с эритроцитарным антигенным мелиоидозным диагностикумом были любезно предоставлены сотрудниками Совместного Российско-Вьетнамского Тропического научно-исследовательского и технологического центра под кодовыми наименованиями согласно Хельсинкской декларации [2, 3]. Сыворотки были разделены на аликвоты и зарезервированы в хранилище при температуре -70°C .

Выполнение РНГА осуществляли в микроварианте. Сыворотки инактивировали при 56°C , разводили 1:10 в 0,15 М NaCl и титровали двойным шагом в объеме 50 мкл в 1% нормальной кроличьей сыворотке (НКС), содержащей 1% формалина, в полистироловой 96-луночной пластине с V-образным дном, после чего в каждую лунку вносили по 25 мкл 2,5% диагностикума,

и пластину оставляли при комнатной температуре под крышкой. Отрицательными контролями служили лунки с добавлением интактной 1% НКС. Учет реакции осуществляли по 4-крестовой системе: предварительно через 2 ч и окончательно — спустя 24 ч после постановки.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программного обеспечения Microsoft Excel. Границы доверительного интервала (95% CI) рассчитывали по методу Уилсона (Wilson).

Результаты

Антигенный комплекс возбудителя мелиоидоза, осажденный с помощью насыщенного до 40% раствора сульфата аммония и ресуспендированный до концентрации 10 мг белка/мл, был использован для сенсибилизации обработанных танином и формалином эритроцитов. В состав сенситина входили 4 мажорных протеина — 28, 29, 40, 51,2 kDa.

Оптимальная сенсибилизирующая доза, при которой нагрузка сенситина обеспечивала получение образцов диагностикума с чувствительностью не ниже 1:1280 с контрольной гипериммунной козьей сывороткой, составила 250 мкг/мл, что послужило основанием для использования в ходе конструирования опытной серии препарата концентрации сенситина 500 мкг/мл (двойной сенсибилизирующей дозы).

Аналитические характеристики полученного диагностикума были изучены на наборах гомо- и гетерологичных гипериммунных сывороток, а также сывороток зараженных различными штаммами возбудителей особо опасных инфекций экспериментальных животных (табл. 1).

Как следует из данных таблицы, нами был получен препарат эритроцитарного антигенного мелиоидозного диагностикума, продемонстрировавший на моделях иммунных и переболевших чувствительности и специфичности, которые в полной мере в эксперименте обеспечивали выявление специфических антител к *B. pseudomallei*.

Для определения фоновых показателей возможных перекрестно реагирующих антител у населения Российской Федерации были изучены в РНГА образцы 36 интактных сывороток человека (жителей г. Волгограда) при их титровании двукратным шагом с начального разведения 1:5.

Итоги РНГА, отражающие взаимодействие антигенов возбудителя мелиоидоза с антителами, присутствовавшими в образцах интактных сывороток человека, представлены в табл. 2.

Как следует из представленных данных, на модели образцов сывороток, полученных из неэндемичного региона, положительные результаты РНГА в титре проб 1:5 обнаружены в 14 (38,9%), 1:10 — в 9 (25%) наблюдениях. В 13 слу-

чаях из 36 (36,1%) антител, перекрестно реагирующих с возбудителем мелиоидоза, не было зарегистрировано ни в одном из изученных разведений, то есть все 36 образцов сывороток, принадлежащих жителям неэндемичной зоны, в титрах от 1:20 и выше оказались отрицательными.

В рамках работы, проводимой совместно с Российско-Вьетнамским Тропическим научно-исследовательским и технологическим центром, нами проведено тестирование в РНГА

550 образцов сывороток крови лиц, проживающих во вьетнамских провинциях Ха Занг, Лангшон, Куангнинь (290, 195 и 65 проб соответственно) в возрасте от 18 до 81 года (Me = 41, IQR 30–50), у которых отсутствовали клинические признаки мелиоидозной инфекции.

Изучение некоторых демографических показателей (пол, возраст) было выполнено с использованием проб сывороток, полученных из провинции Ха Занг. Выборка в равной мере

Таблица 1. Аналитические характеристики эритроцитарного антигенного мелиоидозного диагностикума по результатам РНГА с сыворотками экспериментальных животных

Table 1. Analytical characteristics of Erythrocyte Antigenic Melioidosis Diagnostic Agent based on IHA results with experimental animal sera

Вид сыворотки Type of serum	Титры в РНГА IHA titers
Сыворотки кроликов, зараженных <i>B. pseudomallei</i> 107 Serum of rabbits infected with <i>B. pseudomallei</i> 107	1:1280–1:2560
Сыворотки белых мышей, зараженных <i>B. pseudomallei</i> 56830 Sera of white mice infected with <i>B. pseudomallei</i> 56830	1:160– 1:1280
Сыворотки кроликов, иммунизированных различными инактивированными штаммами возбудителей мелиоидоза (<i>B. pseudomallei</i> 56830, 57576, 59361«S» 111-6-1 и др.) Sera of rabbits immunized with various inactivated strains of melioidosis pathogens (<i>B. pseudomallei</i> 56830, 57576, 59361 «S» 111-6-1, etc.)	1:3200–1:25 600
Сыворотка козья гипериммунная мелиоидозная (против <i>B. pseudomallei</i> 100) Goat hyperimmune serum melioidosis (against <i>B. pseudomallei</i> 100)	1:51 200–1:204 800
Сыворотка кролика, иммунизированного авирулентным штаммом <i>B. pseudomallei</i> VPA Sera from rabbits immunized with avirulent strain <i>B. pseudomallei</i> VPA	1:320–1:640
Иммунная сыворотка кролика против <i>B. thailandensis</i> Rabbit immune serum against <i>B. thailandensis</i>	1:400
Иммунная сыворотка кролика против <i>B. cepacia</i> 423 Rabbit immune serum against <i>B. cepacia</i> 423	–
Иммунная сыворотка кролика против <i>B. cepacia</i> 8235 Rabbit immune serum against <i>B. cepacia</i> 8235	–
Иммунная сыворотка кролика против <i>B. cepacia</i> 3181 Rabbit immune serum against <i>B. cepacia</i> 3181	1:40
Иммунная сыворотка кролика против <i>B. cepacia</i> 8236 Rabbit immune serum against <i>B. cepacia</i> 8236	–
Иммунная сыворотка кролика против <i>B. cepacia</i> (ЭЦАг) Rabbit immune serum against <i>B. cepacia</i> (ECAg)	1:20
Иммунная сыворотка кролика против <i>P. aeruginosa</i> H-8 Rabbit immune serum against <i>P. aeruginosa</i> H-8	–
Иммунная сыворотка кролика против <i>P. aeruginosa</i> H1 Rabbit immune serum against <i>P. aeruginosa</i> H1	–
Иммунная сыворотка кролика против <i>P. aeruginosa</i> H-6 Rabbit immune serum against <i>P. aeruginosa</i> H-6	–
Иммунная сыворотка кролика против <i>P. aeruginosa</i> PAO 1 Rabbit immune serum against <i>P. aeruginosa</i> PAO 1	–
Иммунная сыворотка кролика против <i>P. fluorescens</i> 540 Rabbit immune serum against <i>P. fluorescens</i> 540	–
Иммунная сыворотка кролика против <i>P. pseudoalcaligenes</i> Rabbit immune serum against <i>P. pseudoalcaligenes</i>	–
Иммунная сыворотка кролика против <i>F. tularensis</i> 32 Rabbit immune serum against <i>F. tularensis</i> 32	–
Иммунная сыворотка кролика против <i>F. tularensis</i> Rabbit immune serum against <i>F. tularensis</i>	–
Иммунная сыворотка кролика против <i>Y. pestis</i> Rabbit immune serum against <i>Y. pestis</i>	–

Таблица 2. Результаты РНГА с эритроцитарным антигенным мелиоидозным диагностикумом при исследовании сывороток лиц, проживающих вне эндемичного региона

Table 2. IHA results with Erythrocyte Antigenic Melioidosis Diagnostic Agent assessing sera from persons living outside the endemic region

Общее число проб Total number of samples	Из них положительные в РНГА в титрах Of these, IHA positive titers					
	1:5		1:10		1:20	
	n	% (95% CI)	n	% (95% CI)	n	% (95% CI)
36	14	38,9 (24,8–55,1)	9	25 (13,8–41,1)	0	–

охватывала взрослое население (как мужчин, так и женщин) в возрасте от 18 до 81 года (рис. 1).

Таким образом, результаты РНГА с эритроцитарным антигенным мелиоидозным диагностикумом при изучении рандомных образцов сывороток жителей Вьетнама из провинций Ха Занг, Лангшон и Куангнинь, потенциально содержащих антитела к возбудителю мелиоидоза, подтвердили возможность использования РНГА для выявления мелиоидозных антител в сыворотках человека (табл. 3).

Согласно полученным результатам, мелиоидозные антитела в изученных образцах сывороток обнаружены в титре проб 1:10 в 71,5% наблюдений, хотя при дальнейшем разведении сывороток количество положительных находок в РНГА резко снижалось и составляло для титров 1:20–1:40–1:80 соответственно 7,8, 6,1 и 14,6% (в целом около 30%).

Результаты реакции иллюстрированы гистограммой (рис. 2).

Таким образом, положительные находки РНГА в титрах сывороток от 1:20 до 1:80 были зарегистрированы в образцах, принадлежащих

жителям каждой из трех изученных провинций Вьетнама, и во всех наблюдениях отсутствовали в пробах, полученных от лиц, проживающих вне эндемичного региона.

Обсуждение

Формализированные танизированные эритроциты способны эффективно адсорбировать на своей поверхности белковые антигенные комплексы и как биологический носитель остаются востребованными компонентами диагностических тест-систем.

Опытные серии препарата, представляющие собой носитель, ковалентно связанный с антигенами возбудителя мелиоидоза, были получены при белковой нагрузке сенситина 500 мкг/мл.

Аналитические характеристики диагностикума были изучены на моделях более чем 20 образцов сывороток экспериментальных животных (коз, кроликов, белых мышей), подвергавшихся как иммунизации, так и заражению. При этом оказалось, что титры сывороток переболевших мелиоидозом в острой форме лабораторных белых мышей и кроликов составляют в РНГА (в зависимости от вида объекта) от 1:160 до 1:1280.

Уровень мелиоидозных антител в гипериммунных сыворотках, полученных в ходе многократной иммунизации взвесями инактивированных клеток возбудителя здоровых животных (кроликов, коз), может достигать 1:25 000 и даже — при использовании одного из наиболее вирулентных штаммов *B. pseudomallei* 100 — 1:204 800.

Представляет интерес тот факт, что авирулентный штамм *B. pseudomallei* VPA, в геноме которого закрепилась необратимая делеция, вызывает у кроликов антителообразование такого же уровня (по результатам РНГА), что и близкородственный возбудитель III группы патогенности *B. thailandensis* — 1:300–1:400. Как нам кажется, таким образом прослеживается четкая патогенетически значимая связь вирулентных свойств возбудителя мелиоидоза с его иммуногенностью.

Следует отметить, что в низких титрах (1:20–1:40) в отдельных случаях положительные результаты РНГА были продемонстрированы на моделях гипериммунных сывороток против близкородственных возбудителю мелиоидоза

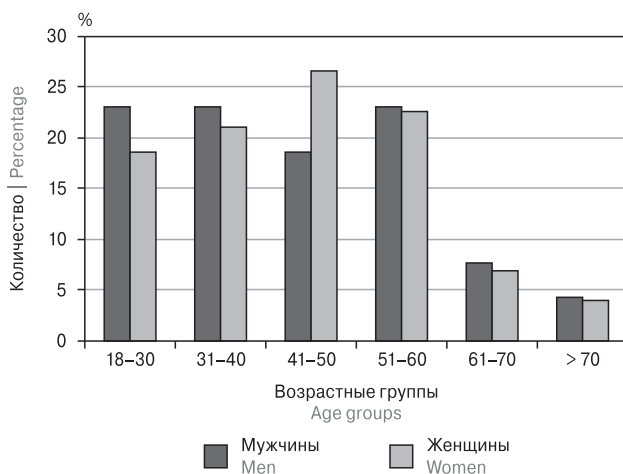


Рисунок 1. Распределение жителей провинции Ха Занг Социалистической Республики Вьетнам, сыворотки которых были изучены в РНГА, по полу и возрасту

Figure 1. IHA-based sex- and age-dependent distribution of residents in the province of Ha Giang of the Socialist Republic of Vietnam

Таблица 3. Результаты РНГА при определении титров мелиоидозных антител в образцах сывороток лиц, проживающих в провинциях Ха Занг, Лангшон, Куангнинь Социалистической Республики Вьетнам

Table 3. IHA results determining titer of serum melioidosis antibodies in persons living in the provinces of Ha Giang, Lang Son, Quang Ninh of the Socialist Republic of Vietnam

Провинция Provinces	Общее число проб Total number of samples	Из них положительные в РНГА в титрах Of these, IHA positive titers							
		1:10		1:20		1:40		1:80	
		n	% (95% CI)	n	% (95% CI)	n	% (95% CI)	n	% (95% CI)
Ха Занг Ha Giang	290	210	72,4 (67–77,2)	27	9,3 (6,5–13,2)	4	1,4 (0,54–3,5)	49	16,9 (13–21,6)
Лангшон Lang Son	195	137	70,3 (63,5–76,2)	15	7,7 (4,7–12,3)	22	11,3 (7,6–16,5)	21	10,8 (7,2–15,9)
Куангнинь Quang Ninh	65	46	70,8 (58,8–80,4)	1	1,5 (0,3–8,2)	8	12,3 (6,4–22,5)	10	15,4 (8,6–26,1)
Всего Total	550	393	71,5 (67,5–75,1)	43	7,8 (5,8–10,4)	34	6,1 (4,5–8,5)	80	14,6 (11,9–17,7)

буркгольдерий *B. ceracia*-комплекса. При этом сыворотки, направленные против патогенных псевдомонад (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. pseudocaligenses*), которые, как известно, также имеют перекрестно реагирующие с возбудителем мелиоидоза антигенные детерминанты, как и сывороточные иммуноглобулины против *F. tularensis* или *Y. pestis*, в реакции с антигенным мелиоидозным диагностикумом в исследуемых разведениях (1:10 и выше) не взаимодействовали, что в целом подтверждает специфические свойства полученного препарата.

В ходе изучения аналитических характеристик эритроцитарного антигенного мелиоидозного диагностикума чувствительность РНГА при исследовании гипериммунных сывороток лабораторных животных составила 1:320–1:640 и выше (в отдельных случаях до 1:204 800).

В 12 из 15 наблюдений активные центры антител сывороток, которые были получены путем иммунизации лабораторных животных гетерологичными или близкородственными возбудителями, не взаимодействовали с антигенными детерминантами возбудителя мелиоидоза, то есть специфичность диагностикума составила 80%.

Таким образом, РНГА, не требующая применения специализированного оборудования, позволила в эксперименте в течение 2–4 ч получить четкие, специфичные и легко визуализируемые результаты, что явилось весомым основанием для использования РНГА в работе по изучению уровня мелиоидозных антител в сыворотках человека.

С этой целью нами отобраны образцы биопроб жителей как эндемичных (провинции Ха Занг, Лангшон и Куангнинь Социалистической Республики Вьетнам), так и неэндемичной (РФ) местностей.

Контингент лиц, проживающих на территориях провинций Ха Занг, Лангшон и Куангнинь, оказался представлен преимущественно фермерами (49,8%), а также другими категориями

населения (врачи, учителя, рабочие, студенты и др., 51,2%) — 274 и 276 человек соответственно.

Следует отметить, что провинции Ха Занг и Лангшон расположены в северных районах Вьетнама в гористой местности с высоким среднегодовым уровнем осадков и температурой до +22,78°C. Около 90 и 80% населения провинций Ха Занг и Лангшон соответственно составляют сельские жители.

Провинция Куангнинь находится в прибрежной зоне северного Вьетнама примерно в тех же климатических условиях, но является промышленным регионом, связанным, в основном, с до-

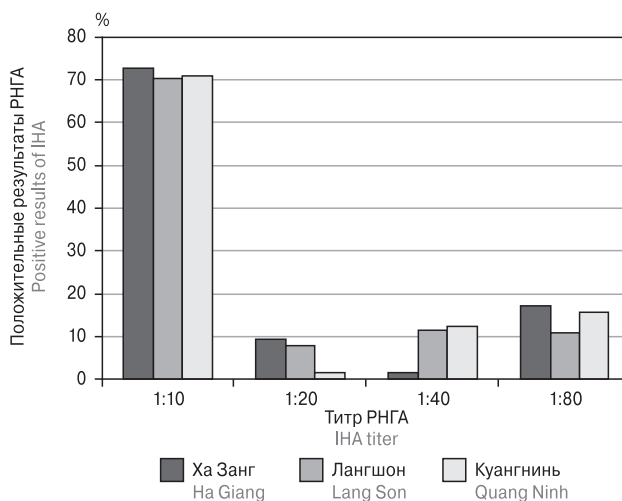


Рисунок 2. Титры РНГА с эритроцитарным антигенным мелиоидозным диагностикумом при анализе сывороток клинически здоровых лиц, проживающих на территориях отдельных провинций Социалистической Республики Вьетнам

Figure 2. Serum IHA titers by using Erythrocyte Antigenic Melioidosis Diagnostic Agent in clinically healthy individuals living in the territories of certain provinces of the Socialist Republic of Vietnam

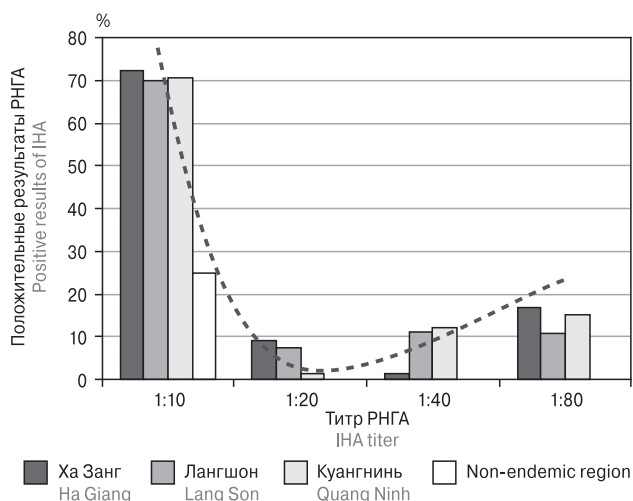


Рисунок 3. Результаты РНГА с эритроцитарным антигенным мелиоидозным диагностикумом при изучении специфической активности сывороток лиц, проживающих на территории эндемичного региона Вьетнама и вне его

Figure 3. Serum IHA results by using Erythrocyte Antigenic Melioidosis Diagnostic Agent in individuals living in the territory of the endemic region of Vietnam and outside

бычей каменного угля. Около 50% жителей провинции Куангнинь относят к городскому населению, многие из которых, тем не менее, по роду деятельности имеют близкий контакт с землей.

Такие условия способствуют формированию и поддержанию эндемичного очага мелиоидоза, являющегося источником значительного эпидемиологического риска для проживающих в данном регионе лиц, который, тем не менее, может быть снижен формированием у населения иммунной прослойки (коллективного иммунитета). При этом, согласно литературным данным, вероятной причиной формирования иммунитета у обследуемых лиц, кроме регистрируемого заболевания, может быть циркуляция штамма возбудителя мелиоидоза со сниженной вирулентностью или контакт с близкородственным видом, что в целом обеспечивает продукцию специфических антител и серопревалентность популяции [9]. Также существует мнение о возможности формирования популяционного иммунитета к *B. pseudomallei* под влиянием авирулентных почвенных штаммов *B. thailandensis*, которые имеют схожую с возбудителем мелиоидоза антигенную структуру и могут, в конечном итоге, приводить к выработке кросс-реактивных антител [8, 19, 20].

И действительно, при исследовании образцов сывороток, полученных от жителей провинций Ха Занг (290), Лангшон (195) и Куангнинь (65), оказалось, что в титре до 1:10 иммуноглобулины более 70% проб вступали в реакцию с эритроцитарным антигенным мелиоидозным диагностикумом. По-видимому, эти взаимодействия

обусловлены неспецифическим связыванием разнообразных пулов IgG, присутствующих в сыворотках человека. При этом, начиная с титров от 1:20 и выше, средний уровень положительных результатов РНГА снижался до 7,8% (43), 6,1% (34) и 14,6% (80) соответственно (рис. 3). Среди интактных сывороток положительных результатов РНГА в разведениях от 1:20 и выше не было зарегистрировано ни в одном из наблюдений, что, с нашей точки зрения, является основанием для рекомендации проведения РНГА-исследований, связанных с иммунодиагностикой мелиоидоза, в титрах от 1:20 и выше. Полученные в отдельных случаях результаты титров 1:5–1:10 не могут иметь диагностического значения, так как, несомненно, обусловлены неспецифическими взаимодействиями перекрестно реагирующих сывороточных антител.

По-видимому, нисходящая линия такой условной параболы (рис. 3) отражает, наряду с увеличением титра сывороточных иммуноглобулинов, уменьшение числа неспецифически положительных результатов РНГА, при том что более высокие разведения сывороток, соответствующие восходящей ветви, позволяют выявить в пробах присутствие специфически взаимодействующих с антигенами возбудителя мелиоидоза антител, выработанных иммунными лимфоцитами, возможно вследствие постоянно поддерживаемого контакта макроорганизма с возбудителем или даже перенесенной мелиоидозной инфекции.

Полученные нами данные находят подтверждение в материалах зарубежных авторов. Так, в соответствии с выводами P. Chaichana, присутствие специфических мелиоидозных иммуноглобулинов в сыворотках по результатам РНГА следует регистрировать, начиная с разведения от 1:80 и выше [7].

Cheng называет титры РНГА 1:40–1:80 «низкоположительными» и пограничными, а 1:160 и выше — «высокоположительными», однозначно позволяющими подтвердить диагноз мелиоидоза с помощью некультуральных методов исследования [9].

При изучении некоторых демографических показателей (пол, возраст), выполненном на образцах сывороток, полученных от жителей провинции Ха Занг, показано, что независимо от возраста в титрах от 1:20 оказались серопозитивными 25 из 91 (27,4%) сывороток мужчин и 55 из 199 (27,6%) сывороток женщин, из чего следует, что положительные результаты проб не имеют корреляции ни с полом, ни с возрастом обследуемых [16].

Представленные результаты согласуются с выводами P. Chaichana, которая наиболее важным аспектом серопозитивности популяции считала область проживания людей (село или город) и род их деятельности, но не пол или возраст [7].

Таким образом, на основе выделенных антигенных комплексов *B. pseudomallei* проведено

конструирование эритроцитарного антигенного мелиоидозного диагностикума, который был подвергнут лиофилизации по многоступенчатой программе [4], позволившей обеспечить в полной мере сохранение его аналитических характеристик как в условиях жаркого тропического климата, так и перепадов давления при авиаперелетах.

С помощью полученного нами эритроцитарного антигенного мелиоидозного диагностикума в РНГА проведено изучение 550 сывороток крови лиц, проживающих в провинция Ха Занг,

Лангшон и Куангнинь Социалистической Республики Вьетнам, а также 36 интактных сывороток лиц из неэндемичного региона.

По результатам выполненных исследований подтверждено формирование у 30% лиц, проживающих в эндемичной зоне, естественного иммунитета к мелиоидозу в виде присутствия в сыворотках мелиоидозных антител в титрах от 1:20 и выше. При этом не исключено, что титры от 1:80 и выше при иммунодиагностике мелиоидоза могут иметь критическое значение.

Список литературы/References

1. Захарова И.Б., Топорков А.В., Викторов Д.В. Мелиоидоз в аспектах эпидемиологии, клиники и лабораторной диагностики // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 3. С. 409–422. [Zakharova I.B., Toporkov A.V., Viktorov D.V. Melioidosis in aspects of epidemiology, clinic, and laboratory diagnostics. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2021, vol. 11, no. 3, pp. 409–422. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-MIA-1584
2. Калинина О.В., Личная Е.В., Pham T.H.G., Bui T.L.A., Vo V.C., Pham N.Q., Чуланов В.П., Дмитриев А.В. Распространенность парентеральных вирусных гепатитов во Вьетнаме. Под ред. А.Ю. Поповой, А.В. Топоркова. 2019. С. 259–270. [Kalinina O.V., Lichnaia E.V., Pham T.H.G., Bui T.L.A., Vo V.C., Pham N.Q., Chulanov V.P., Dmitriev A.V. Prevalence of parenteral viral hepatitis in Vietnam. Eds.: A.Yu. Popova, A.V. Toporkov. 2019, pp. 259–270. (In Russ.)]
3. Личная Е.В., Фам Т.Ж., Петрова О.А., Чан Т.Н., Нгуен Т.Т., Буй Т.Н., Во В.К., Дмитриев А.В., Калинина О.В. Распространенность гепатита Е среди коренного населения северной провинции Ха Занг, Вьетнам // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 4. С. 692–700. [Lichnaia E.V., Pham T.G., Petrova O.A., Tran T.N., Nguyen T.T., Bui T.N., Vo V.C., Dmitriev A.V., Kalinina O.V. Hepatitis E virus seroprevalence in indigenous residents of the Ha Giang northern province of Vietnam. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2021, vol. 11, no. 4, pp. 692–700. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-HEV-1764
4. Патент № 2011127595/06 Российская Федерация, МПК F26B 5/06 (2006.01). Способ лиофильной сушки эритроцитарного диагностикума: № 2011127595/06; заявлено 05.07.2011; опубликовано 27.02.2013 / Пушкарь В.Г., Новицкая И.В., Кулаков М.Я., Павлова К.А., Степурина А.М. Федеральное государственное учреждение здравоохранения Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (RU). 9 с. [Patent No. 2011127595/06 Russian Federation, Int. F26B 5/06 (2006.01). Method of lyophilic drying of erythrocyte diagnosticum: No. 2011127595/06; application: 05.07.2011; date of publication 27.02.2013 / Pushkar V.G., Novitskaya I.V., Kulakov M.J., Pavlova K.A., Stepurina A.M. Proprietor: Federal'noe gosudarstvennoe uchrezhdenie zdravookhraneniya Volgogradskij nauchno-issledovatel'skij protivochumnyj institut Rospotrebnadzora (RU). 9 p.]
5. Патент № 2013135369/15 Российская Федерация, МПК G01N 33/531(2006.01), A61K 39/104 (2006.01). Способ получения антигенного эритроцитарного диагностикума для обнаружения антител к антигенам возбудителей сапа и мелиоидоза: № 2013135369/15; заявлено 2013.07.26; опубликовано 2015.02.10 / Куделина А.М., Новицкая И.В., Кулаков М.Я., Пушкарь В.Г., Илюхин В.И., Будченко А.А., Прохвятилова Е.В., Дубина И.А., Замарин А.Е., Мазурова И.Ю., Куликова А.С., Сенина Т.В. Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (RU). 9 с. [Patent No. 2013135369/15 Russian Federation, Int. G01N 33/531(2006.01), A61K 39/104 (2006.01). Method for obtaining antigenic erythrocyte diagnosticum for the detection of antibodies to the antigens of the causative agents of glanders and melioidosis: No. 2013135369/15; application: 2013.07.26; date of publication 2015.02.10 / Kudelina A.M., Novitskaya I.V., Kulakov M.Y., Pushkar V.G., Ilyukhin V.I., Budchenko A.A., Prokhvatilova E.V., Dubina I.A., Zamarin A.E., Mazurova I.Yu., Kulikova A.S., Senina T.V. Proprietor: Federal'noe kazennoe uchrezhdenie zdravookhraneniya "Volgogradskij nauchnoissledovatel'skij protivochumnyj institut" Federal'noj sluzhby po nadzoru v sfere zashchity prav potrebitel'ej i blagopoluchija cheloveka. 9 p.]
6. Brett P.J., Woods D.E. Pathogenesis of and immunity to melioidosis. *Acta Trop.*, 2000, vol. 74, no. 2–3, pp. 201–210. doi: 10.1016/S0001-706X(99)00071-6
7. Chaichana P., Jenjaroen K., Amornchai P., Chumseng S., Langla S., Rongkard P., Sumonwiriya M., Jeeyapant A., Chantratita N., Terarrukkul P., Limmathurotsakul D., Day N.P.J., Wuthiekanun V., Dunachie S.J. Antibodies in melioidosis: the role of the indirect hemagglutination assay in evaluating patients and exposed populations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2018, vol. 99, no. 6, pp. 1378–1385. doi: 10.4269/ajtmh.17-0998
8. Charoenwong P., Lumbiganon P., Puapermpoonsiri S., The prevalence of the indirect hemagglutination test for melioidosis in children in an endemic area. *Southeast Asian. J. Trop. Med. Public Health*, 1992, vol. 23, no. 4, pp. 698–701.
9. Cheng A.C., O'Brien M., Freeman K., Lum G., Currie B.J. Indirect hemagglutination assay in patients with melioidosis in northern Australia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2006, vol. 74, no. 2, pp. 330–334. doi: 10.4269/ajtmh.2006.74.330
10. Cheng A.C., Currie B.J. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2005, vol. 18, no. 2, pp. 383–416. doi: 10.1128/CMR.18.2.383-416.2005
11. Dong S., Wu L., Long F., Wu Q., Liu X., Pei H., Xu K., Lu Y., Wang Y., Lin Y., Xia Q. The prevalence and distribution of *Burkholderia pseudomallei* in rice paddy within Hainan, China. *Acta Trop.*, 2018, vol. 187, pp. 165–168. doi: 10.1016/j.actatropica.2018.08.007

12. Inglis T.J.J., Sagripanti J.L. Environmental factors that affect the survival and persistence of *Burkholderia pseudomallei*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, vol. 72, no. 11, pp. 6865–6875. doi: 10.1128/AEM.01036-06
13. Manivanh L., Pierret A., Rattanavong S., Kounnavongsa O., Buisson Y., Elliott I., Maeght J.L., Xayyathip K., Silisouk J., Vongsouvath M., Phetsouvanh R., Newton P.N., Lacombe G., Ribolzi O., Rochelle-Newall E., Dance D.A.B. *Burkholderia pseudomallei* in a lowland rice paddy: seasonal changes and influence of soil depth and physico-chemical properties. *Sci. Rep.*, 2017, vol. 7, no. 1, pp. 1–11. doi: 10.1038/s41598-017-02946-z
14. Phuong D.M., Trung T.T., Breitbach K., Tuan N.Q., Nübel U., Flunker G., Khang D.D., Quang N.X., Steinmetz I. Clinical and microbiological features of melioidosis in northern Vietnam. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 2008, vol. 102, iss. Supplement_1, pp. S30–S36. doi: 10.1016/S0035-9203(08)70009-9
15. Samy P.R., Stiles B.G., Sethi G., Lim L.H.K. Melioidosis: Clinical impact and public health threat in the tropics. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2017, vol. 11. doi: 10.1371/journal.pntd.0004738
16. So S.Y., Chau P.Y., Aquinas M., Gabriel M., Lam W.K. Melioidosis: a serological survey in a tuberculosis sanatorium in Hong Kong. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1987, vol. 81, no. 6, pp. 1017–1019. doi: 10.1016/0035-9203(87)90384-1
17. Thomas A.D., Forbes-Faulkner J., Parker M. Isolation of *Pseudomonas pseudomallei* from clay layers at defined depths. *Am. J. Epidemiol.*, 1979, vol. 110, no. 4, pp. 515–521. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a112832
18. Wiersinga W.J., Virk H.S., Torres A.G., Currie B.J., Peacock S.J., Dance D., Limmathurotsakul D. Melioidosis. *Nat. Rev. Dis. Primers*, 2018, vol. 4, no. 1, pp. 1–22. doi: 10.1038/nrdp.2017.107
19. Wuthiekanun V., Chierakul W., Langa S., Chaowagul W., Panpitpat C., Saipan P., Thoujaikong T., Day N.P., Peacock S.J. Development of antibodies to *Burkholderia pseudomallei* during childhood in melioidosis-endemic northeast Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2006, vol. 74, no. 6, pp. 1074–1075. doi: 10.4269/ajtmh.2006.74.1074
20. Wuthiekanun V., Langa S., Swaddiwudhipong W., Jedsadapanpong W., Kaengnet Y., Chierakul W., Day N.P., Peacock S.J. Short report: melioidosis in Myanmar: forgotten but not gone? *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2006, vol. 75, no. 5, pp. 945–946. doi: 10.4269/ajtmh.2006.75.945

Авторы:

Терешко Д.Л., научный сотрудник лаборатории иммунодиагностических препаратов ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Волгоград, Россия;

Новицкая И.В., к.м.н., доцент, ведущий научный сотрудник, зав. отделом иммунологии и экспериментального производства МИБП ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Волгоград, Россия;

Захарова И.Б., к.б.н., доцент, зав. отделом микробиологического мониторинга особо опасных инфекций ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Волгоград, Россия;

Чиен Д., согендиректор Совместного Российско-Вьетнамского Тропического Научно-исследовательского и технологического центра, г. Ханой, Социалистическая Республика Вьетнам;

Кузнецов А.Н., д.б.н., согендиректор Совместного Российско-Вьетнамского Тропического Научно-исследовательского и технологического центра, г. Ханой, Социалистическая Республика Вьетнам;

Кулаков М.Я., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунодиагностических препаратов ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Волгоград, Россия;

Будченко А.А., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории протеомного анализа ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Волгоград, Россия;

Пушкар В.Г., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунодиагностических препаратов ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Волгоград, Россия;

Викторов Д.В., д.б.н., доцент, зам. директора ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Волгоград, Россия.

Топорков А.В., д.м.н., доцент, директор ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Волгоград, Россия.

Authors:

Tereshko D.L., Researcher, Laboratory of Immunodiagnostic Preparations, Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russian Federation;

Novitskaya I.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Leading Researcher, Head of the Department of Immunology and Experimental Production of Medical Immunobiological Preparations, Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russian Federation;

Zakharova I.B., PhD (Biology), Associate Professor, Head of the Department of Microbiology, Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russian Federation;

Trien D., Co-director of the Joint Russian-Vietnamese Tropical Research and Technology Center, Hanoi, Socialist Republic of Vietnam;

Kuznetsov A.N., PhD, MD (Biology), Co-director of the Joint Russian-Vietnamese Tropical Research and Technology Center, Hanoi, Socialist Republic of Vietnam;

Kulakov M.Ya., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Immunodiagnostic Preparations, Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russian Federation;

Budchenko A.A., PhD (Biology), Senior Researcher, Proteomic Analysis Laboratory, Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russian Federation;

Pushkar V.G., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Immunodiagnostic Preparations, Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russian Federation;

Viktorov D.V., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Deputy Director for Science, Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russian Federation;

Toporkov A.V., PhD, MD (Medicine), Director, Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russian Federation.

ЭКСПРЕССИЯ *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* И *ERG11* У УСТОЙЧИВЫХ К АЗОЛАМ ШТАММОВ *CANDIDA ALBICANS*, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ В ГОРОДЕ МОСКВЕ

А.Д. Воропаев¹, Д.А. Екатеринчев¹, Ю.Н. Урбан², В.В. Зверев¹, Ю.В. Несвижский¹,
Е.А. Воропаева², Е.И. Лиханская², М.С. Афанасьев¹, С.С. Афанасьев²

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

² ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия

Резюме. Грибы рода *Candida* — повсеместно распространенные оппортунисты человека, способные вызывать инфекции различной локализации, а также угрожающие жизни состояния у иммунокомпрометированных пациентов, число которых в последние годы неуклонно растет. Это ВИЧ-инфицированные, пациенты с различными онкологическими заболеваниями и пациенты, перенесшие трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток. Кроме того, распространяется устойчивость к противогрибковым препаратам. Природно-чувствительные к азолам *Candida albicans* обладают разнообразными механизмами приобретенной устойчивости, включая эффлюксные переносчики и амплификацию гена белка-мишени. Данное исследование проводилось с целью оценить распространенность данных механизмов в выборке изолятов, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов в Московском регионе Российской Федерации, охарактеризовать взаимосвязь данных механизмов и закономерности развития устойчивости. 18 устойчивых к флуконазолу и вориконазолу штаммов *C. albicans* были выделены от ВИЧ-инфицированных пациентов с рецидивирующим орофарингеальным кандидозом, находящихся на лечении в ГБУЗ ИКБ № 2 ДЗМ. Уровни экспрессии генов *ERG11*, *MDR1*, *CDR1*, *CDR2*, участвующих в формировании приобретенной устойчивости к азолам были измерены с помощью количественной полимеразной цепной реакции, метода $-2\Delta\Delta CT$ с генами *ACT* и *PMA* в качестве контрольных генов и референсных значений чувствительных изолятов. Уровни экспрессии выше средних значений чувствительных изолятов более чем на 3 стандартных отклонения считались достоверно повышенными. У большей части изолятов обнаружены повышенные уровни экспрессии генов *CDR1* и *CDR2*: 89 и 78% соответственно. Уровень экспрессии гена *MDR1* был повышен только в 28% случаев. Уровни экспрессии *ERG11* были достоверно повышенными у 78% изолятов. У 4 штаммов были значительно повышены уровни экспрессии всех исследуемых генов устойчивости. В данной выборке изолятов *C. albicans* приобретенная устойчивость в основном связана с эффлюксными переносчиками, кодируемыми генами *CDR1* и *CDR2*. Также, у большинства

Адрес для переписки:

Воропаев Александр Дмитриевич
125009, Россия, Москва, ул. Моховая, 11, стр. 10,
ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский
университет им. И.М. Сеченова Минздрава России.
Тел.: 8 916 598-14-12.
E-mail: advoropaev@gmail.com

Contacts:

Alexander D. Voropaev
125009, Russian Federation, Moscow, Mokhovaya str., 11/10,
I.M. Sechenov First Moscow State Medical University.
Phone: +7 916 598-14-12.
E-mail: advoropaev@gmail.com

Для цитирования:

Воропаев А.Д., Екатеринчев Д.А., Урбан Ю.Н., Зверев В.В.,
Несвижский Ю.В., Воропаева Е.А., Лиханская Е.И., Афанасьев М.С.,
Афанасьев С.С. Экспрессия *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* и *ERG11* у устойчивых
к азолам штаммов *Candida albicans*, выделенных от ВИЧ-
инфицированных пациентов в городе Москве // Инфекция и иммунитет.
2022. Т. 12, № 5. С. 929–937. doi: 10.15789/2220-7619-CCM-1931

Citation:

Voropaev A.D., Yekaterinchev D.A., Urban Yu.N., Zverev V.V., Nesvizhsky Yu.V.,
Voropaeva E.A., Likhanskaya E.I., Afanasiev M.S., Afanasiev S.S. *CDR1*,
CDR2, *MDR1* and *ERG11* expression in azole resistant *Candida albicans*
isolated from HIV-infected patients in city of Moscow // Russian Journal of
Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 5,
pp. 929–937. doi: 10.15789/2220-7619-CCM-1931

изолятов выявлен повышенный уровень экспрессии гена белка-мишени азолов — *ERG11*. Уровень экспрессии гена эффлюксного переносчика *MDR1* был повышен в наименьшем числе образцов. Нельзя также исключать вероятную роль других механизмов приобретенной устойчивости, таких как мутации в гене *ERG11*. Можно предположить, что выявленные механизмы устойчивости являются следствием длительного, широкого, а порой и бесконтрольного применения азолов, в том числе для лечения и профилактики кандидозов в группе ВИЧ-инфицированных пациентов.

Ключевые слова: *Candida albicans*, ВИЧ, флуконазол, *ERG11*, *CDR1*, *CDR2*, *MDR1*.

CDR1, CDR2, MDR1 AND ERG11 EXPRESSION IN AZOLE RESISTANT CANDIDA ALBICANS ISOLATED FROM HIV-INFECTED PATIENTS IN CITY OF MOSCOW

Voropaev A.D.^a, Yekaterinchev D.A.^a, Urban Yu.N.^b, Zverev V.V.^a, Nesvizhsky Yu.V.^a, Voropaeva E.A.^b, Likhanskaya E.I.^b, Afanasiev M.S.^a, Afanasiev S.S.^b

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

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

Abstract. *Candida* fungi are common opportunistic microorganisms capable of causing infections of various localization, as well as life-threatening conditions in immunocompromised patients, such as HIV-infected individuals, oncology patients, subjects undergoing HSCT, which number has been steadily increasing in recent years. In addition, resistance to anti-fungal drugs has been spreading as well. Naturally sensitive to azoles, *C. albicans* possess a variety of mechanisms of acquired resistance, including efflux transporters and target protein-encoding gene amplification. This study was conducted to assess a prevalence of such mechanisms in the isolates sample obtained from HIV-infected patients in the Moscow region of the Russian Federation, characterize a relationship between these mechanisms and patterns of developing drug resistance. 18 strains of *C. albicans* resistant to fluconazole and voriconazole were isolated from HIV-infected patients with recurrent oropharyngeal candidiasis in the Moscow region. The expression levels of the *ERG11*, *MDR1*, *CDR1*, *CDR2* genes involved in the formation of acquired azole resistance were measured using quantitative PCR, the $-2\Delta\Delta CT$ method with *ACT* and *PMA* genes as control genes and reference values of sensitive isolates. Expression levels exceeding the average values of sensitive isolates by more than 3 standard deviations were considered significantly elevated. In most of the isolates, elevated levels of *CDR1* and *CDR2* gene expression were found: 89% and 78%, respectively. The expression level of the *MDR1* gene was increased only in 28% of cases. *ERG11* expression levels were significantly elevated in 78% of the isolates. Expression levels of all resistance genes studied were significantly increased in 4 strains. In this sample of *C. albicans* isolates, acquired resistance is mainly associated with efflux vectors encoded by the *CDR1* and *CDR2* genes. Also, in most isolates, an increased expression level for the azole target protein gene — *ERG11* was detected. The expression level of the efflux transporter gene *MDR1* was increased in the smallest number of samples. It is also impossible to exclude a potential role of other mechanisms in developing acquired resistance, such as mutations in the *ERG11* gene. It can be assumed that the identified mechanisms of resistance result from long-term, widespread, and sometimes uncontrolled use of azoles, including those in treatment and prevention of candidiasis in HIV-infected patients.

Key words: *Candida albicans*, HIV, fluconazole, *ERG11*, *CDR1*, *CDR2*, *MDR1*.

Введение

Candida spp. — убиквитарные условно-патогенные микроорганизмы, способные вызывать инфекции различной локализации, а также угрожающие жизни состояния у иммунокомпрометированных пациентов [26]. У 90% ВИЧ-инфицированных наблюдается как минимум один эпизод орофарингеального кандидоза. Всего в данной группе пациентов ежегодно регистрируется около 2 млн случаев орального кандидоза и 1,3 млн случаев кандидоза пищевода [9]. Рецидивирующий орофарингеальный кандидоз, вызываемый *C. albicans*, значительно ухудшает качество жизни иммунокомпрометированных пациентов [25].

В последнее время повышается доля устойчивых к противогрибковым препаратам штам-

мов *Candida* spp. [14]. В исследовании SENTRY на 20 788 инвазивных изолятах *Candida* spp. отмечено нарастание устойчивости к флуконазолу [30]. По данным отечественного исследования КРИТ (кандидоз в отделениях реанимации и интенсивной терапии) устойчивость к флуконазолу достигает 21% [2]. При этом природно-чувствительные к азолам *C. albicans* приобретают устойчивость за счет разнообразных механизмов приобретенной резистентности, таких как повышенная экспрессия генов эффлюксных переносчиков и амплификация гена белка-мишени [11, 31].

Среди механизмов устойчивости к азолам отмечена значимость двух основных типов эффлюксных переносчиков: ABC (ATP-binding cassette) и MFS (Major-Facilitator superfamily) [32]. ABC-транспортеры функционируют за счет

гидролиза АТФ, MFS — за счет протонного хемиосмотического градиента. Среди АВС-транспортеров в устойчивости к противогрибковым препаратам принимают участие *CDR1* и *CDR2*, среди MFS — *MDR1*. Повышенная экспрессия эффлюксных переносчиков *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* позволяет удалять из клетки различные токсичные вещества, в том числе противогрибковые препараты [7]. Если *CDR1* и *CDR2* обеспечивают резистентность ко всем азолам, то *MDR1* — преимущественно к флуконазолу [17]. Кроме того, *CDR1* и *CDR2* могут способствовать устойчивости к топическим препаратам тербинафину и аморолфину, но не к эхинокандинам, амфотерицину В или флюцитозину [21]. Приобретенная устойчивость возникает одновременно в отношении всех имидазолов и какой-либо части препаратов из ряда триазолов. Так, утрата *CDR1* приводит к повышенной чувствительности *C. albicans* к азолам, в то время как потеря *MDR1* не оказывает существенного влияния на базовый уровень устойчивости к этим препаратам [27].

Гиперэкспрессия гена *ERG11*, кодирующего ланостерол-14 α -диметилазу, повышает необходимую минимальную подавляющую концентрацию препарата [22]. Азолы снижают активность фермента ланостерол-14 α -диметилазы, который относится к семейству цитохромов P450 (CYP51A) и катализирует один из этапов биосинтеза эргостерола — ключевого компонента клеточной стенки гриба. У устойчивых к азолам клинических изолятов *Candida* spp. выявляется повышенная концентрация фермента 14- α -диметилазы, что может быть обусловлено повышенной экспрессией гена *ERG11* [36]. *ERG11* регулируется преимущественно транскрипционным фактором UPC2, *CDR1* и *CDR2* — TAC1, *MDR1* — MRR1. UPC2, TAC1 и MRR1 относятся к одному семейству транскрипционных факторов (zinc cluster transcription factors [ZCFs]), внутри которого также обнаружен фактор MRR2, влияющий преимущественно на экспрессию *CDR1* [13].

Несмотря на изученность механизмов приобретенной устойчивости *C. albicans* к азолам, исследования, касающиеся распространенности данных механизмов, совсем немногочисленны. В одном из первых исследований, характеризующем распространенность различных механизмов устойчивости среди небольшой выборки (n = 20) лиц со СПИД и рецидивирующим орофарингеальным кандидозом из США, преобладающим механизмом оказалась повышенная экспрессия эффлюксных переносчиков *CDR1* и *CDR2* (55% штаммов), а также *MDR1* (55%). Гиперэкспрессия гена *ERG11*, ответственного за синтез фермента-мишени азолов, наблюдалась у 35% штаммов [28]. В швейцарском

исследовании на 16 изолятах *C. albicans* от пациентов со СПИД выявлено преобладание гиперэкспрессии *CDR1* и *MDR1* [5]. В исследовании, проведенном в Сингапуре в 2012–2015 гг., у всех изолятов *C. albicans* обнаружена повышенная экспрессия *CDR2*, у двух штаммов — повышенная экспрессия *MDR1* [38]. У пациентов из Китая отмечалось повышение экспрессии *MDR1*, *CDR1*, *CDR2* и TAC1 (регулятор транскрипции *CDR1*, *CDR2*) [37]. В российском исследовании 47 штаммов *Candida* spp., выделенных от пациенток с кольпитом и сальпингоофоритом, было установлено повышение экспрессии гена *MDR1* [3]. Повышенная экспрессия *CDR1* и *CDR2* наблюдалась у пациентов, длительно получавших противогрибковую терапию [35].

Данные о механизмах устойчивости *Candida* spp. имеют большое значение для актуальных рекомендаций по терапии грибковых инфекций, а также для поиска новых противогрибковых препаратов, к примеру ингибиторов эффлюксных переносчиков [23]. Механизмы устойчивости к противогрибковым препаратам, как и факторы их активации по отдельности, хорошо известны, однако процессы совместной активации все еще не до конца изучены [29]. Анализ распределения показателей экспрессии основных генов, связанных с устойчивостью, может помочь в развитии понимания механизмов, управляющих развитием резистентности *C. albicans* в ответ на воздействие ксенобиотиков.

Приведенные факты, несмотря на актуальность проблемы лекарственной резистентности, указывают на ограниченность информации о популяционной распространенности молекулярно-генетических механизмов устойчивости *Candida* spp. к антимикотическим препаратам на территории Российской Федерации. Это ограничивает наши прогностические возможности в плане преодоления резистентности и повышения эффективности специфической терапии.

В связи со сказанным целью настоящей работы было оценить распространенность повышенной экспрессии генов *CDR1*, *CDR2*, *ERG11* и *MDR1* в устойчивой к азолам выборке изолятов *C. albicans*, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов в Московском регионе Российской Федерации, и охарактеризовать возможные закономерности и взаимосвязи данных механизмов.

Материалы и методы

В исследование включены 22 штамма *C. albicans* из коллекции ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора: 18 устойчивых к флуконазолу и вориконазолу штам-

мов, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов с рецидивирующим орофарингеальным кандидозом, находящихся на лечении в ГБУЗ ИКБ № 2 ДЗМ, и 7 чувствительных штаммов в качестве контрольных образцов. У всех обследованных лиц было получено информированное согласие на использование данных лабораторных анализов в научных целях. Все исследования проведены с согласия Комитета по этике при ГБОУ ВПО ЮУГМУ Минздрава России (протокол № 4 от 25.04.2014) на основании требований Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» от июня 1964 г.

Штаммы культивировались на плотной питательной среде Сабуро и хромогенном агаре для грибов рода *Candida* (HiChrome, Himedia, Индия). Видовая идентификация проводилась рутинными методами, в том числе с помощью микроскопии нативных и окрашенных по Граму препаратов, тестов на образование ростовых трубок в присутствии сыворотки и способности к образованию гиф на кукурузном агаре по Дальмау, оценке морфологии, а также с помощью биохимических тестов (remel RapID Yeast Plus). Идентификация подтверждалась методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с видоспецифическими праймерами («АмплиСенс *C. albicans/C. glabrata/C. krusei*—МУЛЬТИПРАЙМ-FL», ООО «Интерлабсервис», Россия). Устойчивость к флуконазолу и вориконазолу определялась диско-диффузионным методом в соответствии со стандартами CLSI M44 и M60, методом микроразведений с помощью планшетов Sensititre YeastOne10 (Trek Diagnostic System, Великобритания).

