

2

МАРТ – АПРЕЛЬ

Том 99
2022

Ж
М
Э
И

ЖУРНАЛ
МИКРОБИОЛОГИИ
ЭПИДЕМИОЛОГИИ И
ИММУНОБИОЛОГИИ

ISSN 2686-7613 (Online)
ISSN 0372-9311 (Print)

JOURNAL

OF MICROBIOLOGY
EPIDEMIOLOGY
AND
IMMUNOBIOLOGY

2

MARCH – APRIL

VOLUME 99
2022

УЧРЕДИТЕЛИ:
ФБУН ЦНИИ ЭПИДЕМИОЛОГИИ РОСПОТРЕБНАДЗОРА
ВСЕРОССИЙСКОЕ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЕ ОБЩЕСТВО ЭПИДЕМИОЛОГОВ,
МИКРОБИОЛОГОВ И ПАРАЗИТОЛОГОВ

ЖУРНАЛ МИКРОБИОЛОГИИ, ЭПИДЕМИОЛОГИИ И ИММУНОБИОЛОГИИ

(Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii)

Двухмесячный научно-практический журнал

Основан в 1924 г.

Рецензируемый «Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии» рассматривает актуальные проблемы мировой науки и обеспечивает синтез новейших результатов исследований в области микробиологии, вирусологии, эпидемиологии, вакцинологии, иммунобиологии, профилактики и контроля инфекционных заболеваний. Междисциплинарный подход дает возможность интеграции передовых научных знаний смежных специальностей, широкого видения проблем фундаментальной и прикладной инфектологии, а также комплексного подхода к созданию биомедицинских технологий. К публикации принимаются научные труды российских и зарубежных исследователей, лекции, а также методические материалы и законодательные документы в области сохранения эпидемиологического благополучия населения.

Журнал входит в базу данных SCOPUS и рекомендованный ВАК «Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук» по специальностям:

- 1.5.10. Вирусология (медицинские и биологические науки),
- 1.5.11. Микробиология (медицинские и биологические науки),
- 3.2.2. Эпидемиология (медицинские и биологические науки),
- 3.2.7. Аллергология и иммунология (медицинские и биологические науки).

2

МАРТ – АПРЕЛЬ

**ТОМ 99
2022**

Журнал зарегистрирован
Федеральной службой по надзору
в сфере связи, информационных
технологий и массовых
коммуникаций.

Свидетельство ПИ № ФС77-75442

ISSN 0372-9311 (Print)

ISSN 2686-7613 (Online)

DOI prefix: 10.36233

Журнал открытого доступа,
не берущий плату за публикации.
Контент доступен под лицензией
Commons Attribution International
4.0 CC-BY.

Используется сервис CrossMark для
поддержания контента журнала
в актуальном состоянии и информирования
читателей об изменениях в опубликованных
статьях.

При публикации статьи на русском
и английском языках статья
размещается под одним DOI.
Переводы публикуются на сайте журнала.

**Журнал представлен
в международных базах данных
и информационно-справочных
системах:**

SCOPUS, Russian Science Citation
Index (RSCI), интегрированная с
платформой Web of Science; DOAJ;
Ulrich's Periodicals Directory, ROAD;
EBSCO Publishing (на платформе
EBSCOhost); CrossRef; Dimensions.

ПОДПИСКА:

«Объединенный каталог. Пресса
России. Газеты и журналы»,
подписные индексы: E71436, 71436.

**Полные тексты статей журнала
доступны на сайтах:**

[https://www.microbiol.elpub.ru/](https://www.microbiol.elpub.ru;);
<https://www.elibrary.ru/>;
<https://www.cyberleninka.ru/>;
<https://www.rucont.ru/>;
<https://www.ebsco.com>.