Уровни экспрессии генов *ERG11*, *MDR1*, *CDR1*, *CDR2* были измерены с помощью количественной ПЦР и метода $2^{-\Delta\Delta C_t}$ для анализа, где $\Delta C_T = C_{T,X} - C_{T,R}$ — разница между пороговыми циклами исследуемого и контрольного генов, и $-\Delta\Delta C_T = -(\Delta C_{T,q} - \Delta C_{T,cb})$ — разница между значением, полученным для образца *q*, и базовым значением, полученным для чувствительных изолятов [18]. Выделение РНК проводилось с помощью реагента для выделения суммарной РНК ExtractRNA (ЗАО «Евроген», Россия) в соответствии с инструкцией производителя из суточной чистой культуры исследуемого штамма. Обратная транскрипция проводилась с помощью набора «Реверта-Л» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) в соответствии с инструкцией производителя: 30 мин при 37°C.

В работе использовались следующие праймеры:

- *ERG11-F* aactacttttgtttataatttaagatggactattga;
- *ERG11-R* aatgatttctgctggttcagtaggt;
- *MDR1-F* ttacctgaaacttttggcaaaaaca;

- *MDR1-R* acttgtgattctgtcgttacccg;
- *CDR2-F* ggtattggctggctcaatgtga;
- *CDR2-R* gcttgaatcaataagtgatggattac;
- *CDR1-F* tttagccagaactttcactcatgatt;
- *CDR1-R* tatttattttctcatgttcatatggattga;
- *PMA1-F* ttgaagatgaccaccaatcc;
- *PMA1-R* gaaacctctggaagcaaatgg;
- *ACT1-F* ttggtgatgaagcccaatcc;
- *ACT1-R* catatcgtcccagttggaaca.

Амплификация проводилась с помощью набора реактивов для проведения ПЦР в реальном времени в присутствии интеркалирующего красителя Sybr-Green I (ЗАО «Синтол», Россия) с использованием амплификатора Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System (США) со следующими параметрами: 95°C 3 мин; далее 40 циклов: 95°C — 10 с, 55°C — 20 с.

Гены домашнего хозяйства *ACT* и *PMA* использовались в качестве контрольных генов. Базовые значения $2^{-\Delta\Delta C_t}$ для генов *ERG11*, *MDR1*, *CDR1*, *CDR2* получены при исследовании чувствительных изолятов ($n = 7$). Уровень экспрессии исследуемого штамма считался достоверно повышенным в случае, если он превышал базовые средние значения для чувствительных изолятов (m) более чем на 3 стандартных отклонения (3σ).

Для статистического анализа использовалось программное обеспечение Microsoft Excel. Для оценки значимости различий между группами использовался точный критерий Фишера. Критический уровень ошибки при проверке статистических гипотез принимался равным или менее 0,05.

Результаты

В ходе проведенного исследования было установлено, что у каждого из устойчивых штаммов в нашей выборке повышен уровень экспрессии по крайней мере одного из изучаемых генов ($p = 0,0001$) (рис. 1).

Уровни экспрессии *ERG11* были значительно повышенными у 77% ($n = 14$) изолятов. У одного штамма (№ 128) был повышен уровень экспрессии только *ERG11*. Уровень экспрессии гена *MDR1* был повышен только в 27% случаев ($n = 5$). У подавляющего большинства изолятов обнаружены повышенные уровни экспрессии генов *CDR1* и *CDR2*: 88% ($n = 16$) и 83% ($n = 15$) соответственно (рис. 2). При этом уровень экспрессии *CDR2*, но не *CDR1*, был повышен только у одного штамма. У данного штамма (№ 122), помимо этого, отмечалась гиперэкспрессия *ERG11*, и нормальный уровень экспрессии *MDR1*. В то же время гиперэкспрессия *CDR1* без *CDR2* отмечалась у трех штаммов, у одного из них без гиперэкспрессии других генов, у двух — *ERG11*, но не *MDR1*. У 1 штамма (№ 51.2) была выявлена повышенная не менее чем в 10 раз по сравнению

с другими штаммами экспрессия всех исследуемых генов, за исключением *ERG11*. Штаммы с изолированным повышением экспрессии *MDR1* или *MDR1* и *ERG11* отсутствовали.

У 13 штаммов (59%) одновременно был повышен уровень *CDR1* и *CDR2*. Выявлена равноценная взаимосвязь экспрессии *CDR1* и *CDR2* ($p < 0,01$). У 2 штаммов (9%) повышен уровень только *CDR1*, *CDR2*. У 1 штамма (№ 8.2) повышен уровень экспрессии только гена *CDR1*, при этом в выборке отсутствуют штаммы с изолированной гиперэкспрессией *CDR2*.

У 5 штаммов (22%) была выявлена коэкспрессия *MDR1*, *CDR1*, *CDR2*, у 4 штаммов (18%) — коэкспрессия всех исследуемых генов. Таким образом, при повышении экспрессии *MDR1* наблюдалось одновременное повышение экспрессии *CDR1/2* (100%, $n = 5$) и *ERG11* (92,9%, $n = 4$) ($p < 0,05$). При этом обратного влияния повышения экспрессии *CDR1/2*, *ERG11* на экспрессию *MDR1* не выявлено.

У 10 штаммов (45,5%) была обнаружена коэкспрессия *CDR1*, *CDR2* и *ERG11*. Выявлена равноценная взаимосвязь экспрессии *ERG11*

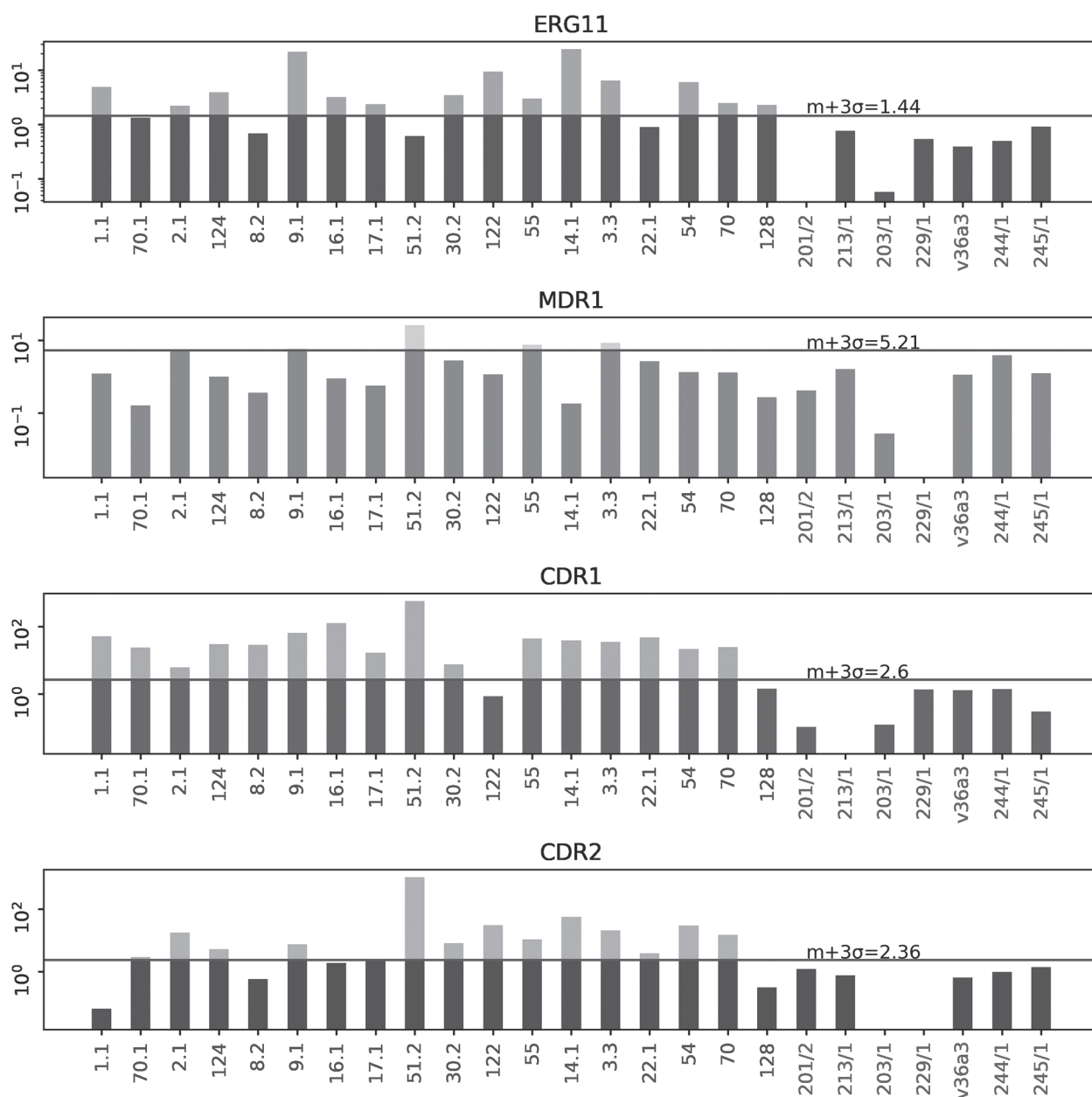


Рисунок 1. Уровни экспрессии *ERG11*, *MDR1*, *CDR1*, *CDR2* ($-2\Delta\Delta CT$)

Figure 1. *ERG11*, *MDR1*, *CDR1*, *CDR2* expression levels ($-2\Delta\Delta CT$)

Примечание. Линией обозначен уровень $m+3\sigma$, 1.1–128 — устойчивые изоляты, 201/2–245/1 — чувствительные изоляты.
Note. Line depicts $m+3\sigma$ level, 1.1–128 — resistant isolates, susceptible controls — 201/2–245/1.

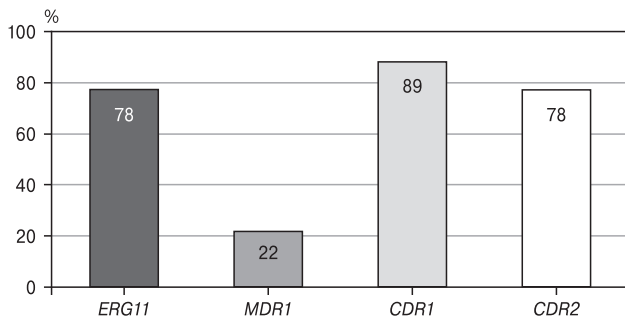


Рисунок 2. Доли штаммов с повышенным уровнем экспрессии *ERG11*, *MDR1*, *CDR1*, *CDR2*
 Figure 2. Percentage of strains with elevated expression level of *ERG11*, *MDR1*, *CDR1*, *CDR2*

и *CDR1*, *ERG11* и *CDR2* ($p < 0,05$). Кроме того, выявлена взаимосвязь между повышением экспрессии *ERG11* и одновременным повышением экспрессии *CDR1*, *CDR2* ($p < 0,05$). Также выявлена взаимосвязь между повышением экспрессии *CDR2* и одновременным повышением экспрессии *ERG11* и *CDR1* ($p < 0,05$).

Обсуждение

Таким образом, было установлено, что в данной выборке изолятов *C. albicans* приобретенная устойчивость связана с несколькими вариантами коэкспрессии генов *ERG11*, *CDR1*, *CDR2* и *MDR1*.

Различные механизмы устойчивости к азолам, включая повышение экспрессии генов эффлюксных переносчиков, подробно описаны для одного из первых выявленных устойчивых к азолам штаммов *C. albicans* — штамма Дарлингтон, выделенного от пациента с рецидивирующим кандидозом кожи и слизистых оболочек (Darlington strain). Селективное ингибирование *MDR1* и *CDR1* у данного штамма не приводило к снижению устойчивости к флуконазолу или вориконазолу. Однако при ингибировании *CDR1* восстанавливалась чувствительность к итраконазолу и позаконазолу. Это позволяет предположить влияние *MDR1* на устойчивость к короткоцепочечным азолам — флуконазолу и вориконазолу, но не к итраконазолу и позаконазолу. Повышенная экспрессия *ERG11* также обеспечивает устойчивость лишь к короткоцепочечным азолам [12]. В другом подобном исследовании описывается серия из 17 штаммов *C. albicans*, выделенных за два года от ВИЧ-инфицированного пациента, получавшего терапию азолами против рецидивирующего орофарингеального кандидоза. За период исследования уровень устойчивости возрос более чем в 200 раз, были выявлены мутации в гене *ERG11*, регуляторах транскрипции

Tac1, Urc2, что приводило к повышенной экспрессии *CDR1*, *CDR2*, *ERG11*. Уровень экспрессии *MDR1* также был повышен [33].

По данным нашего исследования у 59% штаммов были одновременно повышены уровни *CDR1* и *CDR2*. Подобные результаты достаточно характерны для устойчивых к азолам клинических изолятов *C. albicans* [1]. Это может быть обусловлено тем, что гены, кодирующие эффлюксные переносчики *CDR1* и *CDR2*, расположены в одном локусе на хромосоме 3, и часто обнаруживается их одновременная гиперэкспрессия [19]. Следует отметить, что *CDR1*, *CDR2* также регулируются общими механизмами, такими как промотор TAC1, расположенный в одном локусе на левом плече хромосомы 5 вместе с геном *ERG11*, промоторами CaNDT80, CaFCR1 и CaFCR3 [8].

В то же время в исследованной выборке имеются штаммы с изолированной экспрессией *CDR1* либо *CDR2*. Эти данные также находят подтверждение в результатах других исследований: делеция *CDR2* оказывает заметно меньшее воздействие на устойчивость к азолам по сравнению с отсутствием *CDR1* [16].

У подавляющего большинства изолятов был выявлен повышенный уровень экспрессии гена белка мишени азолов — *ERG11*. Также обнаруживалась коэкспрессия *ERG11* как минимум с одним из исследуемых генов. Однако в литературе имеются противоречивые сведения относительно распространенности экспрессии этого гена и его влияния на устойчивость к различным группам противогрибковых препаратов [40]. Многие исследователи отмечают, что в случае повышенной экспрессии *ERG11* минимальная подавляющая концентрация для препарата пропорционально повышается, в то время как мутационные механизмы обеспечивают полную устойчивость к антимикотику [24].

Уровень экспрессии гена эффлюксного переносчика *MDR1* был повышен в наименьшем числе образцов, хотя в работах ряда исследователей данный механизм был более распространенным [37]. Изолированная гиперэкспрессия *MDR1* не оказывает воздействия, сравнимого с другими эффлюксными переносчиками. Тем не менее он способен обеспечивать устойчивость к флуконазолу — наиболее часто рекомендуемому противогрибковому препарату [6]. Ген *MDR1* находится на хромосоме 6 и регулируется фактором транскрипции Mrr1 (Multidrug resistance regulator 1), мутации в котором могут приводить к конститутивному повышению его экспрессии [20].

В нашей выборке повышенный уровень экспрессии *MDR1* сопровождался одновременным повышением уровней экспрессии *CDR1*, *CDR2* и *ERG11* ($p < 0,05$). Это наблюдение может быть

обусловлено функционированием транскрипционного фактора Efg1, который к тому же регулирует образование гиф и другие факторы вирулентности *C. albicans* и рассматривается в качестве терапевтической мишени для новых препаратов [4]. Возможно также положительное влияние транскрипционного фактора Upc2, регулирующего преимущественно *ERG11*, на экспрессию *MDR1* и *CDR1* [10].

Практически в половине случаев (45,5%) наблюдалась коэкспрессия *CDR1*, *CDR2* и *ERG11*. Выявлена двусторонняя зависимость повышения экспрессии данных генов ($p < 0,05$). Кроме того, установлена зависимость одновременного повышения уровня экспрессии *CDR1*, *CDR2* при повышении *ERG11* ($p < 0,05$) и *ERG11*, *CDR1* при повышении экспрессии *CDR2* ($p < 0,05$). В литературе встречаются случаи возникновения анеуплоидии левого плеча пятой хромосомы *C. albicans*, где находится *ERG11*, а также регулятор транскрипции TAC1, влияющий на экспрессию *CDR1* и *CDR2*, что ведет к одновременной гиперэкспрессии гена 14- α -диметилазы и эффлюксных насосов *CDR1* и *CDR2* [15]. В то же

время на левом плече хромосомы 5 находятся гены *PGA4*, *CHT2*, *CNBI* и *MIDI*, ассоциированные с устойчивостью к эхинокандинам. Таким образом, появление подобной перестройки может быть механизмом множественной устойчивости к противогрибковым препаратам [34]. Также может играть роль транскрипционный фактор Ace2, который активирует гены *CDR1*, *CDR2*, *ERG11* и снижает экспрессию *MDR1* [39].

По результатам нашего исследования можно предположить, что выявленные механизмы устойчивости являются следствием длительного, широкого, а порой и бесконтрольного применения флуконазола, в том числе для лечения ВИЧ-инфицированных пациентов. Возможно приобретение устойчивости, выходящей за рамки спектра короткоцепочечных азолов. Подобные явления могут приводить к неэффективной терапии случаев инвазивного кандидоза дорогостоящими резервными препаратами. Кроме того, нельзя исключать опасность широкого распространения штаммов *Candida* spp. с приобретенной устойчивостью к противогрибковым препаратам.

Список литературы/References

1. Беженар М.Б., Плахова К.И. Механизмы развития резистентности к противогрибковым препаратам грибов рода *Candida* при рецидивирующем течении урогенитального кандидоза // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2020. Т. 38, № 1. С. 15–23. [Bezhenar M.B., Plakhova K.I. Mechanisms of developing antifungal drug resistance of candida spp. in recurrent urogenital candidiasis. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya = Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 2020, vol. 35, no. 1, pp. 15–23. (In Russ.)] doi: 10.17116/molgen20203801115
2. Веселов А.В., Козлов Р.С. Инвазивный кандидоз: современные аспекты эпидемиологии, диагностики, терапии и профилактики у различных категорий пациентов (в вопросах и ответах) // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2016. Т. 18, № 2 (Приложение). С. 1–104. [Veselov A.V., Kozlov R.S. Invasive candidiasis: modern aspects of epidemiology, diagnosis, therapy, and prevention in various categories of patients. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2016, vol. 18, no. 2 (suppl.), pp. 1–104. (In Russ.)]
3. Пашинина О.А., Карташова О.Л., Пашкова Т.М., Попова Л.П. Антимикотикорезистентность грибов рода *Candida*, выделенных из репродуктивного тракта женщин с воспалительными заболеваниями гениталий // Бюллетень Оренбургского Научного Центра УрО РАН. 2016. № 3. 9 с. [Pashinina O.A., Kartashova O.L., Pashkova T.M., Popova L.P. Antimycotic resistance of *Candida* fungi isolated from the reproductive tract of women with inflammatory diseases of the genitals. *Byulleten' Orenburgskogo Nauchnogo Tsentra UrO RAN = Bulletin of the Orenburg Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences*, 2016, no. 3, 9 p. (In Russ.)]
4. Araújo D., Mil-Homens D., Henriques M., Silva S. Anti-EFG1 2'-OMethylRNA oligomer inhibits *Candida albicans* filamentation and attenuates the candidiasis in *Galleria mellonella*. *Mol. Ther. Nucleic Acids*, 2021, vol. 27, pp. 517–523. doi: 10.1016/j.omtn.2021.12.018
5. Assres H.A., Selvarajan R., Nyoni H., Mamba B.B., Msagati T.A.M. Antifungal azoles and azole resistance in the environment: current status and future perspectives — a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 2021, vol. 20, pp. 1011–1041. doi: 10.1007/s11157-021-09594-w
6. Banerjee A., Pata J., Sharma S., Monk B.C., Falson P., Prasad R. Directed mutational strategies reveal drug binding and transport by the MDR transporters of *Candida albicans*. *J. Fungi (Basel)*, 2021, vol. 7, no. 2: 68. doi: 10.3390/jof7020068
7. Bhattacharya S., Sae-Tia S., Fries B.C. Candidiasis and mechanisms of antifungal resistance. *Antibiotics*, 2020, vol. 9, no. 6: 312. doi: 10.3390/antibiotics9060312
8. Biswas C., Chen C.-A., Halliday C., Kennedy K., Playford E.G., Marriott D.J., Slavin M.A., Sorrell T.C., Sintchenko V. Identification of genetic markers of resistance to echinocandins, azoles and 5-fluorocytosine in *Candida glabrata* by next-generation sequencing: a feasibility study. *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 23, no. 9, pp. 676.e7–676.e10. doi: 10.1016/j.cmi.2017.03.014
9. Bongomin F., Gago S., Oladele R., Denning D. Global and multi-national prevalence of fungal diseases — estimate precision. *J. Fungi (Basel)*, 2017, vol. 3, no. 4: 57. doi: 10.3390/jof3040057
10. Flowers S.A., Barker K.S., Berkow E.L., Toner G., Chadwick S.G., Gygax S.E., Morschhäuser J., Rogers P.D. Gain-of-function mutations in UPC2 are a frequent cause of ERG11 upregulation in azole-resistant clinical isolates of *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell*, 2012, vol. 11, no. 10, pp. 1289–1299. doi: 10.1128/EC.00215-12

11. Garcia-Effron G. Molecular markers of antifungal resistance: potential uses in routine practice and future perspectives. *J. Fungi (Basel)*, 2021, vol. 7, no. 3: 197. doi: 10.3390/jof7030197
12. Graham D.O., Wilson R.K., Ruma Y.N., Keniya M.V., Tyndall J.D.A., Monk B.C. Structural insights into the azole resistance of the *Candida albicans* darlington strain using *Saccharomyces cerevisiae* lanosterol 14 α -demethylase as a surrogate. *J. Fungi (Basel)*, 2021, vol. 7, no. 11: 897. doi: 10.3390/jof7110897
13. Hampe I.A.I., Friedman J., Edgerton M., Morschhäuser J. An acquired mechanism of antifungal drug resistance simultaneously enables *Candida albicans* to escape from intrinsic host defenses. *PLoS Pathog.*, 2017, vol. 13, no. 9: e1006655. doi: 10.1371/journal.ppat.1006655
14. Hoving J.C., Brown G.D., Gómez B.L., Govender N.P., Limper A.H., May R.C., Meya D.B. AIDS-related mycoses: updated progress and future priorities. *Trends Microbiol.*, 2020, vol. 28, no. 6, pp. 425–428. doi: 10.1016/j.tim.2020.01.009
15. Kukurudz R.J., Chapel M., Wonitowy Q., Bukari A.-R.A., Sidney B., Sierhuis R., Gerstein A.C. Acquisition of cross-azole tolerance and aneuploidy in *Candida albicans* strains evolved to posaconazole. *G3 (Bethesda)*, 2022, vol. 12, no. 9: jkac156 doi: 10.1093/g3journal/jkac156
16. Lee Y., Puumala E., Robbins N., Cowen L.E. Antifungal drug resistance: molecular mechanisms in *Candida albicans* and beyond. *Chem. Rev.*, 2021, vol. 121, no. 6, pp. 3390–3411. doi: 10.1021/acs.chemrev.0c00199
17. Liu J.-Y.Y., Shi C., Wang Y., Li W.-J.J., Zhao Y., Xiang M.-J.J. Mechanisms of azole resistance in *Candida albicans* clinical isolates from Shanghai, China. *Res. Microbiol.*, 2015, vol. 166, no. 3, pp. 153–161. doi: 10.1016/j.resmic.2015.02.009
18. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 2001, vol. 25, no. 4, pp. 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
19. Maras B., Maggiore A., Mignogna G., D'Erme M., Angiolella L. Hyperexpression of CDRs and HWP1 genes negatively impacts on *Candida albicans* virulence. *PLoS One*, 2021, vol. 16, no. 6: e0252555. doi: 10.1371/journal.pone.0252555
20. Morio F., Pagniez F., Besse M., Oise Gay-Andrieu F., Miegerville M., Le Pape P. Deciphering azole resistance mechanisms with a focus on transcription factor-encoding genes TAC1, MRR1 and UPC2 in a set of fluconazole-resistant clinical isolates of *Candida albicans*. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2013, vol. 42, pp. 410–415. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2013.07.013
21. Morschhäuser J. Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. *Fungal Genet. Biol.*, 2010, vol. 47, no. 2, pp. 94–106. doi: 10.1016/j.fgb.2009.08.002
22. Moye-Rowley W.S. Linkage between genes involved in azole resistance and ergosterol biosynthesis. *PLoS Pathog.*, 2020, vol. 16, no. 9: e1008819. doi: 10.1371/journal.ppat.1008819
23. Niimi M., Niimi K., Tanabe K., Cannon R.D., Lamping E. Inhibitor resistant mutants give important insights into *Candida albicans* ABC transporter Cdr1 substrate specificity and help elucidate efflux pump inhibition. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2022, vol. 66, no. 1: e0174821. doi: 10.1128/AAC.01748-21
24. Oliveira J.M.V., Oliver J.C., Dias A.L.T., Padovan A.C.B., Caixeta E.S., Ariosa M.C.F. Detection of ERG11 Overexpression in *Candida albicans* isolates from environmental sources and clinical isolates treated with inhibitory and subinhibitory concentrations of fluconazole. *Mycoses*, 2021, vol. 64, no. 2, pp. 220–227 doi: 10.1111/myc.13208
25. Orlandini R.K., Bepu D.A.N., Saraiva M.D.C.P., Bollela V.R., Motta A.C.F., Lourenço A.G. Are *Candida albicans* isolates from the oral cavity of HIV-infected patients more virulent than from non-HIV-infected patients? Systematic review and meta-analysis. *Microbial Pathogenesis*, 2020, vol. 149: 104477. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104477
26. Pankhurst C.L. Candidiasis (oropharyngeal). *BMJ Clin. Evid.*, 2013, vol. 2013: 1304.
27. Paul S., Moye-Rowley W.S. Multidrug resistance in fungi: regulation of transporter-encoding gene expression. *Front. Physiol.* 2014, vol. 5: 143. doi: 10.3389/fphys.2014.00143
28. Perea S., López-Ribot J.L., Kirkpatrick W.R., McAtee R.K., Santillán R.A., Martínez M., Calabrese D., Sanglard D., Patterson T.F. Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2001, vol. 45, no. 10, pp. 2676–2684. doi: 10.1128/AAC.45.10.2676-2684.2001
29. Perlin D.S., Rautemaa-Richardson R., Alastruey-Izquierdo A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. *Lancet Infect. Dis.*, 2017, vol. 17, no. 12, pp. e383–e392. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30316-X
30. Pfaller M.A., Carvalhaes C.G., DeVries S., Huband M.D., Castanheira M. Elderly versus nonelderly patients with invasive fungal infections: species distribution and antifungal resistance, SENTRY antifungal surveillance program 2017–2019. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2022, vol. 102, no. 4: 115627. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2021.115627
31. Rajadurai S.G., Maharajan M.K., Veetil S.K., Gopinath D. Comparative efficacy and safety of antifungal agents in the prophylaxis of oropharyngeal candidiasis among HIV-infected adults: a systematic review and network meta-analysis. *Life (Basel)*, 2022, vol. 12, no. 4: 515. doi: 10.3390/life12040515
32. Redhu A.K., Shah A.H., Prasad R. MFS transporters of *Candida* species and their role in clinical drug resistance. *FEMS Yeast Res.*, 2016, vol. 16, no. 4: fow043 doi: 10.1093/femsyr/fow043
33. Robbins N., Caplan T., Cowen L.E. Molecular evolution of antifungal drug resistance. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2017, vol. 71, no. 1, pp. 753–775. doi: 10.1146/annurev-micro-030117-020345
34. Sah S.K., Hayes J.J., Rustchenko E. The role of aneuploidy in the emergence of echinocandin resistance in human fungal pathogen *Candida albicans*. *PLoS Pathog.*, 2021, vol. 17, no. 5: e1009564. doi: 10.1371/journal.ppat.1009564
35. Sanglard D., Coste A., Ferrari S. Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. *FEMS Yeast Res.*, 2009, vol. 9, no. 7, pp. 1029–1050. doi: 10.1111/j.1567-1364.2009.00578.x
36. Sanguinetti M., Posteraro B., Lass-Flörl C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. *Mycoses*, 2015, vol. 58, suppl. 2, pp. 2–13. doi: 10.1111/myc.12330
37. Shi C., Liu J., Li W., Zhao Y., Meng L., Xiang M. Expression of fluconazole resistance-associated genes in biofilm from 23 clinical isolates of *Candida albicans*. *Braz. J. Microbiol.*, 2019, vol. 50, no. 1, pp. 157–163. doi: 10.1007/s42770-018-0009-2
38. Teo J.Q.-M., Lee S.J.-Y., Tan A.-L., Lim R.S.-M., Cai Y., Lim T.-P., Kwa A.L.-H. Molecular mechanisms of azole resistance in *Candida* bloodstream isolates. *BMC Infect Dis.*, 2019, vol. 19, no. 1: 63. doi: 10.1186/s12879-019-3672-5

39. Wakade R.S., Ristow L.C., Stamnes M.A., Kumar A., Krysan D.J. The Ndr/LATS kinase Cbk1 regulates a specific subset of Ace2 functions and suppresses the hypha-to-yeast transition in *Candida albicans*. *mBio*, 2020, vol. 11, no. 4: e01900-20. doi: 10.1128/mBio.01900-20
40. Zhang J., Li L., Lv Q., Yan L., Wang Y., Jiang Y. The fungal CYP51s: their functions, structures, related drug resistance, and inhibitors. *Front. Microbiol.*, 2019, vol. 10: 691. doi: 10.3389/fmicb.2019.00691

Авторы:

Воропаев А.Д., аспирант кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия;

Екатеринчев Д.А., аспирант кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия;

Урбан Ю.Н., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Зверев В.В., академик РАН, д.б.н., профессор, зав. кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия;

Несвижский Ю.В., д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия;

Воропаева Е.А., д.б.н., доцент, главный научный сотрудник, руководитель отдела медицинской биотехнологии ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Лиханская Е.И., к.б.н., руководитель лаборатории микробиологии и профилактики кишечных инфекций ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Афанасьев М.С., д.м.н., профессор кафедры клинической аллергологии и иммунологии ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия;

Афанасьев С.С., д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, главный научный сотрудник ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия.

Authors:

Voropaev A.D., PhD Student, Department of Microbiology, Virology and Immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation;

Yekaterinchev D.A., PhD Student, Department of Microbiology, Virology and Immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation;

Urban Yu.N., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Clinical Microbiology and Biotechnology, Gabrichevsky Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Zverev V.V., RAS Full Member, PhD, MD (Biology), Professor, Head of the Department of Microbiology, Virology and Immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation;

Nesvizhsky Yu.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Honored Scientist of the Russian Federation, Professor of the Department of Microbiology, Virology and Immunology I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation;

Voropaeva E.A., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Head Researcher, Head of Medical Biotechnology Department, Gabrichevsky Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Likhanskaya E.I., PhD (Biology), Head of the Laboratory of Microbiology and Prophylaxis of Intestinal Infections, Gabrichevsky Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Afanasyev M.S., PhD, MD (Medicine), Professor of the Department of Clinical Allergology and Immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation;

Afanasyev S.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Honored Scientist of the Russian Federation, Head Researcher, Gabrichevsky Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 19.04.2022
Принята к печати 15.05.2022

Received 19.04.2022
Accepted 15.05.2022

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ VEGF ПРИ ОСЛОЖНЕННОМ ИНФЕКЦИОННОМ ЭНДОКАРДИТЕ

Е.С. Самойленко^{1,2}, Н.В. Колесникова¹, В.И. Баклай³, Е.Ю. Майданникова²,
Е.В. Омельченко²

¹ Кубанский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации,
г. Краснодар, Россия

² ГБУЗ Научно-исследовательский институт — Краевая клиническая больница № 1 им. проф. С.В. Очаповского
Министерства здравоохранения Краснодарского края, г. Краснодар, Россия

³ ГБУЗ Специализированная клиническая инфекционная больница Министерства здравоохранения Краснодарского
края, г. Краснодар, Россия

Резюме. *Введение.* Инфекционный эндокардит (ИЭ) является заболеванием бактериальной природы с частой локализацией патогена на клапанном аппарате сердца, отличается быстрым развитием сердечной недостаточности и частыми тромбоэмболическими осложнениями (ТЭО). Особенности ИЭ обусловлены чужеродностью патогена и состоянием иммунной системы (ИС) человека. Дисбаланс ИС при инфекционном эндокардите проявляется нарушением цитокин-опосредованных взаимодействий, что подтверждает рациональность их изучения для углубления понимания патогенеза различных состояний. Для большинства генов цитокинов характерен полиморфизм и наличие изоформ, обуславливающих развитие предрасположенности к заболеванию. При этом генетический полиморфизм фактора роста эндотелия сосудов — А (Vascular endothelial growth factor А — VEGF-A), играющего важную роль в индукции васкуло- и ангиогенеза, и его патогенетическая роль при ИЭ изучены недостаточно. Цель исследования — анализ полиморфных вариантов нуклеотидной последовательности гена фактора роста эндотелия сосудов с учетом связи с его сывороточной концентрацией у пациентов с инфекционным эндокардитом. *Материалы и методы.* 86 пациентов, проходивших лечение по поводу установленного диагноза ИЭ в ГБУЗ «НИИ-ККБ № 1» г. Краснодара были разделены на две клинические группы в соответствии с характером течения ИЭ: Группа 1 — ИЭ с ТЭО (n = 44), группа 2 — ИЭ без ТЭО (n = 42), а контрольную группу составляли 20 относительно здоровых лиц. Концентрация VEGF-A (пг/мл) в сыворотке крови была определена в первый день поступления в стационар методом иммуноферментного анализа, а геномная ДНК, выделенная из лейкоцитов цельной крови, использовалась для определения частоты генотипов полиморфных вариантов гена VEGF. *Результаты.* Выявлены статистически значимые различия в распределении частот генотипов VEGF-rs2010963 между пациентами с инфекционным эндокардитом и контрольной группой: G/G (OR = 0,25; p = 0,012) и G/C (OR = 4,28; p = 0,022), а также различия между концентрациями VEGF по различным генотипам SNP-rs2010963 (p = 0,0001). Исследование распределения частот генотипов VEGF между пациентами клинических групп показало статистически значимое снижение частоты генотипа G/G (rs2010963) в группе ИЭ с ТЭО (OR = 0,21; p = 0,014) и повышение частоты G/C (OR = 4,72; p = 0,024) по сравнению с контрольной группой, тогда как у пациентов с ИЭ без ТЭО обнаружены статистически

Адрес для переписки:

Самойленко Екатерина Сергеевна
350063, Россия, г. Краснодар, ул. им. Митрофана Седина, 4,
Кубанский государственный медицинский университет.
Тел.: 8 (918) 969-71-42.
E-mail: kondrenko.ekaterina@yandex.ru

Contacts:

Ekaterina S. Samoylenko
350063, Russian Federation, Krasnodar, Mitrofan Sedina str., 4,
Kuban State Medical University.
Phone: +7 (918) 969-71-42.
E-mail: kondrenko.ekaterina@yandex.ru

Для цитирования:

Самойленко Е.С., Колесникова Н.В., Баклай В.И., Майданникова Е.Ю.,
Омельченко Е.В. Полиморфизм генов VEGF при осложненном
инфекционном эндокардите // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 5.
С. 938–946. doi: 10.15789/2220-7619-VGP-1877

Citation:

Samoylenko E.S., Kolesnikova N.V., Baklay V.I., Maydannikova E.Yu.,
Omelchenko E.V. VEGF gene polymorphism in complicated infective
endocarditis // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya
i immunitet, 2022, vol. 12, no. 5, pp. 938–946. doi: 10.15789/2220-
7619-VGP-1877

значимые ($p = 0,0003$) различия сывороточных концентраций VEGF-rs2010963 в соответствии с генотипами GG/CC ($p = 0,01$) и GG/GC ($p = 0,003$). **Выводы.** Выявлена связь между генотипами (G/G и G/C полиморфизма rs2010963) VEGF и его сывороточной концентрацией среди пациентов с ИЭ. Носители минорного аллеля С (rs2010963) имели более высокие уровни VEGF в сыворотке крови. Полученные результаты дополняют и систематизируют современные научные данные о патогенезе заболевания, а также акцентируют внимание на генетическую детерминанту развития осложнений.

Ключевые слова: инфекционный эндокардит, VEGF, SNP, патогенез, диагностика, тромбэмболические осложнения.

VEGF GENE POLYMORPHISM IN COMPLICATED INFECTIVE ENDOCARDITIS

Samoylenko E.S.^{a,b}, Kolesnikova N.V.^a, Baklay V.I.^c, Maydannikova E.Yu.^b, Omelchenko E.V.^b

^a Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

^b Scientific Research Institute — Ochapovsky Regional Clinical Hospital No. 1, Krasnodar, Russian Federation

^c Specialized Clinical Infectious Diseases Hospital, Krasnodar, Russian Federation

Abstract. Introduction. Infective endocarditis (IE) is a bacterial disease with frequent pathogen localization on the heart valve apparatus. IE is characterized by rapid development of heart failure and frequent thromboembolic complications (TEC). IE features are accounted for by foreign pathogen nature and state of human immune system (IS). The imbalanced IS in infective endocarditis is manifested by impaired cytokine-mediated interactions. This confirms the rationality of studying cytokines to advance understanding of the pathogenesis for various conditions. Most cytokine genes are characterized by polymorphism and existing isoforms underlying disease predisposition. Genetic polymorphism of vascular endothelial growth factor — A (VEGF-A) plays an important role in the induction of vasculogenesis and angiogenesis. The pathogenetic VEGF role in IE has not been thoroughly studied. Research objective — analysis of polymorphic nucleotide sequence variants in the vascular endothelial growth factor gene, taking into account a relation with its serum concentration in patients with infective endocarditis. **Materials and methods.** 86 patients treated with verified diagnosis of infective endocarditis at the Scientific Research Institute — “Regional Clinical Hospital No. 1” of Krasnodar were divided into two clinical groups in accordance with the IE course: Group 1 — IE with TEC ($n = 44$), group 2 — IE without TEC ($n = 42$), and the control group consisted of 20 apparently healthy individuals. The concentration of serum VEGF-A (pg/mL) was measured by ELISA on day 1 of hospitalization. Genomic DNA was isolated from whole blood leukocytes and used to determine the frequency of genotypes of VEGF gene polymorphic variants. **Results.** Significant differences in the frequency distribution of VEGF-rs2010963 genotypes between patients with infective endocarditis and control group were revealed: G/G (OR = 0.25; $p = 0.012$) and G/C (OR = 4.28; $p = 0.022$), as well as differences between VEGF concentrations for various SNP-rs2010963 genotypes ($p = 0.0001$). A study of VEGF genotype frequency distribution between patients of clinical groups showed a significantly decreased frequency of the genotype G/G (rs2010963) in the IE group with TEC (OR = 0.21; $p = 0.014$) and increased frequency of G/C (OR = 4.72; $p = 0.024$) compared with the control group, whereas in patients with IE without TEC, significant ($p = 0.0003$) differences in serum concentrations of VEGF-rs2010963 were found in accordance with genotypes GG/CC ($p = 0.01$) and GG/GC ($p = 0.003$). **Conclusion.** The relationship between the VEGF genotypes (G/G and G/C of rs2010963 polymorphism) and related serum concentration among patients with IE was revealed. Carriers of the minor C allele (rs2010963) had higher serum VEGF levels. The results obtained complement and systematize current scientific data on the disease pathogenesis, as well as focus on the genetic determinant of the developing complications.

Key words: infective endocarditis, VEGF, SNP, pathogenesis, diagnosis, thromboembolic complications.

Введение

Инфекционный эндокардит (ИЭ) является заболеванием бактериального происхождения, при котором возбудитель размещается на клапанном аппарате сердца и эндокарде, и характеризуется быстрым развитием сердечной недостаточности и частыми системными эмболическими осложнениями. Особенности формирования и течения инфекционного процесса обусловлены как чужеродностью возбудителя, так и состоянием иммунной системы (ИС) индивидуума [14, 18], дисбаланс которой при инфекционном процессе выражается нарушением

межклеточных цитокин-опосредованных контактов [6], что оправдывает целесообразность их изучения для углубления знаний основ патогенеза различных состояний. Известно, для генов многих цитокинов характерен полиморфизм и присутствие изоформ как свойство, способное изменять направленность иммунного ответа и приводить к развитию предрасположенности к различным вариантам течения заболевания [5]. Хорошо изученной группой таких генетических вариантов являются однонуклеотидные замены (SNP), которые представляют значительный интерес как возможные предиктивные факторы [25]. Поэтому

исследование генов, влияющих на активность цитокинов, является одной из главных задач в изучении патогенеза как инициации, так и течения ИЭ, а также выявления предрасположенности к нему. Тромбоэмболические осложнения (ТЭО) — одна из наиболее частых причин смерти пациентов с ИЭ, их выраженность напрямую связана с клиническим вариантом течения заболевания [11]. В современной модели патофизиологии клеточной адгезии при формировании ИЭ первостепенную роль играют деструктивные и некробиотические изменения эндотелиальных клеток (ЭК), контролирующих гомеостаз и сосудисто-тканевую проницаемость [9].

Наиболее значимым цитокиновым фактором ангиогенеза является фактор роста эндотелия сосудов — А (Vascular endothelial growth factor A — VEGF-A) как ключевая молекула индукции васкуло- и ангиогенеза [19] и важнейший регулятор физиологического и патологического усиления роста сосудов за счет прямого митогенного действия на эндотелий [17]. Потребность дополнительного синтеза VEGF-A активированными клетками ИС при ИЭ необходима для усиления роста сосудов [10] и питания поврежденных тканей как эндокарда, так и других систем при ТЭО [21]. VEGF-A кодируется геном, который расположен на хромосоме 6p21.3, однако роль генов цитокина и его сывороточная концентрация при ИЭ изучены недостаточно.

В этой связи целью настоящего исследования был анализ полиморфных вариантов нуклеотидной последовательности гена фактора роста эндотелия сосудов с учетом связи с его сывороточной концентрацией у пациентов с ИЭ.

Материалы и методы

В исследование было включено 86 пациентов, находившихся в ГБУЗ «НИИ-ККБ № 1» г. Краснодара в связи с установленным диагнозом ИЭ. В соответствии с наличием/отсутствием тромбоэмболических осложнений, все исследуемые были разделены на 2 клинические группы: группа 1 — ИЭ с ТЭО ($n = 44$) и группа 2 — ИЭ без ТЭО ($n = 42$), а контрольную группу составили 20 условно здоровых лиц. Исследование проведено с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности (участниками исследования подписано информированное согласие и получена полная информация относительно целей, хода и содержания исследования) и одобрено Независимым Этическим Комитетом ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России от 27.09.2019 г., протокол № 80.

Все группы были сопоставимы по возрасту (пациенты с ИЭ — 52 ± 10 лет, условно-здоровые

лица — 53 ± 10 лет), сопутствующей патологии, этиологическому фактору эндокардита и локализации бактерии (клапанная локализация). Критериями исключения являлись: отсутствие письменного согласия на исследование, хронические инфекционно-воспалительные состояния, аутоиммунная патология, сопутствующие острые состояния, аллергические реакции в острой фазе, беременность, возраст < 18 лет или > 70 лет.

Проведено иммунологическое и молекулярно-биологическое обследование образцов биологического материала (венозная кровь). Определение сывороточной концентрации VEGF-A осуществляли в первый день поступления пациентов в стационар методом иммуноферментного анализа с помощью набора реагентов для VEGF-A (Вектор-БЕСТ, Россия) с использованием соответствующего оборудования — Multiscan FC (Thermo Scientific, Финляндия), Shaker-Thermostat ST-3L (ELMI, Латвия), HydroFlex (Tecan, Австрия).

Выделение геномной ДНК из лейкоцитов цельной крови производили с использованием реагента «ДНК-ЭКСПРЕСС-кровь» (ООО НПФ «Литех», Россия). Определение SNPs генов VEGF проводили с помощью наборов реагентов для определения полиморфизма C/A гена VEGF-A (rs2146323), полиморфизма C2578A гена VEGF-A (rs699947), полиморфизма C936T гена VEGF (rs3025039), полиморфизма G634C гена VEGF-A (rs2010963) (Синтол, Россия) и соответствующего оборудования — амплификатора CFX96 Real-Time (США), термостата «Гном» (Россия), центрифуги Eppendorf MiniSpin (Германия), вортекса Microspin FV-2400 (Латвия).

Статистическую обработку результатов осуществляли посредством программного обеспечения IBM SPSS Statistics (версия 26). Нормальность распределения признаков проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Описательная статистика представлена медианой и интерквартильным размахом — Me (C_{25} – C_{75}). Независимые клинические группы сравнивали критерием U (Манна–Уитни) — если их две; и критерием H (Краскела–Уоллиса) — более 2-х групп. Использовали поправку Бонферрони для расчета скорректированного значения вероятности p . Генотипы SNP тестировали на отклонение от равновесия Харди–Вайнберга ($p > 0,05$). Достоверность различий частот генотипов определяли по двустороннему точному критерию Фишера. Проведен логистический регрессионный анализ для определения отношения шансов OR (Odds Ratio) с расчетом 95% доверительного интервала CI (Confidence Interval). Пороговый уровень критической значимости — значение вероятности (p) $< 0,05$.

Результаты

Как иммунологическое, так и молекулярно-генетическое исследование проводилось в первые дни поступления пациентов в стационар, после установления точного диагноза — «Инфекционный эндокардит» — в соответствии с диагностическими критериями Duke [12]. Охарактеризованное нами распределение частот генотипов VEGF относительно контрольной группы соответствует распределению частоты в европеоидных популяциях. Для более точных данных были рассчитаны

собственные ожидаемые частоты в соответствии с законом Харди–Вайнберга. Таким образом распределение наблюдаемых частот как в контрольной, так и в клинических группах находится в равновесии Харди–Вайнберга.

Исследованиями выявлены статистически значимые различия распределения частот VEGF-rs2010963 между пациентами с ИЭ и группой относительно здоровых лиц по генотипам G/G (OR = 0,25; p = 0,012) и G/C (OR = 4,28; p = 0,022), тогда как исследование генотипа C/C (rs2010963) указывает на отсутствие межгрупповых различий (табл. 1).

Таблица 1. Распределение частот генотипов VEGF среди пациентов с ИЭ и в контрольной группе

Table 1. Distribution of VEGF genotype frequencies among patients with IE and control group

SNP, VEGF	Пациенты с ИЭ Patients with IE	Группа контроля Control group	OR (95% CI)	p
rs699947	n = 86	n = 20		
C/C	n = 24 (28%)	n = 9 (45%)	0,17 < 0,47 < 1,28	0,180
C/A	n = 37 (43%)	n = 6 (30%)	0,62 < 1,76 < 5,02	0,323
A/A	n = 25 (29%)	n = 5 (25%)	0,4 < 1,23 < 3,75	0,790
rs2010963	n = 86	n = 20		
G/G	n = 37 (43%)	n = 15 (75%)	0,08 < 0,25 < 0,76	0,012*
G/C	n = 37 (43%)	n = 3 (15%)	1,17 < 4,28 < 15,69	0,022*
C/C	n = 12 (14%)	n = 2 (10%)	0,3 < 1,46 < 7,11	0,999
rs2146323	n = 86	n = 20		
C/C	n = 32 (37%)	n = 11 (55%)	0,18 < 0,48 < 1,3	0,205
C/A	n = 28 (33%)	n = 6 (30%)	0,39 < 1,13 < 3,24	0,999
A/A	n = 26 (30%)	n = 3 (15%)	0,66 < 2,46 < 9,11	0,264
rs3025039	n = 85	n = 20		
C/C	n = 62 (72,9%)	n = 15 (75%)	0,35 < 1,08 < 3,35	0,999
C/T	n = 20 (23,5%)	n = 4 (20%)	0,37 < 1,23 < 4,11	0,999
T/T	n = 3 (3,5%)	n = 1 (5%)	0,07 < 0,7 < 7,06	0,576

Примечание. p — точный критерий Фишера; * — значимые отличия между группами, p < 0,05; OR — отношение шансов; CI — доверительный интервал.

Note. p — Fisher's exact criterion; * — significant inter-group differences, p < 0.05; OR — odds ratio; CI — confidence interval.

Таблица 2. Сывороточные уровни концентрации VEGF в соответствии с вариантами генотипа среди пациентов с ИЭ

Table 2. Serum VEGF levels according to genotype variants among patients with IE

SNP, VEGF	Пациенты с инфекционным эндокардитом, пг/мл Patients with infectious endocarditis, pg/mL			p
rs699947 n = 86	C/C (n = 24)	C/A (n = 37)	A/A (n = 25)	0,141
	809,88 (445,66–1041,53)	612,5 (228,76–1062,13)	319,28 (111,01–1012,5)	
rs2010963 n = 86	G/G (n = 37)	G/C (n = 37)	C/C (n = 12)	0,0001*
	201,37 (77,58–764,69)	785,37 (484,87–1131,15)	926,04 (574,78–1041,53)	
	Поправка Бонферрони Bonferroni correction			
	p (GG-CC) = 0,016*	p (GC-GG) = 0,001*	p (CC-GC) = 1	
rs2146323 n = 86	C/C (n = 32)	C/A (n = 28)	A/A (n = 26)	0,288
	701,29 (192,61–1001,05)	403,37 (145,35–1041,53)	722,76 (329,87–1105,80)	
rs3025039 n = 85	C/C (n = 62)	C/T (n = 20)	T/T (n = 3)	0,161
	762,69 (269,91–1085,83)	293,35 (177,82–904,15)	562,62 (175,46–577,48)	

Примечание. p — критерий Краскела–Уоллиса; * — значимые отличия между группами, p < 0,05. Результаты концентрации VEGF представлены в виде Me (C₂₅–C₇₅).

Note. p — Kruskal–Wallis test; * — significant inter-group differences, p < 0.05. VEGF concentration results presented as Me (C₂₅–C₇₅).

Распределение генотипов по остальным SNP (rs699947, rs2146323 и rs3025039) также не выявило достоверных различий между группами.

Что касается концентраций VEGF (пг/мл) в сыворотке крови среди пациентов с ИЭ и ее распределения по соответствующим генотипам (табл. 2), то статистически значимое различие наблюдалось между концентрациями цитокина по SNP-rs2010963, по критерию Краскела–Уоллиса — межгруппового дисперсионного анализа, $p = 0,0001$.

Для выяснения результатов множественного сравнения, а именно, какие генотипы по rs2010963 дают значимую разницу, использовали поправку Бонферрони. Анализ полученных данных указал на весомую разницу в концентрациях цитокина между генотипами GG/GC ($p = 0,001$) и GG/CC ($p = 0,016$) по rs2010963. Распределение концентраций между генотипа-

ми по остальным трем SNP не показало достоверной разницы ни в одном из случаев.

При анализе распределения частот генотипов различных SNP VEGF между пациентами клинических групп (ИЭ с ТЭО и ИЭ без ТЭО) с группой контроля (табл. 3), выявлено статистически значимое снижение частоты генотипа G/G (rs2010963) в группе ИЭ с ТЭО по сравнению с частотой G/G в контрольной группе (OR = 0,21; $p = 0,014$). При этом также обнаружено статистически значимое повышение частоты генотипа G/C того же SNP в группе ИЭ с ТЭО по сравнению с частотой G/C в контрольной группе (OR = 4,72; $p = 0,024$), тогда как достоверных различий среди других SNP не наблюдалось.

Следует отметить, что некоторые явно завышенные значения — для rs3025039 генотип T/T (OR = 2 при сравнении групп ИЭ с ТЭО/ИЭ без ТЭО) или rs2146323 генотип A/A (OR = 3,57

Таблица 3. Распределение частот генотипов VEGF среди пациентов с ИЭ разных клинических групп и контрольной группой

Table 3. Frequency distribution of VEGF genotypes among IE patients in diverse clinical groups and controls

VEGF, SNP	ИЭ с ТЭО IE with TEC	ИЭ без ТЭО IE without TEC	Контроль Control	ИЭ с ТЭО/ ИЭ без ТЭО IE with TEC/IE without TEC OR (95% CI)	ИЭ с ТЭО/ контроль IE with TEC/Control OR (95% CI)	ИЭ без ТЭО/ контроль IE without TEC/Control OR (95% CI)
rs699947	n = 44	n = 42	n = 20			
C/C	13 (29%)	11 (26%)	9 (45%)	0,46 < 1,18 < 3,04 $p = 0,812$	0,17 < 0,51 < 1,53 $p = 0,264$	0,14 < 0,43 < 1,33 $p = 0,157$
C/A	17 (39%)	20 (48%)	6 (30%)	0,29 < 0,69 < 1,63 $p = 0,513$	0,47 < 1,47 < 4,56 $p = 0,582$	0,68 < 2,12 < 6,58 $p = 0,271$
A/A	14 (32%)	11 (26%)	5 (25%)	0,52 < 1,32 < 3,35 $p = 0,638$	0,42 < 1,4 < 4,62 $p = 0,769$	0,31 < 1,06 < 3,62 $p = 1$
rs2010963	n = 44	n = 42	n = 20			
G/G	17 (39%)	20 (48%)	15 (75%)	0,29 < 0,69 < 1,63 $p = 0,513$	0,06 < 0,21 < 0,68 $p = 0,014^*$	0,09 < 0,3 < 0,99 $p = 0,056$
G/C	20 (45%)	17 (40%)	3 (15%)	0,52 < 1,23 < 2,88 $p = 0,668$	1,21 < 4,72 < 18,46 $p = 0,024^*$	0,98 < 3,85 < 15,2 $p = 0,079$
C/C	7 (16%)	5 (12%)	2 (10%)	0,42 < 1,44 < 4,95 $p = 0,756$	0,33 < 1,75 < 9,3 $p = 0,706$	0,21 < 1,22 < 6,89 $p = 1$
rs2146323	n = 44	n = 42	n = 20			
C/C	13 (29%)	19 (45%)	11 (55%)	0,21 < 0,51 < 1,23 $p = 0,180$	0,11 < 0,34 < 1,02 $p = 0,093$	0,23 < 0,68 < 1,97 $p = 0,588$
C/A	14 (32%)	14 (33%)	6 (30%)	0,38 < 0,93 < 2,3 $p = 0,999$	0,35 < 1,09 < 3,43 $p = 0,999$	0,37 < 1,17 < 3,69 $p = 1$
A/A	17 (39%)	9 (22%)	3 (15%)	0,89 < 2,31 < 6 $p = 0,102$	0,91 < 3,57 < 14,03 $p = 0,082$	0,37 < 1,55 < 6,47 $p = 0,735$
rs3025039	n = 43	n = 42	n = 20			
C/C	31 (72%)	31 (74%)	15 (75%)	0,35 < 0,92 < 2,39 $p = 0,999$	0,26 < 0,86 < 2,89 $p = 1$	0,28 < 0,94 < 3,19 $p = 1$
C/T	10 (23%)	10 (24%)	4 (20%)	0,36 < 0,97 < 2,64 $p = 0,999$	0,33 < 1,21 < 4,47 $p = 1$	0,34 < 1,25 < 4,61 $p = 1$
T/T	2 (5%)	1 (2%)	1 (5%)	0,17 < 2 < 22,93 $p = 1$	0,08 < 0,93 < 10,86 $p = 1$	0,03 < 0,46 < 7,81 $p = 0,544$

Примечание. p — точный критерий Фишера; * — значимые отличия между группами, $p < 0,05$; OR — отношение шансов; CI — доверительный интервал.

Note. p — Fisher's exact criterion; * — significant inter-group differences, $p < 0,05$; OR — odds ratio; CI — confidence interval.

при сравнении групп ИЭ с ТЭО/контроль), обусловлены недостаточным числом лиц в клинических группах и для их уточнения необходимы дополнительные исследования.

При этом есть тенденция к значимости различий, но она не оказалась достаточной в пределах выбранного уровня вероятности ($p < 0,05$). Это касается SNP — rs2010963 генотипов G/G (OR = 0,3; $p = 0,056$) и G/C (OR = 3,85; $p = 0,079$) между группой ИЭ без ТЭО и контролем. Отметим полиморфизм rs2146323, его генотипы C/C (OR = 0,34; $p = 0,093$) и A/A (OR = 3,57; $p = 0,082$) между группой ИЭ с ТЭО и группой условно здоровых лиц, где также видна тенденция к значимости различий, но ограничена выбранным уровнем значимости ($p < 0,05$).

Анализ уровней сывороточных концентраций разных SNP-VEGF (пг/мл) в соответствии с вариантами генотипов среди пациентов с осложненным и неосложненным течением ИЭ продемонстрировал отсутствие взаимосвязи между генотипами и концентрацией VEGF в 1 группе (ИЭ с ТЭО) ни по одному из исследованных SNP-VEGF (табл. 4). Между тем в клинической группе с неосложненным течением ИЭ обнаружены статистически значимые различия по rs2010963 между различными генотипами ($p = 0,0003$),

и коррекция на множественные сравнения указала достоверную разницу этой группы по генотипам: GG/CC ($p = 0,01$) и GG/GC ($p = 0,003$)

Анализ связи между частотой генотипов rs2010963 и концентрацией сывороточного уровня VEGF в клинических группах показал, что во 2-й группе (ИЭ без ТЭО) частота генотипа G/G с концентрацией VEGF 152,42 (44,09–411,33) пг/мл была в 6 раз ниже концентрации VEGF по генотипу C/C 913,59 (591,87–1387,6) пг/мл, и в 5,1 раз ниже по генотипу G/C, 785,37 (444,1–991,9) пг/мл. Между тем в 1-й группе (ИЭ с ТЭО) значимых различий концентрации по генотипам выявлено не было.

Наряду с этим выявлены тенденции к снижению концентрации VEGF в связи с аллелем T по rs3025039 генотип C/C 762,69 (269,91–1085,83) пг/мл против C/T 293,35 (177,82–904,15) пг/мл и T/T 562,62 (175,46–577,48) пг/мл, а также при сравнении генотипов SNP rs3025039 в подгруппах ИЭ с/без ТЭО.

Обсуждение

ИЭ, как и многие другие состояния, является воспалительным процессом и сопровождается гипоксией тканей, что является сильнейшим

Таблица 4. Сывороточные уровни концентрации VEGF в соответствии с вариантами генотипа среди пациентов с ИЭ разных клинических групп

Table 4. Serum VEGF levels according to genotype variants among IE patients of different clinical groups

SNP, VEGF	Пациенты, ИЭ с ТЭО, пг/мл Patients, IE with TEC, pg/mL			p
	C/C (n = 13)	C/A (n = 17)	A/A (n = 14)	
rs699947 n = 44	1012,17 (692,18–1188,44)	693,63 (356,8–1154,19)	517,51 (189,97–1088,38)	0,310
rs2010963 n = 44	G/G (n = 17) 495,75 (165,63–1094,2)	G/C (n = 20) 881,51 (438,57–1161,6)	C/C (n = 7) 938,5 (508,89–1042,48)	0,177
rs2146323 n = 44	C/C (n = 13) 938,5 (451,33–1191,29)	C/A (n = 14) 733,05 (283,59–1058,32)	A/A (n = 17) 577,48 (326,34–1182,93)	0,854
rs3025039 n = 43	C/C (n = 31) 938,5 (508,89–1109,83)	C/T (n = 10) 349,74 (197,72–1284,48)	T/T (n = 2) –	0,410
Пациенты, ИЭ без ТЭО, пг/мл Patients, IE without TEC, pg/mL				
rs699947 n = 42	C/C (n = 11) 785,37 (186,27–913,59)	C/A (n = 20) 536,13 (177,82–957,72)	A/A (n = 11) 251,49 (3,5–797,58)	0,294
rs2010963 n = 42	G/G (n = 20) 152,42 (44,09–411,33)	G/C (n = 17) 785,37 (444,1–991,9)	C/C (n = 5) 913,59 (591,87–1387,6)	0,0003*
	Поправка Бонферрони Bonferroni correction			
	p(GG-CC)=0,01*	p(GC-GG)=0,003*	p(CC-GC)=1	
rs2146323 n = 42	C/C (n = 19) 612,5 (169,93–819,77)	C/A (n = 14) 196,27 (71,95–872,09)	A/A (n = 9) 795,23 (419,16–991,9)	0,129
rs3025039 n = 42	C/C (n = 31) 643,57 (138,29–973,93)	C/T (n = 10) 237,1 (154,08–714,88)	T/T (n = 1) –	0,273

Примечание. p — критерий Краскела–Уоллиса (использовался при сравнении 3-х признаков), критерий Манна–Уитни (использовался при сравнении 2-х признаков); * — значимые отличия между группами, $p < 0,05$. Результаты концентрации VEGF представлены в виде Me ($C_{25}–C_{75}$).
Note. p — Kruskal–Wallis criterion (used to compare 3 signs), Mann–Whitney criterion (used to compare 2 signs); * — significant inter-group differences, $p < 0.05$. VEGF concentration results presented as Me ($C_{25}–C_{75}$).

стимулом, вызывающим секрецию VEGF [19]. Поскольку развитие и прогрессирование эндокардита, как и многих заболеваний инфекционной природы, является результатом взаимодействия генетического аппарата с факторами внешнего воздействия, прогностическая значимость единичного полиморфизма крайне мала [23]. И тем не менее существуют исследования, которые указывают на связь SNP генов VEGF, его сывороточного уровня и риска тяжести состояния пациента [8, 20], а увеличение числа генотипов цитокинов и факторов роста в составе сложных генетических комплексов у одного пациента значительно повышает клиническую значимость результата иммуногенетического исследования [3].

Так, среди исследуемых нами полиморфных вариантов гена VEGF, особый интерес вызвал полиморфизм rs2010963, показана связь генотипов с ИЭ, в том числе с осложненным его течением. В современной литературе имеются работы, устанавливающие связь SNP с риском выявления нарушений сердечно-сосудистого аппарата. Так, Vannay A. и соавт. (2006) в своем исследовании акцентируют внимание на аллель +405C VEGF, который указывал на значимую распространенность в группе пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС) ($p < 0,001$) и повышенный риск в отношении данного состояния (OR = 1,72; доверительный интервал — 95%) [22].

Другие работы указывают на связь генотипов с более низкой экспрессией VEGF (rs2010963) и с более высоким риском дефекта межжелудочковой перегородки (ДМЖП), а именно: аллель -634C находится в значительной протективной связи против ДМЖП, что свидетельствует о нарушении регуляции VEGF в патологических процессах данного заболевания [24].

В своем исследовании Lambrechts D. и соавт. (2005) при генотипировании 148 лиц с изолированным, несиндромальным ТОФ (тетрада Фалло) обнаружили повышенный риск развития заболевания при наличии полиморфных вариантов в промоторе VEGF (rs699947 и rs1570360) и лидерной последовательности (rs2010963), которые снижали уровни VEGF [16]. Для ИЭ полиморфизм rs699947 не оказался значим в нашем исследовании.

Анализ результатов оценки сывороточного уровня концентрации VEGF у пациентов с ИЭ позволил обнаружить значимые отличия по вариантам генотипов полиморфизма rs2010963. Стоит отметить, что присутствие минорного аллеля С указывало на более высокие уровни цитокина в крови. Так, медиана генотипа G/G = 201,37 пг/мл; генотипа G/C = 785,37 пг/мл; генотипа C/C = 926,04 пг/мл. Это находит свое подтверждение в исследованиях Awata T.

и соавт. (2002), указывающих на связь генотипа C/C rs2010963 с более высоким сывороточным уровнем VEGF и может свидетельствовать об усилении синтеза VEGF. Авторы отмечают более высокие уровни VEGF в сыворотке крови у лиц с генотипом CC полиморфизма rs2010963, чем у субъектов с другими генотипами ($p = 0,021$) [7].

Исследованием установлено отсутствие связи ИЭ с однонуклеотидными заменами rs699947, rs2146323 и rs3025039. Важно отметить, что немногочисленные данные по полиморфным вариантам гена VEGF и его связи с кардиоваскулярной патологией свидетельствуют об их противоречивости. Так по мнению одних авторов полиморфизм rs699947 связан с риском ишемической болезни сердца [8, 13]. Группу наблюдения составили 175 пациентов с подтвержденной ИБС, в которой наблюдали более высокие частоты генотипа VEGF 2578AA — rs699947 ($p = 0,008$), что также указывало на тяжесть заболевания [8]. Другое исследование также указывает на связь генотипа VEGF -2578CC с более высокой экспрессией фактора роста эндотелия сосудов. Авторы согласовывают эти результаты с защитным эффектом VEGF при развитии атеросклероза [13]. При этом другие исследования связывают риск ИБС с полиморфизмом VEGF rs3025039, и свидетельствуют об отсутствии связи VEGF rs699947 и ИБС. Авторы отмечают высокую частоту аллеля С и генотипа CC в положении +936 гена VEGF (rs3025039) у больных ИБС, которая оказалась значимо выше, чем у пациентов без данного заболевания ($p = 0,02$) [2].

Между тем, выявленная нами тенденция к снижению сывороточной концентрации VEGF в связи с аллелем Т по полиморфизму rs3025039 коррелирует с данными других исследователей, свидетельствующими о связи аллеля Т (rs3025039) с более низким уровнем белка в сыворотке крови [15].

Уникальность молекулярных исследований состоит в учете особенностей конкретного пациента, а профилактическая составляющая включает получение информации о геноме индивидуума еще до болезни, что может предотвратить развитие патологического состояния [1].

Между тем частая противоречивость данных о патогенетической роли SNP при сердечно-сосудистых патологиях и заболеваниях инфекционной природы может быть обусловлена недостаточной по объему выборкой пациентов, влиянием множества других генов и факторов внешней среды на фенотип, эпигенетику, как и недостаточное представление о паттернах вариации в геноме человека. При этом полиморфные варианты в генах воспалительных факторов ИС могут

приводить к неадекватной активации иммунновоспалительной системы при внедрении микроорганизма [4].

Заключение

Таким образом, анализ полученных данных в настоящем исследовании позволил выявить связь между генотипами VEGF и его сывороточными уровнями у пациентов с ИЭ, а именно: генотипы G/G и G/C полиморфизма rs2010963 показали статистически значимое отличие не только в распределении частот у пациентов с ИЭ и контрольной группой ($p = 0,012$ и $p = 0,022$ соответственно), а также среди клинических групп (ИЭ с ТЭО, $p = 0,014$ и $p = 0,024$), но и выявили связь с более высокой плазменной концентрацией VEGF носителей минорного аллеля С, которая прослеживается как на уровне основной группы пациентов с ИЭ (медианы G/G — 201,37 пг/мл против

G/C — 785,37 и С/С — 926,04), так и в клинических группах ИЭ с ТЭО (G/G — 201,37 пг/мл против G/C — 785,37 и С/С — 926,04) и ИЭ без ТЭО (G/G — 152,42 пг/мл против G/C — 785,37 и С/С — 913,59).

Таким образом, с точки зрения актуальности изучения и внедрения в практику дополнительных иммуногенетических критериев лабораторной диагностики ИЭ, представляет интерес анализ и систематизация современных научных сведений о полиморфизме генов цитокинов, ассоциированных с данным заболеванием. Проведенное исследование подтверждает наличие связи ИЭ с полиморфными вариантами гена VEGF rs2010963, а также частоты генотипов — с сывороточным уровнем цитокина. Таким образом, оценка полиморфизма гена VEGF rs2010963 и сывороточный уровень соответствующего цитокина у пациентов с ИЭ обоснована и целесообразна с целью диагностики и профилактики заболевания.

Список литературы/References

1. Будчанов Ю.И., Делягин В.М. Генетика бронхиальной астмы // Практическая медицина. 2010. Т. 6, № 45. С. 19–21. [Budchanov Y.I., Delyagin V.M. Genetics of bronchial asthma. *Prakticheskaya meditsina = Practical Medicine*, 2010, vol. 6, no. 45, pp. 19–21. (In Russ.)]
2. Климонтов В.В., Шевченко А.В., Тянь Н.В., Булумбаева Д.М., Прокофьев В.Ф., Коненков В.И. Полиморфизмы генов цитокинов и матриксных металлопротеиназ, ассоциированные с ишемической болезнью сердца, у больных сахарным диабетом 2-го типа // Кардиология. 2017. Т. 57, № 8. С. 5–10. [Klimontov V.V., Shevchenko A.V., Tyan N.V., Bulumbaeva D.M., Prokof'ev V.F., Konenkov V.I. Polymorphisms in genes of cytokines and matrix metalloproteinases associated with ischemic heart disease in patients with type 2 diabetes. *Kardiologiya = Kardiologiia*, 2017, vol. 57, no. 8, pp. 5–10. (In Russ.)] doi: 10.18087/cardio.2017.8.10011
3. Коненков В.И. Цитокиновые полигенные комплексы — маркеры индивидуальной настройки состояния цитокиновой сети здорового человека и пациентов с заболеваниями различной природы // Аллергология и иммунология. 2011. Т. 12, № 2. С. 191–194. [Konenkov V.I. Cytokine polygenic complexes — markers of individual adjustment of the state of the cytokine network of a healthy person and patients with diseases of various nature. *Allergologiya i immunologiya = Allergology and Immunology*, 2011, vol. 12, no. 2, pp. 191–194. (In Russ.)]
4. Синицкий М.Ю., Понасенко А.В. Роль полиморфизма и особенностей экспрессии генов рецепторов врожденного иммунного ответа в патогенезе инфекционного эндокардита // Российский кардиологический журнал. 2018. Т. 23, № 10. С. 145–150. [Sinititsky M.Yu., Ponasenko A.V. The role of polymorphism and expression features of innate immune response receptors genes in the pathogenesis of infectious endocarditis. *Rossiiskii kardiologicheskii zhurnal = Russian Journal of Cardiology*, 2018, vol. 23, no. 10, pp. 145–150. (In Russ.)] doi: 10.15829/1560-4071-2018-10-145-150
5. Тырнова Е.В., Алешина Г.М., Янов Ю.К., Кокряков В.Н. Изучение экспрессии гена кателицидина LL-37 в слизистой оболочке верхних дыхательных путей // Российская оториноларингология. 2014. Т. 2, № 69. С. 94–99. [Tyrnova E.V., Aleshina G.M., Yanov Yu.K., Kokryakov V.N. Investigation of cathelicidin ll-37 gene expression in the upper airway mucosa. *Rossiiskaya otorinolaringologiya = Russian Otorhinolaryngology*, 2014, vol. 2, no. 69, pp. 94–99. (In Russ.)]
6. Araújo I.R., Ferrari T.C., Teixeira-Carvalho A., Campi-Azevedo A.C., Rodrigues L.V., Guimarães Júnior M.H., Barros T.L., Gelape C.L., Sousa G.R., Nunes M.C. Cytokine signature in infective endocarditis. *PLoS One*, 2015, vol. 10, no. 7: e0133631. doi: 10.1371/journal.pone.0133631
7. Awata T., Inoue K., Kurihara S., Ohkubo T., Watanabe M., Inukai K., Inoue I., Katayama S. A common polymorphism in the 5'-untranslated region of the VEGF gene is associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetes. *Diabetes*, 2002, vol. 51, no. 5, pp. 1635–1639. doi: 10.2337/diabetes.51.5.1635
8. Biselli P.M., Guerzoni A.R., de Godoy M.F., Pavarino-Bertelli E.C., Goloni-Bertollo E.M. Vascular endothelial growth factor genetic variability and coronary artery disease in Brazilian population. *Heart Vessels*, 2008, vol. 23, no. 6, pp. 371–375. doi: 10.1007/s00380-008-1057-6
9. Carmeliet P., Jain R.K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, 2011, vol. 473, no. 7347, pp. 298–307. doi: 10.1038/nature10144
10. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2009, vol. 29, no. 6, pp. 789–791.
11. Habib G., Erba P.A., Iung B., Donal E., Cosyns B., Laroche C., Popescu B.A., Prendergast B., Tornos P., Sadeghpour A., Oliver A., Vaskelyte J.J., Sow R., Axler O., Maggioni A.P., Lancellotti P. Clinical presentation, aetiology and outcome of infective endocarditis. Results of the ESC-EORP EURO-ENDO (European infective endocarditis) registry: a prospective cohort study. *Eur. Heart J.*, 2019, vol. 40, no. 39, pp. 3222–3232. doi: 10.1093/eurheartj/ehz620

12. Habib G., Lancellotti P., Antunes M.J., Bongiorno M.G., Casalta J.P., Del Zotti F., Dulgheru R., El Khoury G., Erba P.A., Jung B., Miro J.M., Mulder B.J., Plonska-Gosciniak E., Price S., Roos-Hesselink J., Snygg-Martin U., Thuny F., Mas P.T., Vilacosta I., Zamorano J.L. 2015 ESC guidelines for the management of infective endocarditis: the task force for the management of infective endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC). Endorsed by: European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS), the European Association of Nuclear Medicine (EANM). *Eur. Heart J.*, 2015, vol. 36, no. 44, pp. 3075–3128. doi: 10.1093/eurheartj/ehv319
13. Howell W.M., Ali S., Rose-Zerilli M.J., Ye S. VEGF polymorphisms and severity of atherosclerosis. *J. Med. Genet.*, 2005, vol. 42, no. 6, pp. 485–490. doi: 10.1136/jmg.2004.025734
14. Hubers S.A., DeSimone D.C., Gersh B.J., Anavekar N.S. Infective endocarditis: a contemporary review. *Mayo Clin. Proc.*, 2020, vol. 95, no. 5, pp. 982–997. doi: 10.1016/j.mayocp.2019.12.008
15. Krippel P., Langsenlehner U., Renner W., Yazdani-Biuki B., Wolf G., Wascher T.C., Paulweber B., Haas J., Samonigg H. A common 936 C/T gene polymorphism of vascular endothelial growth factor is associated with decreased breast cancer risk. *Int. J. Cancer*, 2003, vol. 106, no. 4, pp. 468–471. doi: 10.1002/ijc.11238
16. Lambrechts D., Devriendt K., Driscoll D.A., Goldmuntz E., Gewillig M., Vlietinck R., Collen D., Carmeliet P. Low expression VEGF haplotype increases the risk for tetralogy of Fallot: a family based association study. *J. Med. Genet.*, 2005, vol. 42, pp. 519–522. doi: 10.1136/jmg.2004.026443
17. Nakamura M., Abe Y., Tokunaga T. Pathological significance of vascular endothelial growth factor A isoform expression in human cancer. *Pathol. Int.*, 2002, vol. 52, no. 5–6, pp. 331–339. doi: 10.1046/j.1440-827.2002.01367.x
18. Rajani R., Klein J.L. Infective endocarditis: a contemporary update. *Clin. Med. (Lond.)*, 2020, vol. 20, no. 1, pp. 31–35. doi: 10.7861/clinmed.cme.20.1.1
19. Rakocevic J., Orlic D., Mitrovic-Ajtic O., Tomasevic M., Dobric M., Zlatcic N., Milasinovic D., Stankovic G., Ostojic M., Labudovic-Borovic M. Endothelial cell markers from clinician's perspective. *Exp. Mol. Pathol.*, 2017, vol. 102, no. 2, pp. 303–313. doi: 10.1016/j.yexmp.2017.02.005
20. Renner W., Kotschan S., Hoffmann C., Obermayr-Pietsch B., Pilger E. A common 936 C/T mutation in the gene for vascular endothelial growth factor is associated with vascular endothelial growth factor plasma levels. *J. Vasc. Res.*, 2000, vol. 37, no. 6, pp. 443–448. doi: 10.1159/000054076
21. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor and its receptor system: physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases. *J. Biochem.*, 2013, vol. 153, no. 1, pp. 13–19. doi: 10.1093/jb/mvs136
22. Vannay A., Vasarhelyi B., Kornyei M., Treszl A., Kozma G., Györfly B., Tulassay T., Sulyok E. Single-nucleotide polymorphisms of VEGF gene are associated with risk of congenital valvuloseptal heart defects. *Am. Heart J.*, 2006, vol. 151, no. 4, pp. 878–881. doi: 10.1016/j.ahj.2005.10.012
23. Weinstock M., Grimm I., Dreier J., Knabbe C., Vollmer T. Genetic variants in genes of the inflammatory response in association with infective endocarditis. *PLoS One*, 2014, vol. 9, no. 10: e110151. doi: 10.1371/journal.pone.0110151
24. Xie J., Yi L., Xu Z.F., Mo X.M., Hu Y.L., Wang D.-J., Ren H.-Z., Han B., Wang Y., Yang C., Zhao Y.-L., Shi D.-Q., Jiang Y.-Z., Shen L., Qiao D., Chen S.-L., Yu B.-J. VEGF C-634G polymorphism is associated with protection from isolated ventricular septal defect: case-control and TDT studies. *Eur. J. Hum. Genet.*, 2007, vol. 15, no. 12, pp. 1246–1251. doi: 10.1038/sj.ejhg.5201890
25. Yuzhalin A., Kutikhin A. Integrative systems of genomic risk markers for cancer and other diseases: future of predictive medicine. *Cancer Manag. Res.*, 2012, vol. 4, pp. 131–135. doi: 10.2147/CMAR.S30855

Авторы:

Самойленко Е.С., аспирант кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет МР РФ, г. Краснодар, Россия; врач клинической лабораторной диагностики ГБУЗ Научно-исследовательский институт — Краевая клиническая больница № 1 им. проф. С.В. Очаповского МЗ Краснодарского края, г. Краснодар, Россия;

Колесникова Н.В., д.б.н., профессор, профессор кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет МР РФ, г. Краснодар, Россия;

Баклай В.И., врач-бактериолог ГБУЗ Специализированная клиническая инфекционная больница Министерства здравоохранения Краснодарского края, г. Краснодар, Россия;

Майданникова Е.Ю., биолог клинико-диагностической лаборатории ГБУЗ Научно-исследовательский институт — Краевая клиническая больница № 1 им. проф. С.В. Очаповского МЗ Краснодарского края, г. Краснодар, Россия;

Омельченко Е.В., лаборант клинико-диагностической лаборатории ГБУЗ Научно-исследовательский институт — Краевая клиническая больница № 1 им. проф. С.В. Очаповского МЗ Краснодарского края, г. Краснодар, Россия.

Authors:

Samoylenko E.S., PhD student, Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics of FPS and PPS, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation; Pathologist, Scientific Research Institute — Ochapovsky Regional Clinical Hospital No. 1, Krasnodar, Russian Federation;

Kolesnikova N.V., PhD, MD (Biology), Professor, Professor of the Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics of FPS and PPS, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation;

Baklay V.I., Bacteriologist, Specialized Clinical Infectious Diseases Hospital, Krasnodar, Russian Federation;

Maydannikova E.Yu., Biologist, Clinical Diagnostic Laboratory Pathologist, Scientific Research Institute — Ochapovsky Regional Clinical Hospital No. 1, Krasnodar, Russian Federation;

Omelchenko E.V., Laboratory Assistant, Clinical Diagnostic Laboratory, Scientific Research Institute — Ochapovsky Regional Clinical Hospital No. 1, Krasnodar, Russian Federation.

ROLE OF *TOXOPLASMA GONDII* IN THYROIDITIS IN PREGNANT WOMEN

G. Valizadeh, M.-E. Khamseh, M. Kashaniyan, R. Rafiei-Sefiddashti, R. Hadighi

Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract. Toxoplasmosis (acute and latent) is the most prevalent parasitic infection worldwide and can be associated with some problems in pregnant women. Thyroid diseases are the most common endocrine disorders secondary to diabetes among pregnant women. Previous studies proposed a relationship between latent toxoplasmosis (LT) and autoimmune thyroiditis diseases (AITDs). This study intended to investigate the frequency and correlation between toxoplasmosis and AITD in pregnant women. In this cross-sectional study, the statistical population included 1248 pregnant women at the gestational age of 9–16 weeks and in Tehran. The Toxoplasma IgM and IgG tests were assessed with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The diagnostic criteria for toxoplasmosis were abnormal IgG and IgM titers. In addition, FT₄, TPO Ab, and TSH were evaluated using enzyme-linked fluorescence immunoassay (ELFA). TPO Ab was used to distinguish thyroid patients with autoimmune origin from those with other thyroiditis diseases. The analysis showed no significant relationship between keeping a house cat and acute toxoplasmosis. Acute and latent toxoplasmosis represented 3.4% and 29.6%, respectively. The frequency of thyroid diseases was 18.8% (hypothyroidism 15.8% versus hyperthyroidism 3%). The frequency of autoimmune thyroiditis diseases (AITDs) was 5.5%, and 27.9% of subjects with latent toxoplasmosis (LT) had a thyroiditis disease, but 13.8% of pregnant women with LT had only AITD with a significant correlation ($p < 0.001$). Results show that Toxoplasma IgG+ can increase the risk of AITD by 10.39-fold and a higher TPO Ab titer in people with LT. It seems *Toxoplasma gondii* may cause thyroiditis in pregnant women likely because antigenic similarity of Toxoplasma and thyroperoxidase leads to cross-reactivity in the immune system, potentially causing AITD. It might be said that the high prevalence of LT among pregnant women may have a potential role in the stimulation of the immune system to the development of autoimmune diseases, such as AITD. So future studies could be conducted with a focus on discovering molecular similarities between thyroperoxidase and Toxoplasma antigens.

Key words: latent toxoplasmosis, acute toxoplasmosis, autoimmune thyroiditis disease, hypothyroidism, hyperthyroidism.

РОЛЬ *TOXOPLASMA GONDII* ПРИ ТИРЕОИДИТЕ БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН

Вализаде Г., Хамсе М.-Э., Кашаниян М., Рафии-Сефиддашти Р., Хадиги Р.

Иранский университет медицинских наук, Тегеран, Иран

Резюме. Токсоплазмоз (острый и латентный) является наиболее распространенной паразитарной инфекцией во всем мире и может быть связан с некоторыми проблемами у беременных. Заболевания щитовидной железы являются наиболее частыми эндокринными нарушениями, вторичными по отношению к сахарному диабету, среди беременных женщин. Предыдущие исследования предполагали связь между латентным токсоплазмозом (ЛТ) и аутоиммунным тиреоидитом (АИТ). Целью данного исследования было изучить частоту и взаимосвязь

Адрес для переписки:

Рамтин Хадиги
Иран, Тегеран, шоссе Шахид Хеммат, 1449614535,
Медицинский факультет Иранского университета
медицинских наук.
Тел.: 0098-9120209538 (моб.).
E-mail: hadighi.r@iums.ac.ir

Contacts:

Ramtin Hadighi
Iran, Tehran, Shahid Hemmat Highway, 1449614535,
School of Medicine, Iran University of Medical Sciences.
Phone: 0098-9120209538 (mobile).
E-mail: hadighi.r@iums.ac.ir

Для цитирования:

Вализаде Г., Хамсе М.-Э., Кашаниян М., Рафии-Сефиддашти Р.,
Хадиги Р. Роль *Toxoplasma gondii* при тиреоидите беременных
женщин // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 5. С. 947–952.
doi: 10.15789/2220-7619-ROT-1772

Citation:

Valizadeh G., Khamseh M.-E., Kashaniyan M., Rafiei-Sefiddashti R.,
Hadighi R. Role of *Toxoplasma gondii* in thyroiditis in pregnant women //
Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022,
vol. 12, no. 5, pp. 947–952. doi: 10.15789/2220-7619-ROT-1772

This work was supported by grant (No. 95-01-30-26788) from Iran University of Medical Sciences.

токсоплазмоза с АИТ у беременных. В настоящем перекрестном исследовании статистическая популяция включала 1248 беременных женщин в гестационном возрасте 9–16 недель в Тегеране. Тесты на выявление IgM и IgG тел против *Toxoplasma* оценивали с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Критериями диагностики токсоплазмоза были аномальные титры IgG и IgM. Кроме того, FT₄, антитела к ТПО и ТТГ оценивали с помощью иммуноферментного флуоресцентного анализа (ELFA). Антитела к ТПО использовали для того, чтобы отличить пациентов с аутоиммунным заболеванием щитовидной железы от пациентов с другими формами тиреоидита. Анализ не обнаружил достоверной связи между содержанием домашней кошки и острым токсоплазмозом. У 3,4 и 29,6% женщин был острый и латентный токсоплазмоз, частота заболеваний щитовидной железы составила 18,8% (гипотиреоз — 15,8%, гипертиреоз — 3%). Частота заболеваний аутоиммунным тиреоидитом (АИТ) составила 5,5%, причем у 27,9% пациенток с латентным токсоплазмозом (ЛТ) обнаружен тиреоидит, а у 13,8% беременных с ЛТ имелось только АИТ с достоверной корреляцией ($p < 0,001$). Результаты показывают, что наличие *Toxoplasma* IgG+ может увеличить риск АИТ в 10,39 раза и обуславливать более высокий титр антител к ТРО у людей с ТП. По-видимому, *Toxoplasma gondii* может вызывать тиреоидит у беременных женщин, поскольку, вероятно, антигенное сходство токсоплазмы и тиреопероксидазы приводит к перекрестной реактивности иммунной системы и может вызывать АИТ. Можно сказать, что высокая распространенность ТП среди беременных может играть потенциальную роль в стимуляции иммунной системы к развитию аутоиммунных заболеваний, таких как АИТ. Таким образом, будущие исследования могут быть проведены с акцентом на обнаружение молекулярного сходства между тиреопероксидазой и антигенами токсоплазмы.

Ключевые слова: латентный токсоплазмоз, острый токсоплазмоз, аутоиммунный тиреоидит, гипотиреоз, гипертиреоз.

Introduction

Toxoplasma gondii has a high prevalence, unlike other parasites, because of diverse transmission routes and the multiplicity of hosts in its lifecycle. Infection with this parasite is rarely associated with symptoms in healthy adults [6]. However, people with a weakened immune system may become seriously ill, and pregnant women are at high risk of passing this parasite to their fetus through the placenta. Fetal complications depend on whether the parasite spreads at the early or late gestational age. The immune system causes *Toxoplasma* tachyzoites to convert into bradyzoites with the formation of tissue cysts, and the disease enters the latent phase or latent Toxoplasmosis (LT).

Changing the antigenic configuration is one of the escape mechanisms. The Ag-Ab complex will be separated from the tachyzoite surface and neutralized without damaging the parasite [9]. Thus, *Toxoplasma* can be maintained in the body for years. It might reactivate or reinfect in some patients [4], or be a probable cause of autoimmune diseases (AIDs), such as lupus and multiple sclerosis (MS), in genetically susceptible people. Previous studies showed the possible role of *Toxoplasma* in the development of AITD [20, 24]. The high prevalence of AITD has different aetiology [13, 14], and today many researchers have focused on the importance of AITD among the pregnant population.

Thyroid diseases are the most common endocrine disorders, secondary to diabetes, among pregnant women; they are associated with spontaneous abortion, impaired fetal growth, preeclampsia, and preterm delivery [18]. The importance of thyroid hormones for natural fetal growth is well established [5].

Maternal thyroid dysfunction during the pregnancy, specifically in the first trimester, has a critical role in the neural development of the fetus since the fetal thyroid hormones are not produced until the 16–20 weeks [15].

Clinical diagnoses of normal euthyroid pregnant women and those with thyroid dysfunction have a significant overlap. Autoimmune thyroid disease during pregnancy is divided into four groups: asymptomatic autoimmune disease; primary hypothyroidism; Graves' hyperthyroid; and postpartum thyroid disease [8]. Increased concentration of total serum T3 and T4 in natural pregnancy results from an increase in thyroxine-binding globulin (TBG); FT₄ and TSH are the best predictors of thyroid function [9].

In this research, the frequency of acute and latent Toxoplasmosis and thyroid diseases among pregnant women at the gestational age of 9–16 weeks was studied to find any relationship between toxoplasmosis and thyroiditis and to examine the potential role of latent toxoplasmosis in late spontaneous abortions.

Materials and methods

The Research Ethical Review Committee approved this study, Code No: 95-01-30-26788. Based on the frequency of AITDs, the research population size was considered 1248 pregnant women at the gestational age of 9–16 weeks. They were asked to complete the questionnaires that assess thyroid diseases, taking thyroid medication, having a house cat, and intentional or unintentional abortions. Exclusion criteria for statistical analysis were: 1) a history of intentional abortion; 2) a history of taking thyroid medications; and 3) acute toxoplasmosis subjects. Serum samples were collected by standard procedures and

kept frozen at -20°C . The hemolytic and lipemic samples were replaced with re-sampling of women.

Serologic tests were carried out for Toxoplasmosis diagnosis in the Research Center of Iran University of Medical Sciences. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with Virocell Kit (Spain) were used for the diagnosis of Toxoplasma IgG and Toxoplasma IgM (antibody capture). The diagnostic criteria for toxoplasmosis were abnormal IgG and IgM titers (Table 1). The enzyme-linked fluorescent assay (ELFA) with Biomerieux diagnostic kit (France) and VIDAS instrument was employed to analyze TSH (thyroid-stimulating hormone), TPO Ab (thyroperoxidase Ab), and FT_4 (free T_4) for the diagnosis of autoimmune and subclinical thyroiditis. TPO Ab was used to distinguish thyroid patients with autoimmune origin from those with other thyroiditis diseases. Patients whose TPO Ab level was higher than 8 IU/ml, and who had abnormal TSH results at the same time, were placed in the AITD+ group. Data were analyzed with SPSS 21 software and Mann–Whitney and Chi-square tests to determine the probable effect and relationship of Toxoplasmosis on TPO Ab, FT_4 , TSH, and AITDs.

Results

In this study, 1248 pregnant women, with a mean age of 29 years (18–44), participated. Of them, 42 (3.37%) and 370 (29.64%) subjects had IgM and IgG seropositive toxoplasmosis, respectively. Two hundred thirty-five women (18.8%) had thyroid disorders, of which 197 (15.8%) and 38 (3%) cases featured hypothyroidism and hyperthyroidism (Table 2); 39 subjects had a history of taking thyroid medications. The Chi-square test showed a significant correlation between Toxoplasma IgG and TSH (OR = 2.84, $p < 0.001$). The chi-square test and Mantel–Hansel test on Toxoplasma IgG and AITD indicated a meaningful relationship between these two variables (CI = 95%, OR = 9.281, $p < 0.001$). These figures convey that the risk of AITD is 9.3-fold higher among people with Toxoplasma IgG+ than Toxoplasma IgG-. According to the results, 113 subjects (9.7%) had TPO Ab > 8.0 IU/ml; the median titer of TPO Ab (190 IU/ml) was higher in Toxoplasma IgG+ and AITD+ women. The Mann–Whitney test showed a significant relationship between TPO Ab and Toxoplasma IgG+, and TPO Ab was significantly higher in the Toxoplasma IgG+ group.

In addition, no significant correlation was found between: age and AITD ($p = 0.35$); or age and Toxoplasmosis ($p = 0.42$). There were 52 subjects with abnormal TPO Ab titer placed into the AITD- group, indicating that abnormal TPO Ab titer does not necessarily lead to AITD+, and 61 persons in the AITD+ group were LT+. There was a significant correlation between Toxoplasma IgG+ and AITD+ when TPO Ab was also positive ($p = 0.046$). In this regard,

Toxoplasma IgG+ can increase the risk of AITD by 10.39-fold. On the other hand, there was a significant correlation between these two variables concerning the relative risk of pregnancy complications.

According to the results, TPO Ab was higher than expected in 144 (11.5%) out of 1248 subjects. Further, 113 (9.7%) out of 1,167 issues (with AT and no history of thyroid medications) had abnormal TPO Ab. In other words, 54.1% of thyroid patients (235 patients) had a high TPO Ab level. The Chi-square test showed a significant correlation between Toxoplasma IgG and TPO Ab ($p < 0.05$, Fig.). Among subjects with LT, 27.9% had thyroid disease. Chi-square and Mantel–Haenszel tests showed a significant correlation between toxoplasmosis and thyroiditis ($p < 0.001$).

The analysis showed no significant relationship between keeping a house cat and acute toxoplasmosis ($p = 0.21$). However, the frequency of LT among those with a history of maintaining a house cat was significant ($p < 0.001$). The Chi-square test showed no significant correlation between LT and unintentional abortion ($p = 0.39$).

Table 1. Normal range tests

Test	Normal range	Method
Toxoplasma IgG	0–9 (IU/ml) = Negative 9–11 (IU/ml) = Suspicious > 11 (IU/ml) = Positive	ELISA
Toxoplasma IgM	0–9 (IU/ml) = Negative 9–11 (IU/ml) = Suspicious > 11 (IU/ml) = Positive	ELISA
TSH	Normal KIT: 0.27–4.7 ($\mu\text{IU/ml}$) (Trimester 1) 0.1–2.5 ($\mu\text{IU/ml}$) (Trimester 2) 0.2–3.0 ($\mu\text{IU/ml}$)	ELFA
TPO Ab	< 8.0 (IU/ml)	ELFA
FT_4	10.3–23 (pmol/L)	ELFA

Table 2. Prevalence of thyroid diseases

Hypothyroidism	15.8%	Clinical hypothyroidism	1.84%
		Subclinical hypothyroidism	13.96%
Hyperthyroidism	3%	Clinical hyperthyroidism	2.2%
		Subclinical hyperthyroidism	0.8%

Table 3. Frequency and percentage of different variables among the research population, obtained from the questionnaire

Keeping a house cat	25 (2.1%)
History of miscarriage	371 (30.9%)
History of induced abortion	97 (8.1%)
History of thyroid disease	76 (6.3%)
Use of medications for thyroid disease	39 (32%)

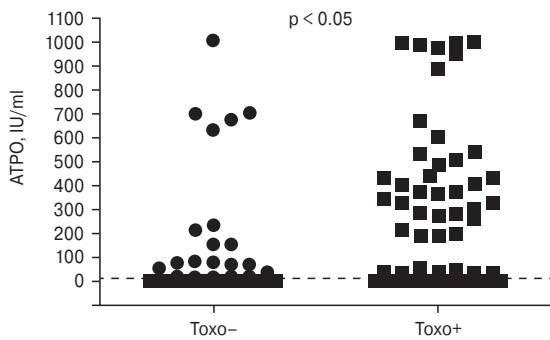


Figure. Association of latent toxoplasmosis and serum TPO Ab levels in pregnant women (9–16th gestation weeks)

Discussion

The prevalence values of clinical hypothyroidism, subclinical hypothyroidism, overt hyperthyroidism, and subclinical hyperthyroidism in the Saki et al. article were 2.4%, 11.3%, 1.2%, and 0.3% [19], but in our study, they were 1.84%, 13.96%, 2.2%, and 0.8%, respectively. A relative increase in percentages in subclinical hypothyroidism, clinical hyperthyroidism, and subclinical hyperthyroidism could be seen, and these results could be an alarm for thyroid function diseases, especially hyperthyroidism. AITDs gradually weaken the function of the thyroid gland. However, with the compensatory rise of TSH levels, thyroid hormones maintain at an average level, so subclinical hypothyroidism patients display few signs and symptoms, which are harder to recognize.

FT₄ level will drop, and TSH level will increase in subclinical hypothyroidism; this may increase the risk of pregnancy complications, such as placental abruption, preterm delivery, and low birth weight [1, 3]. TSH levels higher than 10 μ IU/ml in this stage would be called clinical hypothyroidism or overt hypothyroidism. Hyperthyroidism is relatively not prevalent (0.1–1%) during pregnancy [2, 23, 25]. In the current study, the prevalence of clinical hyperthyroidism was 0.8%. There is no general guidance for treating thyroid disorders during pregnancy. Therefore, performing thyroid tests and checkups by a gynecologist, specifically in the first trimester, must be specially considered. In this study, 3.2% of subjects had a history of taking thyroid medications. Among 79 subjects with a history of thyroid disease, 37 cases had stopped, and 39 women continued the medicines. Of those with hypothyroidism or hyperthyroidism (aware of their problem), 45% had destroyed their medications. It would be better for women with a history of thyroid problems, specifically those on the verge of pregnancy, not to stop the medication arbitrarily.

According to Soldin et al., 12% of asymptomatic healthy women and 1% of asymptomatic healthy men are TPO Ab+. The frequency of clinical hypothy-

roidism (9.21%) and subclinical hypothyroidism (3.7%) is higher in TPO Ab+ than TPO Ab- patients. The annual risk of clinical TPO Ab, accompanied by hypothyroidism, is almost 5–20% [21]. Due to the binding effect of thyroid disorders on both fetus and mother, thyroid and TPO Ab screening should be included in trimester examinations for maternal health. The prevalence of postpartum thyroiditis directly correlates with TPO Ab titer, and is associated with an increased rate of clinical hypothyroidism within three to six months after delivery. Postpartum thyroid will appear in half of the women who become TPO Ab+ in early pregnancy. Regarding the incidence of postpartum thyroid dysfunction, which is associated with several signs and postpartum depression symptoms, screening for postpartum diseases through the measurement of TPO Ab seems necessary [12].

In Kankova's retrospective article, the frequency of LT was not significant among AITD patients. It was mentioned a relationship between Toxoplasmosis and FT₄, with a higher FT₄ titer ($p = 0.033$) [7]. However, based on our results, it seems that LT may have a role in the incidence of AITD because our data was gathered within a specific time by considering similar and standard conditions for all samples. Eligible subjects were first selected and entered into the study after completing the questionnaire. Another point was patients aware of their thyroid disease, taking medications, and thus with normal FT₄, as 26.5% of thyroid patients in our study got thyroid medicines. Despite having abnormal TSH results, their FT₄ was average and excluded in this survey, which had not been done in Konkova's research.

In the same manner, the sera from 1591 women were tested for cytomegalovirus, Epstein–Barr virus, herpes simplex virus type 1, herpes simplex virus type 2, and *Toxoplasma gondii*. It was mentioned that prior infection with *T. gondii* was associated significantly with the elevation of TPOa Ab, whereas seropositivity for other infections was not [24]. However, the relationship between LT and AITDs was not done. In another study, a multiplex array platform was performed for the detection of antibodies against *Toxoplasma gondii*, *Treponema pallidum*, rubella virus, cytomegalovirus, and Epstein–Barr virus in a large group of AITD patients and healthy controls. Antibody levels against *T. gondii* were significantly higher in AITD patients than in controls, suggesting that molecular mimicry of this protozoa may be involved in the initiation of AITD [22]. Our results support the hypothesis that antigenic similarity of *Toxoplasma* and thyroperoxidase likely leads to cross-reactivity in the immune system and may cause AITD.

The initial screening test of Iranian pregnant women is the TORCH test, which includes a toxoplasmosis diagnosis test. However, there is also a gap for thyroid screen tests in this program. Regarding

the significant frequency of AITD in people with LT, gynaecologists propose prescribing thyroid tests in pregnant women. Although spontaneous abortion caused by congenital toxoplasmosis is well identified, the potential role of LT in abortion is still uncertain. However, some studies have reported a significant relationship between the frequency of IgG Toxoplasma antibody and abortion [10, 17], whereas some studies reported no correlation [16]. The high frequency of intentional abortion has faded the role of diseases in this process, and the only solution was to record the history of deliberate and unintentional abortions separately. Involuntary and spontaneous abortions are not associated with severe physical complications, whereas intentional abortion is related to maternal risks. It increases the risk of placenta previa (attachment of the placenta to the lower part of the womb). Therefore, those with a history of intentional abortion were excluded from the study, and no significant relationship between latent toxoplasmosis and unintentional abortion was seen. The causes of miscarriage and other preg-

nancy complications might be biological conditions or unmeasured common risk factors [11]. Therefore, in the retrospective design of this study, it seems to be one of the study limitations.

Conclusion

This study, along with previous studies, has shown higher TPO Ab titers in people with LT. It seems *Toxoplasma gondii* may cause thyroiditis in pregnant women likely because antigenic similarity of *Toxoplasma* and thyroperoxidase leads to cross-reactivity in the immune system perhaps leading to AITD. Thus, future studies could be conducted with a focus on discovering molecular similarities between thyroperoxidase and *Toxoplasma* antigens.