УЧРЕДИТЕЛИ:

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора
www.crie.ru
Всероссийское научно-практическое
общество эпидемиологов,
микробиологов и паразитологов

ИЗДАТЕЛЬ:

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора
111123, Москва,
ул. Новогиреевская, д. 3А.
Тел.: +7(495) 974-96-46.
E-mail: crie@pcr.ru

*Начальник редакционно-
издательского отдела:*
Осокина Ольга Владимировна

РЕДАКЦИЯ:

111123, Москва,
ул. Новогиреевская, д. 3А.
Тел.: +7(925)011-87-79.
E-mail: jmei@crie.ru

Заведующая редакцией:

Устинкова Ольга Владимировна

Журнал размещает рекламу в соответствии
с ФЗ РФ от 13.03.2006 № 38-ФЗ
«О рекламе» и рекламной политикой.

К публикации принимаются только статьи,
подготовленные в соответствии с правилами
для авторов (www.microbiol.elpub.ru).

Направляя статью в редакцию, авторы
принимают условия договора публичной
оферты (<https://microbiol.elpub.ru/jour>).

Подписано в печать 27.04.2022.

Формат 60×90^{1/8}. Тираж 280 экз.

Усл.-печ. л. 15,5.

Отпечатано в «Объединенный
полиграфический комплекс».

115114, Москва, Дербеневская

набережная, 7с2.

E-mail: info@opk.bz. www.opk.bz

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

Зверев В.В., д.б.н., проф., академик РАН, зав. кафедрой микробиологии, вирусологии, иммунологии, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Заместитель главного редактора

Семенов Т.А., д.м.н., проф., руководитель отдела эпидемиологии ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия

Ответственный секретарь

Платонов А.Е., д.м.н., проф., главный научный сотрудник лабораторий эпидемиологии природно-очаговых инфекций, ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Российские члены редакционной коллегии

Акимкин В.Г., д.м.н., проф., академик РАН, директор ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва

Брико Н.И., д.м.н., проф., академик РАН, директор Института общественного здоровья, зав. кафедрой эпидемиологии и доказательной медицины, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва

Брусина Е.Б., д.м.н., проф., зав. кафедрой эпидемиологии, Кемеровский государственный медицинский университет, Кемерово

Бухарин О.В., д.м.н., проф., академик РАН, научный руководитель Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения РАН, Оренбург

Гинцбург А.Л., д.б.н., проф., академик РАН, директор ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва

Горелов А.В., д.м.н., проф., член-корр. РАН, зам. директора по научной работе ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва

Жирнов О.П., д.б.н., проф., чл.-корр. РАН, зав. лабораторией вирусного патогенеза Института вирусологии им. Д.И. Иванова, ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва

Караулов А.В., д.м.н., проф., академик РАН, зав. кафедрой клинической иммунологии и аллергологии Института клинической медицины, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва

Козлов Р.С., д.м.н., проф., член-корр. РАН, ректор, Смоленский государственный медицинский университет, Смоленск

Куличенко А.Н., д.м.н., проф., член-корр. РАН, директор Ставропольского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора, Ставрополь, Россия

Кутырев В.В., д.м.н., проф., академик РАН, директор, Российский научно-исследовательский институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов

Лобзин Ю.В., д.м.н., проф., академик РАН, директор, Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург

Иностранные члены редакционной коллегии

Alexander V. Bocharov, MD, PhD (Medicine), Staff scientist, Department of Laboratory Chemistry, Clinical Center, National Institutes of Health, Bethesda, USA

Shubhada Vopengamage, PhD, MSc, Professor, Institute of Microbiology, Slovak Medical University, Bratislava, Slovak Republic

Michael O. Favorov, PhD, D.Sci. (Medicine), President, DiaPrep System Inc., Atlanta, GA, United States; Chief Scientific Officer, Turcklab, Turkey

Elena A. Govorkova, MD, PhD, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, USA

Helmut Hahn, MD, PhD, Professor, Vice-president of the European Academy of Natural Sciences, President of the R. Koch Medical Society (Germany), Chairman of German-Russian Koch-Mechnikov Forum, Berlin, Germany

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Игнатьев Г.М., д.м.н., проф., зам. рук. направления качества и инновационных разработок ФГБНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова» РАН, Москва, Россия

Кюрегян К.К., д.б.н., проф., зав. отделом изучения вирусных гепатитов НИИ молекулярной и персонализированной медицины ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования», Москва, Россия

Мескина Е.Р., д.м.н., зав. отделением детских инфекций отдела терапии, ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского», Москва, Россия