Acknowledgements

The authors of this article express gratitude for the practical cooperation of the Endocrine Institute of Firoozgar Hospital.

References

1. Baker V.L., Rone H.M., Pasta D.J., Nelson H.P., Gvakharia M., Adamson G.D. Correlation of thyroid stimulating hormone (TSH) level with pregnancy outcome in women undergoing in vitro fertilization. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2006, vol. 194, no. 6, pp. 1668–1674; discussion 1674–1675. doi: 10.1016/j.ajog.2006.03.040
2. Becks G.P., Burrow G.N. Thyroid disease and pregnancy. *Med. Clin. North Am.*, 1991, vol. 75, no. 1, pp. 121–150. doi: 10.1016/s0025-7125(16)30475-8
3. Casey B.M., Dashe J.S., Wells C.E., McIntire D.D., Byrd W., Leveno K.J., Cunningham F.G. Subclinical hypothyroidism and pregnancy outcomes. *Obstet. Gynecol.*, 2005, vol. 105, no. 2, pp. 239–245. doi: 10.1097/01.AOG.0000152345.99421.22
4. Chukhlovina A.B., Zubarovskaya L.S., Bondarenko S.N., Eismont Yu.A., Semenov A.V., Vladovskaya M.D., Totolian Areg A., Afanasyev B.V. Activation of T. gondii infection after allogeneic transplantation of hematopoietic stem cells: dependence on time and serological status of the patients. *Russian Journal of Infection and Immunity*, 2014, vol. 4, no. 4, pp. 381–386. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2014-4-381-386
5. Gharib H., Cobin R.H., Dickey R.A. Subclinical hypothyroidism during pregnancy: position statement from the American Association of Clinical Endocrinologists. *Endocr. Pract.*, 1999, vol. 5, pp. 367–368.
6. Hunter C.A., Sibley L.D. Modulation of innate immunity by Toxoplasma gondii virulence effectors. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2012, vol. 10, no. 11, pp. 766–778. doi: 10.1038/nrmicro2858
7. Kaňková Š., Procházková L., Flegr J., Calda P., Springer D., Potluková E. Effects of latent toxoplasmosis on autoimmune thyroid diseases in pregnancy. *PLoS One*, 2014, vol. 9, no. 10: e110878. doi: 10.1371/journal.pone.0110878
8. Lazarus J. Thyroid Regulation and Dysfunction in the Pregnant Patient. [Updated 2016 Jul 21]. In: Endotext [Internet]. Eds: Feingold K.R., Anawalt B., Boyce A., et al. *South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000. URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279059*
9. LeBeau S.O., Mandel S.J. Thyroid disorders during pregnancy. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, 2006, vol. 35, no. 1, pp. 117–136. doi: 10.1016/j.ecl.2005.09.009
10. Machumi I., Mirambo M.M., Ruganuzi D., Rambau P., Massinde A.N., Kihunrwa A., Mshana S.E., Morona D. Factors associated with Toxoplasma gondii IgG and IgM antibodies, and placental histopathological changes among women with spontaneous abortion in Mwanza City, Tanzania. *East Afr. Health Res. J.*, 2017, vol. 1, no. 2, pp. 86–94. doi: 10.24248/EAHRJ-D-16-00408
11. Magnus M.C., Wilcox A.J., Morken N.H., Weinberg C.R., Håberg S.E. Role of maternal age and pregnancy history in risk of miscarriage: prospective register based study. *BMJ*, 2019, vol. 364: 1869. doi: 10.1136/bmj.1869
12. Mamede da Costa S., Sieiro Netto L., Coeli C.M., Buescu A., Vaisman M. Value of combined clinical information and thyroid peroxidase antibodies in pregnancy for the prediction of postpartum thyroid dysfunction. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2007, vol. 58, no. 4, pp. 344–349. doi: 10.1111/j.1600-0897.2007.00508.x
13. Morohoshi K., Takahashi Y., Mori K. Viral infection and innate pattern recognition receptors in induction of Hashimoto's thyroiditis. *Discov. Med.*, 2011, vol. 12, no. 67, pp. 505–511.
14. Negro R., Formoso G., Mangieri T., Pezzarossa A., Dazzi D., Hassan H. Levothyroxine treatment in euthyroid pregnant women with autoimmune thyroid disease: effects on obstetrical complications. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2006, vol. 91, no. 7, pp. 2587–2591. doi: 10.1210/jc.2005-1603
15. Pop V.J., Kuijpers J.L., van Baar A.L., Verkerk G., van Son M.M., de Vijlder J.J., Vulsma T., Wiersinga W.M., Drexhage H.A., Vader H.L. Low maternal free thyroxine concentrations during early pregnancy are associated with impaired psychomotor development in infancy. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*, 1999, vol. 50, no. 2, pp. 149–155. doi: 10.1046/j.1365-2265.1999.00639.x

16. Qublan H.S., Jumaian N., Abu-Salem A., Hamadelil F.Y., Mashagbeh M., Abdel-Ghani F. Toxoplasmosis and habitual abortion. *J. Obstet. Gynaecol.*, 2002, vol. 22, no. 3, pp. 296–298. doi: 10.1080/01443610220130616
17. Rehman F., Ahmad R., Jan S.S. Prevalence of abortion among toxoplasma gondii seropositive pregnant women in Community Hospital of Mardan. *Journal of Saidu Medical College*, 2018, vol. 8, no. 1, pp. 6–9.
18. Reid S.M., Middleton P., Cossich M.C., Crowther C.A., Bain E. Interventions for clinical and subclinical hypothyroidism pre-pregnancy and during pregnancy. *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2013, vol. 5: CD007752. doi: 10.1002/14651858.CD007752.pub3
19. Saki F., Dabbaghmanesh M.H., Ghaemi S.Z., Forouhari S., Ranjbar Omrani G., Bakhshayeshkaram M. Thyroid function in pregnancy and its influences on maternal and fetal outcomes. *Int. J. Endocrinol. Metab.*, 2014, vol. 12, no. 4: e19378. doi: 10.5812/ijem.19378
20. Shapira Y., Agmon-Levin N., Selmi C., Petriková J., Barzilai O., Ram M., Bizzaro N., Valentini G., Matucci-Cerinic M., Anaya J.M., Katz B.S., Shoenfeld Y. Prevalence of anti-Toxoplasma antibodies in patients with autoimmune diseases. *J. Autoimmun.*, 2012, vol. 39, no. 1–2, pp. 112–116. doi: 10.1016/j.jaut.2012.01.001
21. Soldin O.P., Soldin D., Sastoque M. Gestation-specific thyroxine and thyroid stimulating hormone levels in the United States and worldwide. *Ther. Drug Monit.*, 2007, vol. 29, no. 5, pp. 553–559. doi: 10.1097/FTD.0b013e31815709ac
22. Tozzoli R., Barzilai O., Ram M., Villalta D., Bizzaro N., Sherer Y., Shoenfeld Y. Infections and autoimmune thyroid diseases: parallel detection of antibodies against pathogens with proteomic technology. *Autoimmun. Rev.*, 2008, vol. 8, no. 2, pp. 112–115. doi: 10.1016/j.autrev.2008.07.013
23. Wang C., Crapo L.M. The epidemiology of thyroid disease and implications for screening. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, 1997, vol. 26, no. 1, pp. 189–218. doi: 10.1016/s0889-8529(05)70240-1
24. Wasserman E.E., Nelson K., Rose N.R., Rhode C., Pillion J.P., Seaberg E., Talor M.V., Burek L., Eaton W., Duggan A., Yolken R.H. Infection and thyroid autoimmunity: a seroepidemiologic study of TPOaAb. *Autoimmunity*, 2009, vol. 42, no. 5, pp. 439–446. doi: 10.1080/08916930902787716
25. Williams obstetricia. Study guide. 23rd ed. Eds. Cunningham F.G., Williams J.W. Mexico: McGraw-Hill Interamericana, 2011. 1385 p.

Авторы:

Вализаде Г., магистр медицинской паразитологии, кафедра паразитологии и микологии Иранского университета медицинских наук, Тегеран, Иран;

Хамсе М.-Э., профессор эндокринологии, кафедра внутренних болезней и эндокринологии Иранского университета медицинских наук, Тегеран, Иран;

Кашаниян М., профессор гинекологии Иранского университета медицинских наук, Тегеран, Иран;

Рафии-Сефиддашти Р., доцент кафедры паразитологии и микологии медицинского факультета Иранского университета медицинских наук, Тегеран, Иран;

Хадиги Р., доцент кафедры паразитологии и микологии медицинского факультета Иранского университета медицинских наук, Тегеран, Иран.

Authors:

Valizadeh G., Master of Science in Medical Parasitology, Department of Parasitology and Mycology, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran;

Khamseh M.-E., Endocrinology Professor, Department of Internal Medicine and Endocrinology, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran;

Kashaniyan M., Gynaecology Professor, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran;

Rafiei-Sefiddashti R., Assistant Professor, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran;

Hadighi R., Associate Professor, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Поступила в редакцию 24.07.2021
Отправлена на доработку 16.11.2021
Принята к печати 22.02.2022

Received 24.07.2021
Revision received 16.11.2021
Accepted 22.02.2022

ПОВЫШЕНИЕ БЕЗОПАСНОСТИ ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКИ НА ОСНОВЕ МАСЛЯНЫХ АДЬЮВАНТОВ

С.В. Скупневский, Е.Г. Пухаева, А.К. Бадтиева, Ф.К. Руруа, Ф.Э. Батагова,
Ж.Г. Фарниева

Институт биомедицинских исследований — филиал ФГБУН ФНЦ Владикавказский научный центр РАН,
г. Владикавказ, Россия

Резюме. Ограничением повышению эффективности вакцинотерапии служит высокая реактогенность адьювантов. Цель работы — снижение иммунотоксических эффектов, обусловленных введением полного адьюванта Фрейнда (ПАФ) теплокровным. *Материалы и методы.* Объект исследования — крысы Wistar. Негативный контроль (растворители); позитивный контроль (однократное подкожное введение ПАФ 0,1 мл/200 г массы тела [м.т.]); опыт «минимально» и опыт «максимально» (рег ос лимонная и янтарная кислоты (1:4) в соотношении 17 и 88 мг/кг м.т. — 4 недели после иммунизации ПАФ). Массу тела, гематологические и биохимические (гидроперекиси, малоновый диальдегид (МДА), активность каталазы, дегидрогеназная активность митохондрий) показатели изучали в динамике. По окончании эксперимента осуществлена некропсия и расчет массовых коэффициентов органов. Селезенку и соединительную ткань (коленный сустав) изучали гистологически. Рассчитывали медиану, C_{25} – C_{75} квантили, U-критерий Манна–Уитни. *Результаты и обсуждение.* Для животных негативного контроля исследуемые параметры колебались в пределах нормы. Иммунизация теплокровных ПАФ сопровождалась переходом острой воспалительной реакции (3-я неделя) в хроническую (7-я неделя). Общее количество лейкоцитов повышалось с $12,5 \times 10^9$ (негативный контроль) до $26,6 \times 10^9$ /л ($P = 0,01$) на 3-й неделе и затем снижалось до $19,2 \times 10^9$ /л ($P = 0,01$) к 7-й. Столь же значимо возрастали тромбоциты: с 506×10^9 (негативный контроль) до 656×10^9 /л ($P = 0,01$, 3-я неделя) с последующим снижением до 610×10^9 /л к 7-й ($P = 0,01$). Активация процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) проявилась увеличением МДА на 55,8–61,8% ($P = 0,01$); общетоксическое действие ПАФ сказалось 11,7% снижением массы тела ($P = 0,01$), отечностью селезенки и редуцированием тимуса. Введение антиоксидантов привело к дозозависимому снижению воспалительной реакции (лейкоциты в минимальной дозировке $19,6 \times 10^9$ – $20,9 \times 10^9$ /л; в максимальной — $16,6 \times 10^9$ – $16,0 \times 10^9$ /л), нормализации индекса «тромбоциты/лейкоциты» до 29,5–36,3 (позитивный контроль 24,6, негативный — 40,5). Защитное действие кислот проявилось сохранением массы тела, активацией каталазы и ингибированием ПОЛ. На тканевом уровне выявлено купирование дегенеративных изменений в селезенке и соединительной ткани: уменьшение очагов кровоизлияний, отечности и сохранение гистоархитектоники. *Заключение.* Использование лимонной и янтарной кислот способствует снижению токсичности масляного адьюванта Фрейнда за счет повышения антиоксидантного статуса, ингибирования процессов липопероксидации, усиления метаболической активности митохондрий, снижения общего системного воспаления, что позволяет рекомендовать кислоты в качестве протекторов иммунотоксических эффектов адьювантов.

Ключевые слова: вакцинотерапия, иммунотоксический эффект, лимонная кислота, масляные адьюванты, патология соединительной ткани, полный адьювант Фрейнда, янтарная кислота.

Адрес для переписки:

Пухаева Елена Георгиевна
362025, Россия, РСО-Алания, г. Владикавказ, ул. Пушкинская, 47,
Институт биомедицинских исследований — филиал ФГБУН ФНЦ
Владикавказский научный центр РАН.
Тел.: 8 (928) 491-16-91.
E-mail: medgenetika435@yandex.ru

Contacts:

Elena G. Pukhaeva
362025, Russian Federation, RNO-Alania, Vladikavkaz,
Pushkinskaya str., 47, Institute of Biomedical Research,
Affiliate of Vladikavkaz Scientific Center of RAS.
Phone: +7 (928) 491-16-91.
E-mail: medgenetika435@yandex.ru

Для цитирования:

Скупневский С.В., Пухаева Е.Г., Бадтиева А.К., Руруа Ф.К., Батагова Ф.Э.,
Фарниева Ж.Г. Повышение безопасности вакцинопрофилактики
на основе масляных адьювантов // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12,
№ 5. С. 953–962. doi: 10.15789/2220-7619-ISO-1897

Citation:

Skupnevskii S.V., Pukhaeva E.G., Badiyev A.K., Rurua F.K., Batagova F.E.,
Farnieva Zh.G. Improving safety of oil adjuvant-based vaccines // Russian
Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12,
no. 5, pp. 953–962. doi: 10.15789/2220-7619-ISO-1897

IMPROVING SAFETY OF OIL ADJUVANT-BASED VACCINES

Skupnevskii S.V., Pukhaeva E.G., Badtiev A.K., Rurua F.K., Batagova F.E., Farnieva Zh.G.

Institute of Biomedical Investigations — the Affiliate of Vladikavkaz Scientific Centre of RAS, Vladikavkaz, Russian Federation

Abstract. High adjuvant reactogenicity is the main limitation for increasing the effectiveness of vaccine therapy. The aim was to reduce the immunotoxicity effects of complete Freund's adjuvant (CFA) in warm-blooded animals. *Materials and methods.* The study examined Wistar rats by dividing animals into negative control (solvents); positive control (single subcutaneous CFA injection of 0.1 ml/200 g body weight (b.w.)); the "minimum" and "maximum" (*per os* administration of 1:4 citric and succinic acids in ratio of 17 and 88 mg/kg b.w. during 4 weeks after immunization of CFA) experiment. Body weight, hematological (complete blood count) and biochemical (hydroperoxides, malondialdehyde, catalase activity, mitochondrial dehydrogenase activity) parameters were dynamically investigated. At the end of the experiment, necropsy was performed and the relative internal organ mass coefficients were calculated. The spleen and connective tissue (knee joint) were examined histologically. The median, C_{25} – C_{75} quartiles, Mann–Whitney U-test were calculated. *Results and discussion.* It was found that parameters examined were within normal range in animals of negative control group. Immunization of warm-blooded animals with CFA was accompanied by transition of acute-to- chronic inflammatory reaction (week 3 and week 7, respectively). The total leukocyte count increased from 12.5×10^9 (negative control) up to $26.6 \times 10^9/L$ ($P = 0.01$) on week 3 followed by its decline down to $19.2 \times 10^9/L$ ($P = 0.01$) by week 7. Platelet count also increased significantly: from 506×10^9 (negative control) up to $656 \times 10^9/L$ ($P = 0.01$, week 3) followed by decrease down to $610 \times 10^9/L$ by week 7 ($P = 0.01$). Activation of lipid peroxidation was manifested by malondialdehyde (MDA) level elevated by 55.8–61.8% ($P = 0.01$); the general CFA-related toxic effect resulted in 11.7% weight loss ($P = 0.01$), spleen swelling and thymus reduction. Administration of antioxidant acids led to a dose-dependent decline in inflammation (leukocyte count at the minimum dosage — 19.6×10^9 – $20.9 \times 10^9/L$; at the maximum 16.6×10^9 – $16.0 \times 10^9/L$), as well as normalized the "platelet/leukocyte" index up to 29.5–36.3 (positive control 24.6, negative control 40.5). The acid-related protective effect was also manifested as maintained body weight, activated catalase and inhibited lipid peroxidation. The therapeutic effect in alleviated degenerative changes in the spleen and connective tissue were revealed: reduced hemorrhagic focuses and swelling as well as preserved histoarchitectonics. *Conclusion.* The use of citric and succinic acids contributes to profoundly lowered CFA toxicity due to increased total antioxidant status, inhibited lipid peroxidation, improved mitochondrial metabolic activity, which ultimately lead to a decline in general systemic inflammation and allows to recommend such acids as immunoprotectors from oil adjuvant-coupled effects.

Key words: complete Freund's adjuvant, connective tissue pathology, vaccine therapy, immunotoxic effect, lemon acid, oil adjuvants, succinic acid.

Введение

В фундаментальной монографии по вакцинологии [20] S. Plotkin отмечает, что влияние вакцинации на здоровье людей в мировом масштабе огромно: за исключением улучшения качества питьевой воды, ничто другое не способствовало столь значительному снижению смертности и росту населения планеты, — включая антибиотики. По экспертным оценкам, благодаря вакцинации во всем мире ежегодно удается предотвратить порядка 6 млн смертей, сохранить 386 млн лет жизни и 96 млн лет, скорректированных по индексу нетрудоспособности DALY [17]. Повышение эффективности и безопасности современных вакцин напрямую связано с успехами в области разработки адъювантных технологий, которые берут свое начало с 1916 г., когда авторами работы [11] впервые было установлено, что эмульсия минеральных масел может значительным образом усиливать иммунный ответ организма на вводимый антиген. Дальнейшие эксперименты по иммунизации животных позволили выявить адъювантные свойства у целого ряда химических соединений и сформулировать об-

щие теоретические принципы их функционирования. В настоящее время эти знания легли в основу классификации адъювантов по механизму действия: активные иммуностимуляторы (оказывают непосредственное воздействие на антигенпрезентирующие клетки), системы доставки (осуществляют депонирование, адресную доставку и модификацию антигена), комбинированные адъюванты (так называемые адъюванты нового поколения, призванные сочетать в себе преимущества первых двух групп) [3]. Тем не менее характер иммунного ответа, видовые и индивидуальные особенности организма, способы и схемы эффективной иммунизации до сих пор во многом определяются эмпирически [1], а в каждую из трех указанных групп могут входить адъюванты, различающиеся по своим физико-химическим свойствам: минеральные, масляные, корпускулярные и комбинированные.

После солей алюминия, долгое время являвшихся единственным общеупотребимым адъювантом, в последние десятилетия значительное распространение при производстве вакцин получили масляные эмульсии, которые применяются для профилактики сезонного и пандемии-

ческого гриппа, гепатита В, папилломавирусных инфекций, немелкоклеточного рака легких и других широко распространенных заболеваний человека [12, 14]. Применение эмульсий типа «масло в воде» и «вода в масле» оправдано также в педиатрической практике [12], пациенты которой составляют одну из наиболее уязвимых групп населения. Преимуществом масляных адъювантов (МА) является медленное (в случае липосом — контролируемое) высвобождение антигенов из депо, а также активация гуморального и клеточного звеньев иммунной системы, что обуславливает их эффективность. Основу молекулярно-клеточного механизма действия МА составляет выделение в местах ввода вакцины молекулярных паттернов, ассоциированных с повреждением собственных клеток организма. Высвобождение аутологических ДНК, РНК, полипептидов и других макромолекулярных фрагментов в результате дестабилизации клеточных мембран, обусловленной в том числе и липофильными свойствами масляных адъювантов [15, 19], обеспечивает потенцирующий эффект презентруемых антигенов и определяет высокую биологическую активность вакцин на их основе. Несмотря на достигнутые успехи в области создания вакцин на основе МА, для них продолжают оставаться актуальными вопросы купирования системной и локальной реактогенности.

Целью работы являлось снижение иммунотоксических эффектов, обусловленных введением полного адъюванта Фрейнда теплокровным животным.

Материалы и методы

Исследования были проведены на крысах-самцах линии Wistar ($n = 32$) с массой тела 420 ± 20 г в возрасте 24 месяца, полученных из ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово», Ленинградская область. Условия содержания животных отвечали стандартам, предъявляемым для вивариев¹. Световой режим в помещениях для содержания животных был 12:12; доступ к воде — свободный. На период введения тестируемых веществ (смеси лимонной и янтарной кислот) с кормом осуществлялась пищевая депривация животных — кормление проводилось после полного потребления затравки, равномерно распределенной в кормовой смеси.

При работе с грызунами придерживались правил и этических норм, описанных в «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для эксперимен-

тов или в иных научных целях» (Страсбург, 18 марта 1986 г.) и с разрешения этического комитета при Институте биомедицинских исследований РАН. В конце эксперимента эвтаназию крыс осуществляли в CO_2 -затравочном боксе.

Дизайн эксперимента. Животные были разделены на четыре равные группы. Манипуляции по введению растворов и отбору крови проводились под легким общим наркозом (Золетил, Франция). Крысам первой группы (негативный контроль) подкожно вводили изотонический раствор натрия хлорида в объеме 0,1 мл на 200 г массы тела (м.т.). Иммунизацию крыс второй группы (позитивный контроль) осуществляли подкожным введением полного адъюванта Фрейнда в объеме 0,1 мл на 200 г м.т. (Freund's Complete Adjuvant, Difco Laboratories, США). Животным третьей и четвертой групп («Опыт минимально (мин.)» и «Опыт максимально (макс.)» соответственно) после однократного подкожного введения ПАФ в объеме 0,1 мл на 200 г м.т. осуществляли профилактику иммунотоксического действия смесью лимонной и янтарной кислот, взятых в массовом соотношении 1:4. Для этого карбоновые кислоты предварительно нейтрализовывали минеральной водой до pH 7,0–7,5 и полученным раствором равномерно смачивали экструдированные гранулы, которые после просушивания скармливали животным. Введение антиоксидантов осуществляли на протяжении 4 недель в дозировках 17 мг/кг (мин.) м.т. и 88 мг/кг (макс.) м.т. После этого животных переводили на стандартный рацион и режим питания.

По истечении 3-х и 7-ми недель у животных из сердца отбирали кровь для гематологических и биохимических исследований.

Методики проведения исследований. Измерение массы тела животных проводили в динамике с интервалами в 2–3 недели. По окончании эксперимента осуществляли некропсию и измерение массы внутренних органов; на основании полученных результатов рассчитывали массовые коэффициенты внутренних органов (г/кг массы тела). Гематологические показатели определяли с помощью автоматического гематологического анализатора Mythic 22 (Польша), лейкоцитарную формулу для повышения точности рассчитывали микроскопией мазка.

Содержание гидроперекисей (ГП) в плазме крови определяли по Гаврилову, используя наборы фирмы ООО «Агат-Мед» (Россия). В отмытых холодным изотоническим раствором эритроцитах измеряли стандартным методом содержание малонового диальдегида по реакции с тиобарбитуровой кислотой [2].

¹ ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур».

Активность каталазы в гемолизованных эритроцитах измеряли по методу T. Beutler [4], основанном на расчете кинетики распада перекиси водорода по результатам спектрофотометрического анализа.

Для гистологических исследований образцы селезенки и соединительной ткани (коленный сустав) помещали в нейтральный 10% раствор формалина и фиксировали не менее 72 часов. Парафиновые срезы окрашивали гематоксилин-эозином и анализировали при увеличении 10×10 и 10×40.

Для анализа выборок рассчитывали медиану (Me), 25-й и 75-й процентиля (C₂₅–C₇₅). Выбор нулевой или альтернативной гипотез осуществляли на основе U-критерия Манна–

Уитни с помощью онлайн калькулятора [18]. Значимыми считались различия при $p < 0,05$.

Результаты

Введение животным полного адьюванта Фрейнда приводит к срыву иммунной толерантности и запуску каскада патологических процессов, выявляемых на различных уровнях — от организменного до клеточного (табл. 1–5, рис. 1, 2, III обложка). На основе анализа интегрального показателя — изменения массы тела животных — можно заключить, что гиперактивация иммунной системы компонентами ПАФ приводит к общему дисбалансу в системе пластического обмена и сопровождается снижением веса (табл. 1)

Таблица 1. Динамика показателей массы тела у крыс

Table 1. Dynamics of body weight in rats

Группы животных Groups of animals	Стат. критерии Stat. criteria	Сроки обследования (в неделях) Timepoints of examination (weeks)			
		0	2	5	7
Негативный контроль Negative control	Me	467,50	475,00	482,50	490,00
	C ₂₅ –C ₇₅	430,00–500,00	438,75–498,75	450,00–501,25	465,00–506,25
Позитивный контроль Positive control	Me	461,88	419,06	419,06	407,67
	C ₂₅ –C ₇₅	447,76–470,99	398,56–448,67	408,81–456,64	397,42–446,39
	P*	н/д ID	0,05	0,05	0,01
Опыт «мин.» “Min.” experiment	Me	444,00	430,50	445,00	432,50
	C ₂₅ –C ₇₅	429,25–508,50	411,50–470,00	422,50–487,50	396,25–456,25
	P**	н/д ID	н/д ID	н/д ID	н/д ID
Опыт «макс.» “Max.” experiment	Me	480,00	455,00	467,50	450,00
	C ₂₅ –C ₇₅	452,50–521,25	420,00–482,50	440,00–491,25	428,75–472,50
	P***	н/д ID	н/д ID	н/д ID	н/д ID

Примечание. * — позитивный контроль относительно негативного; ** — опытная «мин.» относительно позитивного контроля; *** — опытная «макс.» относительно позитивного контроля; н/д — недостоверные отличия.

Note. * — positive vs. negative control; ** — “min.” experiment vs. positive control; *** — “max.” experiment vs. positive control; ID — insignificant differences.

Таблица 2. Массовые коэффициенты внутренних органов (г/кг массы тела) крыс

Table 2. The relative internal organ mass coefficients (g/kg body weight) in rats

Группы животных Groups of animals	Стат. критерии Stat. criteria	Масса тела, г Body weight, g	Печень Liver	Почки Kidney	Селезенка Spleen	Тимус Thymus
Негативный контроль Negative control	Me	490,00	38,05	6,39	2,13	1,62
	C ₂₅ –C ₇₅	465,00–506,25	36,02–40,06	5,52–7,05	1,97–2,43	1,32–1,71
Позитивный контроль Positive control	Me	407,67	36,70	6,29	2,67	1,02
	C ₂₅ –C ₇₅	397,42–446,39	34,19–37,44	6,22–6,53	2,49–2,69	0,95–1,17
	P*	0,01	н/д ID	н/д ID	0,01	0,01
Опыт «мин.» “Min.” experiment	Me	432,50	35,45	6,32	3,74	1,00
	C ₂₅ –C ₇₅	396,25–456,25	32,28–37,37	5,66–8,49	2,64–4,05	0,98–1,05
	P**	н/д ID	н/д ID	н/д ID	н/д ID	н/д ID
Опыт «макс.» “Max.” experiment	Me	450,00	36,97	5,93	2,22	1,25
	C ₂₅ –C ₇₅	428,75–472,5	35,67–41,16	5,54–6,01	1,78–2,73	1,18–1,43
	P***	н/д ID	н/д ID	0,05	н/д ID	0,05

Примечание. Обозначения те же, что и в табл. 1.

Note. For legend see Table 1.

В группе позитивного контроля к окончанию второй недели статистически значимое (относительно негативного контроля) снижение массы составило 9,1% и после относительной стабилизации в течение последующих трех недель (5-я неделя) регистрируемый показатель дополнительно снизился (к 7-й неделе). Итоговая потеря в весе составила 11,7% относительно исходного значения. В условиях профилактического воздействия смеси лимонной и янтарной кислот, вводимых в режиме «доза-эффект», проявилась качественно иная закономерность: менее выраженное (3,1–5,2%) снижение массы к окончанию второй недели и затем ее (2,6–3,4%) прирост в период введения антиоксидантов (пятая неделя). Последующая отмена антиоксидантов приводит к повторному снижению массы на 3,0–3,6%, что в сумме дает ее конечное уменьшение от исходного уровня на 2,7–6,25% (при существенном (до 9%) прибавлении на фоне животных позитивного контроля).

У животных из группы негативного контроля отмечен стабильный прирост массы в соответствии с физиологическими закономерностями, характерными их возрасту [9].

По окончании эксперимента в результате некропсии значимых аномалий в топографии, структуре, форме и цвете органов у животных опытных и контрольных групп не выявлено. Изучение индексов массы внутренних органов (относительно массы тела) позволило вскрыть отдельные патологические изменения, затронувшие организм животных, подвергнутых воздействию адьюванта Фрейнда (табл. 2).

Из таблицы видно, что статистически значимые изменения у животных из группы позитивного контроля выявляются прежде всего в органах иммунной системы — селезенке и вилочковой железе. При этом относительная масса селезенки увеличилась на 25,3%, а тимус, наоборот, оказался редуцирован на 37,0%. Протективное действие карбоновых кислот в максимальной дозировке проявилось сохранением лимфоэпителиального органа с коэффициентом защиты 25% (относительно позитивного контроля), а расчеты по критерию Манна–Уитни показали, что массив полученных данных составляет единую выборку с животными негативного контроля.

Ключевые гематологические показатели теплокровных представлены в табл. 3.

Из таблицы видно, что в ходе проведения общего клинического анализа крови у животных негативного контроля исследуемые параметры изменяются незначительно и остаются в пределах колебаний нормы [21]. После введения ПАФ у теплокровных отмечается острая воспалительная реакция, выявляемая повышением уровня лейкоцитов. Так, в группе позитивного

Таблица 3. Динамика основных гематологических показателей у крыс

Table 3. Dynamics of major rat hematological parameters

Группы животных Groups of animals	Стат. критерии Stat. criteria	Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$ White blood cells, $\times 10^9/\text{L}$		Эритроциты, $\times 10^{12}/\text{л}$ Red blood cells, $\times 10^{12}/\text{L}$		Гемоглобин, г/л Hemoglobin, g/L		Тромбоциты, $\times 10^9/\text{л}$ Platelets, $\times 10^9/\text{L}$	
		3 нед. week 3	7 нед. week 7	3 нед. week 3	7 нед. week 7	3 нед. week 3	7 нед. week 7	3 нед. week 3	7 нед. week 7
Негативный контроль Negative control	Me	12,5	13,2	8,5	9,2	145,0	147,5	506,0	519,0
	$C_{25}-C_{75}$	11,8–16,2	11,8–14,4	8,1–8,9	9,0–9,5	142,2–147,5	144,7–151,5	474,0–562,7	481,0–573,5
Позитивный контроль Positive control	Me	26,6	19,2	8,7	9,5	144,0	151,5	656,0	610,5
	$C_{25}-C_{75}$	23,6–30,9	17,8–21,2	8,2–8,9	9,3–9,6	140,2–147,0	149,7–158,0	640,5–700,5	591,0–657,5
	P*	0,01	0,01	н/д ID	н/д ID	н/д ID	н/д ID	0,01	0,01
Опыт «мин.» "Min." experiment	Me	19,6	20,9	8,9	8,9	147,0	147,0	579,0	550,5
	$C_{25}-C_{75}$	14,2–23,3	16,9–25,8	8,8–9,4	8,5–9,1	144,0–149,0	140,8–150,8	534,5–629,5	470,8–629,0
	P**	0,05	н/д ID	н/д ID	0,05	н/д ID	н/д ID	0,05	н/д ID
Опыт «макс.» "Max." experiment	Me	16,6	16,0	9,3	9,5	149,5	155,0	603,5	567,5
	$C_{25}-C_{75}$	14,3–19,9	14,9–16,1	8,7–9,5	9,4–9,8	142,8–153,7	148,8–159,2	513,5–665,0	494,3–645,8
	P***	0,01	0,01	н/д ID	н/д ID	н/д ID	н/д ID	н/д ID	н/д ID

Примечание. Обозначения те же, что и в табл. 1.
Note. For legend see Table 1.

Таблица 4. Лейкоцитарная формула экспериментальных животных
Table 4. Leukocyte count in experimental animals

Группы животных Groups of animals	Стат. критерии Stat. criteria	П/я нейтрофилы, % Band cells		С/я нейтрофилы, % Segmented neutrophils		Эозинофилы, % Eosinophils		Лимфоциты, % Lymphocytes		Моноциты, % Monocytes	
		3 нед. 3 weeks	7 нед. 7 weeks	3 нед. 3 weeks	7 нед. 7 weeks	3 нед. 3 weeks	7 нед. 7 weeks	3 нед. 3 weeks	7 нед. 7 weeks	3 нед. 3 weeks	7 нед. 7 weeks
Негативный контроль Negative control	Me	2,00	1,5	22,00	26,00	4,00	2,00	67,5	62,50	4,00	5,00
	C ₂₅ -C ₇₅	1,75-3,25	0-2,25	20,5-24,25	22,50-28,25	2,00-5,25	2,00-5,25	62,75-69,25	59,00-67,75	2,75-5,00	4,75-6,00
Позитивный контроль Positive control	Me	1,5	1	24,00	19,00	4,00	3,00	65,00	75,00	4,00	3,00
	C ₂₅ -C ₇₅	1-1,25	0-1	19,00-32,50	16,25-20,00	0-6,25	2,75-4,00	62,00-68,25	72,50-80,75	3,00-5,50	1,00-3,00
	P*	н/д ID	н/д ID	н/д ID	0,05	н/д ID	н/д ID	н/д ID	0,05	н/д ID	0,01
Опыт «мин.» "Min." experiment	Me	2,5	1,5	14,00	25,50	3,00	2,00	74,00	65,50	7,50	5,50
	C ₂₅ -C ₇₅	0-3,25	1-2,25	12,50-15,25	14,00-34,75	2,00-6,50	0-2,25	67,75-75,75	53,75-77,00	5,50-8,50	5,00-6,00
	P**	н/д ID	0,05	0,01	н/д ID	н/д ID	н/д ID	н/д ID	н/д ID	0,05	0,01
Опыт «макс.» "Max." experiment	Me	0,5	1	25,50	15,00	1,00	2,00	64,50	76,50	3,00	3,50
	C ₂₅ -C ₇₅	0-2,25	1-1	22,75-36,25	14,00-24,50	0,75-2,00	2,00-3,25	56,50-70,25	63,50-79,00	2,00-5,00	2,00-5,50
	P***	н/д ID	н/д ID	н/д ID	н/д ID	н/д ID	н/д ID	н/д ID	н/д ID	н/д ID	н/д ID

Примечание. Обозначения те же, что и в табл. 1.
Note. For legend see Table 1.

контроля общее количество клеток белой крови на третьей неделе эксперимента увеличилось относительно негативного контроля в 2,1 раз (статистически значимо). В условиях профилактики карбоновыми кислотами степень лейкоцитоза статистически значимо и дозозависимо снижается: с минимальной концентрацией на 26,3%, с максимальной — на 37,6%. При этом также отмечается другая положительная тенденция — сужение размаха выборки: в первом случае (опыт «мин.») разница между верхним и нижним квартилями составляет 64%, а во втором — не превышает 40% (опыт «макс.»).

К окончанию всего эксперимента (7-я неделя) степень выраженности воспалительных реакций у крыс из группы позитивного контроля снижается на 27,8%, у опытных животных на фоне изначального купирования лейкоцитоза существенных колебаний общей численности клеток белой крови не выявлено.

Состояние системы эритропоэза в условиях проводимого эксперимента остается достаточно стабильным: у всех животных общее количество эритроцитов и содержание в них гемоглобина колеблется незначительно и сохраняется в пределах нормы.

В мегакариоцитарном ростке в условиях иммунизации ПАФ отмечаются статистически значимые патологические сдвиги: количество тромбоцитов относительно животных негативного контроля оказывается повышенным на 20,6–29,6%. Коррекция тромбоцитоза на фоне приема антиоксидантов способствовала 9,8–11,7%-ному снижению содержания кровяных пластинок даже при минимальной дозировке.

О протективном действии карбоновых кислот в отношении ПАФ-индуцированного воспаления свидетельствуют также расчеты отношения «тромбоциты/лейкоциты» (Т/Л). Для животных негативного контроля данный параметр колеблется незначительно и сохраняется в пределах 39,5–40,6. На фоне введения ПАФ (позитивный контроль) к третьей неделе отношение Т/Л значительно снижается, достигая значения 24,6, а к седьмой неделе — 31,8. Наиболее выраженное защитное действие антиоксидантов проявилось в максимальной дозировке, способствуя поддержанию рассчитываемого индекса в пределах 35,3–36,3.

Воздействие ПАФ и антиоксидантов на отдельные субпопуляции лейкоцитов отражено в табл. 4.

Согласно полученным результатам, регистрируемые колебания в показателях крови у крыс негативного контроля незначительны и не выходят за границы нормы [17]. При иммунизации животных в лейкоцитарной формуле выявляются определенные сдвиги, затра-

гивающие преимущественно лимфобластный и миелобластный ростки крови. Так, у крыс позитивного контроля статистически значимые изменения отмечаются на 7-й неделе: относительное содержание зрелых нейтрофилов снижается на 7% (относительно негативного контроля), а лимфоцитов — повышается на 12,5%. Воздействие карбоновых кислот на лейкопоз носит дозозависимый характер и проявляется по-разному: нейтропения (и соответственно лимфоцитоз) при сравнении с позитивным контролем у опытных животных с минимальной концентрацией на третьей неделе, а с максимальной — на седьмой.

В других клеточных звеньях системы лейкона существенных различий между сравниваемыми группами не выявлено.

Изменения, затронувшие систему перекисного окисления липидов и общую дыхательную (дегидрогеназную) активность лимфоцитов в условиях коррекции аутоиммунных реакций карбоновыми кислотами, отражены в табл. 5.

Из таблицы видно, что существенных изменений в содержании первичных продуктов ПОЛ — гидроперекисей не отмечается. Единственным значимым событием явилось 15%-ное увеличение ГП в плазме животных опытной группы с максимальной дозировкой антиоксидантов к 7-й неделе (при сравнении с группой позитивного контроля). Уровень вторичных продуктов ПОЛ, в виде маркера — МДА — изменился статистически значимо у всех экспериментальных животных, затравленных ПАФ. Так, в группе позитивного контроля содержание МДА при сравнении «негативный/позитивный» контроли возросло на 55,8–61,8%. Введение органических кислот даже в минимальной дозировке способствовало снижению интенсивности реакций окислительной деструкции мембран на 11,2–16,8% ($p = 0,01–0,05$).

Анализ каталазной активности позволяет заключить, что иммунизация адьювантом привела к компенсаторному увеличению ферментного звена системы антиоксидантной защиты. Уже к третьей неделе оцениваемый параметр у теплокровных из группы позитивного контроля возрос на 9,8% (статистически значимо). Смесь лимонной и янтарной кислот позволила еще более повысить эффективность антирадикальной защиты, способствуя росту энзиматической активности каталазы на 1,4–4,1% к третьей неделе с момента антигенной стимуляции и на 7,8–12,2% (статистически значимо) к окончанию эксперимента.

Наиболее существенные изменения в дегидрогеназной активности митохондрий лимфоцитов отмечены к 7-й неделе: у животных из группы позитивного контроля регистрируемый параметр статистически значимо умень-

Таблица 5. Динамика биохимических показателей крови у крыс
Table 5. Dynamics of rat blood biochemical parameters

Группы животных Groups of animals	Стат. критерии Stat. criteria	Гидроперекиси, мкмоль/л Hydroperoxides, $\mu\text{mol/L}$		МДА, мкмоль/л MDA, $\mu\text{mol/L}$		Каталаза, $\times 10^4$ ME/г Hb Catalase, $\times 10^4$ IU/g Hb		Дегидрогеназная активность, у.е. Dehydrogenase activity, c.u.	
		3 нед. 3 weeks	7 нед. 7 weeks	3 нед. 3 weeks	7 нед. 7 weeks	3 нед. 3 weeks	7 нед. 7 weeks	3 нед. 3 weeks	7 нед. 7 weeks
Негативный контроль Negative control	Me	4,79	5,09	30,45	28,97	3,99	5,15	4,81	3,67
	C ₂₅ -C ₇₅	4,62–5,00	4,71–6,41	28,97–32,05	26,03–29,55	3,69–4,07	4,95–5,58	4,56–5,39	2,91–3,78
Позитивный контроль Positive control	Me	5,12	4,65	49,27	45,13	4,38	4,98	3,03	1,30
	C ₂₅ -C ₇₅	4,85–5,39	4,57–4,82	46,96–50,79	44,42–45,83	4,10–4,52	4,75–5,30	2,75–3,15	1,09–1,61
Опыт «мин.» "Min." experiment	P*	н/д ID	н/д ID	0,01	0,01	0,05	н/д ID	0,01	0,01
	Me	4,72	5,12	43,73	37,56	4,44	5,59	2,68	1,91
Опыт «макс.» "Max." experiment	C ₂₅ -C ₇₅	4,12–5,29	4,72–5,62	40,85–44,68	35,90–40,32	4,35–4,53	5,52–5,72	2,50–3,76	1,77–2,15
	P**	н/д ID	н/д ID	0,01	0,05	н/д ID	0,01	н/д ID	0,01
	Me	5,92	5,38	43,98	42,31	4,56	5,37	2,79	1,86
	C ₂₅ -C ₇₅	5,52–6,15	4,99–5,85	42,79–44,86	40,26–43,46	4,33–4,78	5,01–5,55	2,53–3,09	1,70–2,01
	P***	н/д ID	0,05	0,05	0,05	н/д ID	0,05	н/д ID	0,01

Примечание. Обозначения те же, что и в табл. 1.
Note. For legend see Table 1.

шился в 2,8 раза (в сравнении с негативным контролем); введение антиоксидантов — субстратов цикла трикарбоновых кислот позволило повысить общую дыхательную активность иммунокомпетентных клеток на 43,1–46,9%.

Изменения на клеточном уровне, обусловленные воздействием ПАФ и карбоновых кислот на ткани селезенки, представлены на рис. 1 (см. III обложку).

Гистоархитектоника селезенки животных из группы негативного контроля (рис. 1А, III обложка) не нарушена, в отдельных случаях отмечается венозное полнокровие. У животных позитивного контроля отмечены следующие дегенеративные изменения в ткани: в красной пульпе очаги кровоизлияний с гемосидерозом, в ряде случаев — по всей плоскости среза; синусы расширены. Сосудистая стенка артерий и вен — в состоянии отека. Отмечается уменьшение общей площади лимфоидных узелков, просветление герменативных центров, частичное или полное стирание границ между зонами мантии, маргинальной зоной и красной пульпой, расширение межклеточных щелей. В лимфатических узелках и в красной пульпе нарушена структура ретикулярной сети с разрывами, расслоением и фрагментацией волокон. На фоне воздействия смеси лимонной и янтарной кислот (рис. 1В, 1Г, III обложка) степень дегенеративных изменений снижается: краевая и мантийная зоны четко очерчены, площадь лимфоидных узелков приближена к норме. Синусоиды расширены; отмечаются редкие и мелкофокальные очаги кровоизлияний, количество которых в группе с максимальной дозировкой незначительно.

Одним из проявлений иммунотоксического действия ПАФ является индуцированная патология соединительной ткани и, как следствие, развитие аутоиммунного ревматоидного артрита [13]. Морфологические исследования суставного аппарата животных модельной группы (позитивный контроль) охарактеризованы изменениями различной степени тяжести (рис. 2, III обложка).

На фоне введения ПАФ (рис. 2Б, III обложка) у животных отмечается пролиферация синовиоцитов, гиперплазия, отечность и утолщение слоев в синовиальной оболочке. В строме выявляются множественные очаги периваскулярного инфильтрата, представленного преимущественно лимфоцитами. Морфологическая картина надхрящницы свидетельствует о признаках дезорганизации соединительной ткани в виде истончения и разволокнения наружного и внутреннего слоев. При этом в наружном слое рыхлой волокнистой соединительной ткани характерным является умеренно выраженный периваскулярный отек, отмечаются единичные лимфоциты в сосудистой стенке, а также фокусы кровоизлияний.

Для внутреннего слоя выявлены участки с относительным уменьшением клеточного состава. При гистологическом исследовании суставных поверхностей гиалинового хряща коленного сустава отмечаются дегенеративные изменения в виде истончения поверхностного слоя молодых хондроцитов, варьирующие от слабой до умеренной степени, очаговые кровоизлияния. В промежуточной зоне — изогенные группы хондроцитов с признаками дистрофических изменений и усилением базофилии территориальных участков межклеточного вещества, очаговая вакуолизация матрикса. В большинстве случаев в строении субхондральной кости гистоархитектоника не нарушена, однако, в единичных случаях отмечено истончение костной пластинки.

На фоне введения смеси лимонной и янтарной кислот (рис. 2В, 2Г, III обложка) общая степень дегенеративных изменений снижена. Это проявлялось снижением степени отечности в синовиальной оболочке, уменьшением или полным исчезновением очагов периваскулярного инфильтрата. Фиброзный и камбиальный слои надхрящницы с незначительными признаками истончения и разволокнения. Хондроциты гиалинового хряща крупные, овальной формы и образуют изогенные группы, ориентированные перпендикулярно поверхности хряща.

Обсуждение

Полный адьювант Фрейнда, представляющий собой водно-масляную эмульсию с термически инактивированными микобактериями туберкулеза, широко используется в практике лабораторного эксперимента и продолжает оставаться «золотым стандартом» в иммунологии [7]. Его введение животным приводит к росту в крови моноаминов [22], выполняющих роль медиаторов воспаления, и сопровождается высоким титром антител [8].

Согласно полученным результатам, гиперэргическое воспаление в ответ на введение ПАФ развивается к третьей неделе, после чего идет на спад и к седьмой неделе приобретает характер хронического процесса. На фоне смеси лимонной и янтарной кислот степень воспалительной реакции дозозависимо снижается, и при максимальной дозировке такие показатели воспаления, как уровень лейкоцитов и тромбоцитов становятся статистически неразличимыми при сравнении с группой негативного контроля, а отношение Т/Л приближается к норме, что, как указывается в работе [6], является чувствительным и информативным маркером воспаления.

О снижении воспалительного процесса под действием антиоксидантов свидетельствует и нормализация содержания в крови малоново-

го диальдегида, повышенный уровень которого свидетельствует не только об оксидативном стрессе, но и отражает интенсификацию воспалительных реакций в организме [10].

Анализ ключевых параметров, диагностирующих общетоксическое действие ПАФ, — динамика массы тела и массовые коэффициенты органов — также свидетельствует о модифицирующем эффекте карбоновых кислот, особенно четко фиксируемом в максимальной дозировке действующих веществ. В работе [5] отмечается, что потеря массы тела приводит к снижению общего системного воспаления за счет уменьшения образования провоспалительных цитокинов, сокращения объемов выработки активных форм кислорода и увеличения эффективности энергетической продуктивности митохондрий.

Относительная стабилизация массы тела животных, получавших смесь лимонной и янтарной кислот на фоне ПАФ-индуцированной аутоиммунной патологии, может раскрывать возможный саногенетический механизм тестируемых веществ. Его основу составляют: непосредственный антиоксидантный (мембранопротекторный) эффекты и повышение об-

щей дегидрогеназной активности митохондрий за счет участия цитрат- и сукцинат-ионов в цикле Кребса. На тканевом уровне защитное действие проявилось сохранением площади и структуры лимфатических фолликулов селезенки на фоне очаговой или тотальной делимфатизации в условиях ПАФ (позитивный контроль), а также значительным купированием признаков дегенеративных изменений в базовых элементах соединительной ткани: суставном хряще и синовиальной оболочке.

Заключение

Использование смеси лимонной и янтарной кислот позволяет существенным образом снизить токсические проявления полного адъюванта Фрейнда за счет повышения антиоксидантного статуса, ингибирования процессов липопероксидации, усиления метаболической активности митохондрий, что в конечном счете приводит к снижению общего системного воспаления и способствует сохранению гистоархитектоники органов-мишеней: селезенки и соединительной ткани.

Список литературы/References

1. Козлов В.Г., Ожерелков С.В., Санин А.В., Кожевникова Т.Н. Адъюванты в современной медицине и ветеринарии // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2014. № 1. С. 91–102. [Kozlov V.G., Ozherelkov S.V., Sanin A.V., Kozhevnikova T.N. Adjuvants in modern medicine and veterinary. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii* = *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2014, no. 1, pp. 91–102. (In Russ.)]
2. Методы клинических лабораторных исследований / Под ред. В.С. Камышниковой. 8-е изд. М.: МЕДпресс-информ, 2016. 736 с. [Methods of clinical laboratory research. Ed. by V.S. Kamyshnikova. 8th ed. Moscow: MEDpress-inform, 2016. 736 p. (In Russ.)]
3. Семакова А.П., Микшис Н.И. Адъювантные технологии в создании современных вакцин // Проблемы особо опасных инфекций. 2016. № 2. С. 28–35. [Semakova A.P., Mikshis N.I. Adjuvant technologies in the creation of modern vaccines. *Problemy osobo opasnykh infektsii* = *Problems of Especially Dangerous Infections*, 2016, no 2, pp. 28–35. (In Russ.)] doi: 10.21055/0370-1069-2016-2-28-35
4. Справочник по лабораторным методам исследования / Под ред. Л.А. Даниловой. М.: Питер, 2003. 733 с. [Handbook of laboratory research methods. Ed. by L.A. Danilova. Moscow: Piter, 2003. 733 p. (In Russ.)]
5. Bianchi V.E. Weight loss is a critical factor to reduce inflammation. *Clin. Nutr. ESPEN*, 2018, vol. 28, pp. 21–35. doi: 10.1016/j.clnesp.2018.08.007.
6. Chan A.S., Rout A. Use of neutrophil-to-lymphocyte and platelet-to-lymphocyte ratios in COVID-19. *J. Clin. Med. Res.*, 2020, vol. 12, no. 7, pp. 448–453. doi:10.14740/jocmr4240
7. Dubé J.Y., McIntosh F., Zarruk J.G., David S., Nigou J., Behr M.A. Synthetic mycobacterial molecular patterns partially complete Freund's adjuvant. *Sci. Rep.*, 2020, vol. 10, no. 1: 5874. doi:10.1038/s41598-020-62543-5
8. Fontes J.A., Barin J.G., Talor M.V., Stickel N., Schaub J., Rose N.R., Čiháková D. Complete Freund's adjuvant induces experimental autoimmune myocarditis by enhancing IL-6 production during initiation of the immune response. *Immun. Inflamm. Dis.*, 2017, vol. 5, no. 2, pp. 163–176. doi: 10.1002/iid3.155
9. Ghasemi A., Jeddi S., Kashfi K. The laboratory rat: age and body weight matter. *EXCLI J.*, 2021, no. 20, pp. 1431–1445. doi: 10.17179/excli2021-4072
10. Ito F., Sono Y., Ito T. Measurement and clinical significance of lipid peroxidation as a biomarker of oxidative stress: oxidative stress in diabetes, atherosclerosis, and chronic inflammation. *Antioxidants (Basel)*, 2019, vol. 8, no. 3, 72 p. doi:10.3390/antiox8030072
11. Le Moignic and Pinoy. Les vaccins en emulsion dans les corps gras ou "lipo-vaccins". *Comptes Rendus de la Societe de Biologie*, 1916, no. 79, pp. 201–203.
12. Lin Y.J., Wen C.N., Lin Y.Y., Hsieh W.C., Chang C.C., Chen Y.H., Hsu C.H., Shih Y.J., Chen C.H., Fang C.T. Oil-in-water emulsion adjuvants for pediatric influenza vaccines: a systematic review and meta-analysis. *Nat. Commun.*, 2020, vol. 11, no. 1: 315. doi:10.1038/s41467-019-14230-x
13. Noh A.S.M., Chuan T.D., Khir N.A.M., Zin A.A.M., Ghazali A.K., Long I., Ab Aziz C.B., Ismail C.A.N. Effects of different doses of complete Freund's adjuvant on nociceptive behaviour and inflammatory parameters in polyarthritic rat model mimicking rheumatoid arthritis. *PLoS One*, 2021, vol. 16, no. 12: e0260423. doi:10.1371/journal.pone.0260423

14. Nuwarda R.F., Alharbi A.A., Kayser V. An overview of influenza viruses and vaccines. *Vaccines (Basel)*, 2021, vol. 9, no. 9: 1032. doi: 10.3390/vaccines9091032
15. Powell B.S., Andrianov A.K., Fusco P.C. Polyionic vaccine adjuvants: another look at aluminum salts and polyelectrolytes. *Clin. Exp. Vaccine Res.*, 2015, vol. 4, no. 1, pp. 23–45. doi: 10.7774/cevr.2015.4.1.23
16. Rodrigues C.M.C., Plotkin S.A. Impact of vaccines; health, economic and social perspectives. *Front. Microbiol.*, 2020, vol. 11: 1526. doi: 10.3389/fmicb.2020.01526
17. Siegel A., Walton R.M. Hematology and biochemistry of small mammals. *Ferrets, Rabbits, and Rodents*, 2020, pp. 569–582. doi: 10.1016/B978-0-323-48435-0.00039-3
18. Statistics Kingdom. Mann Whitney U test calculator (Wilcoxon rank-sum). URL: https://www.statskingdom.com/170median_mann_whitney.html
19. Tizard I.R. Adjuvants and adjuvanticity. *Vaccines for Veterinarians*, 2021, pp. 75–86. doi: 10.1016/B978-0-323-68299-2.00016-2
20. Vaccines: Expert Consult (Vaccines (Plotkin)) 5th ed. Eds.: S.A. Plotkin, W. Orenstein, P.A. Offit. 1748 p.
21. Washington I.M., Van Hoosier G. Clinical biochemistry and hematology. *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents*, 2012, pp. 57–116. doi: 10.1016/B978-0-12-380920-9.00003-1
22. Zhang W., Lyu J., Xu J., Zhang P., Zhang S., Chen Y., Wang Y., Chen G. The related mechanism of complete Freund's adjuvant-induced chronic inflammation pain based on metabolomics analysis. *Biomed. Chromatogr.*, 2021, vol. 35, no. 4: e5020. doi: 10.1002/bmc.5020

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;

Пухаева Е.Г., младший 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;

Бадтиев А.К., к.б.н., 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;

Руруа Ф.К., младший 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;

Батагова Ф.Э., младший научный сотрудник лаборатории субклеточных структур, аспирант отдела молекулярных и клеточных механизмов аутоиммунных заболеваний Института биомедицинских исследований — филиала ФГБУН ФНЦ Владикавказский научный центр РАН, г. Владикавказ, Россия;

Фарниева Ж.Г., младший научный сотрудник лаборатории субклеточных структур, аспирант отдела молекулярных и клеточных механизмов аутоиммунных заболеваний Института биомедицинских исследований — филиала ФГБУН ФНЦ Владикавказский научный центр РАН, г. Владикавказ, Россия.

Authors:

Skupnevskiy S.V., PhD, MD (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;

Pukhaeva E.G., Junior Researcher, Laboratory of Subcellular Structures, Department of Molecular and Cellular Mechanisms of Autoimmune Diseases, Institute of Biomedical Research, Affiliate of Vladikavkaz Scientific Center of RAS, Vladikavkaz, Russian Federation;

Badtiev A.K., PhD (Biology), Researcher, Laboratory of Subcellular Structures, Department of Molecular and Cellular Mechanisms of Autoimmune Diseases, Institute of Biomedical Research, Affiliate of Vladikavkaz Scientific Center of RAS, Vladikavkaz, Russian Federation;

Rurua F.K., Junior Researcher, Laboratory of Subcellular Structures, Department of Molecular and Cellular Mechanisms of Autoimmune Diseases, Institute of Biomedical Research, Affiliate of Vladikavkaz Scientific Center of RAS, Vladikavkaz, Russian Federation;

Batagova F.E., Junior Researcher, Laboratory of Subcellular Structures, Postgraduate of the Department of Molecular and Cellular Mechanisms of Autoimmune Diseases, Institute of Biomedical Research, Affiliate of Vladikavkaz Scientific Center of RAS, Vladikavkaz, Russian Federation;

Farnieva Zh.G., Junior Researcher, Laboratory of Subcellular Structures, Postgraduate of the Department of Molecular and Cellular Mechanisms of Autoimmune Diseases, Institute of Biomedical Research, Affiliate of Vladikavkaz Scientific Center of RAS, Vladikavkaz, Russian Federation.

ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ КУЛЬТУРЫ МЫШИНЫХ МАКРОФАГОВ *IN VITRO* ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ СПОРАМИ *BACILLUS ANTHRACIS* С РАЗНЫМ ПЛАЗМИДНЫМ СОСТАВОМ

Е.А. Котенева^{1,2}, О.И. Цыганкова¹, В.Ю. Щербакова¹, А.В. Калинин¹,
И.С. Родионов¹, В.В. Сердюков¹, А.В. Абрамович¹, А.Н. Куличенко¹

¹ ФКУЗ Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия

² ФГАОУ ВО Северо-Кавказский федеральный университет, г. Ставрополь, Россия

Резюме. *Bacillus anthracis*, возбудитель сибирской язвы, способен к существованию как в условиях окружающей среды (почвы), так и в макроорганизме. Проявление патогенных свойств штаммов *B. anthracis* определяется их плазмидным составом, так как генетические детерминанты основных факторов вирулентности — двухкомпонентного токсина и капсулы — имеют плазмидную локализацию. Моделирование сибиреязвенной инфекции *in vitro* в культуре макрофагов позволит выявить влияние индивидуальных особенностей штаммов *B. anthracis* на характер взаимодействия бацилл и клеток макрофагов. Целью данного исследования был анализ уровня секреции цитокинов клетками культуры макрофагов при инфицировании *in vitro* спорами штаммов сибиреязвенного микроба с разным плазмидным составом. Выявлена зависимость цитокинового профиля макрофагальных клеток от плазмидного состава заражающих штаммов *B. anthracis* при моделировании сибиреязвенной инфекции *in vitro*. Наличие плазмиды токсинообразования рХО1 у штаммов сибиреязвенного микроба оказывает мощный стимулирующий эффект на выработку цитокинов макрофагами клеточной линии J774A. Штаммы *B. anthracis*, не обладающие плазмидой рХО1, практически не стимулировали выработку IL-1β, вызывали очень низкую секрецию IL-1α, IL-6, MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, IL-12 (p70) и активную продукцию G-CSF. Низкий цитокиновый ответ клеток макрофагов при заражении моноплазмидными штаммами, имеющими только плазмиду капсулообразования, обусловлен не только отсутствием бинарного токсина, но и нарушениями в регуляции синтеза капсулы, связанными с отсутствием гена *atxA*. Капсула, наряду с летальным и отечным токсинами, относится к основным факторам вирулентности *B. anthracis*, но у штаммов, лишенных плазмиды вирулентности рХО1, ее продукция нарушена, так как главным регулятором синтеза капсулы является ген *atxA*, локализованный на плазмиде рХО1 через положительную регуляцию генов *acpA* и *acpB*, поэтому штаммы, лишенные плазмиды токсинообразования, даже при наличии плазмиды капсулообразования, вызывают слабый цитокиновый ответ у инфицированных клеток. Диплазмидные штаммы *B. anthracis* за счет выработки главных факторов вирулентности — двухкомпонентного токсина и капсулы — вызывают у макрофагов (в экс-

Адрес для переписки:

Котенева Елена Анатольевна
355035, Россия, г. Ставрополь, ул. Советская, 13–15,
ФКУЗ Ставропольский противочумный институт
Роспотребнадзора.
Тел.: 8 (8652) 26-03-12 (служебн.), 8 905 412-54-73 (моб.).
E-mail: postgenom_stv@mail.ru

Contacts:

Elena A. Koteneva
355035, Russian Federation, Stavropol, Sovetskaya str., 13–15,
Stavropol Plague Control Research Institute of Rosпотребнадзор.
Phone: +7 (8652) 26-03-12 (office), +7 905 412-54-73 (mobile).
E-mail: postgenom_stv@mail.ru

Для цитирования:

Котенева Е.А., Цыганкова О.И., Щербакова В.Ю., Калинин А.В.,
Родионов И.С., Сердюков В.В., Абрамович А.В., Куличенко А.Н.
Цитокиновый профиль культуры мышинных макрофагов *in vitro* при
инфицировании спорами *Bacillus anthracis* с разным плазмидным
составом // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 5. С. 963–970.
doi: 10.15789/2220-7619-CPI-1893

Citation:

Koteneva E.A., Tsygankova O.I., Shcherbakova V.Yu., Kalinin A.V.,
Rodionov I.S., Serdyukov V.V., Abramovich A.V., Kulichenko A.N. Cytokine
profile in *in vitro* mouse macrophage culture infected with *Bacillus anthracis*
spores with varying plasmid composition // Russian Journal of Infection
and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 5, pp. 963–970.
doi: 10.15789/2220-7619-CPI-1893

перименте) активную продукцию IL-1 β , IL-6, MCP-1, G-CSF, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-12 (p70). Штаммы, обладающие умеренной вирулентностью и способные к капсулообразованию на воздухе, по воздействию на культуру макрофагов *in vitro* практически не отличались от высоковирулентных штаммов.

Ключевые слова: сибирская язва, цитокины, макрофаги, плазмиды вирулентности, капсула, токсин, моделирование инфекции *in vitro*.

CYTOKINE PROFILE IN *IN VITRO* MOUSE MACROPHAGE CULTURE INFECTED WITH *BACILLUS ANTHRACIS* SPORES WITH VARYING PLASMID COMPOSITION

Koteneva E.A.^{a,b}, Tsygankova O.I.^a, Shcherbakova V.Yu.^a, Kalinin A.V.^a, Rodionov I.S.^a, Serdyukov V.V.^a, Abramovich A.V.^a, Kulichenko A.N.^a

^a Stavropol Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor, Stavropol, Russian Federation

^b North Caucasus Federal University, Stavropol, Russian Federation

Abstract. *Bacillus anthracis*, the causative agent of anthrax, is able to exist both in environmental conditions (soil) and in the macroorganism. The manifestation of pathogenic properties of *B. anthracis* strains is determined by relevant plasmid composition, because the main toxin and the capsule-related virulence factors are located in bacterial plasmid. Modeling anthrax infection *in vitro* in macrophage culture might reveal an influence of individual *B. anthracis* strain characteristics on infection and development of infectious process. The aim of this study was to analyze cytokine level during infection of *in vitro* macrophage cell cultures with spores of anthrax microbe strains bearing varying plasmid composition. The dependence of the macrophage cell cytokine profile on the plasmid composition of *B. anthracis* strains was revealed while modeling anthrax infection *in vitro*. The presence of the toxin-producing plasmid pXO1 in anthrax microbe strains has a powerful stimulating effect on the production of macrophages J774A cell line cytokines. *B. anthracis* strains lacking the pXO1 plasmid virtually stimulated no production of IL-1 β , caused very low secretion of IL-1 α , IL-6, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-12 (p70) and active G-CSF products. The low cytokine response of macrophage cells infected with monoplasmid strains bearing only the capsule-forming plasmid was due not only to the absence of a binary toxin, but also to disturbed regulation of capsule production associated with the absence of the *atxA* gene. The capsule, along with lethal and edematous toxins, belongs to the main virulence factors of *B. anthracis*, but strains lacking the pXO1 virulence plasmid, had its production impaired, because the main regulator of capsule synthesis is the *atxA* gene localized on the pXO1 plasmid being positively regulated by the *acpA* and *acpB* genes, so that strains lacking the toxin-forming plasmid, even in the presence of the encapsulation plasmid, elicit a weak cytokine response in infected cells. Diploplasmid strains of *B. anthracis*, due to produced main virulence factors — a two-component toxin and a capsule, enforce macrophages (in the experiment) to actively produce IL-1 β , IL-6, MCP-1, G-CSF, MIP-1 α ; MIP-1 β , IL-12 (p70). Strains with moderate virulence and capable of capsulation in air virtually did not differ from highly virulent strains in terms of their effect on *in vitro* macrophage culture.

Key words: anthrax, cytokines, macrophages, virulence plasmids, capsule, toxin, modeling infection *in vitro*.

Введение

Возбудитель сибирской язвы — *Bacillus anthracis*, обладает широкими адаптивными способностями, успешно приспосабливаясь к существованию в резко различающихся условиях: почве, организме теплокровных животных, на искусственных питательных средах. Приспособление к разным условиям достигается благодаря способности сибиреязвенного микроба существовать в виде нескольких морфофункциональных форм (споровой, вегетативной капсульной, вегетативной акапсульной), для каждой из которых характерны не только видимые морфологические особенности, но и значительные преобразования транскрипционной и метаболической активности. Важными факторами, способствующими успешной колонизации организма млекопитающего сибиреязвенными бациллами, явля-

ется способность спор к прорастанию внутри макроорганизма, скорость и интенсивность формирования капсулы, секреция компонентов экзотоксинов и дополнительных факторов вирулентности [2]. Вирулентность и проявление патогенных свойств штаммов *B. anthracis* напрямую зависит от их плазмидного состава, так как гены, кодирующие синтез компонентов токсинов и капсулы, локализованы на плазмидах вирулентности pXO1 (плазида токсинообразования) и pXO2 (плазида капсулообразования) [8, 10]. Оба токсина — летальный и отечный — играют важную роль в подавлении врожденных и адаптивных иммунных функций макроорганизма [12]. Капсула наделяет вегетативные клетки *B. anthracis* способностью к опсонизации комплиментом хозяина и опсонофагоцитозу гранулоцитами и макрофагами. Помимо токсинов и капсулы к факторам вирулентности, способствующим проникновению

и успешному размножению в макроорганизме сибиреязвенных бацилл, относят белки S-слоя, аутолизин AmiA, белки прорастания спор, гемолизины, лецитиназу [11]. В природе могут встречаться штаммы *B. anthracis* с разным плазмидным составом, но большинство штаммов имеют обе плазмиды вирулентности. В лабораторных условиях, особенно при воздействии селективных факторов, из популяции одного штамма можно выделить варианты, имеющие разный плазмидный состав и фенотип [3].

Изучение биологических свойств бактерий, в том числе и патогенных, в основном проводится при культивировании на искусственных питательных средах, обеспечивающих оптимальный рост и размножение микроба. В этом случае условия культивирования значительно отличаются от существующих в макроорганизме при развитии инфекционного процесса. При моделировании сибиреязвенной инфекции *in vitro* в культуре макрофагов эксперименты можно проводить в максимально стандартизированных условиях, что позволит применить комплексный подход, сочетающий морфологические, молекулярно-генетические и иммунологические методы, и выявлять наиболее важные (ключевые) особенности штаммов *B. anthracis*, влияющие на проявление их патогенных свойств.

Материалы и методы

Штаммы *B. anthracis*, использованные в работе, и их фенотипическая и генетическая характеристика представлены в табл. Для экспериментов использовали культуру макрофагоподобных клеток J774A. Культивирование культуры клеток макрофагов проводили на среде DMEM с высоким содержанием глюкозы с добавлением 2% стерильной фетальной бычьей сыворотки в CO₂-инкубаторе при 37°C и содержании CO₂ — 5%. Для заражения взвесью спор *B. anthracis* использовали 1–2 суточный монослой с конфлюэнтностью 70–90%, на 2–20 пассаже. Морфологию клеточной культуры и ее чистоту оценивали в мазках, окрашенных методом Романовского. При заражении культуры клеток макрофагов спорами в лунки вносили взвесь спор в среде DMEM с 10% FBS, из расчета 50 спор на 1 клетку культуры макрофагов (это составляет 1 мл взвеси 1×10^7 спор/мл), и помещали в CO₂-инкубатор при 5% CO₂ и 37°C на 1,5 часа. Далее культуральную среду удаляли в емкость с дезраствором (6% перекись водорода с 0,5% ПАВ), а адгезированные на дне лунок планшета клетки культуры макрофагов, содержащие фагоцитированные споры, 2 раза отмывали культуральной средой DMEM в объеме 1 мл для удаления нефагоцитированных

спор, в лунки добавляли 2 мл среды поддержки (DMEM, 2% FBS) и продолжали инкубацию зараженных макрофагов при 37°C и 5% CO₂ в течение времени эксперимента (24 ч).

Количественный анализ уровня цитокинов проводили на приборе для мультиплексного иммунологического анализа в микропланшетах Bio-Plex-200 (Bio-Rad, США) с использованием набора Bio-Plex Pro™ Mouse Cytokine 23-plex (Bio-Rad, США). Прибор предварительно был валидирован и откалиброван с настройкой «low PMTRP1». Пробоподготовка проводилась в соответствии с инструкцией производителя. Объем образца, добавляемого в планшет, составил 50 мкл на лунку. Каждый образец анализировали в двух повторах. Стандартные кривые рассчитывали с помощью программного обеспечения Bio-Plex Manager по формуле пятипараметрической регрессии. Изменчивость внутри анализа, выраженная как коэффициент вариации, была рассчитана на основе среднего значения разведенных стандартных образцов и измерена дважды в мультиплексном анализе. Культивирование штаммов *B. anthracis*, получение свежих спор и определение их жизнеспособности, окрашивание препаратов, обеззараживание образцов и другие работы с возбудителем сибирской язвы проводили в соответствии с МУК 4.2.2413-08 «Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы». Безопасность работ была обеспечена в соответствии с СП 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Результаты и обсуждение

Взаимодействие между макрофагами хозяина и сибиреязвенными бациллами начинается со взаимодействия споры и макрофага, что инициирует инфекционный процесс и реакции макрофагов на летальный и отечный токсины, которые начинают экспрессироваться в вегетативной клетке. Значительное повышение уровня TNF α при аэрозольном заражении мышей спорами *B. anthracis*, которое стремительно уменьшается по мере развития бактериемии описано в работе [13]. Мы наблюдали практически полное отсутствие TNF α (на уровне фоновых значений) через 24 ч после инфицирования культуры клеток макрофагов спорами *B. anthracis*. Микроскопическое исследование препаратов выявило, что в это время в культуре макрофагов находится большое количество бактериальных клеток. Ряд экспериментов, описанных в работе [9] показал, что продукция TNF α и IL-1 β на ранних этапах влияет на увеличение продукции летального токсина, и наоборот, выработка токсина стимулирует иммунный

Таблица. Фенотипические и генетические характеристики штаммов *B. anthracis*, использованных в работе
 Table. Phenotypic and genetic characteristics of *B. anthracis* strains used in the study

№ п/п No.	Наименование штаммов <i>B. anthracis</i> Name of <i>B. anthracis</i> strains and their subcultures	Происхождение культур		Фенотип Phenotype	Ген. группа Genetic group	Плазмидный состав Plasmid composition	Категория вирулентности <i>in vitro</i> [12] Virulence category <i>in vitro</i> [12]
		Источник выделения source of isolation	Признак выделения Feature of selection				
1	1CO	кровь КРС blood of cattle	принадл. к <i>B. anthracis</i> belongs to <i>B. anthracis</i>	Cap(CO ₂) ⁺ (O ₂) ⁻ Tox ⁺ ProtA ⁺ Hly ⁺ Lec ⁻ Trp ⁺	A		Высоковирулентные Highly virulent
2	81/1	отделяемое язвы ulcer discharge	принадл. к <i>B. anthracis</i> belongs to <i>B. anthracis</i>	Cap(CO ₂) ⁺ (O ₂) ⁻ Tox ⁺ ProtA ⁺ Hly ⁺ Lec ⁻ Trp ⁺			
3	228 прот.	штамм 228 strain 228	независимость от Trp Trp independent	Cap(CO ₂) ⁺ (O ₂) ⁻ Tox ⁺ ProtA ⁺ Hly ⁺ Lec ⁻ Trp ⁺			
4	12/16-1 4P	штамм 12/16-1 strain 12/16-1	после 4 пассажей на б.м. 4 passages on w.m.	Cap(CO ₂) ⁺ (O ₂) ⁻ Tox ⁺ ProtA ⁺ Hly ⁺ Lec ⁻ Trp ⁺			
5	140 P Сар- б.м.	штамм 140 P Сар- strain 140 P Сар-	после 1 пассажа на б.м. 1 passage on w.m.	Cap(CO ₂) ⁺ (O ₂) ⁻ Tox ⁺ ProtA ⁺ Hly ⁺ Lec ⁻ Trp ⁺			
6	1284	пельмени meat dumplings	принадл. к <i>B. anthracis</i> belongs to <i>B. anthracis</i>	Cap(CO ₂) ⁺ (O ₂) ⁻ Tox ⁺ ProtA ⁺ Hly ⁺ Lec ⁻	B	pXO1 ⁺ pXO2 ⁺	Умеренно вирулентные Moderately virulent
7	228	производств. шт. manufacture strain	принадл. к <i>B. anthracis</i> belongs to <i>B. anthracis</i>	Cap(CO ₂) ⁺ (O ₂) ⁻ Tox ⁺ ProtA ⁻ Hly ⁻ Lec ⁻ Trp ⁻			
8	14/41	отделяемое язвы ulcer discharge	принадл. к <i>B. anthracis</i> belongs to <i>B. anthracis</i>	Cap(CO ₂) ⁺ (O ₂) ⁻ Tox ⁺ ProtA ⁻ Hly ⁻ Lec ⁻ Trp ⁻	B		Слабовирулентные Weakly virulent
9	1CO-S	штамм 1CO strain 1CO	Cap ⁺ O ₂	Cap(CO ₂) ⁺ (O ₂) ⁻ Tox ⁺ ProtA ⁻ Hly ⁻ Lec ⁻ Trp ⁻			
10	12/16-S	штамм 12/16 strain 12/16	Cap ⁺ O ₂	Cap(CO ₂) ⁺ (O ₂) ⁻ Tox ⁺ ProtA ⁻ Hly ⁻ Lec ⁻ Trp ⁻			
11	14/41-1aSM	штамм 14/41-1 strain 14/41-1	Cap ⁺ O ₂	Cap(CO ₂) ⁺ (O ₂) ⁻ Tox ⁺ ProtA ⁻ Hly ⁻ Lec ⁻ Trp ⁻	A	pXO1 ⁻ pXO2 ⁺	Умеренно вирулентные Moderately virulent
12	1CO RBA9-1 [24]	штамм 1CO strain 1CO	рез. к фагу «BA9» phage «BA9» resistance	Cap(CO ₂) ⁺ (O ₂) ⁻ Tox ⁺ ProtA ⁻ Hly ⁻ Lec ⁻ Trp ⁺			
13	228/8	штамм 228 strain 228	вакцинный штамм vaccine strain	Cap ⁻ Tox ⁺ ProtA ⁻ Hly ⁻ Lec ⁻ Trp ⁺	A	pXO1 ⁺ pXO2 ⁻	Авирулентные Avirulent
14	СТИ	вакцинный штамм vaccine strain		Cap ⁻ Tox ⁺ ProtA ⁻ Hly ⁻ Lec ⁻			
15	14/41 Trp+	штамм 14-41 strain 14-41	независимость от Trp Trp-independent	Cap ⁻ Tox ⁺ ProtA ⁻ Hly ⁻ Lec ⁻ Trp ⁺			

№ п/п No.	Наименование штаммов <i>B. anthracis</i> и их субкультур Name of <i>B. anthracis</i> strains and their subcultures	Происхождение культур		Фенотип Phenotype	Ген. группа Genetic group	Плазмидный состав Plasmid composition	Категория вирулентности <i>in vitro</i> [12] Virulence category <i>in vitro</i> [12]
		Источник выделения source of isolation	Признак выделения Feature of selection				
16	1CO-S Cap ⁻	штамм 1CO-S strain 1CO-S	отсутств. капсулообразования absent capsule formation	Cap ⁻ Tox ⁻ ProtA ⁻ Hly ⁻ Lec ⁻ Trp ⁻	В	pXO1 ⁺ pXO2 ⁻	Авирулентные Avirulent
17	140 P Cap ⁻	штамм 140P strain 140P	отсутств. капсулообразования absent capsule formation	Cap ⁻ Tox ⁻ ProtA ⁻ Hly ⁻ Lec ⁻ Trp ⁻	В	pXO1 ⁻ pXO2 ⁻	Апатогенные Apathogenic
18	228/4	штамм 228 strain 228	отсутств. капсулообразования absent capsule formation	Cap ⁻ Tox ⁻ ProtA ⁻ Hly ⁻ Lec ⁻ Trp ⁻	В	pXO1 ⁻ pXO2 ⁻	Апатогенные Apathogenic

Примечания. Обозначения, использованные в таблице и далее в тексте для описания фенотипических свойств: + наличие признака, — отсутствие признака, * признак не определен в связи с отсутствием роста; б.м. — белая мышь; Cap(CO₂) — способность к образованию капсулы в атмосфере с 5% углекислого газа; Cap(O₂) — способность к образованию капсулы в атмосфере воздуха; Hly — способность лизировать отмые эритроциты барана; Lec — фосфолипазная активность на плотной среде с яичным желтком; Trp — прототрофность по триптофану; Tox — формирование линий иммунопреципитации с противосибирезавязным гаммаглобулином на среде СОПЭК.

Notes. The designations used in the table and further in the text to describe phenotypic properties are: + presence of a trait, — absence of a trait, * trait not defined due to lack of growth; w.m. — white mouse; Cap(CO₂) — potential to form a capsule in atmosphere with 5% carbon dioxide; Cap(O₂) — potential to form a capsule in air atmosphere; Hly — potential to lyse washed sheep erythrocytes; Lec — phospholipase activity on solid medium with egg yolk; Trp — tryptophan prototrophy; Tox — formation of immunoprecipitation lines with anti-anthrax gamma globulin on SOPEK medium.

ответ организма и увеличение выработки цитокинов. Летальный токсин *B. anthracis*, который относится к цинкзависимым металлопротеазам, инактивирует киназы семейства MAPKK (МЕК) путем протеолитического расщепления, что ведет к активному высвобождению цитокинов пораженными клетками [6]. Нами получены данные, подтверждающие, что сублитические концентрации летального токсина индуцируют выработку цитокинов семейства IL-1. Так, штаммы *B. anthracis*, лишенные плазмиды токсинообразования, практически не стимулировали выработку IL-1β, в то время как в культуральной жидкости клеток макрофагов, инфицированных штаммами pXO1⁺, наблюдались высокие уровни IL-1β даже спустя 24 ч после заражения. Концентрация IL-1β в культуральной жидкости была выше в 600 раз при инфицировании макрофагов диплазмидными вирулентными штаммами *B. anthracis* pXO1⁺, pXO2⁺ и в 228 раз выше при использовании атипичных штаммов с фенотипом Cap(CO₂)⁺(O₂)⁺Tox⁻ProtA⁻Hly⁻Lec⁻Trp⁻. Моноплазмидные штаммы *B. anthracis*, лишенные плазмиды капсулообразования, вызывали повышение уровня IL-1β, по сравнению с бесплазмидными, в 400 раз. Штаммы *B. anthracis*, не обладающие плазмидой pXO1: 228/4 (pXO1⁻, pXO2⁻) и 1CO RBA9-1 [24] (pXO1⁻, pXO2⁺), практически не стимулировали выработку IL-1β, вызывали очень низкую секрецию IL-1α, IL-6, MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, IL-12 (p70) и активную продукцию G-CSF (рис.). Уровень гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF) при воздействии на макрофаги штаммами *B. anthracis* (pXO1⁻, pXO2⁺) был в 13 раз выше, чем у диплазмидных вирулентных и в 3 раза выше, чем у моноплазмидных штаммов, имеющих только плазмиду токсинообразования, и бесплазмидных штаммов. G-CSF является многофункциональным цитокином и стимулирует клеточную пролиферацию, усиливает гемопоэз, вызывает антиапоптотические и противовоспалительные эффекты. Нам не удалось найти литературных данных о зависимости продукции G-CSF от вирулентных свойств инфицирующих штаммов *B. anthracis*, однако в ряде исследований [4, 7] описано, что введение зараженным сибирской язвой животным дополнительных доз G-CSF помогало им справиться с инфекцией за счет стимуляции эритропоэза и снижения эффекта развития токсического шока. Исходя из этого можно ожидать, что культура макрофагов, инфицированная диплазмидными штаммами сибирезавязного микроба, будет продуцировать большее количество G-CSF, однако в эксперименте мы наблюдали противоположную картину: наибольшую продукцию G-CSF вызывали

штаммы, у которых отсутствовали одна или обе плазмиды вирулентности. Заметная разница была выявлена и в концентрации IL-12, который влияет на клеточный иммунитет и повышает цитотоксичность макрофагов. Его концентрация при воздействии диплоидных штаммов (pXO1⁺, pXO2⁺) превышала аналогичные значения бесплазмидных (в 6,5 раза) и моноплазмидных штаммов (в 3 раза).

Типичные диплоидные штаммы *B. anthracis* 81/1, 1CO, 140 P Cap⁻ б.м., относящиеся к основной генетической группе А, вызывали высокий уровень секреции IL-1β, IL-6, MCP-1, G-CSF, MIP-1α, MIP-1β, IL-12 (p70), которые являлись доминирующими в цитокиновом профиле их культуральных фильтратов на фоне менее выраженных фракций других цитокинов, экспрессируемых макрофагами. Диплоидные штаммы *B. anthracis* 1CO-S, 14/41-1aSM, 12/16-S с атипичным капсулообразованием по своей способности стимулировать выработку макрофагами цитокинов мало отличались от других диплоидных и моноплазмидных (pXO1⁺, pXO2⁻) штаммов *B. anthracis*. Доминирующими по концентрации в культуральной жидкости были IL-1β, IL-6, MCP-1, G-CSF, MIP-1α, MIP-1β, IL-12 (p70). При использовании штамма *B. anthracis* 14/41 1aSM в фильтрате культуральной жидкости отсут-

ствовал G-CSF. Для группы моноплазмидных (pXO1⁺, pXO2⁻) штаммов *B. anthracis* — 140 P Cap⁻, 14/41 Trpt⁺, 1CO-S Cap⁻, 228/8 характерна высокая продукция IL-1β, IL-6, MCP-1 (MCAF), MIP-1α, MIP-1β, G-CSF (рис.).

Данное исследование является первым опытом по определению влияния генетических и фенотипических особенностей штаммов *B. anthracis* на видовой состав цитокинов и временных параметров секреторной активности макрофагов. Сопоставление цитокиновых профилей фильтратов культуральной среды при использовании различающихся по свойствам штаммов *B. anthracis* позволяет констатировать отсутствие IL-1β в фильтратах штаммов *B. anthracis* с отсутствием плазмиды pXO1 (pXO1⁻, pXO2⁻ и pXO1⁻, pXO2⁺). Интересным является отсутствие MCP-1 в фильтратах штаммов *B. anthracis* 14/41 Trpt⁺ и 14/41-1aSM. Анализ цитокиновых спектров фильтратов культуральной жидкости, полученных при инфицировании штаммами *B. anthracis* 228 и 228 прот., выявил, что они были практически идентичны. Указанные штаммы являются диплоидными, но исходный штамм 228 является умеренно вирулентным [1] с фенотипом Cap(CO₂)⁺(O₂)⁻Tox⁻ProtA-Hly⁻Lec⁻Trp⁻, а выделенный из его популяции штамм 228 прот. относится по той же классификации к высоко вирулентным и име-

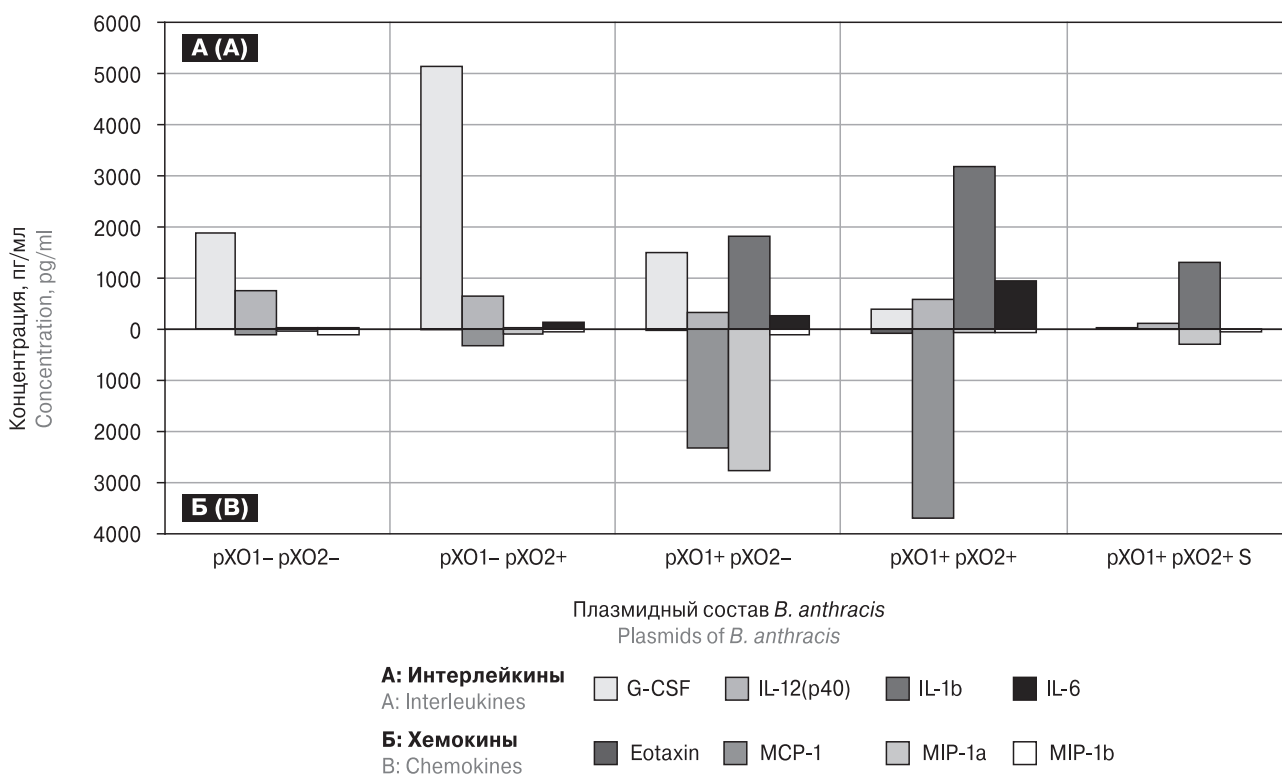


Рисунок. Концентрация цитокинов в культуральной жидкости при инфицировании линии макрофагоподобных клеток J774A штаммами *B. anthracis* с разным плазмидным составом

Figure. Concentration of cytokines in the culture fluid upon infection of the J774A macrophage-like cell line with *B. anthracis* strains with different plasmid composition

ет фенотип $\text{Cap}(\text{CO}_2)^+(\text{O}_2)^- \text{Tox}^+ \text{ProtA}^+ \text{Hly}^+ \text{Lec}^- \text{Trp}^+$. Возможно, метод определения токсинообразования на среде СОПЭК [1] является недостаточно чувствительным, и производимая на невысоком уровне продукция токсина достаточна тем не менее для стимуляции выработки цитокинов. Штаммы с атипичным капсулообразованием в атмосфере воздуха с фенотипом $\text{Cap}(\text{CO}_2)^+(\text{O}_2)^+ \text{Tox}^- \text{ProtA}^- \text{Hly}^- \text{Lec}^- \text{Trp}^-$ также не отличались по способности стимулировать выработку цитокинов от высоковирулентных штаммов. Капсула, наряду с летальным и отечным токсинами, относится к основным факторам вирулентности *B. anthracis*, но у штаммов, лишенных плазмиды вирулентности pXO1 , ее продукция нарушена, так как главным регулятором синтеза капсулы является ген *atxA*, локализованный на плазмиде pXO1 через положительную регуляцию генов *acpA* и *acpB* [13], поэтому штаммы, лишенные плазмиды токсинообразования, даже при наличии у них плазмиды капсулообразования, вызывают слабый цитокиновый ответ у клеток инфицированной культуры макрофагов.

Выводы

Выявлена зависимость секретируемых макрофагальными клетками цитокинов от плазмидного состава заражающих штаммов *B. anthracis* при моделировании сибиреязвенной инфекции *in vitro*. Наличие плазмиды pXO1 оказывает мощный стимулирующий эффект на выработку цитокинов макрофагами клеточной линии J774A. Цитокин IL-1 β активно продуцируется макрофагальными клетками в ответ на синтез факторов вирулентности сибиреязвенного микроба — летального и отечного токсинов и капсулы. Поэтому значительная выработка IL-1 β наблюдается при заражении макрофагов вирулентными диплозмидными штаммами *B. anthracis*. Выработка G-CSF не за-

висела от наличия плазмид вирулентности у штаммов сибиреязвенного микроба, использованных для заражения, и, по всей видимости, является результатом воздействия факторов, имеющих хромосомную детерминацию. Штаммы *B. anthracis*, не обладающие плазмидой pXO1 , практически не стимулировали выработку IL-1 β , вызывали очень низкую секрецию IL-1 α , IL-6, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-12 (p70) и активную продукцию G-CSF. Низкий цитокиновый ответ клеток макрофагов при заражении моноплазмидными штаммами, имеющими только плазмиду капсулообразования, обусловлен, вероятно, не только отсутствием бинарного токсина, но и нарушениями в регуляции синтеза капсулы, связанными с отсутствием гена *atxA*. Диплазмидные штаммы *B. anthracis* за счет выработки главных факторов вирулентности — бинарного токсина и капсулы — вызывают у макрофагов (в эксперименте) активную продукцию IL-1 β , IL-6, MCP-1, G-CSF, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-12 (p70). Штаммы, обладающие умеренной вирулентностью и способные к капсулообразованию на воздухе, по воздействию на культуру макрофагов *in vitro* практически не отличались от высоковирулентных штаммов.

Представляет интерес дальнейшее изучение временной динамики изменений цитокинового профиля макрофагов при моделировании сибиреязвенной инфекции *in vitro* в зависимости от биологических характеристик изучаемых штаммов *B. anthracis*.

Благодарности

Авторы выражают благодарность зав. лабораторией диагностики вирусных инфекций ФКУЗ Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт, к.б.н. Волинкиной А.С. и с.н.с. той же лаборатории Лисицкой Я.В. за предоставленную клеточную культуру макрофагов.

Список литературы/References

1. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней: практ. рук. / Под ред. Г.Г. Онищенко, В.В. Кутырева; изд. 2-е, перераб. и доп. М.: ЗАО «Шико», 2013. 560 с. [Laboratory diagnosis of dangerous infectious diseases. Practical guide / Eds.: G.G. Onishchenko, V.V. Kutyrev. 2nd ed., revised and expanded. Moscow: CJSC «Shiko», 2013. 560 p. (In Russ.)]
2. Онищенко Г.Г., Васильев Н.Г., Литусов Н.В., Харченко А.Т., Васильев П.Г., Садовой Н.В., Кожухов В.В. Сибирская язва: актуальные аспекты микробиологии, эпидемиологии, клиники, диагностики, лечения и профилактики. М.: ВУНМЦ МЗ РФ, 1999. 448 с. [Onishchenko G.G., Vasil'ev N.T., Litusov N.V., Kharchenko A.T., Vasil'ev P.G., Sadovoi I.V., Kozhukhova V.V. Anthrax: actual aspects of microbiology, epidemiology, clinical features, diagnostics and prophylaxis. Moscow: VUNMTs MZ RF, 1999. 448 p. (In Russ.)]
3. Цыганкова О.И., Еременко Е.И., Цыганкова Е.А., Буравцева Н.П., Рязанова А.Г. Фенотипические и генетические особенности культурально-морфологических вариантов *Bacillus anthracis* // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2008. № 4. С. 6–11. [Tsygankova O.I., Eremenko E.I., Tsygankova E.A., Buravtseva N.P., Ryazanova A.G. Phenotypic and genetic features of cultural and morphological variants of *Bacillus anthracis*. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology, 2008, no. 4, pp. 6–11. (In Russ.)]
4. Chang H.H., Wang T.P., Chen P.K., Lin Y.Y., Liao C.H., Lin T.K., Chiang Y.W., Lin W.B., Chiang C.Y., Kau J.H., Huang H.H., Hsu H.L., Liao C.Y., Sun D.S. Erythropoiesis suppression is associated with anthrax lethal toxin-mediated pathogenic progression. PLoS One, 2013, vol. 8, no. 8: e71718. doi: 10.1371/journal.pone.0071718

5. Drysdale M., Bourgogne A., Hilsenbeck S.G., Koechler T.M. AtxA controls Bacillus anthracis capsule synthesis via acpA and a newly discovered regulator acpB. *J. Bacteriol.*, vol. 186, no. 2, pp. 307–315. doi: 10.1128/JB.186.2.307-315.2004
6. Duesbery N.S., Webb C.P., Leppla S.H., Gordon V.M., Klimpel K.R., Copeland T.D., Ahn N.G., Oskarsson M.K., Fukasawa K., Paull K.D., Vande Woude G.F. Proteolytic inactivation of MAP-kinase-kinase by anthrax lethal factor. *Science*, 1998, vol. 280, no. 5364, pp. 734–737. doi: 10.1126/science.280.5364.734
7. Erwin J.L., DaSilva L.M., Bavari S., Little S.F., Friedlander A.M., Chanh T.C. Macrophage-derived cell lines do not express proinflammatory cytokines after exposure to Bacillus anthracis lethal toxin. *Infect. Immun.*, 2001, vol. 69, no. 2, pp. 1175–1177. doi: 10.1128/IAI.69.2.1175-1177.2001
8. Green B.D., Battisti L., Koehler T.M., Thorne C.B., Ivins B.E. Demonstration of a capsule plasmid in Bacillus anthracis. *Infect. Immun.*, 1985, vol. 49, no. 2, pp. 291–297. doi: 10.1128/iai.49.2.291-297.1985
9. Hanna P.C., Acosta D., Collier R.J. On the role of macrophages in anthrax. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, no. 21, pp. 10198–10201. doi: 10.1073/pnas.90.21.10198
10. Mikesell P., Ivins B.E., Ristroph J.D., Dreier T.M. Evidence for plasmid-mediated toxin production in Bacillus anthracis. *Infect. Immun.*, 1983, vol. 39, no. 1, pp. 371–376. doi: 10.1128/iai.39.1.371-376.1983
11. Missiakas D., Schneewind O. Assembly and function of the Bacillus anthracis S-layer. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2017, vol. 71, pp. 79–98. doi: 10.1146/annurev-micro-090816-093512
12. Moayeri M., Leppla S.H., Vrentas C., Pomerantsev A.P., Liu S Anthrax pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2015, vol. 69, pp. 185–208. doi: 10.1146/annurev-micro-091014-104523
13. Zakowska D., Bartoszcze M., Niemcewicz M., Bielawska-Drózd A., Kocik J. New aspects of the infection mechanisms of Bacillus anthracis. *Ann. Agric. Environ. Med.*, 2012, vol. 19, no. 4, pp. 613–618.

Авторы:

Котенева Е.А., к.б.н., зав. лабораторией постгеномных технологий ФКУЗ Ставропольский противочумный институт, г. Ставрополь, Россия; доцент базовой кафедры микробиологии ФГАОУ ВО Северо-Кавказский федеральный университет, г. Ставрополь, Россия;

Цыганкова О.И., д.м.н., врач-бактериолог лаборатории бруцеллеза ФКУЗ Ставропольский противочумный институт, г. Ставрополь, Россия;

ЩербакOVA В.Ю., младший научный сотрудник лаборатории постгеномных технологий ФКУЗ Ставропольский противочумный институт, г. Ставрополь, Россия;

Калинин А.В., биолог лаборатории постгеномных технологий ФКУЗ Ставропольский противочумный институт, г. Ставрополь, Россия;

Родионов И.С., м.н.с. лаборатории постгеномных технологий ФКУЗ Ставропольский противочумный институт, г. Ставрополь, Россия;

Сердюков В.В., лаборант-исследователь лаборатории постгеномных технологий ФКУЗ Ставропольский противочумный институт, г. Ставрополь, Россия;

Абрамович А.В., младший научный сотрудник лаборатории постгеномных технологий ФКУЗ Ставропольский противочумный институт, г. Ставрополь, Россия;

Куличенко А.Н., член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор, директор ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия.

Authors:

Koteneva E.A., PhD (Biology), Head of the Laboratory of Postgenomic Technologies, Stavropol Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor, Stavropol, Russian Federation; Associate Professor, Basic Department of Microbiology, North Caucasus Federal University, Stavropol, Russian Federation;

Tsygankova O.I., PhD, MD (Medicine), Bacteriologist, Laboratory of Brucellosis, Stavropol Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor, Stavropol, Russian Federation;

Shcherbakova V.Yu., Junior Researcher, Laboratory of Postgenomic Technologies, Stavropol Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor, Stavropol, Russian Federation;

Kalinin A.V., Biologist, Laboratory of Postgenomic Technologies, Stavropol Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor, Stavropol, Russian Federation;

Rodionov I.S., Junior Researcher, Laboratory of Postgenomic Technologies, Stavropol Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor, Stavropol, Russian Federation;

Serdyukov V.V., Laboratory Assistant — Researcher, Laboratory of Postgenomic Technologies, Stavropol Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor, Stavropol, Russian Federation;

Abramovich A.V., Junior Researcher, Laboratory of Postgenomic Technologies, Stavropol Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor, Stavropol, Russian Federation;

Kulichenko A.N., RAS Corresponding Member, PhD, MD (Medicine), Professor, Director of the Stavropol Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor, Stavropol, Russian Federation.

ГУМОРАЛЬНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ ПОСЛЕ ИММУНИЗАЦИИ МОРСКИХ СВИНОК ВАКЦИННЫМ ПРЕПАРАТОМ НА ОСНОВЕ ВИРУСА ПУУМАЛА

С.С. Курашова¹, М.В. Баловнева¹, А.А. Ишмухаметов^{1,2}, Р.Д. Теодорович¹,
Ю.В. Попова¹, Е.А. Ткаченко¹, Т.К. Дзагурова¹

¹ ФГАНУ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов
им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва, Россия

² Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет),
Москва, Россия

Резюме. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) занимает в РФ ведущее место среди природноочаговых инфекций. Вакцина против ГЛПС находится на стадии доклинических и клинических испытаний. Для возбудителей ГЛПС отсутствует лабораторная модель инфекции, поэтому иммуногенность вакцины определяют по индукции нейтрализующих вирус антител (НАТ). Цель исследования — анализ влияния схемы дозирования иммуногена на динамику титра НАТ на модели морских свинок после введения экспериментального хантавирусного вакцинного препарата (ХВП) на основе вируса Пуумала. Количественная оценка нейтрализующих антител в реакции нейтрализации по 50%-му подавлению фокособразующих единиц (РН/ФОЕ₅₀) в культуре клеток Vero представлена в виде средней геометрической величины титра антител, выраженной в двоичных логарифмах (log₂). Двукратную иммунизацию морских свинок проводили с интервалом 14 дней, бустерное введение — на 182 день, по 0,3 мл в мышечную ткань бедра в неразведенном виде (ХВП-н/р) и в разведении 1/10 (ХВП-1/10). Для определения НАТ кровь отбирали каждые 14 дней. Через 14 дней после первой иммунизации ХВП-н/р НАТ определялись в титре 5,5±0,3, а для ХВП-1/10 — 4,8±0,3 (p < 0,0001). После второй иммунизации ХВП-н/р и ХВП-1/10 максимальное увеличение НАТ наблюдали до 9±0,2 на 42 день, и 6,5±0,2 на 14 день соответственно. В дальнейшем наблюдалось снижение титра НАТ до 6,2±0,3 и 5±0,3 к 308 дню после первой иммунизации. Бустерное введение ХВП-н/р индуцировало повышение уровня НАТ до 9,5±0,3, а ХВП-1/10 — до 6,5±0,3. Стоит отметить, что после бустерного введения наблюдалась индукция статистически значимо более высоких значений НАТ на 238 день после первой иммунизации ХВП-н/р и на 294 день после ХВП-1/10, с последующей тенденцией к их снижению. Результаты исследования свидетельствуют о раннем формировании иммунного ответа, интенсивность которого зависела от дозы вводимого иммуногена. Бустерное введение иммуногена через 3 месяца от начала иммунизации существенно усиливало иммунный ответ пропорционально вводимой дозе иммуногена. Длительное персистирование НАТ после двукратной иммунизации указывает на возможность применения бустерного введения иммуногена через год.