Лукашев А.Н., д.м.н., проф., член-корр. РАН, директор Института медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И. Марциновского, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва

Максютов Р.А., д.б.н., генеральный директор, ГНЦ вирусологии и биотехнологии (Вектор) Роспотребнадзора, Новосибирск

Малеев В.В., д.м.н., проф., академик РАН, советник директора, ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва

Михайлов М.И., д.м.н., проф., чл.-корр. РАН, зав. лабораторией вирусных гепатитов НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва; проф. кафедры эпидемиологии Белгородского государственного университета, Белгород

Несвижский Ю.В., д.м.н., проф., проф. кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии им. А.А. Воробьева, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва

Онищенко Г.Г., д.м.н., проф., академик РАН, зав. кафедрой экологии человека и гигиены окружающей среды, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва

Свищич О.А., д.м.н., чл.-корр. РАН, директор, НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва

Тартаковский И.С., д.б.н., проф., зав. лабораторией легионеллеза, ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва

Тотолян А.А., д.м.н., проф., академик РАН, директор, Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург

Черкасов С.В., д.м.н., проф., чл.-корр. РАН, врио директора, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения РАН, Оренбург

Шаркова В.А., д.м.н., проф., зав. кафедрой микробиологии и вирусологии, Тихоокеанский государственный медицинский университет, Владивосток

Werner Lubitz, MSc, PhD, Professor, VP R&D, Founder, Biotech Innovation Research Development & Consulting, Vienna, Austria

Bogdan N. Petrunov, MD, DSc, Professor, Academic of the Bulgarian Academy of Sciences, National Center of Infectious and Parasitic Diseases, President of the Medical Section of the Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria

Georgy S. Nikolov, MD, PhD, Associate Professor, National Center of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia, Bulgaria

Murad Giyas oglu Mammadov, MD, DSc, Professor, National Oncology Center of the Ministry of Health of the Republic of Azerbaijan, Baku, Republic of Azerbaijan

Мефед К.М., к.б.н., зам. генерального директора по трансферу лекарственных средств, ООО «БиоИнтегратор», группа компаний «ХимРАР», Москва, Россия

Миронов К.О., д.м.н., рук. научной группы разработки новых методов выявления генетических полиморфизмов, ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва

Никонова А.А., к.б.н., зав. лаб. молекулярной биотехнологии, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия

FOUNDERS:
Central Research Institute for Epidemiology
Russian Scientific Society of Epidemiologists, Microbiologists and Parasitologists

**JOURNAL
of MICROBIOLOGY,
EPIDEMIOLOGY
AND
IMMUNOBIOLOGY**
(Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii)

Bimonthly scientific and practical journal

Founded in 1924

Peer-reviewed Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology is dedicated to the most significant issues of world science and provides a synthesis of the cutting edge research in the field of microbiology, virology, epidemiology, vaccinology, immunobiology, prevention of infectious diseases.

The interdisciplinary approach enables the reader to integrate advanced scientific knowledge of related specialties, to receive a broad vision of the problems of fundamental and applied infectology and a comprehensive approach to creating innovative biomedical technologies.

The Journal welcomes Russian and foreign original research articles, reviews, brief reports, mini-reviews, opinions and other special featured articles as well as lectures, methodological materials related to its profile.

The journal is indexed in the SCOPUS database and 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:

- 1.5.10. Virology (medical and biological sciences);
- 1.5.11. Microbiology (medical and biological sciences);
- 3.2.2. Epidemiology (medical and biological sciences);
- 3.2.7. Clinical immunology, Allergology (medical and sciences)

2

MARCH–APRIL

VOLUME 99

2022

The journal is registered by the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology and Mass Media. Certificate of registration PI no. FS77-75442

ISSN 0372-9311 (Print)
ISSN 2686-7613 (Online)

DOI prefix: 10.36233

The journal is an Platinum Open Access peer-reviewed scholarly journal, which does not charge author fees.

The content is licensed under Commons Attribution International 4.0 CC-BY.

The CrossMark service is used.