Адрес для переписки:

Курашова Светлана Сергеевна
108819, Россия, Москва, пос. Московский, п. Института
полиомиелита, двлд. 8, корп. 1, ФГАНУ Федеральный научный
центр исследований и разработки иммунобиологических
препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита).
Тел.: 8 965 309-32-41.
E-mail: svetlanak886@yandex.ru

Contacts:

Svetlana S. Kurashova
108819, Russian Federation, Moscow, Settlement "Moskovskiy",
Village of Institute of Poliomyelitis, Premises 8, build. 1, Chumakov
Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-
and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute
of Poliomyelitis).
Phone: +7 965 309-32-41.
E-mail: svetlanak886@yandex.ru

Для цитирования:

Курашова С.С., Баловнева М.В., Ишмухаметов А.А., Теодорович Р.Д.,
Попова Ю.В., Ткаченко Е.А., Дзагурова Т.К. Гуморальный иммунный
ответ после иммунизации морских свинок вакцинным препаратом
на основе вируса Пуумала // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 5.
С. 971–975. doi: 10.15789/2220-7619-IRE-1956

Citation:

Kurashova S.S., Balovneva M.V., Ishmukhametov A.A., Teodorovich R.D.,
Popova Yu.V., Tkachenko E.A., Dzagurova T.K. Immune response evaluation
in the guinea pigs after immunization with the experimental Puumala virus
vaccine // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet,
2022, vol. 12, no. 5, pp. 971–975. doi: 10.15789/2220-7619-IRE-1956

Данные эксперимента позволяют подобрать оптимальную схему вакцинации (дозу и время бустерного введения иммуногена). Иммунологическая эффективность и протективная активность такой схемы вакцинации может быть оценена только по результатам клинических испытаний.

Ключевые слова: геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, вирус Пуумала, хантавирусный вакцинный препарат, схема вакцинации, нейтрализующие антитела, иммунный ответ.

IMMUNE RESPONSE EVALUATION IN THE GUINEA PIGS AFTER IMMUNIZATION WITH THE EXPERIMENTAL PUUMALA VIRUS VACCINE

Kurashova S.S.^a, Balovneva M.V.^a, Ishmukhametov A.A.^{a,b}, Teodorovich R.D.^a, Popova Yu.V.^a, Tkachenko E.A.^a, Dzagurova T.K.^a

^a Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

^b Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Abstract. In the Russian Federation, the vaccine against hemorrhagic fever with renal syndrome is at the stage of preclinical and clinical trials. The aim of the study was to analyze an effect of vaccine schedule on neutralizing antibodies (nAB) dynamics in guinea pig models applied with experimental Puumala virus based hantavirus vaccine (HV). Quantitative evaluation of neutralizing antibodies was presented as antibody titer geometric mean expressed in binary logarithms (\log_2) by the 50% reduction of focus-forming units (FRNT₅₀) in Vero cell in the focus reduction neutralization test. The HV dual inoculation to guinea pigs was carried out in 14 day intervals, booster injection was applied on day 182 after the onset, in the thigh muscle tissue by using 0.3 ml undiluted (HV-u/d) and in the 1/10 dilution (HV-1/10). nAB titer on day 14 after the first HV-u/d and HV-1/10 injection was measured to be at titer of 5.5 ± 0.3 and 4.8 ± 0.3 , respectively. After the second injection, the nAB peak was as high as 9 ± 0.2 on day 42 after the first HV-u/f injection, and 6.5 ± 0.2 on day 14 after the HV-1/10 injection. nAB decreased down to 6.2 ± 0.3 and 5 ± 0.3 , respectively, on day 364 after the first injection. The booster HV-u/d and HV-1/10 injection induced increase in nAB up to 9.5 ± 0.3 and 6.5 ± 0.3 , respectively. After the booster injection, it induced significantly higher nAB observed on day 238 after the first HV-u/d injection and delayed up to the 294 day for the HV-1/10. The results of the study indicated the early formation of the immune response, long-term nAB persistence and significantly enhanced immune response after the booster injection on day 182, which indicated a potential for the booster injection a year later. The immunological efficacy and protective activity of the vaccine schedule may be finally assessed according to the results of clinical trials.

Key words: hemorrhagic fever with renal syndrome, Puumala virus, hantavirus vaccine, vaccination schedule, neutralizing antibodies, immune response.

Введение

Хантавирус Пуумала является одним из шести возбудителей геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС). Патогенные хантавирусы в составе рода *Orthohantavirus* входят в семейство *Hantaviridae*, порядок *Bunyavirales* [11]. Более 97% всех случаев геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС) в России этиологически обусловлены вирусом Пуумала, около 3% — другими 5 возбудителями ГЛПС — вирусами Хантаан, Сеул, Амур, Куркино и Сочи [10], что указывает на ведущую этиологическую роль вируса Пуумала в структуре заболеваемости ГЛПС в России.

Отсутствие тенденции к снижению заболеваемости ГЛПС, расширение ареала инфекции, отсутствие специфических средств лечения и малая эффективность неспецифической профилактики обуславливают социальную и медицинскую значимость внедрения вакцины для профилактики ГЛПС [10].

Успех вакцинации зависит от качества, величины и длительности генерируемого адап-

тивного иммунного ответа, что в свою очередь зависит от схемы дозирования иммуногена [5].

В последние годы наблюдается тенденция пересмотра схем дозирования вакцин, используемых на регулярной основе, как это произошло с вакциной Превенар 13® (Pfizer) для профилактики пневмококковой инфекции, с установленной оптимальной схемой введения двух доз с двухнедельным интервалом и третьей в качестве бустера [6]. Подобному пересмотру подверглись схемы введения вакцин Imovax® (Sanofi Pasteur) против полиомиелита, RabAvert® (Novartis Vaccines and Diagnostics GmbH) против бешенства человека с целью сокращения количества доз вакцины с 5 до 4 доз [9]; для Gardasil®9 (Merck), четырехвалентной Gardasil® (Merck) и двухвалентной Cervarix® (GlaxoSmithKline) против вируса папилломы человека — с 3 доз до 2 в возрасте до 15 лет [8].

В этой связи целесообразно подбирать оптимальную схему дозирования вакцин для поддержания приемлемого уровня защитных гуморальных антител до выхода на клиничес-

кие испытания, позволив избежать пересмотра схемы вакцинации в будущем. Как было показано в предыдущих исследованиях, уровень нАТ у мышей BALB/c после иммунизации кандидатными вакцинами для профилактики ГЛПС после двух иммунизаций с двухнедельными интервалами не отличался от такового после трех иммунизаций с тем же интервалом. В результате оптимальной схемой дозирования для последующих экспериментов было принято применение двукратной иммунизации с третьей в виде бустерного введения [7].

Морские свинки (*Cavia porcellus*) представляют собой ценную и подтвержденную экспериментальную модель животных из-за ряда биологических сходств с людьми [2]. Использование морских свинок позволяет сократить количество экспериментальных животных, при этом позволяет увеличить длительность эксперимента до 3 лет. Для возбудителей ГЛПС отсутствует лабораторная модель инфекции, поэтому иммуногенную активность вакцинного препарата определяют по индукции нейтрализующих вирус антител. Таким образом целесообразность проведения экспериментов по оценке иммуногенности вакцинного препарата на морских свинках обусловлена возможностью оценить продолжительность иммунного ответа и влияние бустерного введения вакцины.

Целью данного исследования было изучение динамики нейтрализующих антител в сыворотках крови морских свинок в ответ на введение хантавирусного вакцинного препарата на основе вируса Пуумала с разной схемой дозирования иммуногена.

Материалы и методы

Хантавирусный вакцинный препарат (ХВП) был получен на основе штамма PUU-TKD-VERO вируса Пуумала (ПУУ) по ранее описанной технологии [1]. Хроматографически очищенный на сорбенте Capto Core 700 (GE Healthcare) полуфабрикат с титром вируса $3,7 \pm 0,5$ lg ФОЕ/мл и 2×10^4 копий РНК/мл инактивировали бета-пропиолактоном в разведении 1/6000. ХВП вводили по 0,3 мл в мышечную ткань бедра морских свинок в неразведенном виде (ХВП-н/р) и в разведении 1/10 (ХВП-1/10). Самки морских свинок были случайным образом распределены по 3 в каждой группе, содержались согласно ГОСТ 33216-2014. Иммунизировали свинок по схеме: 2 иммунизации (I-ИМ, II-ИМ) с двухнедельным интервалом и бустерное введение (БВ) на 182 день, забор крови каждые 14 дней от момента первой иммунизации пункцией сердца. Каждая проба сыворотки крови трехкратно исследована в реакции нейтрализации (РН) в культуре

клеток Vero E6. Результат представлен в виде среднегеометрического значения титра (СГТ) нАТ в двоичных логарифмах по 50% редукции числа фокусобразующих единиц (ФОЕ) [3]. Для количественной оценки РНК в вакцинном материале использовали ПЦР в режиме реального времени со штаммоспецифичными праймерами Ufa F_R, и зондом Ufa Z [4].

Статистический анализ. Полученные результаты анализировали в программе GraphPad Prism 9.4.1. Статистическую значимость различий определяли с помощью одностороннего ANOVA с тестом множественных сравнений Тьюка.

Результаты

В контрольных группах, так же, как и в экспериментальных группах, нАТ до иммунизации не выявлены в сыворотках крови, начиная с разведения 1/2. За приемлемый уровень нАТ принимали СГТ выше $4,32 \pm 0,2 \log_2$ (рис.). Нейтрализующие антитела были выявлены у всех животных во всех экспериментальных группах в ответ на введение ХВП.

Через 2 недели после I-ИМ наблюдали статистически значимый подъем титра нАТ по сравнению с контрольной группой. Более выраженный иммунный ответ наблюдали в группе ХВП-н/р (СГТ = $5,5 \pm 0,3$) в сравнении с ХВП-1/10 (СГТ = $4,8 \pm 0,3$) с достоверной статистической разницей в титре нАТ ($p < 0,0001$) (рис.).

После II-ИМ в группе ХВП-н/р максимальное нарастание нАТ зафиксировано на 56 день (СГТ = $9 \pm 0,2$) с постепенным снижением титра к 238 дню до $6,2 \pm 0,2$. На этом уровне антитела оставались до 322 дня с последующим снижением до $5,2 \pm 0,3$ к концу срока наблюдения. Бустерное введение ХВП на 182 день стимулировало иммунный ответ: максимальные титры антител, зафиксированные через 56 дней (238 дней после I-ИМ), достоверно превышали таковые после II-ИМ (СГТ = $9,48 \pm 0,3$) ($p = 0,001$). К концу срока наблюдения уровень нАТ снижался до $7 \pm 0,3$, статистически достоверно превышая таковой без бустерного введения ХВП-н/р (рис., А).

В группе ХВП-1/10 после II-ИМ максимальное нарастание нАТ зафиксировано на 28 день (СГТ = $6,5 \pm 0,3$), к 56 дню наблюдалось снижение титра нАТ и далее, в течение 10 месяцев, наблюдалось некое плато с низким титром нАТ (СГТ = $5 \pm 0,3$). Десятикратное снижение антигенной нагрузки все еще индуцировало иммунный ответ, хотя и на предельно низких значениях титра нАТ (рис., Б). Бустерное введение ХВП-1/10 характеризовалось медленным подъемом нАТ в течение 4-х месяцев до максимальных титров $7,5 \pm 0,2$ (на 294 день после I-ИМ), которые

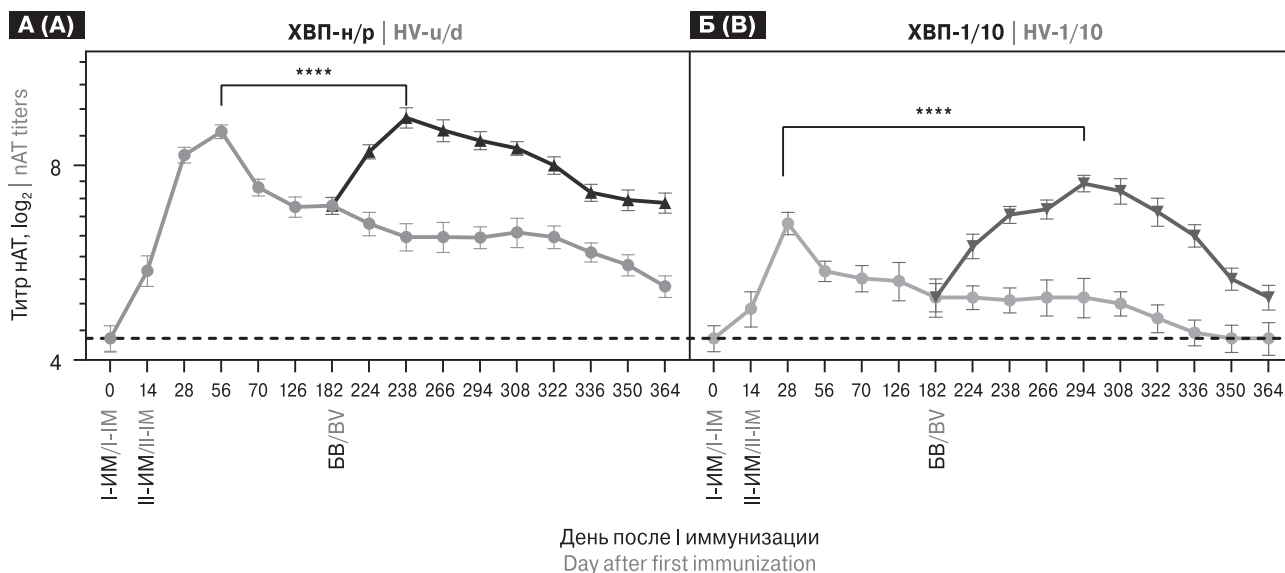


Рисунок. Средние титры nAT в сыворотках крови морских свинок после первой (I-ИМ), второй (II-ИМ) иммунизаций и бустерного введения (БВ)

Figure. Mean nAb titers in guinea pigs blood sera after the first (I-IM), second (II-IM) and booster (BV) inoculation

Примечание. Средние титры nAT в сыворотках крови морских свинок после первой (I-ИМ), второй (II-ИМ) иммунизаций и бустерного введения (БВ). Образцы крови получали в указанные временные интервалы. В дни 0, 14 и 182 образцы крови собирали перед иммунизацией. Экспериментальные группы: А — XВП-н/р; XВП-н/р-БВ; Б — XВП-1/10; XВП-1/10-БВ и контрольная группа (КГ). Титры nAT определяли методом РН/ФОЕ₅₀. ns — несущественно, ****p < 0,0001. Данные показывают средние геометрические титры nAT против вируса Пуумала в группе с 95% доверительными интервалами.

Note. Mean nAT titers in guinea pigs blood sera after the first (I-IM), second (II-IM) immunizations and booster administration (BV). Blood samples were collected at the indicated time intervals. On days 0, 14 and 182, blood samples were collected prior to immunization. Experimental groups: A — HV-u/d; HV-u/d-BV; B — HV-1/10; HV-1/10-BV and control group (CG). nAT titers were measured by the FRNT₅₀ method. ns — not significant, ****p < 0.0001. The data are shown as geometric mean nAb titers against Puumala virus in the group with 95% confidence intervals.

оставались достоверно ниже таковых после бустерного введения XВП-н/р. Также постепенно снижался титр nAT и к концу наблюдения составил $5 \pm 0,2$, сравнившись с титром nAT после двукратного введения XВП-н/р без бустерного введения.

Полученные результаты позволяют сделать следующие выводы:

1. Интенсивность гуморального иммунного ответа прямо пропорциональна дозе вводимого иммуногена.

2. Выраженная динамика нарастания nAT после бустерного введения в сравнении с ответом после I-ИМ и II-ИМ указывает на формирование устойчивой иммунной памяти.

3. Бустерное введение иммуногена можно рассматривать через год от начала иммунизации, принимая во внимание тот факт, что nAT все еще выявляются в эти сроки после двукратной иммунизации. Подтверждение этого положения должно быть получено в ходе клинических испытаний.

4. Для определенных групп населения (дети, пожилые люди, лица, имеющие хронические заболевания) возможно будет целесообразным использование низких доз иммуногена. Ограничением является величина протективной дозы вакцинного препарата, определить которую возможно только по результатам клинических испытаний.

Список литературы/References

1. Бархалева О.А., Воробьева М.С., Ладыженская И.П., Ткаченко Е.А., Дзагурова Т.К. Вакцина против геморрагической лихорадки с почечным синдромом // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2011. Т. 41, № 1. С. 27–30. [Barkhaleva O.A., Vorobyeva M.S., Ladizhenskaya I.P., Tkachenko E.A., Dzagurova T.K. Vaccine against hemorrhagic fever with kidney syndrome. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie* = *Biopreparations*, 2011, vol. 1, pp. 27–30. (In Russ.)]
2. Рыбакова А.В., Макарова М.Н. Использование морских свинок в биомедицинских исследованиях // Международный вестник ветеринарии. 2018. № 1. С. 132–137. [Rybakova A.V., Makarova M.N. The use of guinea pigs in biomedical research. *Mezhdunarodnyi vestnik veterinarii* = *International Veterinary Bulletin*, 2018, vol. 1, pp. 132–137 (In Russ.)]
3. Dzagurova T.K., Klempa B., Tkachenko E.A., Slyusareva G.P., Morozov V.G., Auste B., Kruger D.H. Molecular diagnostics of hemorrhagic fever with renal syndrome during a Dobrava virus infection outbreak in the European part of Russia. *J. Clin. Microbiol.*, 2009, vol. 47, no. 12, pp. 4029–4036. doi: 10.1128/JCM.01225-09

4. Egorova M.S., Kurashova S.S., Ishmukhametov A.A., Balovneva M.V., Devyatkin A.A., Safonova M.V., Ozherelkov S.V., Khapchaev Yu.Kh., Balkina A.S., Belyakova A.V., Dzagurova T.K., Tkachenko E.A. Real-time PCR assay development for the control of vaccine against hemorrhagic fever with renal syndrome. *Probl. Viral.*, 2021, vol. 66, no. 1, pp. 65–73. doi: 10.36233/0507-4088-30
5. Ghimire T.R. The mechanisms of action of vaccines containing aluminum adjuvants: an in vitro vs in vivo paradigm. *Springerplus*, 2015, vol. 4, no. 1, pp. 1–18.
6. Goldblatt D., Southern J., Andrews N. J., Burbidge P., Partington J., Roalfe L., Pinto V.M., Thalasselis V., Plestedd E., Richardson H., Snape M.D., Miller E. Pneumococcal conjugate vaccine 13 delivered as one primary and one booster dose (1+1) compared with two primary doses and a booster (2+1) in UK infants: a multicentre, parallel group randomised controlled trial. *Lancet Infect. Dis.*, 2018, vol. 18, no. 2, pp. 171–179. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30654-0
7. Kurashova S.S., Ishmukhametov A.A., Dzagurova T.K., Egorova M.S., Balovneva M.V., Nikitin N.A., Evtushenko E.A., Karpova O.V., Markina A.A., Aparin P.G., Tkachenko P.E., Lvov V.L., Tkachenko E.A. Various adjuvants effect on immunogenicity of Puumala virus vaccine. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2020, vol. 10: 545371. doi: 10.3389/fcimb.2020.545371
8. Meites E., Szilagyi P.G., Chesson H.W., Unger E.R., Romero J.R., Markowitz L.E. Human papillomavirus vaccination for adults: updated recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices. *Am. J. Transplant.*, 2019, vol. 19, no. 11, pp. 3202–3206. doi: 10.1111/ajt.15633
9. Mittal M.K. Revised 4-dose vaccine schedule as part of postexposure prophylaxis to prevent human rabies. *Pediatr. Emerg. Care*, 2013, vol. 29, no. 10, pp. 1119–1121. doi: 10.1097/PEC.0b013e3182a63125
10. Tkachenko E.A., Ishmukhametov A.A., Dzagurova T.K., Bernshtein A.D., Morozov V.G., Siniugina A.A., Kurashova S.S., Balkina A.S., Tkachenko P.E., Kruger D.H., Klempa B. Hemorrhagic fever with renal syndrome Russia. *Emerg. Infect. Dis.*, 2019, vol. 25, no. 12, pp. 2325–2328. doi: 10.3201/eid2512.181649
11. Vaheiri A., Strandin T., Hepojoki J., Sironen T., Henttonen H., Mäkelä S., Mustonen J. Uncovering the mysteries of hantavirus infections. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2013, vol. 11, no. 8, pp. 539–550.

Авторы:

Курашова С.С., к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории геморрагических лихорадок ФГАНУ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва, Россия;

Баловнева М.В., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории геморрагических лихорадок ФГАНУ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва, Россия;

Ишмухаметов А.А., академик РАН, д.м.н., профессор, генеральный директор ФГАНУ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва, Россия; руководитель кафедры организации и технологии иммунобиологических препаратов ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия;

Теодорович Р.Д., научный сотрудник лаборатории геморрагических лихорадок ФГАНУ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва, Россия;

Попова Ю.В., научный сотрудник лаборатории геморрагических лихорадок ФГАНУ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва, Россия;

Ткаченко Е.А., д.м.н., профессор, руководитель научного направления ФГАНУ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва, Россия;

Дзагурова Т.К., д.м.н., зав. лабораторией геморрагических лихорадок ФГАНУ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва, Россия.

Authors:

Kurashova S.S., PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Hemorrhagic Fevers, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russian Federation;

Balovneva M.V., PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Hemorrhagic Fevers, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russian Federation;

Ishmukhametov A.A., RAS Full Member, PhD, MD (Medicine), Professor, General Director, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russian Federation; Head of the Department of Organization and Research of Immunobiological Technologies, Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation;

Teodorovich R.D., Researcher, Laboratory of Hemorrhagic Fevers, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russian Federation;

Popova Yu.V., Researcher, Laboratory of Hemorrhagic Fevers, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russian Federation;

Tkachenko E.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Scientific Supervisor, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russian Federation;

Dzagurova T.K., PhD, MD (Medicine), Head of the Laboratory of Hemorrhagic Fevers, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 24.05.2022
Отправлена на доработку 28.07.2022
Принята к печати 20.08.2022

Received 24.05.2022
Revision received 28.07.2022
Accepted 20.08.2022

СЕКВЕНИРОВАНИЕ 16S-ITS-23S ФРАГМЕНТА РИБОСОМАЛЬНОГО ОПЕРОНА ОБЕСПЕЧИВАЕТ НЕОБХОДИМЫЕ И ДОСТАТОЧНЫЕ УСЛОВИЯ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКОБАКТЕРИЙ

О.Б. Огарков, С.Н. Жданова, Е.А. Орлова, П.А. Хромова, Н.Л. Белькова, В.В. Синьков, И.Г. Кондратов

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

Резюме. Введение. Секвенирование гена 16S рРНК является преобладающим методом количественной оценки состава микробных сообществ и молекулярной идентификации отдельных штаммов. При этом технология на основе коротких прочтений (секвенирование 2-го поколения) не позволяет выходить за рамки гена 16S рРНК, а уровень таксономической идентификации образцов обычно остается на уровне рода или даже семейства. В последние годы предлагается использование технологий длинных прочтений (Oxford Nanopore MinION, PacBio) для секвенирования ампликонов почти полного рибосомального оперона, включающего гены 16S, 23S, 5S и межрибосомальный транскрибируемый спейсер (ITS). К настоящему моменту этот подход изучен недостаточно, кроме того предполагает ПЦР-амплификацию весьма протяженного участка ДНК (более 4000 п.н.). **Материалы и методы.** Сбор штаммов нетуберкулезных микобактерий и их первичная идентификация осуществлена в 2019–2021 гг. Штаммы получены при высевае на среду Левенштейна–Йенсена положительных культур с бактериологического анализатора Bactec MGIT 960, не имеющих антигена МРТ64 в иммунохроматографическом тесте MGIT TB Identification Test (Becton Dickinson, США). Предварительная видовая идентификация штаммов осуществлена набором Speed-oligo Mycobacteria (Vircell, Испания) по протоколу производителя. В настоящей работе применяются как известные, так и разработанные вновь, универсальные бактериальные праймеры, фланкирующие почти полный ген 16S рРНК, ITS и начало гена 23S рРНК. **Результаты и обсуждение.** Секвенированием по Сэнгеру полученных ампликонов (около 2000 п.н.) показан уровень таксономической идентификации, достаточный для определения до вида 8 штаммов нетуберкулезных микобактерий, выделенных от людей, вызвавших клинически и бактериологически подтвержденные заболевания. Предложенная методика ПЦР-амплификации фрагмента бактериального оперона, содержащего большую часть гена 16S рРНК, весь ITS и начало гена 23S рРНК, рассматривается нами как апробация методического подхода по исследованию микробных сообществ из материала с высокой степенью деградации (некротических очагов и т. д.). Полученные результаты свидетельствуют о значительно большей разрешающей способности использованного подхода, чем классическое секвенирование гена 16S рРНК.

Ключевые слова: молекулярная таксономия бактерий, секвенирование, 16S, ITS, rRNA operon, Mycobacterium.

Адрес для переписки:

Огарков Олег Борисович
664003, Россия, г. Иркутск ул. Тимирязева, 16,
ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи
и репродукции человека.
Тел.: 8 (3952) 20-73-67. E-mail: obogarkov@yandex.ru

Contacts:

Oleg B. Ogarkov
664003, Russian Federation, Irkutsk, Timiryaseva str., 16,
Scientific Center for Family Health and Human
Reproduction Problems.
Phone: +7 (3952) 20-73-67. E-mail: obogarkov@yandex.ru

Для цитирования:

Огарков О.Б., Жданова С.Н., Орлова Е.А., Хромова П.А., Белькова Н.Л., Синьков В.В., Кондратов И.Г. Секвенирование 16S-ITS-23S фрагмента рибосомального оперона обеспечивает необходимые и достаточные условия для идентификации микобактерий // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 5. С. 976–980. doi: 10.15789/2220-7619-ROS-1871

Citation:

Ogarkov O.B., Zhdanova S.N., Orlova E.A., Khromova P.A., Belkova N.L., Sinkov V.V., Kondratov I.G. 16S-ITS-23S rRNA operon segment sequencing provides necessary and sufficient conditions for bacterial species-specific identification // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 5, pp. 976–980. doi: 10.15789/2220-7619-ROS-1871

Работа выполнена при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований 20-015-00078 А.

This work was supported by Russian Foundation for Basic Research grant 20-015-00078 A.

16S-ITS-23S rRNA OPERON SEGMENT SEQUENCING PROVIDES NECESSARY AND SUFFICIENT CONDITIONS FOR BACTERIAL SPECIES-SPECIFIC IDENTIFICATION

Ogarkov O.B., Zhdanova S.N., Orlova E.A., Khromova P.A., Belkova N.L., Sinkov V.V., Kondratov I.G.

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

Abstract. Introduction. Sequencing of the 16S rRNA gene is the predominant method for assessing microbial communities and strain molecular identification. The short reads (2nd generation sequencing)-based technology does not allow analysis beyond the 16S rRNA gene. The taxonomic verification level of samples usually remains at the genus or even family level. Currently, there have been proposed the latest versions of long-read technologies (Oxford Nanopore MinION, PacBio) for amplicon sequencing of near-complete ribosomal operon, including genes 16S, 23S, 5S, and internal transcribed spacer (ITS). At the moment, this approach has not been sufficiently studied, in addition, it involves PCR amplification of a very extended DNA region (more than 4000 bp-long). **Materials and methods.** The collection of non-tuberculous mycobacteria strains and their primary identification was carried out in the years 2019–2021. The strains were obtained by inoculation of positive cultures from the Bactec MGIT 960 bacteriological analyzer lacking MPT64 antigen in the MGIT TB Identification Test (Becton Dickinson, USA) on Lowenstein-Jensen medium. Preliminary species strain identification was carried out with the Speed-oligo Mycobacteria kit (Vircell, Spain) according to the manufacturer's protocol. In this work, both known and newly developed universal bacterial primers flanking the near-complete 16S rRNA gene, ITS, and the beginning of the 23S rRNA gene are used. In the present study, both known and newly developed universal bacterial primers are used to flank the near-complete 16S rRNA gene, ITS, and start of the 23S rRNA gene. **Results and discussion.** Sanger sequencing of the amplicons (about 2000 bp) obtained shows the taxonomic level sufficient to determine species up to 8 strains of non-tuberculous mycobacteria isolated from humans that caused clinically and bacteriologically confirmed diseases. The method proposed for PCR amplification of a bacterial operon a fragment containing most of the 16S rRNA gene, ITS, and the beginning of the 23S rRNA gene is considered by us as an approbation of a methodological approach to study microbial communities in material with a high degree of degradation (necrotic foci, etc.). The results obtained indicate a significantly higher resolution of the approach used than the classical 16S rRNA gene sequencing.

Key words: production of biofilms, sequencing, 16S, ITS, rRNA operon, Mycobacterium.

Введение

Ген 16S рНК десятилетиями используется для филогенетической классификации бактерий и архей. В этом отношении ген выделяется своей универсальностью, устойчивостью к горизонтальному переносу генов и высокой степенью сохранности [7, 15]. Высококонсервативные области перемежаются с высоковариабельными, что в ряде случаев позволяет проводить филогенетическую классификацию по видам и более высоким таксономическим уровням. Кроме того, этот ген оказался отличной мишенью для исследований, направленных на количественную оценку таксономического состава микробных сообществ с помощью высокопроизводительного секвенирования ампликонов ПЦР [6]. Праймеры обычно конструируются таким образом, чтобы они гибридизовались с участками консервативных сайтов, фланкирующих вариабельную область, это позволяет извлечь наиболее полную информацию при изучении микробных сообществ. Несмотря на свои многочисленные преимущества, ген 16S рНК имеет ограниченное количество филогенетически информативных сайтов. Филогенетический анализ на основе гена 16S рНК чувствителен к стохастической ошибке и демонстрирует разрешение, во многих случаях ограниченное родом микроорганизма [3, 5]. Нуклеотидная последовательность гена 16S рНК широко использу-

ется платформами на основе секвенирования коротких прочтений [4], однако эта технология не позволяет расширить рамки мишени [9]. Для секвенирования ампликонов полного рибосомального оперона в последние годы предлагается использование технологий длинных прочтений, таких как Oxford Nanopore MinION и PacBio [2, 9]. Этот подход позволяет включить в исследование гены 16S, 23S, 5S и межрибосомальный транскрибируемый спейсер (ITS). Область полного рибосомального оперона 16S-ITS-23S имеет в четыре раза больше вариабельности, чем одна только область 16S, и может использоваться для таксономической классификации на уровне вида, а в некоторых случаях на уровне штамма [2]. В настоящее время ведется активная работа по разработке инструментов для анализа результатов NGS микробных сообществ полных рибосомальных оперонов бактерий [10, 12], в том числе в очагах туберкулеза [11]. Существенным недостатком этого подхода является почти предельная для стандартной ПЦР длина ампликона (более 4000 п.н.), что может существенно исказить количественную оценку исследуемых видов при изучении микробных сообществ. Задачей настоящего исследования был дизайн и апробация эубактериальных праймеров для амплификации участка 16S-ITS-23S рибосомального оперона при длине ампликона около 2000 п.н., оптимальной для большинства коммерческих Taq-полимераз.

Таблица. Сравнительная идентификация секвенированием по Сэнгеру и тест-системой Speed-oligo «Mycobacteria»

Table. Sanger sequencing and the Speed-oligo test system of "Mycobacteria" for comparative identification

№ штамма Strain number	Мишень Target	Длина, п.н. Lenght	Сходство [NCBI Blastn, Genome DataBase; RefSeq; Mycobacteria (taxid:85007)] Similarity [NCBI Blastn, Genome DataBase; RefSeq; Mycobacteria (taxid:85007)]	Результат по тестам Speed-oligo Speed-oligo test result	Вид, определенный секвенированием Species determined by sequencing
MOT1	16S-ITS- 23S	1904	> 99% (1901/1904) <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> (36 штаммов) > 99% (1901/1904) <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> (36 strains)	<i>Mycobacterium avium</i> (MAC)	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> (MAC)
MOT2	16S-ITS- 23S	1900	> 99% (1898/1899) <i>Mycobacterium gordonae</i> (8 штаммов) > 99% (1898/1899) <i>Mycobacterium gordonae</i> (8 штаммов) > 99% (1891/1899) <i>Mycobacterium paragordonaе</i> (6 штаммов) > 99% (1891/1899) <i>Mycobacterium paragordonaе</i> (6 strains)	<i>Mycobacterium gordonae</i>	<i>Mycobacterium gordonae</i>
MOT3	16S-ITS- 23S	1960	100% (1960/1960) <i>Mycolicibacterium holsaticum</i> штамм M7 PROKKA 100% (1960/1960) <i>Mycolicibacterium holsaticum</i> M7 PROKKA strain 95% (1882/1960) <i>Mycolicibacterium gadium</i> strain JCM 12688 95% (1882/1960) <i>Mycolicibacterium gadium</i> strain JCM 12688	<i>Mycobacterium</i> spp.	<i>Mycolicibacterium holsaticum</i>
MOT4	16S-ITS- 23S	1475	> 99% (1473/1475) <i>Mycolicibacterium fortuitum</i> (27 штаммов) > 99% (1473/1475) <i>Mycolicibacterium fortuitum</i> (27 strains)	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	<i>Mycolicibacterium fortuitum</i>
MOT6	16S-ITS- 23S	1909	> 99% (1907/1909) <i>Mycobacterium paragordonaе</i> (6 штаммов) > 99% (1907/1909) <i>Mycobacterium paragordonaе</i> (6 strains)	<i>Mycobacterium gordonae</i>	<i>Mycobacterium paragordonaе</i>
MOT7	16S-ITS- 23S	1920	> 99% (1918/1920) <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> (32 штаммов) > 99% (1918/1920) <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> (32 strains) > 99% (1918/1920) <i>Mycobacterium bouchedurhonense</i> штамм DSM 45439 > 99% (1918/1920) <i>Mycobacterium bouchedurhonense</i> strain DSM 45439 > 99% (1918/1920) <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> (37 штаммов) > 99% (1918/1920) <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> (37 strains)	<i>Mycobacterium avium</i> (MAC)	<i>Mycobacterium avium</i> (MAC)
MOT8	16S-ITS- 23S	1917	> 99% (456/458) <i>Mycobacteroides abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i> (98 штаммов) > 99% (456/458) <i>Mycobacteroides abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i> (98 strains)	<i>Mycobacterium abscessus</i>	<i>Mycobacteroides abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>
MOT9	16S-ITS- 23S	1551	> 99% (1550/1551) <i>Mycobacterium mantenii</i> (6 штаммов) > 99% (1550/1551) <i>Mycobacterium mantenii</i> (6 strains)	<i>Mycobacterium intracellulare</i> (MAC)	<i>Mycobacterium mantenii</i> (MAC)

Материалы и методы

Сбор штаммов нетуберкулезных микобактерий и их первичная идентификация осуществлена в рамках некоммерческого сотрудничества с ОГБУЗ Иркутская Областная Туберкулезная Больница в 2019–2021 гг. Штаммы получены при высевах на среду Левенштейна–Йенсена положительных культур с бактериологического анализатора Vactec MGIT 960, не имеющих антигена МРТ64 в иммунохроматографическом тесте MGIT TB Identification Test (Becton Dickinson, США). Предварительная видовая идентификация штаммов осуществлена набором Speed-oligo Mycobacteria (Vircell, Испания) по протоколу производителя. Данный тест предполагает ПЦР амплификацию ДНК фрагментов 16S рРНК и ITS с последующей гибридизацией ампликонов с олигонуклеотидными зондами на хроматографической тест-полоске. Секвенирование по Сэнгеру фрагментов 16S-ITS-23S рРНК проведено на базе ЗАО «Евроген». В работе изначально планировалось использовать 9 культур нетуберкулезных микобактерий (MOT — Mycobacterium other than tuberculosis), однако одна из культур по результатам секвенирования по Сэнгеру была исключена, как смесь нескольких видов микроорганизмов. В дальнейшем исследовались 5 медленно растущих (MOT1, MOT2, MOT6, MOT7, MOT9) и 3 быстро растущих штамма микобактерий (MOT3, MOT4, MOT8).

ПЦР в течение 37 циклов выполняли с праймерами 27F и 189R (синтезированы ЗАО «Евроген») в концентрации 500 нмоль каждого с реактивами AmpliTaqGold 360 MasterMix (Applied Biosystems, США) в присутствии 1× раствора энхансера на амплификаторе CFX-96 (BioRad, США). Режим амплификации: 95°C — 10 мин, активация полимераза; 95°C — 60 с; 55°C — 30 с; 72°C — 120 с. Нами использована структура широко известного зубактериального праймера 27F 5'-AGAGTTTGGATCMTGGCTCAG [13, 14], берущего старт в начале гена 16S рРНК. Праймер 189R 5'-GGGAAGTGAACATCTHAGTA, гибридизующийся в начале гена 23S рРНК, сконструирован с учетом известной вариабельности гена 23S рРНК [8], структура праймера проверена в сервисах SILVA rRNA database (<https://www.arb-silva.de>) и Blastn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Список литературы/References

1. Bel'kova N.L., Parfenova V.V., Kostornova T.Ya., Denisova L.Ya., Zaichikov E.F. Microbial biodiversity in the water of lake Baikal. *Microbiology*, 2003, vol. 72, pp. 203–213. doi: 10.1023/A:1023224215929
2. Benítez-Páez A., Sanz Y. Multi-locus and long amplicon sequencing approach to study microbial diversity at species level using the MinION™ portable nanopore sequencer. *Gigascience*, 2017, vol. 6, no. 7, pp. 1–12. doi: 10.1093/gigascience/gix043
3. Brown J.R., Douady C.J., Italia M.J., Marshall W.E., Stanhope M.J. Universal trees based on large combined protein sequence data sets. *Nat. Genet.*, 2001, vol. 28, no. 3, pp. 281–285. doi: 10.1038/90129
4. Burke C.M., Darling A.E. A method for high precision sequencing of near full-length 16S rRNA genes on an Illumina MiSeq. *Peer J.*, 2016, vol. 4: e2492. doi: 10.7717/peerj.2492

Секвенирование по Сэнгеру выполнялось в ЦКП «Центр разработки прогрессивных персонализированных технологий здоровья» ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ (г. Иркутск), с использованием праймеров 27F, 189R и внутреннего 800L 5'-AGGATTAGATACCCTGGTAGTC (ген 16S рРНК) [1].

Результаты и обсуждение

Нуклеотидные последовательности фрагментов рибосомального оперона 16S-ITS-23S образцов MOT1, MOT2, MOT3, MOT4, MOT6, MOT7, MOT8, MOT9 размещены в GenBank под номерами MZ823582, MZ851786, MZ851787, MZ851788, MZ851789, MZ851790, MZ851791, MZ851792 соответственно. Как видно из таблицы, в одном случае (MOT3) в рамках предлагаемого подхода определен вид возбудителя, ранее не установленный коммерческим тестом Speed-oligo Mycobacteria (Vircell, Испания). В двух случаях (MOT6 и MOT9) изменена видовая принадлежность штамма. В остальных случаях наблюдалось совпадения результатов коммерческого теста с результатами секвенирования по Сэнгеру, при этом в двух случаях (MOT1 и MOT8) удалось провести идентификацию таксонов до подвида.

Заключение

Предложенная методика ПЦР амплификации фрагмента бактериального оперона, содержащего большую часть гена 16S рРНК, весь ITS и начало гена 23S рРНК, рассматривается нами как апробация методического подхода по исследованию микробных сообществ из материала с высокой степенью деградации (некротических очагов и т. д.). Полученные результаты свидетельствуют о значительно большей разрешающей способности использованного подхода, чем классическое секвенирование гена 16S рРНК. Авторы предполагают, что предложенный подход может получить в дальнейшем широкое распространение при исследовании микробных сообществ как секвенированием по Сэнгеру клонированных образцов, так и с помощью NGS-технологий длинных прочтений, таких как Oxford Nanopore MinION и PacBio.

5. Delsuc F., Brinkmann H., Philippe H. Phylogenomics and the reconstruction of the tree of life. *Nat. Rev. Genet.*, 2005, vol. 6, no. 5, pp. 361–375. doi: 10.1038/nrg1603
6. Doolittle W.F. Phylogenetic classification and the universal tree. *Science*, 1999, vol. 284, no. 5423, pp. 2124–2129. doi: 10.1126/science.284.5423.2124
7. Green R., Noller H.F. Ribosomes and translation. *Annu. Rev. Biochem.*, 1997, vol. 66, pp. 679–716. doi: 10.1146/annurev.biochem.66.1.679
8. Hunt D.E., Klepac-Ceraj V., Acinas S.G., Gautier C., Bertilsson S., Polz M.F. Evaluation of 23S rRNA PCR primers for use in phylogenetic studies of bacterial diversity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, vol. 72, no. 3, pp. 2221–2225.
9. Martijn J., Lind A.E., Schön M.E., Spiertz I., Juzokaite L., Bunikis I., Pettersson O.V., Ettema T.J.G. Confident phylogenetic identification of uncultured prokaryotes through long read amplicon sequencing of the 16S-ITS-23S rRNA operon. *Environ. Microbiol.*, 2019, vol. 21, no. 7, pp. 2485–2498. doi: 10.1111/1462-2920.14636
10. Milani C., Alessandri G., Mangifesta M., Mancabelli L., Lugli G.A., Fontana F., Longhi G., Anzalone R., Viappiani A., Duranti S., Turroni F., Costi R., Annicchiarico A., Morini A., Sarli L., Ossiprandi M.C., van Sinderen D., Ventura M. Untangling species-level composition of complex bacterial communities through a novel metagenomic approach. *mSystems*, 2020, vol. 5, no. 4: e00404-20. doi: 10.1128/msystems.00404-20
11. Orlova E.A., Ogarkov O.B., Suzdalnitskiy A.E., Khromova P.A., Sinkov V.V., Plotnikov A.O., Belkova N.L., Zhdanova S.N. Analysis of microbial diversity in caseous necrosis of tuberculosis foci. *Mol. Genet. Microbiol. Virol.*, 2021, vol. 36, pp. 132–138. doi: 10.3103/S0891416821030058
12. Peker N., Garcia-Croes S., Dijkhuizen B., Wiersma H.H., van Zanten E., Wisselink G., Friedrich A.W., Kooistra-Smid M., Sinha B., Rossen J.W.A., Couto N. A comparison of three different bioinformatics analyses of the 16S-23S rRNA encoding region for bacterial identification. *Front. Microbiol.*, 2019, vol. 10: 620. doi: 10.3389/fmicb.2019.00620
13. Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.*, 1991, vol. 173, no. 2, pp. 697–703. doi: 10.1128/jb.173.2.697-703.1991
14. Wilson K.H., Blichington R.B., Greene R.C. Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, 1990, vol. 28, no. 9, pp. 1942–1946. doi: 10.1128/jcm.28.9.1942-1946.1990
15. Woese C.R. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.*, 1987, vol. 51, pp. 221–271. doi: 10.1128/mr.51.2.221-271.1987

Авторы:

Огарков О.Б., д.м.н., главный научный сотрудник, зав. отделом эпидемиологии и микробиологии ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск, Россия;

Зданова С.Н., д.м.н., ведущий научный сотрудник отдела эпидемиологии и микробиологии ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск, Россия;

Орлова Е.А., младший научный сотрудник отдела эпидемиологии и микробиологии ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск, Россия;

Хромова П.А., младший научный сотрудник отдела эпидемиологии и микробиологии ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск, Россия;

Белькова Н.Л., к.б.н., старший научный сотрудник отдела эпидемиологии и микробиологии ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск, Россия;

Синьков В.В., к.м.н., старший научный сотрудник отдела эпидемиологии и микробиологии ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск, Россия;

Кондратов И.Г., к.б.н., научный сотрудник отдела эпидемиологии и микробиологии ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск, Россия.

Authors:

Ogarkov O.B., PhD, MD (Medicine), Head of the Department of Epidemiology and Microbiology, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation;

Zhdanova S.N., PhD, MD (Medicine), Leading Researcher, Department of Epidemiology and Microbiology, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation;

Orlova E.A., Junior Researcher, Department of Epidemiology and Microbiology, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation;

Khromova P.A., Junior Researcher, Department of Epidemiology and Microbiology, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation;

Belkova N.L., PhD (Biology), Senior Researcher, Department of Epidemiology and Microbiology, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation;

Sinkov V.V., PhD (Medicine), Senior Researcher, Department of Epidemiology and Microbiology, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation;

Kondratov I.G., PhD (Biology), Researcher, Department of Epidemiology and Microbiology, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation.

МОДИФИЦИРОВАННЫЙ МЕТОД КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЕЙ TREC И KREC В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ С ИММУНОДЕФИЦИТНЫМИ СОСТОЯНИЯМИ

М.А. Сайтгалина¹, Ю.В. Останкова¹, Н.Е. Любимова¹, А.В. Семенов²,
Р.Н. Кузнецова^{1,3}, А.А. Тотолян^{1,3}

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

² Екатеринбургский НИИ вирусных инфекций ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, г. Екатеринбург, Россия

³ ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Введение. Иммунный статус представляет собой комплексный показатель состояния иммунной системы, это количественная и качественная характеристика состояния функциональной активности органов иммунной системы и некоторых неспецифических механизмов противомикробной защиты. В качестве суррогатных маркеров созревания Т- и В-клеток может служить содержание в периферической крови, соответственно, Т-рецепторных эксцизионных колец (TREC) и В-клеточных эксцизионных колец (KREC). В настоящее время к недостаткам представленных на рынке диагностических наборов следует отнести два фактора: направленность наборов на диагностику иммунодефицитных состояний только у новорожденных и детей, в то время как взрослые пациенты остаются не охвачены; существенным недостатком является использование для нормирования данных одного эталонного нормировочного гена, в результате чего повышается вариабельность и снижается чувствительность результатов анализа. Цель: разработать высокочувствительный метод лабораторной оценки состояния иммунитета пациентов с использованием ПЦР в режиме реального времени на основе определения концентрации TREC и KREC у детей и взрослых. *Материалы и методы.* В работе использованы образцы цельной крови и сухой капли крови, полученные от новорожденных и взрослых людей, в том числе от условно здоровых лиц, а также от пациентов с диагностированными ПИД и ВИЧ-инфицированных больных. Общий объем выборки — 2577 человек. В качестве методов сравнения использовали коммерческие наборы. *Результаты.* Проводили мультиплексную ПЦР, анализируя количество целевых молекул TREC и KREC, а также фрагментов нормировочных генов HPRT и RPP30 с использованием разработанной серии плазмидных калибраторов. Аналитический диапазон измерений ДНК TREC/KREC составил от 10^3 до 10^9 копий/мл. Точность измерений на приборе планшетного типа (CFX) составила

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:

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. doi: 10.15789/2220-7619-MMF-2039

Citation:

Saitgalina M.A., Ostankova Yu.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 //
Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022,
vol. 12, no. 5, pp. 981–996. doi: 10.15789/2220-7619-MMF-2039

Отраслевая НИР «Изучение механизмов формирования иммунного ответа на новую коронавирусную инфекцию, вызванную SARS-CoV-2
у населения Северо-Западного Федерального округа» № АААА-А21-121030200299-3.

Research project "Study of mechanisms of formation of immune response to new coronavirus infection caused by SARS-CoV-2
in population of North-West Federal District" No. АААА21-121030200299-3.

95,84%, на приборе роторного типа (Rotor-Gene 3000) — 95,11%, что соответствует нормативному показателю. Показана эквивалентность получаемых результатов при работе с цельной кровью и сухими каплями крови. Анализ результатов исследуемой выборки позволил определить 100%-ную диагностическую специфичность и чувствительность метода. *Заключение.* Метод позволяет диагностировать снижение Т- и/или В-клеточного иммунитета у детей и взрослых, и может быть применен для детекции молекул TREC и KREC как в образцах цельной периферической крови, так и в сухой капле крови с использованием карт Гатри. При этом возможно применение единых значений референсных норм, независимо от анализируемого клинического материала. Результаты испытаний свидетельствуют о возможности эффективного использования мультиплексной ПЦР-диагностики как для комплексного первичного тестирования/скрининга новорожденных, так и для оценки состояния иммунитета в целях выявления взрослых больных ПИД и в рамках диагностики пациентов со вторичными иммунодефицитами, например, с инфекцией ВИЧ.

Ключевые слова: иммунный статус, иммунодефицит, TREC, KREC, метод диагностики.

MODIFIED QUANTITATIVE APPROACH FOR ASSESSING PERIPHERAL BLOOD TREC AND KREC LEVELS IN IMMUNODEFICIENT PATIENTS

Saitgalina M.A.^a, Ostankova Yu.V.^a, Liubimova N.E.^a, Semenov A.V.^b, Kuznetsova R.N.^{a,c}, Totolian A.A.^{a,c}

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

^b Ekaterinburg Research Institute of Viral Infections of SRC VB Vector of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Ekaterinburg, Russian Federation

^c I.P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University of the Ministry of Healthcare of Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. *Introduction.* The immune status is a multifaceted parameter quantitatively and qualitatively analyzing functional activity immune system state in immune organs as well as some non-specific mechanisms of antimicrobial protection. Peripheral blood level of T-receptor excision rings (TREC) and B-cell excision rings (KREC), respectively, can serve as surrogate markers of T- and B-cell maturation. Currently, the diagnostic kits available on the market have two significant disadvantages: i) the kits are aimed at diagnosing immunodeficiency conditions only in newborns and children, while keeping adult patients uncovered; ii) essentially, use solely single reference normalization gene for data normalization resulting in increased variability and decreased sensitivity of the assay data. The aim: to develop a highly sensitive method for laboratory assessment of the state of immunity in immunodeficient patients by using real-time PCR for assessing TREC and KREC level in children and adults. *Materials and methods.* There were used whole blood and dry blood spot samples obtained from newborns and adults, apparently healthy individuals as well as patients with verified PID and HIV-infection. A total of 2577 samples were examined. Commercial kits were used as comparison methods. *Results.* Multiplex PCR was carried out, analyzing the number of target molecules TREC and KREC, as well as fragments of the HPRT and RPP30 normalization genes analyzed with the developed series of plasmid calibrators. The established analytical range of TREC/KREC DNA measurements comprised 10^3 to 10^9 copies/mL. The accuracy of measurements on a tablet-type instrument (CFX) was 95.84%, on a rotary-type instrument (Rotor-Gene 3000) — 95.11%, which corresponds to the standard indicator. The equivalence between the data obtained after assessing whole blood samples and dry blood drops was shown. The data analysis allowed to find out 100%-diagnostic specificity and sensitivity of the method proposed. *Conclusion.* The method developed by us allows to diagnose decline in T- and/or B-cell immunity in children and adults and can be used to detect TREC and KREC molecules both in peripheral whole blood samples and dry blood spots using Guthrie cards. Moreover, the uniform values of reference norms can be used regardless of the type of analyzed clinical material. The study data evidence about potential for effective use of multiplex PCR diagnostics both for complex primary testing/screening of newborns and assessing state of immunity to identify adult patients with PID and as a part of the diagnostic monitoring of patients with secondary immunodeficiencies, e.g., HIV infection.

Key words: immune status, immunodeficiency, TREC, KREC, diagnostic method.

Введение

Иммунный статус представляет собой комплексный показатель состояния иммунной системы, это количественная и качественная характеристика состояния функциональной активности органов иммунной системы и некоторых неспецифических механизмов противомикробной защиты.

Иммунодефицитные состояния характеризуются полным или частичным отсутствием Т- или В-клеток, а также натуральных киллеров, или ослаблением функций этих клеток [27]. В качестве суррогатных маркеров созревания Т- и В-клеток и функциональной активности соответствующих звеньев иммунной системы может служить содержание в периферической крови, соответственно, Т-рецепторных эксци-

зионных колец (T-cell receptor excision circles — TREC) и В-клеточных эксцизионных колец (kappa-deleting recombination excision circles — KREC), формирующихся в процессе V(D)J-реарранжировки, в результате которой часть генетического материала вырезается и замыкается в кольцо [27, 23]. TREC служат маркерами созревания Т-клеток, недавно эмигрировавших из тимуса и слабо вовлекавшихся в процесс пролиферации или не делившихся совсем. В связи с этим концентрацию TREC в периферической крови рассматривают как показатель функциональной активности тимуса — его способности продуцировать Т-лимфоциты. В ходе пролиферации клеток иммунной системы эксцизионные кольца остаются в одной из дочерних клеток, что позволяет использовать их в качестве показателя пролиферации лимфоцитов и сурrogатный маркер нормального развития иммунной системы. Содержание KREC в периферической крови является маркером эффективности развития В-клеточного звена иммунной системы в процессе эмбриогенеза.

Полное или частичное отсутствие (снижение уровня) Т- и/или В-клеток у новорожденных определяется при первичных иммунодефицитах (ПИД), трисомиях по 21 и 18 хромосомам, различных цитогенетических мутациях, а также при недоношенности младенцев, в том числе при плановом кесаревом сечении (КС). Врожденные аномалии, включая пороки сердца, пороки развития ЖКТ, множественные врожденные пороки развития, а также преждевременные роды могут быть связаны со вторичной лимфопенией младенцев. Современная стратегия развития скрининга новорожденных связана с максимально ранним, в идеале сразу после рождения, выявлением иммунодефицитов, связанных с нарушением пролиферации Т- и В-клеток. В случае генетически обусловленных заболеваний, таких как ПИД, отсутствие функциональных Т- и/или В-лимфоцитов служит диагностическим критерием, в случае преждевременных родов и КС оценка содержания Т- и/или В-лимфоцитов может служить прогностическим маркером. И в том, и в другом случае выявление и оценка уровня TREC и KREC может применяться для скрининга новорожденных.

У взрослых пациентов снижение уровней Т- и/или В-клеток может быть определено при выявлении ПИД, поздняя диагностика которых связана с разнообразной и преимущественно сглаженной клинической картиной заболевания, например при селективном IgA-дефиците, общей вариабельной иммунной недостаточности (ОВИН), являющихся наиболее частыми впервые выявляемыми формами ПИД у лиц старше 18 лет [7]. Так, например, описано применение анализа уровней TREC и KREC у взрослых па-

циентов с ОВИН и выявление его ассоциации с тяжестью течения заболевания; показано, что у взрослых больных с синдромом Ди Джорджи при нормальных уровнях KREC уровни TREC достоверно снижены [10, 14]. Кроме того, полное или частичное отсутствие Т- и/или В-клеток у взрослых может быть связано с развитием СПИД у инфицированных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), развитием злокачественных заболеваний кроветворной системы, а также показано при трансплантации стволовых клеток [13, 22, 26].

Таким образом, определение уровней TREC и KREC для ранней диагностики первичных и вторичных иммунодефицитных состояний в клинической практике может дать ценную диагностическую и прогностическую информацию в отношении широкого спектра заболеваний, связанных с нарушением Т- и/или В-клеточного звена иммунитета как у детей, так и у взрослых людей, позволяя выявлять пациентов нуждающихся в углубленном обследовании и своевременно назначать адекватную терапию [4]. Количественная оценка уровней TREC и KREC высокоинформативна и может быть легко внедрена в рутинную лабораторную практику [16].

В настоящее время к недостаткам представленных на рынке диагностических наборов следует отнести два фактора. Во-первых, направленность наборов на диагностику иммунодефицитных состояний только у новорожденных и детей, в то время как взрослые пациенты остаются не охвачены [2]. Во-вторых, существенным недостатком является использование для нормирования данных одного эталонного нормировочного гена, в результате чего повышается вариабельность и снижается чувствительность результатов анализа, так как не существует идеального нормировочного гена, постоянного в независимости от ткани и состояния клеток в анализируемом образце. В связи с этим выбор эталонного гена является одним из самых ответственных этапов при разработке анализа. Оптимальным можно считать подход, при котором одновременно используются два и более эталонных гена [9].

Целью настоящей нашей работы была разработка высокочувствительного метода лабораторной оценки состояния иммунитета пациентов с использованием ПЦР в режиме реального времени на основе определения концентрации TREC и KREC у детей и взрослых.

Материалы и методы

Материалы

В работе были использованы следующие образцы от лиц, проживающих на территории Санкт-Петербурга и Ленинградской области:

157 образцов пуповинной крови новорожденных, 2000 образцов сухой капли крови на картах Гатри, полученных от здоровых доношенных новорожденных на 3–4 день жизни, 300 образцов, полученных от условно здоровых лиц старше 18 лет в виде цельной крови и сухой капли крови на картах Гатри одновременно. Были проанализированы также образцы от пациентов с диагностированными первичными иммунодефицитами: 10 образцов сухой капли крови от детей и 10 образцов в виде цельной крови и сухой капли крови на картах Гатри одновременно от больных старше 18 лет.

Среди детей с установленными первичными иммунодефицитами присутствовали пациенты с тяжелой комбинированной иммунной недостаточностью (ТКИН), транзиторной гипогаммаглобулинемией детского возраста, синдромом CHARGE, а также с недифференцированными ПИД, сопровождающимися пневмониями, неонатальными сепсисами, лимфоцитопениями. Все исследованные пациенты старше 18 лет имели установленный диагноз ОВИН.

Дополнительно исследовали образцы цельной крови, полученные от ВИЧ-инфицированных лиц. Представлены 100 образцов от пациентов 18–65 лет, проживающих в Северо-Западном федеральном округе, в том числе от 25 мужчин и 25 женщин с впервые выявленным ВИЧ и подтвержденным сроком инфицирования менее одного года, а также от 25 мужчин и 25 женщин, инфицированных ВИЧ не менее пяти лет, с высокой вирусной нагрузкой и вирусологически неэффективной антиретровирусной терапией (АРТ).

Методы

Методы сравнения

В качестве сравнительных методов использовали две диагностические системы: коммерческий набор «EnLite™ TREC-KREC kit» (PerkinElmer, Финляндия) и зарегистрированный в РФ диагностический набор «ИММУНО-БИТ» (АБВ-Тест, Москва).

Набор реагентов «EnLite™ TREC-KREC kit» (PerkinElmer, Финляндия). Набор предназначен для полуколичественного определения ДНК TREC и KREC у новорожденных в образцах крови, высушенной на фильтровальной бумаге. Определение уровней TREC и KREC осуществляется методом ПЦР в режиме реального времени с гибридационно-флуоресцентной детекцией с последующим пересчетом абсолютных количеств целевых молекул на нормировочный ген бета-актина (BetaActin), с использованием специального термоциклера «VICTOR™ EnLite» (PerkinElmer, Финляндия). Полученные результаты представляют в копи-

ях на мкл. Определены нижние границы для TREC и KREC при использовании набора — 33 и 46 копий/мкл соответственно. Указанный набор не зарегистрирован в Российской Федерации в качестве медицинского изделия, однако широко применяется в странах Европы и в США [12, 17].

Набор реагентов «ИММУНО-БИТ» (АБВ-Тест, Москва). Набор зарегистрирован в РФ в качестве медицинского изделия, предназначен для определения уровней TREC и KREC у новорожденных и детей в цельной крови и сухой капле крови. Определение уровней TREC и KREC осуществляется методом ПЦР в режиме реального времени с гибридационно-флуоресцентной детекцией с последующим пересчетом абсолютных количеств целевых молекул на нормировочный ген сывороточного альбумина (ALB). Полученные результаты представляют в копиях на 10^5 клеток.

Указанные нижние границы нормы целевых молекул при использовании набора различаются для образцов ДНК, экстрагированных из цельной крови (TREC — 200 копий/ 10^5 клеток для детей в возрасте от 0 до 1 года, 80 копий/ 10^5 клеток — от 1 года до 6 лет, 30 копий/ 10^5 клеток от 6 до 18 лет; KREC — 250 копий/ 10^5 клеток для детей в возрасте от 0 до 1 года, 100 копий/ 10^5 клеток — от 1 года до 6 лет, 40 копий/ 10^5 клеток от 6 до 18 лет) и из сухой капли крови (TREC — 450 копий/ 10^5 клеток, KREC — 250 копий/ 10^5 клеток для новорожденных) [1].

Модифицированный метод

Выделение нуклеиновых кислот. Экстракцию ДНК проводили с помощью двух коммерческих комплектов реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала: «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИЭ, Россия) и «Экстра-ДНК-Био» (Алкор-Био, Россия), согласно инструкциям производителей.

Аmplификация целевых и нормировочных генов. В образце ДНК, выделенном из цельной крови или из капли сухой крови, определяли количество целевых молекул ДНК TREC, KREC и двух эталонных нормировочных генов «домашнего хозяйства» — ген гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы человека (HPRT) и ген белковой субъединицы р30 рибонуклеазы Р (RPP30) с использованием олигонуклеотидов и соответствующих олигонуклеотидных флуоресцентно меченых зондов (табл. 1).

Для ПЦР в общем виде использовали следующий состав амплификационной смеси: буферный раствор, содержащий Трис-НСl pH 8,8 (при 25°C), KCl, 6–7 мМ MgCl₂, дезоксинуклеозидтрифосфаты, глицерол, Tween 20, SynTaq ДНК-полимераза с ингибирующими активностью фермента антителами (или 1 ед. рекомбинантной Taq ДНК-полимераза или Hot-start

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров и зондов, использованные для выявления ДНК TREC, KREC и двух эталонных нормировочных генов HPRT и RPP30 методом ПЦР в режиме реального времени

Table 1. Primer and probe nucleotide sequences used to detect the DNA TREC, KREC as well as two reference normalization genes HPRT and RPP30 using real-time PCR

Праймер Primer	Нуклеотидная последовательность Nucleotide sequence
TRECF	5'-CACATCCCTTTCAACCATGCT-3'
TRECR	5'-TGCAGGTGCCTATGCATCA-3'
TRECzondFAM	5'-FAM-CACCTCTGGTTTTGTAAAGGTGCCC-RTQ1/BHQ1-3'
KRECF	5'-TCCCTTAGTGGCATTATTTGTATCACT-3'
KRECR	5'-AGGAGCCAGCTCTTACCCTAGAGT-3'
KRECzondHEX	5'-HEX-TCTGCACGGGCAGCAGGTTGG-BHQ1-3'
HPRTF	5'-CTTGCTCGAGATGTGATGAAGG-3'
HPRTR	5'-CAGCAGGTCAGCAAAGAATTTATAG-3'
HPRT-zondCy5	5'-Cy5-ATCACATTGTAGCCCTCTGTGTGCTCAAGG-RTQ2/BHQ2-3'
RPP30F	5'-TTTGGACCTGCGAGCG-3'
RPP30R	5'-GAGCGGCTGTCTCCACAAGT-3'
RPP30-zondROX	5'-ROX-TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG-RTQ2/BHQ2-3'

Тaq ДНК-полимеразы), вода без нуклеаз до конечного объема 15 мкл.

ПЦР проводили на амплификаторах с функцией детекции флуоресценции в режиме реального времени по каналам HEX/Yellow, FAM/Green, ROX/Orange и Cy5/Red планшетного типа (например, CFX96) или роторного типа (например, Rotor-Gene 3000/6000) при указанных в табл. 2 условиях. Регистрировали полученные результаты посредством гибридно-флуоресцентной детекции с помощью программного обеспечения используемых приборов.

Оценка результатов амплификации. Анализировали кривые накопления флуоресцентного сигнала по четырем каналам: по каналу для флуорофора FAM/Green — сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК TREC; по каналу для флуорофора HEX/Yellow — сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК KREC; по каналу для флуорофора ROX/Orange сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК RPP30; по каналу для флуорофора Cy5/Red сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК HPRT. Результаты интерпретировали на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (устанавливается в середине линейного участка прироста флуоресценции положительного контроля в логарифмической шкале), что определяло наличие (или отсутствие) для данной пробы значения порогового цикла C_t в соответствующей графе в таблице результатов.

Подготовка калибраторов. Для получения калибраторов и последующего определения уровней TREC и KREC использовали плазмиду, несущую синтетическую последовательность, соответствующую выявляемым фрагментам целевых молекул ДНК TREC, KREC и двух эталонных нормировочных генов HPRT и RPP30 со спейсерами между ними.

Полученную от производителя навеску плазмидной ДНК разводили ТЕ-буфером, ис-

Таблица 2. Параметры программы амплификации на приборах CFX96 (Bio-Rad, США) и Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия)

Table 2. Amplification setup parameters for CFX96 cycler (Bio-Rad, USA) and Rotor-Gene 3000/6000 cycler (Corbett Research, Australia)

Цикл Cycle	Температура, °C Temperature, °C	Время Time	Измерение флуоресценции Fluorescence measurement	Количество циклов Number of cycles
1	95	15 мин/15 min		1
2	95	10 с/10 s		5
	61	30 с/30 s		
	72	15 с/15 s		
3	95	10 с/10 s	HEX/Yellow, FAM/Green, Cy5/Red, ROX/Orange	40
	60	30 с/30 s		
	72	15 с/15 s		

ходя из указанной в паспорте производителем концентрации плазмиды и ее протяженности, составляющей 3370 нуклеотидов, получая препарат плазмиды с приблизительной концентрацией 10^{10} копий/мл. Готовили последовательные десятикратные разведения препарата плазмиды с концентрациями 10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 копий/мл в ТЕ буферном растворе. Для предварительной оценки концентрации образцов плазмидной ДНК использовали цифровую ПЦР, позволяющую провести точную (вплоть до 1 копии на 100 000) количественную оценку представленности того или иного участка ДНК в образце без использования калибровочных кривых. При этом в ходе работы реакционная смесь распрыскивалась на множество мельчайших капель (более 20 тысяч), в каждой из которых протекала индивидуальная ПЦР. Интересующую мишень амплифицировали, после чего подсчитывали положительные (присутствовала представляющая интерес последовательность мишени) и отрицательные (отсутствовала представляющая интерес последовательность мишени) реакции для абсолютного количественного определения интересующих молекулярных мишеней. Методом цифровой ПЦР определяли точную концентрацию (копий/мл) в препаратах плазмиды с предположительными концентрациями 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 и относительно данных образцов проводили калибровку серии разведений плазмиды. Из серии разведений отбирали препараты плазмид с концентрациями $1-9 \times 10^8$, $1-9 \times 10^7$, $1-9 \times 10^6$, $1-9 \times 10^5$, $1-9 \times 10^4$ копий/мл и присваивали полученным разведениям наименования, соответственно, — Калибратор К1, Калибратор К2, Калибратор К3, Калибратор К4, Калибратор К5.

Количественная оценка уровней TREC и KREC. Для количественной оценки уровней TREC и KREC параллельно постановке ПЦР в анализируемых образцах проводили постановку ПЦР для калибраторов с известными концентрациями.

Уровень ДНК TREC и KREC определяли в копиях на миллилитр и в копиях на 10^5 клеток. Расчет уровней целевых молекул осуществляли с использованием следующих формул.

Эффективность ПЦР:

$$E = 10^{\frac{1}{\alpha}},$$

где E — эффективность, α — коэффициент из уравнения $y = \alpha x + b$, получаемого при аппроксимации зависимости порогового цикла от концентрации матрицы в образце.

Коэффициент пропорциональности:

$$\alpha = \frac{F_{Ct}}{C_0 \times E^{Ct}},$$

где α — коэффициент пропорциональности, C_t — пороговый цикл, C_0 — исходная концентра-

ция, F_{Ct} — уровень пороговой линии (флуоресценция в пороговом цикле), E — эффективность.

$$\alpha_m = \frac{\alpha_1 + \alpha_2 + \alpha_3 + \alpha_4 + \alpha_5}{5},$$

где α_m — α средняя для флуорофора, α_{1-5} — α для каждого калибратора.

Концентрация целевых молекул в копиях на мл:

$$C_0 = \frac{F_{Ct}}{\alpha_m \times E^{Ct}},$$

где C_0 — исходная концентрация, α_m — α средняя для флуорофора, C_t — пороговый цикл, F_{Ct} — уровень пороговой линии (флуоресценция в пороговом цикле), E — эффективность.

Концентрация целевых молекул в копиях на 100 тыс. клеток: $C_{10^5} = ((4 \times C_0)/C_{HPRT} + C_{RPP30}) \times 10^5$ для женского пола и $C_{10^5} = ((4 \times C_0)/2C_{HPRT} + C_{RPP30}) \times 10^5$ для мужского пола, соответственно, где C_{10^5} — количество TREC или KREC на 100 тыс. ядросодержащих клеток, C_0 — исходная концентрация TREC или KREC в миллилитре образца, C_{HPRT} — исходная концентрация HPRT в миллилитре образца, C_{RPP30} — исходная концентрация RPP30 в миллилитре образца.

Аналитическая специфичность. Оценку аналитической специфичности проводили в ходе анализа *in silico* с помощью алгоритма BLASTn специфических нуклеотидных последовательностей фрагментов целевых генов TREC и KREC, а также RPP30 и HPRT, используемых в качестве внутреннего контроля, являющихся генетическими мишенями для ПЦР, с представленными в международной базе данных GenBank нуклеотидными последовательностями.

Аналитическая чувствительность. Аналитическую чувствительность (предел обнаружения) определяли на основе данных о пороговых циклах флуоресценции в серийных разведениях Калибратора К1 при постановке ПЦР, при ее эффективности $100 \pm 10\%$. Для этого готовили серию десятикратных разведений Калибратора К1 следующим образом: аликвоту объемом 10 мкл вносили в микропробирку объемом 1,5 мл, добавляли 90 мкл ТЕ-буфера, тщательно пипетировали и переносили 10 мкл полученного пула в новую микропробирку, куда снова добавляли 90 мкл ТЕ-буфера и т. д. до получения серии последовательных десятикратных разведений. С каждой пробой проводили ПЦР в 3-х повторях. Вычисляли средние значения концентрации образца в каждом разведении (копий/мл). Наименьшую концентрацию принимали за предел обнаружения. Об аналитическом диапазоне измерений судили по результатам анализа предела обнаруже-

ния. За нижнее значение диапазона принимали предел обнаружения, а за верхнее — концентрацию Калибратора К1.

Точность измерений. Оценку точности (правильности) измерений (ТИ) проводили, используя метод добавок (тест на «открытие»), заключающийся в постановке в восьми повторах ПЦР суммарной пробы, представляющей собой смесь двух Калибраторов наименьшей концентрации, и анализе отклонения практического значения концентрации ДНК TREC и KREC в суммарной пробе от теоретического. При этом значение ТИ должно находиться в пределах от 90 до 110%. Для получения суммарной пробы смешивали в равных объемах Калибраторы К4 и К5 с концентрациями $3,13 \times 10^5$ и $3,34 \times 10^4$ копий/мл соответственно. Анализ проводили по формуле: $ТИ [\%] = (Спр/Ст) \times 100$, где Спр [копий/мл] — рассчитанное по калибровочному графику среднее (практическое) значение концентрации ДНК в исследуемой суммарной пробе при $n = 8$; Ст [копий/мл] — расчетное (теоретическое) значение концентрации ДНК в исследуемой пробе, рассчитываемое по формуле: $Ст [копий/мл] = (СК4 + СК5)/2$, где СК4 и СК5 [копий/мл] — значения концентраций ДНК TREC/KREC в Калибраторах К4 и К5.

Эквивалентность результатов при использовании цельной крови и сухой капли крови. Оценку эквивалентности образцов цельной крови с гемостабилизатором (ЭДТА) и сухих капель крови проводили с использованием ДНК, экстрагированной из цельной крови и сухой капли крови 300 условно здоровых лиц и 10 пациентов старше 18 лет с диагностированным ПИД. Полученные данные сравнивали по наличию позитивности или негативности в отношении Т- и В-клеточного иммунодефицита, опираясь на значения нижней границы нормы для концентрации TREC и KREC в различных возрастных группах. В случае совпадения результатов (положительных или отрицательных) в различных типах клинических образцов делали вывод об эквивалентности образцов цельной крови и сухих капель крови.

Диагностическая чувствительность и специфичность. Оценку диагностической чувствительности и диагностической специфичности проводили с использованием образцов сухих капель крови, полученных от 2000 новорожденных без иммунодефицитов, 300 условно здоровых взрослых лиц, а также от пациентов с диагностированными ПИД (10 детей и 10 взрослых человек).

Границы нормы уровней TREC и KREC у новорожденных. Для определения границ нормы уровней TREC и KREC у новорожденных результаты исследуемых аналитов в группе условно здоровых детей были ранжированы,

после чего из общего массива данных удаляли так называемые выбросы, согласно методу Диксона—Рида, и определяли 95% доверительный интервал [3].

Статистический анализ. Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prizm 5 и Microsoft Exel 2010. Нормальность распределения полученных числовых данных проверяли с помощью двух критериев: Колмогорова—Смирнова и Шапиро—Уилка. Для оценки статистически значимых различий между отдельными выборками применяли критерий Манна—Уитни, а также ROC-анализ. Корреляционный анализ проводили с расчетом коэффициента Спирмена, значение которого оценивали по шкале Чеддока.

Результаты

Для определения уровней TREC и KREC в цельной крови или в сухой капле крови пациентов был разработан способ на базе ранее предложенной нами методики [6].

В рамках настоящей работы для оценки и корректировки эффективности экстракции ДНК и последующей ПЦР, а также в качестве основы для нормирования и расчетов результатов анализа целевых аналитов нами были выбраны два референсных гена: ген гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы человека (HPRT) и ген белковой субъединицы р30 рибонуклеазы Р (RPP30). Было продемонстрировано, что эти гены в цельной крови и в сухой капле крови имеют постоянный уровень, зависящий только от количества клеток, во всех образцах вне зависимости от группы пациентов.

Согласно модифицированному нами методу, выделенную ДНК использовали для одновременной амплификации в одной емкости участков целевых молекул ДНК TREC, KREC и эталонных нормировочных генов RPP30 и HPRT с использованием четырех пар олигонуклеотидных праймеров и соответствующих им олигонуклеотидных флуоресцентно меченых зондов, несущих на 5'-конце флуорофоры, а на 3'-конце нефлуоресцентные тушители (см. табл.1). Основой для возникновения флуоресценции является амплификация целевых и эталонных фрагментов ДНК на специфических олигонуклеотидах. Для детекции накопления специфических продуктов ПЦР используются флуоресцентно меченые олигонуклеотидные зонды. В ходе реакции происходит гибридизация олигонуклеотидов и зондов с комплементарными участками ДНК-мишеней. Образование специфического продукта амплификации в присутствии фермента Taq-полимеразы сопровождается отщеплением флуоресцентной

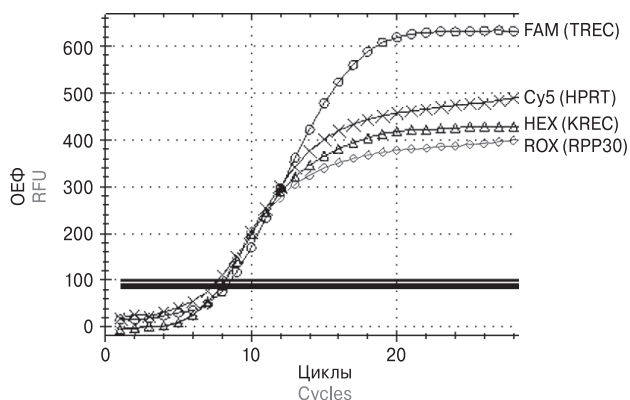


Рисунок 1. Кривые флуоресценции, отражающие динамику образования продуктов реакции в ходе амплификации

Figure 1. Fluorescence curves reflecting dynamic reaction products formation during amplification

Примечание. ОЕФ — относительные единицы флуоресценции. Кружками и треугольниками обозначены сигналы флуорофоров FAM и HEX, свидетельствующие о накоплении продуктов амплификации целевых молекул TREC и KREC соответственно. Ромбами и крестами обозначены сигналы флуорофоров ROX и Cy5, представляющие собой результат амплификации эталонных нормировочных генов RPP30 и HPRT соответственно, свидетельствующие об успешности экстракции ДНК и амплификации в целом.

Note. RFU — relative fluorescence units. The circles and triangles indicate the signals of the FAM and HEX fluorophores pointing at accumulation of amplification products of the target TREC and KREC molecules, respectively. Diamond and cross symbols indicate the signals of the ROX and Cy5 fluorophores resulting from amplification of the reference normalization genes RPP30 and HPRT in the genome of a human, respectively, evidencing about successful DNA extraction and overall amplification.

метки от зондов благодаря наличию у Taq-полимеразы 5'-экзонуклеазной активности. Олигонуклеотидные зонды, используемые для детекции ДНК целевых молекул и детекции фрагментов ДНК эталонных нормировочных генов, имеют флуоресцентные метки с разными спектрами поглощения и испускания, что позволяет проводить одновременную регистрацию флуоресценции по четырем каналам амплификатора с функцией детекции флуоресценции в режиме реального времени. По каналам, соответствующим флуорофорам FAM и HEX, детектировали фрагменты ДНК TREC и KREC, а по каналам, соответствующим флуорофорам Cy5 и ROX, — фрагменты ДНК генов HPRT и RPP30 соответственно (рис. 1).

Выделение и амплификацию ДНК образца считали успешными, если на каналах Cy5 и ROX получены значения порогового цикла C_t .

Анализ результатов проводили с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с гибридиза-

ционно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» с использованием калибровочных графиков, построенных при амплификации калибраторов с известными концентрациями искомым продуктов (TREC, KREC) и эталонных генов (HPRT, RPP30). Наличие калибраторов с известной концентрацией и негативного контроля (К-) позволяет контролировать все этапы анализа для каждого образца и оценивать влияние ингибиторов на результаты амплификации.

При оценке предела обнаружения аналитическая чувствительность составила 10^3 копий ДНК TREC/KREC на 1 мл анализируемого образца, аналитический диапазон измерений ДНК TREC/KREC составил от 10^3 до 10^9 копий/мл. На основании вышесказанного в качестве калибраторов определили препараты плазмид с концентрациями $1-9 \times 10^8$, $1-9 \times 10^7$, $1-9 \times 10^6$, $1-9 \times 10^5$, $1-9 \times 10^4$ копий/мл (рис. 2).

При оценке аналитической специфичности *in silico* установлено, что искомые последовательности имеют сходство только с последовательностями соответствующих генов TREC, KREC, RPP30 и HPRT в геноме человека (рис. 3).

При оценке точности (правильности) измерений в 8 повторях с использованием амплификаторов различных модификаций, ТИ на приборе планшетного типа (CFX) составила 95,84%, а на приборе роторного типа (Rotor-Gene 3000) — 95,11%, что соответствует нормальному показателю (90–110%).

При оценке эквивалентности образцов цельной крови и сухих капель крови во всех проанализированных случаях при параллельных тестированиях условно здоровых лиц и в цельной крови, и в сухой капле крови не выявлено снижения уровней TREC и KREC. При анализе образцов, полученных от больных с ПИД, показано параллельное снижение уровней TREC и KREC в цельной крови и в сухой капле крови.

Ни в одной из выборок (уровни TREC и KREC в цельной и сухой крови) распределение числовых данных не подчинялось закону нормального распределения. В связи с вышесказанным, для расчета коэффициента корреляции использовали критерий Спирмена. При оценке ранговой корреляции Спирмена результатов уровней TREC, полученных при анализе образцов ДНК, экстрагированных из цельной крови и сухого пятна крови, показано: $r_s = 0,7265$, $p < 0,0001$ (95% ДИ: 0,6674–0,7765), теснота связи по шкале Чеддока — высокая. При анализе уровней KREC — $r_s = 0,7349$, $p < 0,0001$ (95% ДИ: 0,6773–0,7836), теснота связи по шкале Чеддока — высокая. Таким образом, модифицированный нами способ позволяет использовать в качестве клинического материала как цельную кровь, так и сухую каплю крови.

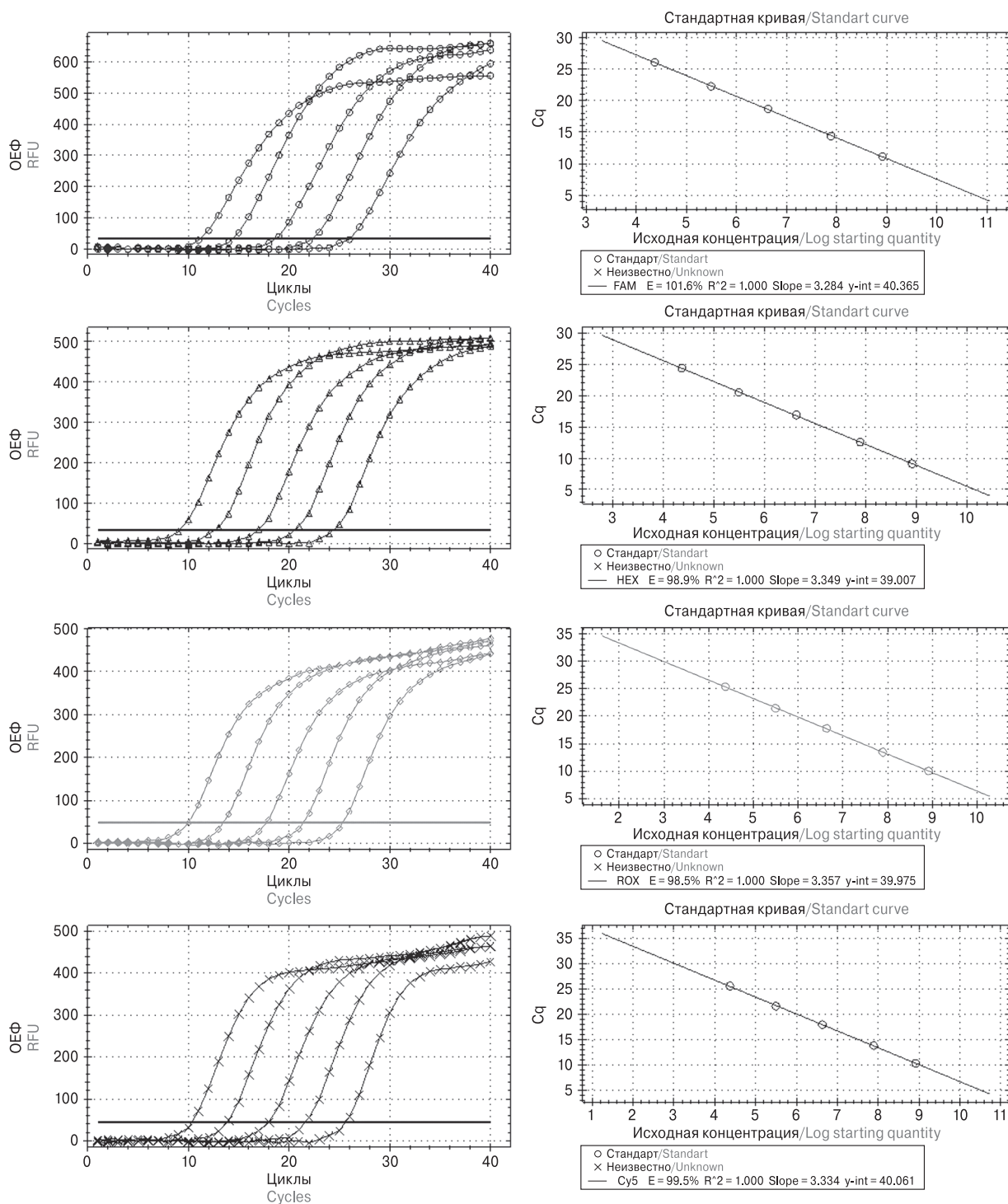


Рисунок 2. Кривые флуоресценции и калибровочные графики, отражающие динамику образования продуктов реакции амплификации при анализе серии разведений калибраторов

Figure 2. Fluorescence curves and calibration graphs reflecting dynamic formation of amplification reaction products in the analysis of calibrator dilutions series

Примечание. ОЕФ — относительные единицы флуоресценции. Кружками и треугольниками обозначены сигналы флуорофоров FAM и HEX, свидетельствующие о накоплении продуктов амплификации целевых молекул TREC и KREC соответственно. Ромбами и крестами обозначены сигналы флуорофоров ROX и Cy5, представляющие собой результат амплификации эталонных нормировочных генов RPP30 и HPRT соответственно.

Note. RFU — relative fluorescence units. The circles and triangles indicate the signals of the FAM and HEX fluorophores, indicating accumulation of amplification products of the target TREC and KREC molecules, respectively. Diamond and cross symbols indicate the signals of the ROX and Cy5 fluorophores after amplification of the reference normalization genes RPP30 and HPRT, respectively.

В ходе работы были определены нижние границы нормы целевых аналитов у новорожденных в группе, образцы которой представлены цельной пуповинной кровью и в группе, образцы которой представлены сухой каплей крови на картах Гатри. Достоверных различий между группами не выявлено ($p > 0,05$), в связи с чем группы были объединены и определены общие для цельной крови и сухой капли крови границы норм новорожденных. Нижняя граница нормы уровней TREC для новорожденных составила $892,6$ копий/ 10^5 клеток, уровней KREC — $400,4$ копий/ 10^5 клеток.

В рамках оценки диагностической чувствительности и диагностической специфичности при сравнении выборок условно здоровых новорожденных и детей с диагностированными первичными иммунодефицитами на основании результатов анализа, полученных с использованием модифицированного нами метода, площадь под кривой для уровней TREC и KREC

достигла единицы при 95% ДИ: $1,000-1,000$, $p < 0,0001$ (рис. 4).

В качестве тестов сравнения использовали диагностический коммерческий набор реагентов для количественного определения ДНК TREC и KREC методом ПЦР в режиме реального времени «ИММУНО-БИТ» (АББ-Тест, Москва) и «EnLite™ TREC-KREC kit» (PerkinElmer, Финляндия).

Согласно проведенному анализу, ни в одной из выборок распределение числовых данных не подчинялось закону нормального распределения. Для расчета коэффициентов корреляции использовали критерий Спирмена. При оценке ранговой корреляции Спирмена результатов уровней TREC, полученных при анализе образцов ДНК условно здоровых новорожденных и детей с диагностированными первичными иммунодефицитами, экстрагированных из сухого пятна крови, проанализированных с использованием модифицированного нами мето-

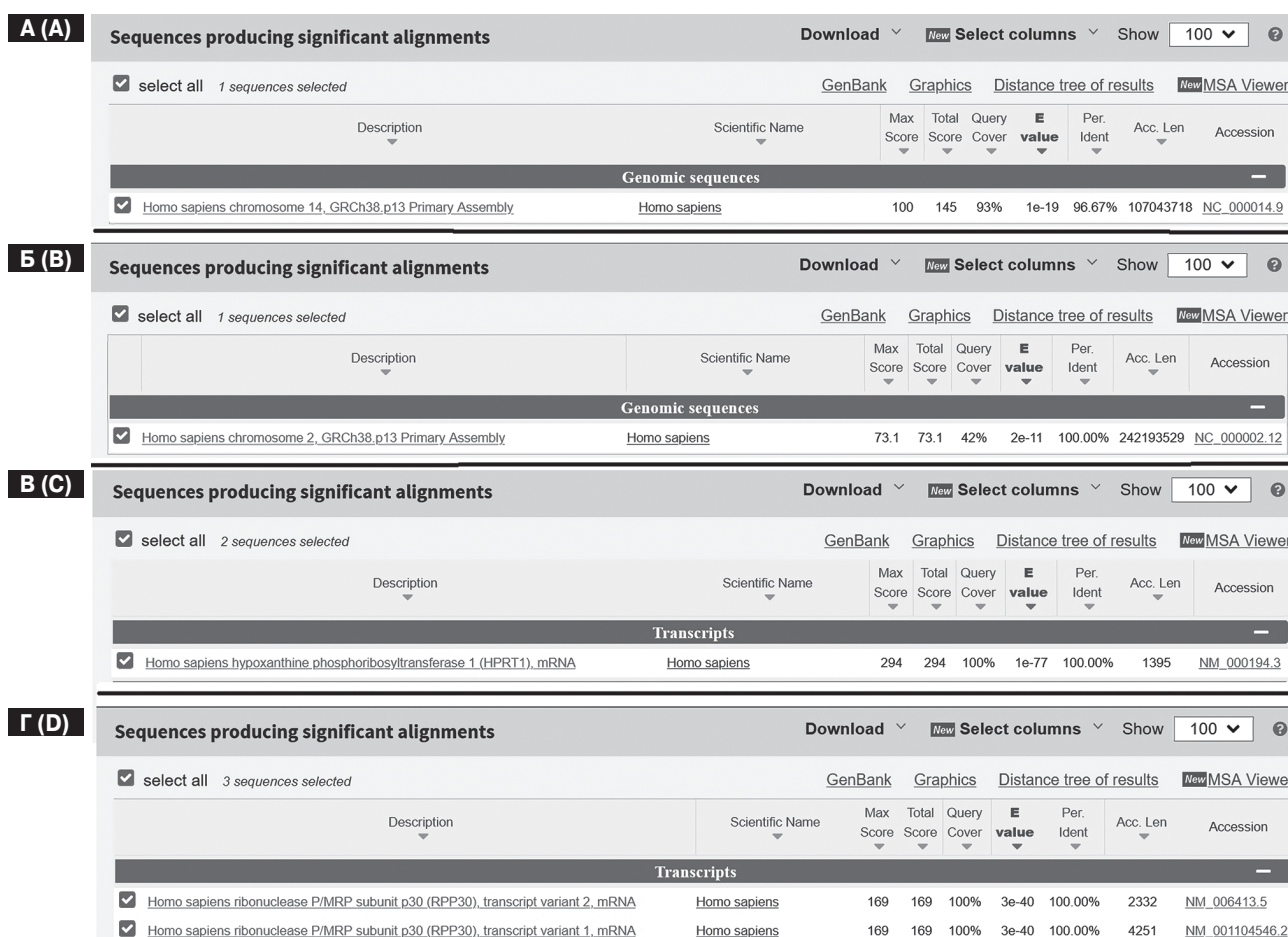


Рисунок 3. Анализ *in silico* фрагментов нуклеотидных последовательностей генов человека

Figure 3. *In silico* analysis of the fragments of human gene nucleotide sequences

Примечание. А — фрагмент целевой молекулы ДНК TREC, Б — фрагмент целевой молекулы ДНК KREC, В — фрагмент ДНК эталонного нормировочного гена HPRT, Г — фрагмент ДНК эталонного нормировочного гена RPP30.

Note. А — fragment of the target DNA molecule TREC, Б — fragment of the target DNA molecule KREC, В — DNA fragment of the HPRT reference normalization gene, D — DNA fragment of the RPP30 reference normalization gene.

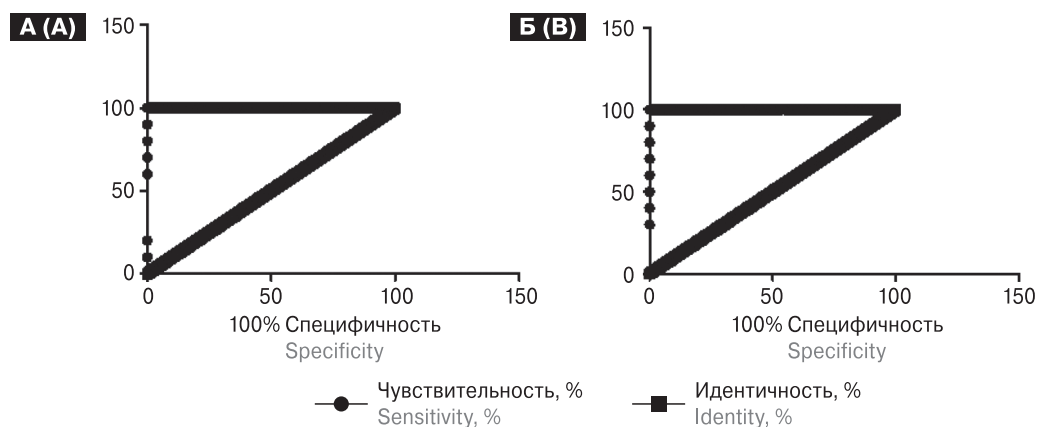


Рисунок 4. ROC-кривые, построенные при сравнении результатов анализа с использованием модифицированного нами метода выборок условно здоровых новорожденных и детей с диагностированными первичными иммунодефицитами по параметрам TREC (А) и KREC (Б)

Figure 4. ROC-curves constructed by comparing the analysis data by using the proposed modified method for samples of apparently healthy newborns and children diagnosed with primary immunodeficiency, according to the TREC (A) and KREC (B) parameters

да и коммерческим набором «ИММУНО-БИТ» (АБВ-Тест, Москва), показано: $r_s = 0,7932$, $p < 0,0001$ (95% ДИ: 0,5714–0,9070), теснота связи по шкале Чеддока — высокая. При анализе уровней KREC — $r_s = 0,8511$, $p < 0,0001$ (95% ДИ: 0,6805–0,9342), теснота связи по шкале Чеддока — высокая. При сравнении полученных результатов с использованием модифицированного нами метода и набора «EnLite™ TREC-KREC kit» (PerkinElmer, Финляндия) коэффициент корреляции для уровней TREC и KREC выше, теснота связи по шкале Чеддока высокая: для TREC $r_s = 0,8130$, $p < 0,0001$ (95% ДИ: 0,6078–0,9164), для KREC $r_s = 0,7495$, $p < 0,0001$ (95% ДИ: 0,4941–0,8858).

При сравнении выборок взрослых условно здоровых лиц и больных с диагностированными первичными иммунодефицитами на основании результатов анализа, полученных с использованием модифицированного нами метода, площадь под кривой для уровней TREC составила $0,98 \pm 0,015$ при 95% ДИ: 0,9489–1,009, $p <$

0,0001; для уровней KREC составила $0,99 \pm 0,003$ при 95% ДИ: 0,9918–1,003, $p < 0,0001$ (рис. 5).

Анализ количества TREC и KREC в образцах цельной крови, полученной от ВИЧ-инфицированных больных, показал достоверное снижение уровней целевых аналитов у длительное время инфицированных пациентов с вирусологической неэффективностью АРТ по сравнению с контрольной группой (рис. 6). Площадь под кривой для параметра TREC составила $0,9997 \pm 0,0003$, при 95% ДИ: 0,9989–1,000, $p < 0,0001$. Для параметра KREC площадь под кривой составила $0,9948 \pm 0,0024$, при 95% ДИ: 0,9900–0,9996, $p < 0,0001$. Разницы уровней ДНК TREC и KREC между здоровыми людьми и лицами с впервые выявленным ВИЧ со сроком инфицирования менее одного года не выявлено.

Наборы реагентов для определения уровней ДНК TREC и KREC «ИММУНО-БИТ» (АБВ-Тест, Москва) и «EnLite™ TREC-KREC kit» (PerkinElmer, Финляндия) предназначены для работы с образцами сухой капли крови, полу-

Таблица 3. Соответствие определения уровней TREC, KREC у здоровых новорожденных и у детей с диагностированными первичными иммунодефицитами

Table 3. Correspondence between detecting the TREC and KREC levels in healthy newborns and children with diagnosed primary immunodeficiencies

Пациенты Patients	Данные по TREC и KREC Data for TREC and KREC	Количество Quantity	Разработанный способ Developed method	ИММУНО-БИТ IMMUNO-BIT	EnLite™ TREC-KREC kit
Здоровые новорожденные Healthy newborns	Нормальные уровни TREC и KREC Normal TREC and KREC levels	2000	98%	98%	97%
Дети с ПИД Children with PID	Сниженные уровни TREC и/или KREC Decreased TREC and/or KREC levels	10	100%	100%	100%

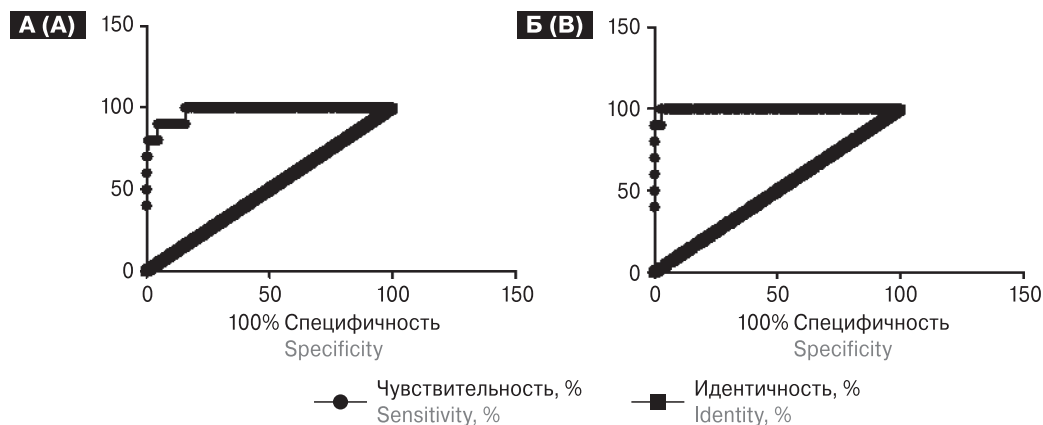


Рисунок 5. ROC-кривые, построенные при сравнении результатов анализа с использованием модифицированного нами метода выборок взрослых условно здоровых лиц и больных с диагностированными первичными иммунодефицитами по параметрам TREC (А) и KREC (Б)
 Figure 5. ROC-curves constructed by comparing the analysis data by using the proposed modified method for samples of apparently healthy adults and patients with diagnosed primary immunodeficiency, according to the TREC (A) and KREC (B) parameters

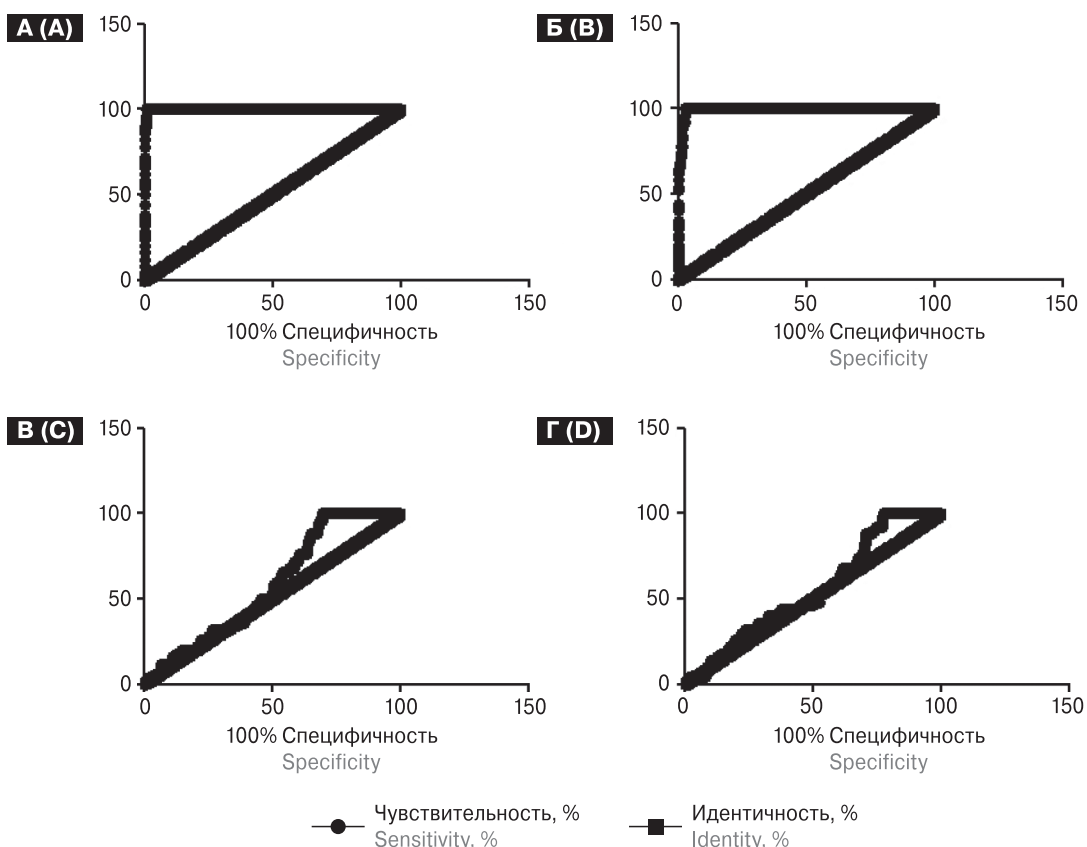


Рисунок 6. ROC-кривые, построенные при сравнении результатов анализа с использованием модифицированного нами метода выборок взрослых условно здоровых лиц и ВИЧ-инфицированных больных: с вирусологической неэффективностью АРТ по параметрам TREC (А) и KREC (Б); с недавно выявленной инфекцией ВИЧ по параметрам TREC (В) и KREC (Г)
 Figure 6. ROC-curves constructed while comparing the analysis data by using the proposed modified method for samples of apparently healthy adults and HIV-infected patients: with virological ART ineffectiveness according to the TREC (A) and KREC (B) parameters; with newly diagnosed HIV infection according to the TREC (C) and KREC (D) parameters

ченными у детей, однако в рамках настоящей работы мы сочли возможным провести анализ с использованием указанных методов у взрослых людей, чтобы оценить корреляцию между полученными результатами и уровнями целевых аналитов, определенными модифицированным нами методом. При оценке ранговой корреляции Спирмена результатов уровней TREC, полученных с использованием модифицированного нами метода и коммерческим набором «ИММУНО-БИТ» (АБВ-Тест, Москва) показано: $r_s = 0,4941$, $p = 0,0026$ (95% ДИ: 0,1826–0,7155), теснота связи по шкале Чеддока — умеренная. При анализе уровней KREC — $r_s = 0,8244$, $p < 0,0001$ (95% ДИ: 0,6715–0,9099), теснота связи по шкале Чеддока — высокая. При сравнении полученных результатов у взрослых людей с использованием модифицированного нами метода и набора «EnLite™ TREC-KREC kit» (PerkinElmer, Финляндия) коэффициент корреляции для уровней TREC и KREC ниже: для TREC корреляция не достоверная $r_s = 0,3301$, $p = 0,0528$ (95% ДИ: 0,01382–0,6042), для KREC теснота связи по шкале Чеддока умеренная — $r_s = 0,4142$, $p = 0,0134$ (95% ДИ: 0,0837–0,6626).