Some articles are translated into English under the decision of the Editorial Board. When publishing an article in Russian and English, the translated article is placed under the same DOI on the Journal's website.

The Journal is indexed by the following abstracting and indexing services:

SCOPUS, Russian Science Citation Index (RSCI) database, integrated in Web of Science; DOAJ; Ulrich's Periodicals Directory, ROAD; EBSCO Publishing (on the EBSCOhost platform); CrossRef; Dimensions.

Index for subscription to the printed version of the journal:

United directory. Press of Russia. Newspapers and magazines: E71436, 71436.

Full texts of issues of the journal are available:

<https://www.microbiol.elpub.ru;>
<https://www.elibrary.ru;>
<https://www.cyberleninka.ru;>
<https://www.rucont.ru;>
[https://www.ebsco.com.](https://www.ebsco.com)

FOUNDERS:

Central Research Institute for Epidemiology; Russian Scientific and Practical Society of Epidemiologists, Microbiologists and Parasitologists

PUBLISHER:

Central Research Institute for Epidemiology, 111123, 3A, Novogireevskaya St., Moscow, Russian Federation.
Phone/fax: +7(495) 974-96-46.
E-mail: crie@pcr.ru

EDITORIAL OFFICE:

5A, Maly Kazenny per., Moscow, 105064, Russia.
Tel.: +7(925)011-87-79.
E-mail: jmei@crie.ru

Head of the Editorial and publishing department:

Olga V. Osokina

Head of Editorial Office:

Olga V. Ustinkova

The Editorial Board is not responsible for the advertising content.

The materials that do not meet the requirements of the journal (www.microbiol.elpub.ru) are rejected without further consideration.

When the author submits an article to the Editorial Board, he/she accepts the terms and conditions of the public offer agreement (<https://microbiol.elpub.ru/jour>).

Signed to the press on April 27, 2022.
Print format 60×90^{1/8}. Circulation 280 copies.

Printed at the Ob'yedinenny poligraficheskij kompleks Ltd.115114, 7C2, Dorbenevskaya emb., Moscow, Russian Federation.
E-mail: info@opk.bz. www.opk.bz

© Central Research Institute for Epidemiology, 2022

EDITOR-IN-CHIEF

Vitaly V. Zverev, Dr. Sci. (Biology), RAS Full Member, Professor, Head, Department of microbiology, virology and immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

Deputy Editor

Tatiana A. Semenenko, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Head, Epidemiology Department, N.F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Executive Secretary

Alexander E. Platonov, Professor, Dr. Sci. (Medicine), chief researcher, Laboratory of Zoonoses, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

EDITORIAL BOARD

Russian members of the Editorial Board

Vasily G. Akimkin, RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Director, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow

Nikolay I. Briko, RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Director, Institute of Public Health, Head, Department of Epidemiology and Evidence-Based Medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow

Elena B. Brusina, professor, Dr. Sci. (Medicine), Head, Department of epidemiology, Kemerovo State Medical University, Kemerovo

Oleg V. Bukharin, RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Scientific Director of the Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Ural Branch of the Academy of Sciences, Orenburg, Russia

Aleksandr L. Gintsburg, RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Biology), Director, N.F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow,

Alexandr V. Gorelov, RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Deputy Director for Scientific Research, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow

Oleg P. Zhirnov, RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Biology), Head, Laboratory of viral pathogenesis, N.F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow

Alexander V. Karaulov, RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Head, Department of Clinical Immunology and Allergology, Institute of Clinical Medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow

Alexander N. Kulichenko, D. Sci. (Medicine), Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Director of the Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russia

Roman S. Kozlov, RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Rector, Smolensk State Medical University, Smolensk

Vladimir V. Kutryev, RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Director, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov

Yuri V. Lobzin, RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Director, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, St. Petersburg

Foreign members of the Editorial Board

Alexander V. Bocharov, MD, PhD (Medicine), Staff scientist, Department of Laboratory Chemistry, Clinical Center, National Institutes of Health, Bethesda, USA

Shubhada Bopagama, PhD, MSc, Professor, Institute of Microbiology, Slovak Medical University, Bratislava, Slovak Republic