Обсуждение

Мультиплексная амплификация TREC, KREC и нормировочного гена в одной реакции устраняет вариабельность, связанную с ошибками пипетирования, позволяя более точно оценивать уровни целевых аналитов. При этом необходимо с особым вниманием отнестись к выбору нормировочных генов, необходимых для оценки и корректировки эффективности экстракции ДНК и последующей ПЦР из разных клинических образцов. Ряд генов домашнего хозяйства традиционно используется в качестве эталонных, однако, как и другие гены, они могут быть вариабельны при некоторых патологических состояниях из-за своей мультифункциональности. Не существует идеального нормировочного гена, однако правильно подобранный эталонный ген может уменьшить вариации, вызванные разным количеством и качеством исходного биологического материала, разной эффективностью выделения нуклеиновых кислот и разной эффективностью ПЦР. В связи с вышесказанным, оптимальным является одновременное использование двух эталонных нормировочных генов. В качестве таковых нами были выбраны гены «домашнего хозяйства» — и ген белковой субъединицы P30 рибонуклеазы Р (RPP30), и ген гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы человека (HPRT). Выбор RPP30 был обоснован анализом литературных данных, свидетельствующих о применимости данного гена в качестве

контрольного для определения эффективности экстракции геномной ДНК человека, в качестве эндогенного контроля для диагностики и количественной оценки бактериальной и вирусной нагрузки для нормализации количества копий инфекционных агентов с количеством клеток, основанным на наличии двух копий RPP30 в каждой клетке, а также в качестве эталонного гена для определения вариаций числа копий целевых генов в геноме человека [11].

Выбор гена HPRT, локализуемого на X-хромосоме, обусловлен тем, что половая принадлежность потенциально может влиять на иммунитет, развитие связанных с иммунным статусом заболеваний. Кроме того, хотя одни исследователи сообщают об отсутствии корреляции уровней TREC и KREC с полом [8, 23], другие указывают на более высокий уровень TREC у девочек-подростков, замедленное снижение уровня TREC у взрослых женщин по сравнению с мужчинами [18, 24], более высокий уровень TREC у новорожденных девочек, чем у новорожденных мальчиков [21] и, напротив, более высокий уровень KREC у девочек в возрасте полового созревания (9–12 лет), чем у мальчиков [16]. Таким образом, можно предположить, что половые гормоны способны играть существенную иммуномодулирующую роль в иммунных реакциях [15]. Выбор одного из нормировочных генов с локализацией на X-хромосоме и, соответственно, отличающиеся формулы расчетов уровней TREC и KREC для женского и мужского полов позволяют более точно оценить влияние гендера на уровни TREC и KREC. Однако наши результаты не показали значительных различий в уровнях целевых аналитов между женщинами и мужчинами, независимо от возраста. Такие отличия в получаемых результатах разными исследовательскими группами могут быть связаны с различиями и объемами анализируемых выборок.

Следует отметить, что цифровая ПЦР обладает большей точностью и чувствительностью, чем мультиплексная ПЦР, что могло бы позволить снизить частоту ложноположительных результатов [19, 25], однако высокая стоимость является очевидным недостатком метода, не позволяющим использовать его в рутинной диагностике. Тем не менее применение в нашей работе цифровой ПЦР для определения концентрации калибраторов, позволяет увеличить точность метода без существенного увеличения стоимости.

Ряд первичных иммунодефицитов, имеющих сравнительно более легкую форму течения заболевания, позволяют больным достичь совершеннолетия и могут быть впервые выявлены у взрослых людей [5]. Поскольку с возрастом уровни ДНК TREC и KREC в периферической крови снижаются, для оценки состояния им-

мунитета пациента необходимы методики с высокой чувствительностью и специфичностью. В противном случае, в то время как адекватная терапия позволяет не только сохранить жизнь больным с тяжелыми ПИД, но и значительно улучшить качество жизни пациентов с более легкими формами заболеваний, взрослые больные с общим переменным иммунодефицитом могут не получать адекватной заместительной терапии из-за отсутствия своевременной диагностики. Модифицированный нами способ оценки иммунодефицитных состояний может быть использован не только для выявления первичных иммунодефицитов у детей, но и для определения снижения иммунитета у взрослых людей. Данное обстоятельство представляется особенно важным, так как из-за распространенного мнения о том, что ПИД характерны только для детского возраста, врачи смежных специальностей исключают ПИД из дифференциальной диагностики у взрослых пациентов. Описанный в настоящей работе метод количественного определения уровней ТREC и KREC в периферической крови для лабораторной диагностики состояния иммунитета пациентов с использованием ПЦР в режиме реального времени позволит обратить особое внимание лечащих врачей на таких пациентов.

Не менее значима возможность применения настоящего метода не только для выявления случаев первичных иммунодефицитов, но и для диагностики состояния иммунитета при вторичных иммунодефицитах.

Так, при анализе двух групп ВИЧ-инфицированных больных показано достоверное снижение уровней ТREC и KREC у инфицированных в течение длительного времени пациентов с вирусологической неэффективностью АРТ, в то время как уровни целевых анализов у инфицированных менее года лиц не отличались от уровней группы условно здоровых взрослых людей. Полученные нами результаты согласуются с данными иностранных коллег, согласно которым количество ТREC у ВИЧ-инфицированных пациентов коррелирует с различными клинико-патологическими параметрами (возраст больных, вирусная нагрузка РНК ВИЧ в плазме, количество CD4⁺ Т-лимфоцитов, процентное содержание CD4⁺ Т-лимфоцитов), а продукция KREC при АРТ остается неизменной на протяжении 10–12 месяцев, однако снижается после продолжительной терапии [20], что также не противоречит выявленному нами снижению KREC у получавших терапию больных. Известно, что уровень ТREC у ВИЧ-инфицированных лиц повышается после начала АРТ и, хотя не поднимается до характерных для здоровых людей уровней, достигает плато через 12 месяцев и остается стабильным в течение нескольких лет [20]. В нашей работе мы

не наблюдали достаточно высоких уровней ТREC у длительно инфицированных ВИЧ больных, находящихся на терапии. По всей видимости, это может быть связано с тем, что исследуемая нами группа была представлена больными с вирусологической неэффективностью АРТ и, соответственно, высокой вирусной нагрузкой, а также преимущественно низким количеством CD4⁺ клеток. Полученные результаты согласуются с ранее показанными данными, согласно которым количество ТREC у пациентов, нуждающихся в АРТ, значительно ниже не только по сравнению с контрольной группой, но и по сравнению с не нуждающимися в лечении, согласно действующим рекомендациям, ВИЧ-инфицированными пациентами с относительно сохранным числом клеток CD4⁺ [23]. Таким образом, количественное определение уровней ТREC и KREC в периферической крови представляет собой усовершенствованный метод мониторинга состояния иммунитета ВИЧ-инфицированных лиц, а также потенциально — метод определения нуждающихся в терапии больных.

Заключение

Способ лабораторной диагностики состояния иммунитета пациентов с использованием ПЦР в режиме реального времени на основе определения уровней ТREC и KREC обладает высокой специфичностью и чувствительностью. Калибраторы характеризуются стабильностью и воспроизводимостью. Метод позволяет диагностировать снижение Т- и/или В-клеточного иммунитета у детей и взрослых, и может быть применен для детекции молекул ТREC и KREC как в образцах цельной периферической крови, так и в сухой капле крови с использованием карт Гатри. При этом возможно применение единых значений референсных норм, независимо от анализируемого клинического материала. Результаты испытаний свидетельствуют о возможности эффективного использования мультиплексной ПЦР-диагностики как для комплексного первичного тестирования/скрининга новорожденных, так и для оценки состояния иммунитета в целях выявления взрослых больных ПИД и в рамках диагностики пациентов со вторичными иммунодефицитами, например, с инфекцией ВИЧ. Своевременная персонифицированная оценка состояния иммунитета будет способствовать сохранению жизни пациентов и улучшению ее качества.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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. Гордукова М.А., Оскорбин И.П., Мишукова О.В., Зимин С.Б., Зиновьева Н.В., Давыдова Н.В., Смирнова А.С., Никитина И.А., Корсунский И.А., Филипенко М.Л., Продеус А.П. Разработка набора реагентов для количественного определения молекул ДНК TREC и KREC в цельной крови и сухих пятнах крови методом мультиплексной ПЦР в режиме реального времени // Медицинская иммунология. 2015. Т. 17, № 5. С. 467–478. [Gordukova M.A., Oskorbin I.P., Mishukova O.V., Zimin S.B., Zinovieva N.V., Davydova N.V., Smirnova A.S., Nikitina I.A., Korsunsky I.A., Filipenko M.L., Prodeus A.P. Development of real-time multiplex PCR for the quantitative determination of TREC's and KREC's in whole blood and in dried blood spots. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, vol. 17, no. 5, pp. 467–478. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2015-5-467-478
3. Евгина С.А., Савельев Л.И. Современные теория и практика референсных интервалов // Лабораторная служба. 2019. Т. 8, № 2. С. 36–44. [Evgina S.A., Saveliev L.I. Current theory and practice of reference interval. *Laboratornaya sluzhba = Laboratory Service*, 2019, vol. 8, no. 2, pp. 36–44. (In Russ.)] doi: 10.17116/labs2019802136
4. Корсунский И.А., Гордукова М.А., Мунблит Д.Б., Козлов И.Г., Продеус А.П., Корсунский А.А. Клинические и эпидемиологические аспекты первичных иммунодефицитных состояний и их раннего обнаружения // Медицинская иммунология. 2017. Т. 19, № 5. С. 505–512. [Korsunskiy I.A., Gordukova M.A., Munblit D.B., Kozlov I.G., Prodeus A.P., Korsunskiy A.A. Clinical and epidemiological aspects of primary immunodeficiency diseases (PID) and early diagnosis options. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2017, vol. 19, no. 5, pp. 505–512. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2017-5-505-512
5. Латышева Т.В., Латышева Е.А., Мартынова И.А., Аминова Г.Э. Пульмонологические проявления у взрослых пациентов с дефектом гуморального звена иммунитета // Терапевтический архив. 2016. Т. 88, № 8. С. 127–134. [Latysheva T.V., Latysheva E.A., Martynova I.A., Aminova G.E. Pulmonary manifestations in adult patients with a defect in the humoral link of immunity. *Terapevticheskii arkhiv = Therapeutic Archive*, 2016, vol. 88, no. 8, pp. 127–134. (In Russ.)] doi: 10.17116/terarkh2016888127-134
6. Патент № 2756979 Российская Федерация, МПК C12Q 1/686 (2018.01), C12Q 1/6876 (2018.01). Способ лабораторной персонализированной диагностики состояния иммунитета новорожденных и набор олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно меченных зондов: № 2019142752; заявлено 17.12.2019; опубликовано 07.10.2021 / Семенов А.В., Останкова Ю.В., Любимова Н.Е., Тотолян Арег А. Патентообладатель: ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера. 20 с. [Patent No. 2756979 Russian Federation, Int. Cl. C12Q 1/686 (2018.01), C12Q 1/6876 (2018.01). A method for laboratory personalized diagnosis of the state of immunity in newborns and a set of oligodeoxyribonucleotide primers and fluorescently labeled probes: No. 2019142752; application: 17.12.2019; date of publication 07.10.2021 / Semenov A.V., Ostankova Yu.V., Liubimova N.E., Totolian Areg A. Proprietor: FBUN NII epidemiologii i mikrobiologii imeni Pastera. 20 p. (In Russ.)]
7. Тузанкина И.А., Каракина М.Л., Власова Е.В. Анализ клинических проявлений дебюта первичных иммунодефицитов у взрослых // Медицинская иммунология. 2014. Т. 4, № 16. С. 367–374. [Tuzankina I.A., Karakina M.L., Vlasova E.V. Analysis of the clinical manifestations of the onset of primary immunodeficiencies in adults. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2014, vol. 4, no. 16, pp. 367–374. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2014-4-367-374
8. Arismendi M.I., Kallas E.G., Santos B.A., Carneiro-Sampaio M.M., Kayser C. Thymopoiesis and regulatory T cells in healthy children and adolescents. *Clinics*, 2012, vol. 67, no. 5, pp. 425–429. doi: 10.6061/clinics/2012(05)04
9. Baker M.W., Grossman W.J., Laessig R.H., Hoffman G.L., Brokopp C.D., Kurtycz D.F., Cogley M.F., Litsheim T.J., Katcher M.L., Routes J.M. Development of a routine newborn screening protocol for severe combined immunodeficiency. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2009, vol. 124, no. 3, pp. 522–527. doi: 10.1016/j.jaci.2009.04.007
10. Dar N., Gothelf D., Korn D., Frisch A., Weizman A., Michaelovsky E., Carmel M., Yeshayahu Y., Dubnov-Raz G., Pessach I.M., Simon A.J., Lev A., Somech R. Thymic and bone marrow output in individuals with 22q11.2 deletion syndrome. *Pediatr. Res.*, 2015, vol. 4, no. 77, pp. 579–585. doi: 10.1038/pr.2015.14
11. Dyavar S.R., Ye Z., Byrareddy S.N., Scarsi K.K., Winchester L.C., Weinhold J.A., Fletcher C.V., Podany A.T. Normalization of cell associated antiretroviral drug concentrations with a novel RPP30 droplet digital PCR assay. *Sci. Rep.*, 2018, vol. 8, no. 1: 3626. doi: 10.1038/s41598-018-21882-0
12. Esber R., Theresa S., Hjort M., Wiley V. Newborn screening for primary immunodeficiencies — a method evaluation. *Twin Res. Hum. Genet.*, vol. 21, no. 5: Special Section: Abstracts for the 42nd Human Genetics Society of Australasia Annual Scientific Meeting, Sydney, New South Wales, 2018, pp. 429–476. doi: 10.1017/thg.2018.52
13. Hazenberg M.D., Borghans J.A., de Boer R.J., Miedema F. Thymic output: a bad TREC record. *Nat. Immunol.*, 2003, vol. 4, no. 2, pp. 97–99. doi: 10.1038/ni0203-97
14. Kamae C., Nakagawa N., Sato H., Honma K., Mitsuiki N., Ohara O., Kanegane H., Pasic S., Pan-Hammarström Q., van Zelm M.C., Morio T., Imai K., Nonoyama S. Common variable immunodeficiency classification by quantifying T-cell receptor and immunoglobulin κ-deleting recombination excision circles. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2013, vol. 5, no. 131, pp. 1437–1440. doi: 10.1016/j.jaci.2012.10.059
15. Klein S.L., Flanagan K.L. Sex differences in immune responses. *Nat. Rev. Immunol.*, 2016, vol. 16, pp. 626–638. doi: 10.1038/nri.2016.90

16. Kwok J.S.Y., Cheung S.K.F., Ho J.C.Y., Tang I.W.H., Chu P.W.K., Leung E.Y.S., Lee P.P.W., Cheuk D.K.L., Lee V., Ip P., Lau Y.L. Establishing simultaneous T cell receptor excision circles (TREC) and K-deleting recombination excision circles (KREC) quantification assays and laboratory reference intervals in healthy individuals of different age groups in Hong Kong. *Front. Immunol.*, 2020, vol. 11: 1411. doi: 10.3389/fimmu.2020.01411
17. Laitala V., Ylikoski A., Raussi H.M., Ollikka P., Hemmilä I. Time-resolved detection probe for homogeneous nucleic acid analyses in one-step format. *Anal. Biochem.*, 2007, vol. 361, no. 1, pp. 126–131. doi: 10.1016/j.ab.2006.11.015
18. Pido-Lopez J., Imami N., Aspinall R. Both age and gender affect thymic output: more recent thymic migrants in females than males as they age. *Clin. Exp. Immunol.*, 2001, vol. 125, pp. 409–413. doi: 10.1046/j.1365-2249.2001.01640.x
19. Profzaizer T., Slev P. A multiplex, droplet digital PCR assay for the detection of T-cell receptor excision circles and kappa-deleting recombination excision circles. *Clin. Chem.*, 2019, vol. 66, pp. 229–238. doi: 10.1373/clinchem.2019.308171
20. Quiros-Roldan E., Serana F., Chiarini M., Zanotti C., Sottini A., Gotti D., Torti C., Caimi L., Imberti L. Effects of combined antiretroviral therapy on B- and T-cell release from production sites in long-term treated HIV-1+ patients. *J. Transl. Med.*, 2012, vol. 10, no. 94. doi: 10.1186/1479-5876-10-94
21. Rechavi E., Lev A., Simon A.J., Stauber T., Daas S., Saraf-Levy T., Broides A., Nahum A., Marcus N., Hanna S., Stepensky P., Tokar O., Dalal I., Etzioni A., Almashanu S., Somech R. First year of israeli newborn screening for severe combined immunodeficiency-clinical achievements and insights. *Front. Immunol.*, 2017, vol. 8: 1448. doi: 10.3389/fimmu.2017.01448
22. Resino S., Seoane E., Pérez A., Ruiz-Mateos E., Leal M., Muñoz-Fernández M.A. Different profiles of immune reconstitution in children and adults with HIV-infection after highly active antiretroviral therapy. *BMC Infect. Dis.*, 2006, vol. 6: 112. doi: 10.1186/1471-2334-6-112
23. Serana F., Chiarini M., Zanotti C., Sottini A., Bertoli D., Bosio A., Caimi L., Imberti L. Use of V(D)J recombination excision circles to identify T- and B-cell defects and to monitor the treatment in primary and acquired immunodeficiencies. *J. Transl. Med.*, 2013, vol. 11: 119. doi: 10.1186/1479-5876-11-119
24. Sottini A., Serana F., Bertoli D., Chiarini M., Valotti M., Vaglio Tessitore M., Imberti L. Simultaneous quantification of T-cell receptor excision circles (TRECs) and K-deleting recombination excision circles (KRECs) by real-time PCR. *J. Vis. Exp.*, 2014, vol. 94: 52184. doi: 10.3791/52184
25. Tessitore M.V., Sottini A., Roccaro A.M., Ghidini C., Bernardi S., Martellosio G., Serana F., Imberti L. Detection of newly produced T and B lymphocytes by digital PCR in blood stored dry on nylon flocked swabs. *J. Transl. Med.*, 2017, vol. 15, no. 1: 70. doi: 10.1186/s12967-017-1169-9
26. Ye P., Kirschner D.E., Kourtis A.P. The thymus during HIV disease: role in pathogenesis and in immune recovery. *Curr. HIV Res.*, 2004, vol. 2, no. 2, pp. 177–183. doi: 10.2174/1570162043484898
27. Van Zelm M., Van der Burg M., Langerak A.M., Van Dongen J. PID comes full circle: applications of V(D)J recombination excision circles in research, diagnostics and newborn screening of primary immunodeficiency disorders. *Front. Immunol.*, 2011, vol. 2, no. 12, pp. 1–9. doi: 10.3389/fimmu.2011.00012

Авторы:

Сайтгалина М.А., младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии 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;
Любимова Н.Е., к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Семенов А.В., д.б.н., директор Екатеринбургского научно-исследовательского института вирусных инфекций ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, г. Екатеринбург, Россия;
Кузнецова Р.Н., к.м.н., врач-иммунолог-аллерголог медицинского центра ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; доцент кафедры иммунологии ГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;
Тотolian А.А., академик РАН, д.м.н., профессор, директор ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; зав. кафедрой иммунологии ГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский Государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Saitgalina M.A., Junior Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Ostankova Yu.V., PhD (Biology), Head of the Laboratory of HIV Immunology and Virology; Senior Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Liubimova N.E., PhD (Biology), Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Semenov A.V., PhD, MD (Biology), Director of Ekaterinburg Research Institute of Viral Infections of SRC VB Vector of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Ekaterinburg, Russian Federation;
Kuznetsova R.N., PhD (Medicine), Allergologist-Immunologist, Medical Center of St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation; Associate Professor, Department of Immunology, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;
Totolian A.A., RAS Full Member, PhD, MD (Medicine), Professor, Director, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation; Head of the Department of Immunology, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation.

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Статьи представляются в редакцию через систему электронного издательства (<http://iimmun.ru>) в соответствии с требованиями журнала «Инфекция и иммунитет» и «Инструкцией для авторов», представленной на сайте. С февраля 2016 года журнал «Инфекция и иммунитет» публикует статьи на двух языках (русском и английском).

Основные виды статей, публикуемых в журнале

Оригинальная статья

Статья должна описывать результаты законченного исследования. Допускается объем статьи до 20 машинописных страниц, включая рисунки, таблицы. Статья должна содержать: 1) введение; 2) материалы и методы; 3) результаты исследований; 4) обсуждение результатов; 5) благодарности.

- **Введение** содержит обоснование цели и задач проведенного исследования.
- **Материалы и методы** могут излагаться в виде отдельных фрагментов с короткими подзаголовками.
- Все нетрадиционные модификации методов должны быть описаны с достаточной степенью подробности. Для всех используемых в работе реактивов, животных, клеточных культур и т.д. необходимо точно указывать производителей и/или источники получения (с названиями страны, фирмы, института).
- **Результаты** описываются в логической последовательности в виде отдельных фрагментов, разделенных подзаголовками, без элементов обсуждения, без повторения методических подробностей, без дублирования цифровых данных, приведенных в таблицах и рисунках.
- В **обсуждении** проводится детальный анализ полученных данных в сопоставлении с данными литературы, что служит обоснованием выводов и заключений авторов.
- Раздел **«Благодарности»** не является обязательным, но крайне желателен. В этом разделе авторы могут выразить признательность организации, субсидировавшей проведение исследований, коллегам, консультировавшим работу в процессе ее выполнения и/или написания, а также техническому персоналу за помощь в выполнении исследований. Благодарности за предоставление специфических реактивов или оборудования, как правило, помещаются в разделе «Материалы и методы».

Краткие сообщения

Журнал публикует небольшие по объему статьи, которые имеют безусловную новизну и значимость. Эти статьи проходят ускоренное рецензирование и публикуются в короткие сроки. Общий объем краткого сообщения ограничен 8 машинописными страницами, количество рисунков и/или таблиц не может быть более 3, а список использованных литературных источников не должен превышать 15. Титульный лист оформляется, как описано ниже (см. «Подготовка статей»). Разделы краткого сообщения аналогичны вышеописанным разделам оригинальной статьи, но не выделяются заголовками и подзаголовками, результаты могут быть изложены вместе с обсуждением.

Обзорные статьи и лекции

Обзорные статьи и лекции в основном заказываются редакцией или могут быть рекомендованы одним из членов редколлегии. Более подробную информацию о правилах оформления этих статей можно узнать в редакции.

Библиографические стандарты описания цитируемых публикаций

Описание статьи из журнала:

Салина Т.Ю., Морозова Т.И. Иммунологические методы в дифференциальной диагностике // Туберкулез и болезни легких. 2011. Т. 88, № 11. С. 50–53.

Salina T.Yu., Morozova T.I. Immunological methods in differential diagnostics. Tuberculosis and Lung Diseases, 2011, vol. 88, no. 11, pp. 50–53.

Описание статьи из книги (монографии):

Шурыгина И.А., Чеснокова М.В., Климов В.Т. Псевдотуберкулез. Новосибирск: Наука, 2003. 320 с.

Shurygina I.A., Chesnokova M.V., Klimov V.T. Pseudotuberculosis. Novosibirsk: Nauka, 2003. 320 p.

Примеры правильного оформления англоязычных ссылок:

Turenne C.Y., Wallace R., Behr M.A. Mycobacterium avium in the postgenomic era. Clin. Microb. Rev., 2007, vol. 20, no. 2, pp. 205–229.

Goodman J.W., Parslow T.G. Immunoglobulin proteins. Basic and Clinical Immunology. Ed. Stites D.P., Terr A.I., Parslow T.G. Appleton & Lange, 1994, pp. 66–79.

Ссылки на литературные источники в тексте статьи, в рисунках и таблицах обозначаются арабскими цифрами в квадратных скобках [1, 2, 3,...]. Не допускаются ссылки на диссертации, авторефераты диссертаций, публикации в сборниках, методические документы местного уровня. Количество источников не ограничено. В каждой ссылке приводятся все авторы работы. Неопубликованные статьи в список не включаются.

Обозначения, сокращения и единицы измерения

Для сложных терминов или названий, наиболее часто используемых в тексте статьи, можно ввести (в круглых скобках после первого упоминания полного названия термина) не более 3–5 нетрадиционных сокращений. Узаконенные международными номенклатурами сокращения используются в соответствующей транскрипции. Например, для термина «интерлейкин» используется сокращение «IL», а не русскоязычный вариант «ИЛ»; аналогично этому используются сокращения: «TNF», а не «ТНФ» или «ФНО»; «CD», а не «СД». Названия микроорганизмов приводятся в оригинальной транскрипции с использованием курсива (*E. coli*, *Streptococcus pyogenes*). Единицы измерения приводятся без точки после их сокращенного обозначения, регламентированного международными правилами (с, ч, см, мл, мг, кДа и т.д.).

Оформление иллюстративного материала

Иллюстративный материал должен быть оригинальным, т.е. ранее нигде не опубликованным. Общее количество иллюстраций (таблиц и рисунков) не должно превышать восьми. При большем количестве иллюстраций их публикация оплачивается автором. Публикация цветных иллюстраций (независимо от их количества) также оплачивается автором.

Размеры иллюстраций:

- максимальная высота — 210 мм
- максимальная ширина для 1 столбца — 82 мм, для 2 столбцов — 170 мм

Таблицы. Каждая таблица предоставляется отдельным файлом. Таблицы нумеруются арабскими цифрами отдельно от нумерации рисунков (графиков и фотографий). Название печатается над таблицей. Весь текст на русском языке, содержащийся в таблице, включая единицы измерения, должен быть переведен на английский язык; при этом перевод следует помещать в ячейку с соответствующим русским текстом отдельной строкой. Название таблицы и текст примечания к ней также должны быть переведены на английский язык и приведены под русским текстом с новой строки. Для пометок в таблицах следует использовать одну или несколько (*). Пояснения печатаются после соответствующего количества (*) под таблицей. Единицы измерения, при необходимости, включаются в заголовки строк или столбцов.

Рисунки (графики и фотографии). В тексте статьи названия рисунков (графиков, фотографий) и таблиц размещаются сразу после абзаца, где на них дается первая ссылка. Все рисунки нумеруются последовательно арабскими цифрами по мере их включения в текст статьи. Названия рисунков и подписи к ним выносятся в виде списка в отдельный файл. В списке указываются: номер рисунка, название (с большой буквы), текст примечаний (для микрофотографий должно быть указано увеличение). Подписи к рисункам даются краткие, но достаточно информативные. Названия рисунков и примечаний к ним, нарисовочные подписи, текст легенды должны быть переведены на английский язык и размещены под соответствующим текстом с новой строки. Рисунки могут быть представлены в графических форматах с расширением .tif (разрешение не менее 300 dpi при 100% масштабе), .eps или .ai. Изображения, встроенные в документы Word, не принимаются. Графики и диаграммы предоставляются вместе с таблицами, на основе которых они были созданы, или с численными обозначениями показателей, отображаемых соответствующими графическими элементами (столбиками, секторами и т.п.) в виде файлов с расширениями .doc или, предпочтительнее, .xls.

Плата за публикацию статей

При соблюдении правил публикация статей в журнале «Инфекция и иммунитет» является бесплатной для авторов и учреждений, в которых они работают. Редакция может потребовать оплату в следующих случаях: 1) за публикацию цветных иллюстраций; 2) при большом количестве иллюстративного материала (свыше 8 иллюстраций).

Подготовка статей

При предоставлении статьи авторы должны руководствоваться требованиями, приведенными в нижеследующих пунктах. Статья может быть отклонена, если она им не соответствует.

1. Направляя статью в журнал, авторы гарантируют, что поданные материалы не были ранее опубликованы полностью или по частям, в любой форме, в любом месте или на любом языке. Так же авторы гарантируют, что статья не представлена для рассмотрения и публикации в другом журнале. С момента принятия статьи к печати в журнале «Инфекция и иммунитет» приведенный в ней материал не может быть опубликован авторами полностью или по частям в любой форме, в любом месте и на любом языке без согласования с руководством журнала. Исключением может являться: 1) предварительная или последующая публикация материалов статьи в виде тезисов или короткого резюме; 2) использование материалов статьи как части лекции или обзора; 3) использование автором представленных в журнал материалов при написании диссертации или книги. Воспроизведение всего издания или части любым способом запрещается без письменного разрешения издателей. Нарушение закона будет преследоваться в судебном порядке. Охраняется Законом РФ № 5351-1 «Об авторском праве и смежных правах» от 09.07.93 г.
2. Файл отправляемой статьи представлен в формате .doc, .docx, .rtf.
3. Помимо файла со статьей, предоставлены следующие файлы:
 - 1) Файл с метаданными (при загрузке в систему ему присваивается имя «Метаданные»):
 - фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность автора, ответственного за дальнейшую переписку с редакцией (на русском и английском языках);
 - название учреждения, где работает ответственный автор (в русском и официально принятом английском вариантах);
 - почтовый адрес для переписки с указанием почтового индекса (на русском и английском языках);
 - телефон, факс (с указанием кода страны и города), e-mail;
 - фамилия и инициалы остальных соавторов, их ученые степени, ученые звания, должности;
 - полное название статьи, направляемой в редакцию;
 - количество страниц текста, количество рисунков, количество таблиц;
 - раздела журнала, для которого предназначена данная работа: «Лекции», «Обзоры», «Оригинальные статьи», «Краткие сообщения», «В помощь практическому врачу»;
 - дата отправления работы.
 - 2) Отсканированная копия файла с метаданными подписанная всеми авторами (при загрузке в систему ему присваивается имя «Подписи авторов»).

- 3) Титульный лист (при загрузке в систему ему присваивается имя «Титульный лист»), по форме:
 - название статьи (без использования каких-либо сокращений, на русском и английском языках);
 - фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность каждого из соавторов статьи (полностью, на русском и английском языках);
 - подразделение и учреждение, в котором выполнялась работа; в случае, если авторами статьи являются сотрудники разных учреждений, то последние нумеруются по порядку, начиная с единицы, и соответствующая цифра размещается после фамилии автора, представляющего данное учреждение; для маркировки авторов в англоязычной части статьи вместо цифр используются латинские буквы (a, b, c, d и т.д.);
 - сокращенное название статьи для верхнего колонтитула (не более 35 символов, включая пробелы и знаки препинания, на русском и английском языках);
 - не менее 6 ключевых слов на русском и английском языках;
 - адрес для переписки с указанием номера телефона, факса и адреса e-mail.
- 4) Резюме (при загрузке в систему ему присваивается имя «Резюме»). Предоставляется в виде одного абзаца без ссылок и специфических сокращений. Объем — не менее 300 слов. Резюме в полном объеме представляется также в переводе на английский язык. В отдельных случаях, по решению редакционной коллегии, может быть затребован развернутый вариант резюме на английском языке.
- 5) Рисунки, если они есть — каждый отдельным файлом (при загрузке в систему каждому рисунку присваивается имя «Рисунок_Порядковый номер рисунка. Название рисунка»).
- 6) Файл в формате .doc, .docx, .rtf со списком, в котором указываются: номер рисунка, название (с большой буквы), текст примечаний (для микрофотографий должно быть указано увеличение). Подписи к рисункам даются краткие, но достаточно информативные.
- 7) Таблицы, если они есть — каждая отдельным файлом (название каждой таблицы должно быть приведены заголовком в файле с самой таблицей).
- 8) Файл с цитируемой литературой (при загрузке в систему ему присваивается имя «Литература») в виде таблицы из четырех столбцов (альбомная ориентация), где:

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	Ф.И.О., название публикации и источника на английском языке	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи и/или ее DOI
Размещаются в таблице в алфавитном порядке, вначале русскоязычные, затем на языках с латинской графикой	Указывать по библиографическому стандарту, представленному выше	Официальное англоязычное название публикации и источника, где она опубликована — для русскоязычных статей. В редких случаях, когда не существует официальных англоязычных названий, редакция просит предоставлять их перевод, обозначая его красным цветом шрифта. Для англоязычных публикаций и источников в этом столбце ставится прочерк	В том случае, если информация о статье не размещена на официальном сайте издания, допустимо использовать URL статьи со сторонних сайтов, в т.ч. системы www.e-library.ru . DOI статьи приводится в квадратных скобках после URL-адреса

4. Текст должен быть набран с одинарным межстрочным интервалом; используется кегль шрифта в 14 пунктов; для выделения используется курсив, а не подчеркивание; все ссылки на иллюстрации, графики и таблицы расположены в соответствующих местах в тексте, а не в конце документа.
5. Текст соответствует стилистическим и библиографическим требованиям.
6. Если вы отправляете статью в рецензируемый раздел журнала, то вы согласны с требованиями слепого рецензирования, подробнее о котором можно узнать на сайте журнала (<http://iimmun.ru>) в рубрике «Рецензирование» раздела «О журнале».

**Вы можете оформить подписку на журнал
 «Инфекция и иммунитет» через отделения связи:
 ООО «Урал-Пресс-Округ» и электронный каталог «Российская периодика»
 в сети Internet на сайте www.arpk.org.
 Подписной индекс 41392.
 Подписка на электронную версию журнала
 на сайте www.elibrary.ru**

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Абрамович А.В.	963	Родионов И.С.	963	Chudilova G.A.	850
Афанасьев М.С.	929	Рубакова Э.И.	827	Danilenko D.M.	837
Афанасьев С.С.	929	Рура Ф.К.	953	Egorova S.A.	902
Бадтиев А.К.	953	Рябухин Д.С.	819	Firstkov A.L.	837
Баклай В.И.	938	Савельева О.В.	875	Forghani M.	837
Баловнева М.В.	971	Сайтгаллина М.А.	981	Gavrilova E.G.	859
Батагова Ф.Э.	953	Самойленко Е.С.	938	Gnativ B.R.	891
Белькова Н.Л.	976	Самойлович Е.О.	909	Hadighi R.	947
Будченко А.А.	919	Самсонова А.П.	875	Hoang M.	902
Викторов Д.В.	919	Семейко Г.В.	909	Kalinina E.L.	891
Воропаев А.Д.	929	Семенов А.В.	981	Kashaniyan M.	947
Воропаева Е.А.	929	Сердюков В.В.	963	Khaidukov S.V.	850
Герасимова А.Г.	909	Синьков В.В.	976	Khalturina E.O.	850
Дзагурова Т.К.	971	Скупневский С.В.	953	Khamsheh M.-E.	947
Екатеринчев Д.А.	929	Сунцов В.В.	809	Komissarov A.B.	837
Ермолович М.А.	909	Теодорович Р.Д.	971	Korobova Z.R.	859
Жданова С.Н.	976	Терешко Д.Л.	919	Kulikov A.N.	859
Захарова И.Б.	919	Тихонова Н.Т.	909	Kuznetsova R.N.	859
Зверев В.В.	929	Ткаченко Е.А.	971	Lavrentieva I.N.	902
Иванова А.Е.	875	Топорков А.В.	919	Lebedeva A.A.	859
Ишмухаметов А.А.	971	Тотolian A.A.	981	Liubimova N.E.	859
Калинин А.В.	963	Тураева Н.В.	909	Lomonosova V.I.	891
Колесникова Н.В.	938	Урбан Ю.Н.	929	Nelyubin V.N.	850
Кондратов И.Г.	976	Фарниева Ж.Г.	953	Nesterova I.V.	850
Коротецкая М.В.	827	Хромова П.А.	976	Pevtcov D.E.	859
Котенева Е.А.	963	Цвиркун О.В.	909	Polushin Yu.S.	859
Кузнецов А.Н.	919	Цыганкова О.И.	963	Rafiei-Sefiddashti R.	947
Кузнецова Р.Н.	981	Чиен Д.	919	Razi A.	869
Кулаков М.Я.	919	Шарапова Н.Е.	875	Rubinstein A.A.	859
Куличенко А.Н.	963	Шербакова В.Ю.	963	Safonova O.S.	891
Курашова С.С.	971	Ahmadabad H.N.	869	Shlyk I.V.	859
Лиханская Е.И.	929	Alyannezhadi M.M.	837	Siuziumova E.A.	891
Лоскутов С.И.	819	Andreassen A.K.	891	Sokolova O.V.	891
Любимова Н.Е.	981	Antipova A.Yu.	902	Solati A.	869
Майданикова Е.Ю.	938	Arezumand R.	869	Stanevich O.V.	859
Несвижский Ю.В.	929	Arsentieva N.A.	859	Stankevich A.I.	891
Новицкая И.В.	919	Azimian A.	869	Stoyanova N.A.	891
Отарков О.Б.	976	Baimova R.R.	891	Tokarevich N.K.	891
Омельченко Е.В.	938	Bancevic M.D.	902	Totolian A.A.	859, 902
Орлова Е.А.	976	Batsunov O.K.	859	Tronin A.A.	891
Останкова Ю.В.	981	Bichurina M.A.	902	Valizadeh G.	947
Петров Е.М.	875	Blinova O.V.	891	Vikse R.	891
Попова Ю.В.	971	Bubnova L.A.	891	Vorobyov E.A.	859
Прошин С.Н.	819	Buts L.V.	891	Vorobyova S.V.	859
Пушаева Е.Г.	953	Buzinov R.V.	891	Zheleznova N.V.	902
Пушкарь В.Г.	919	Camara J.	902		

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

16S	976	природные очаги лептоспирозов	875	European North of Russia	891
антигенный эритроцитарный		реакция микроагглютинации	875	hemagglutinin	837
диагностикум	919	РНГА	919	herd immunity	902
белок	819	секвенирование	976	herpesvirus infections	850
вакциноterapia	953	серогруппа	875	hexapeptide	850
видообразование	809	серопревалентность	909	human granulocytic anaplasmosis	891
вирус Пуумала	971	сибирская язва	963	human monocytic ehrlichiosis	891
ВИЧ	929	скрининг	909	hyperthyroidism	947
гастроинтестинальный барьер	819	Социалистическая Республика		hypothyroidism	947
геморрагическая лихорадка		Вьетнам	919	influenza	837
с почечным синдромом	971	схема вакцинации	971	intensive care unit	869
диагностика	938	токсин	963	interferon system	850
желудочно-кишечный тракт	819	трансляционная биомедицина	819	interleukins	859
иммунитет	909	тромбоэмболические осложнения	938	ITS	976
иммунный ответ	827, 971	туберкулез	827	KREC	981
иммунный статус	981	ферменты	827	latent toxoplasmosis	947
иммунодефицит	981	филогенез	809	Lyme disease	891
иммунодиагностика	919	флуконазол	929	MDR1	929
иммунотоксический эффект	953	хантавирусный вакцинный препарат	971	modeling	837
инфекционный эндокардит	938	хозяйственные очаги лептоспирозов	875	mortality	869
капсула	963	цитокины	963	multiplex analysis	859
краснуха	909	эволюционные модели	809	<i>Mycobacterium</i>	976
лептоспирозы	875	эволюция	819	neutrophilic granulocytes	850
лептоспиры	875	эйкозаноиды	827	nuclear factor NF-κB	850
лимонная кислота	953	экологический сценарий	809	Q fever	891
липидные медиаторы	827	янтарная кислота	953	reduced amino acid alphabet	837
макрофаги	963	AAindex	837	Republic of Guinea	902
масляные адьюванты	953	acute toxoplasmosis	947	Republic of Serbia	902
мелиондоз	919	antibodies	891	rRNA operon	976
метаболизм	827	antigenic evolution	837	rubella	902
метод диагностики	981	autoimmune thyroiditis disease	947	Russian Federation	902
микробиом	819	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	919	seroprevalence	891
моделирование инфекции <i>in vitro</i>	963	<i>Candida albicans</i>	929	severity	859
молекулярная таксономия бактерий	976	CDR1	929	SNP	938
мониторинг	909	CDR2	929	South Vietnam	902
нейтрализующие антитела	971	clinical outcome	869	tick-borne encephalitis	891
патогенез	938	complement system	869	transcription factors	850
патология соединительной ткани	953	COVID-19	859, 869	TREC	981
плазмиды вирулентности	963	cytokines	859	vaccination	902
полный адьювант Фрейнда	953	decision trees	859	VEGF	938
популяционный иммунитет	919	discharge	869	<i>Yersinia pestis</i>	809
популяция	909	Erg11	929	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	809

Иллюстрации к статье «Кодирование с помощью сокращенного аминокислотного алфавита и его влияние на моделирование антигенной эволюции гриппа» (авторы: М. Форгани, А.Л. Фирстков, М.М. Аляннеджади, Д.М. Даниленко, А.Б. Комиссаров) (с. 837–849)

Illustrations for the article “Reduced amino acid alphabet-based encoding and its impact on modeling influenza antigenic evolution” (authors: Forghani M., Firstkov A.L., Alyannezhadi M.M., Danilenko D.M., Komissarov A.B.) (pp. 837–849)

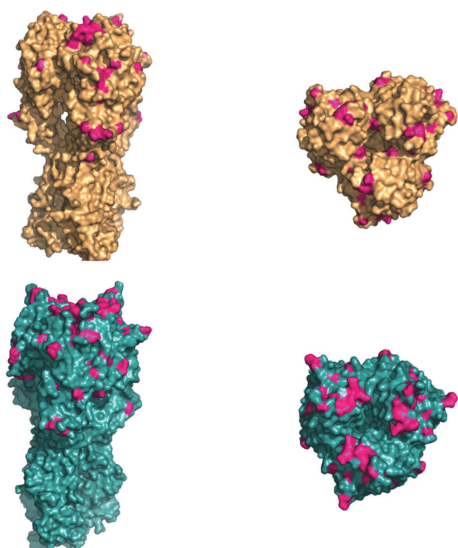


Figure 3. Visualization of high-impact sites on the surface of hemagglutinin protein by PyMOL [26]

Note. Top — H1 protein (PDB ID: 1RUY [3, 12]). Bottom — H3 protein (PDB ID: 5THF [3, 33]). Note that the highlighted sites include not only the antigenic sites but also those experimentally determined as T-cell epitopes, B-cell epitopes, as well as MHC-binding epitopes of different classes.

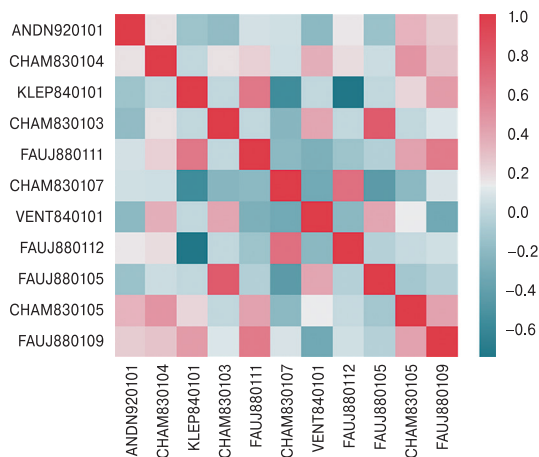


Figure 4. Correlation matrix of 11 unique AAindex1 entries from Table 5

Note. Majority of indices have low correlation.

Иллюстрации к статье «Повышение безопасности вакцинопрофилактики на основе масляных адьювантов» (авторы: С.В. Скупневский, Е.Г. Пухаева, А.К. Бадтиева, Ф.К. Руруа, Ф.Э. Батагова, Ж.Г. Фарниева) (с. 953–962)

Illustrations for the article “Improving safety of oil adjuvant-based vaccines” (authors: Skupnevskii S.V., Pukhaeva E.G., Badatieva A.K., Rurua F.K., Batagova F.E., Farnieva Zh.G.) (pp. 953–962)

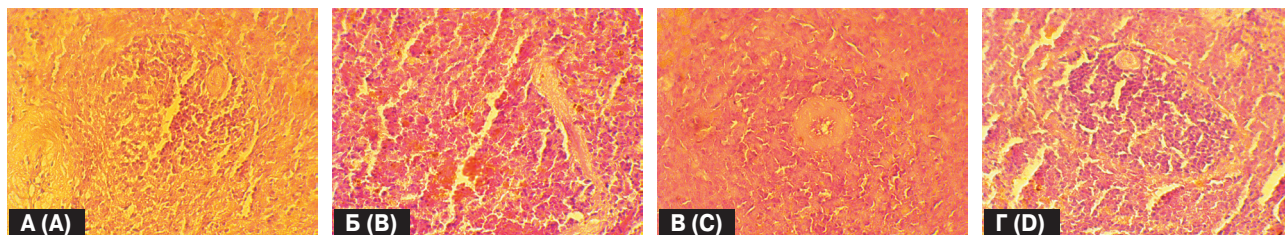


Рисунок 1. Микрофотографии селезенки крыс (увеличение 10×40)

Figure 1. Rat spleen histology microimages (magnification 10×40)

Примечание. А) негативный контроль; Б) позитивный контроль; В) опыт «мин.»; Г) опыт «макс.».

Note. A) negative control; B) positive control; C) “min.” experiment; D) “max.” experiment.

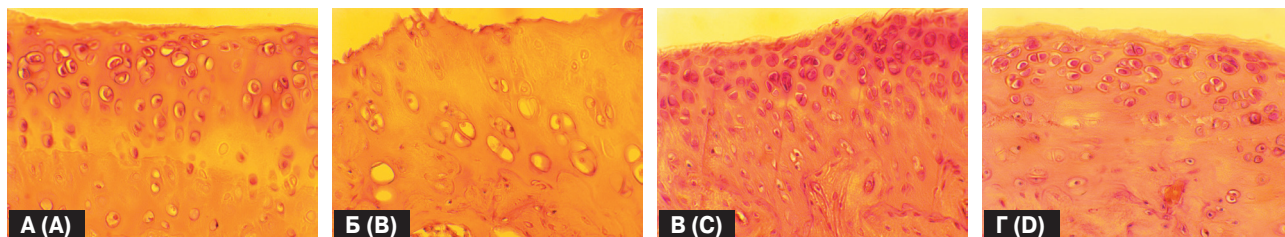


Рисунок 2. Микрофотографии суставного хряща зоны коленного сустава крыс (увеличение 10×40)

Figure 2. Microimages of rat knee articular cartilage (magnification 10×40)

Примечание. А) негативный контроль; Б) позитивный контроль; В) опыт «мин.»; Г) опыт «макс.».

Note. A) negative control; B) positive control; C) “min.” experiment; D) “max.” experiment.

Подписной индекс:
Урал-Пресс – 41392