Michael O. Favorov, PhD, DSc (Medicine), President, DiaPrep System Inc., Atlanta, GA, United States; Chief Scientific Officer, Turklab, Turkey

Elena A. Govorkova, MD, PhD, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, USA

Helmut Hahn, MD, PhD, Professor, Vice-president of the European Academy of Natural Sciences, President of the R. Koch Medical Society (Germany), Chairman of German-Russian Koch-Mechnikov Forum, Berlin, Germany

EDITORIAL COUNCIL

Georgiy M. Ignatyev, Dr. Sci. (Medicine), Professor, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products, Moscow, Russia

Karen K. Kyuregyan, Dr. Sci. (Biology), Professor, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education; I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Elena R. Meskina, Dr. Sci. (Medicine), M.F. Vladimirovsky Moscow Regional Research Clinical Institute, Moscow, Russia

Alexander N. Lukashev, RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Director, Martsinovskiy Institute of Medical Parasitology, Tropical and Vector-Borne Diseases, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow

Rinat A. Maksyutov, Dr. Sci. (Biology), Director General, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Novosibirsk

Victor V. Maleev, RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Director adviser, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow

Mikhail I. Mikhaylov, RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Head, Laboratory of viral hepatitis, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Professor, Department of epidemiology, Belgorod State University, Medical Institute, Belgorod

Gennadiy G. Onishchenko, RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Head, Department of Human Ecology and Environmental Health, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow

Yury V. Nesvizhsky, Dr. Sci. (Med.), Professor, Department of microbiology, virology and immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

Oxana A. Svitich, RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Director, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow

Valentina A. Sharkova, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Head, Department of Microbiology and Virology, Pacific State Medical University, Vladivostok

Igor S. Tartakovskiy, Professor, Dr. Sci. (Biology), Head, Laboratory of legionellosis, N.F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow

Areg A. Totolian, RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Director Saint-Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg

Sergey V. Cherkasov, RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Director, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Ural Branch of RAS, Orenburg

Werner Lubitz, MSc, PhD, Professor, VP R&D, Founder, Biotech Innovation Research Development and Consulting, Vienna, Austria

Bogdan N. Petrunov, MD, DSc, Professor, Academic of the Bulgarian Academy of Sciences, National Center of Infectious and Parasitic Diseases, President of the Medical Section of the Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria

Georgiy S. Nikolov, MD, PhD, Associate Professor, National Center of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia, Bulgaria

Murad Giyas oglu Mammadov, MD, DSc, Professor, National Oncology Center of the Ministry of Health of the Republic of Azerbaijan, Baku, Republic of Azerbaijan

Kirill M. Mefed, Cand. Sci. (Biology), BiolIntegrator LLC (HimRaR group of companies), Moscow, Russia

Konstantin O. Mironov, Dr. Sci. (Medicine), Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

Alexandra A. Nikonova, Cand. Sci. (Biology), I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia

СОДЕРЖАНИЕ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Власенко Н.В., Чурилова Н.С., Лоскутова Т.А., Миронов К.О., Есьман А.С., Дунаева Е.А., Семенов Т.А., Родионова З.С., Никитин И.Г., Тутельян А.В., Кузин С.Н., Акимкин В.Г. Оценка эпидемиологической значимости молекулярно-генетических факторов в отношении напряжённости поствакцинального иммунитета против гепатита В*	150
Давыдов В.В., Жаворонок С.В., Рогачева Т.А., Новик Т.П., Алаторцева Г.И., Нестеренко Л.Н., Сидоров А.В., Лухверчик Л.Н., Михайлов М.И., Зверев В.В. Распространённость антител к вирусу гепатита Е у населения регионов Республики Беларусь*	160
Кравцов А.Л., Бугоркова С.А., Клюева С.Н., Гончарова А.Ю., Кожевников В.А., Чумачкова Е.А., Портенко С.А., Щербакова С.А. Оценка интенсивности дегрануляции и изменений фенотипа нейтрофилов по уровню экспрессии Fc γ RIIIb в крови больных COVID-19 и реконвалесцентов	172
Шамсутдинова О.А., Карал-оглы Д.Д., Лаврентьева И.Н. Использование ПЦР-РВ как теста, подтверждающего отсутствие остаточной нейровирулентности штаммов для живых противовирусных вакцин	185
Сорокин В.М., Водопьянов А.С., Цимбалистова М.В., Павлович Н.В. Дифференциация подвидов <i>Francisella tularensis</i> методом INDEL-типирования	193
Джидарян А.А., Матуа А.З., Медкова А.Ю., Семин Е.Г., Синяшина Л.Н., Дьяков И.Н., Чернышова И.Н., Кубрава Д.Т., Амичба А.А., Каджария И.Г., Микеабиа З.Я., Каратаев Г.И. Безопасность и иммуногенность препарата живой коклюшной вакцины ГамЖВК интраназального применения на экспериментальной модели детёнышей обезьян вида павиан гамадрил*	203
Отрашевская Е.В., Казакова Е.В., Жиренкина Е.Н., Трухин В.П., Игнатъев Г.М. Ретроспективный серологический анализ распространения флавивирусных лихорадок и лихорадки Чикунгунья в Никарагуа — авидность специфических антител как инструмент дифференциальной диагностики	215
Годовалов А.П., Боев И.А. Активность факторов периферической крови против <i>Candida albicans</i>	225
ОБЗОРЫ	
Поляк Ю.М., Поляк М.С. Роль цианотоксинов в патологии человека и животных (обзор)	231
Смирнова С.С., Егоров И.А., Голубкова А.А. Гнойно-септические инфекции у родильниц. Часть 2. Клинико-патогенетическая характеристика нозологических форм, этиология и антибиотикорезистентность (обзор литературы)	244
НЕКРОЛОГИ	
Памяти Рахима Мусаевича Хаитова (6 января 1944 года – 11 марта 2022 года)	260

* Статья опубликована на русском и английском языках на сайте журнала: <https://www.microbiol.elpub.ru>.

CONTENTS

ORIGINAL RESEARCHES

Vlasenko N.V., Churilova N.S., Loskutova T.A., Mironov K.O., Esman A.S., Dunaeva E.A., Semenenko T.A., Rodionova Z.S., Nikitin I.G., Tutelian A.V., Kuzin S.N., Akimkin V.G. Evaluation of the epidemiological significance of molecular genetic factors in relation to the intensity of post-vaccination immunity against hepatitis B*	151
Davydov V.V., Zhavoronok S.V., Rogacheva T.A., Novik T.P., Alatortseva G.I., Nesterenko L.N., Sidorov A.V., Lukhverchik L.N., Mikhailov M.I., Zverev V.V. Prevalence of antibodies to the hepatitis E virus in the population of the Republic of Belarus*	161
Kravtsov A.L., Bugorkova S.A., Klyueva S.N., Goncharova A.Yu., Kozhevnikov V.A., Chumachkova E.A., Portenko S.A., Shcherbakova S.A. Assessment of neutrophil degranulation intensity and changes in neutrophil phenotype by FC γ RIIIB expression level in blood of patients with COVID-19 and convalescents	173
Shamsutdinova O.A., Karal-ogly D.D., Lavrent'eva I.N. The utility of real-time PCR as a test for confirmation of the absence of residual neurovirulence of strains for live antiviral vaccines	186
Sorokin V.M., Vodopyanov A.S., Tsimbalistova M.V., Pavlovich N.V. Differentiation of the <i>Francisella tularensis</i> subspecies by the INDEL typing method.....	194
Djidaryan A.A., Matua A.Z., Medkova A.Yu., Semin E.G., Sinyashina L.N., Dyakov I.N., Chernyshova I.N., Kubrava D.T., Amichba A.A., Kondzariya I.G., Mikvabiya Z.Ya., Karataev G.I. Safety and immunogenicity of live intranasal pertussis vaccine GamZhVK in the experimental infant hamadryas baboon model*	204
Atrasheuskaya A.V., Kazakova E.V., Zhirenkina E.N., Truxin V.P., Ignatyev G.M. Seroprevalence of flavivirus and Chikungunya virus fevers' study in Nicaragua — specific IgG avidity assay as a tool for flavivirus serotyping.....	216
Godovalov A.P., Boev I.A. Activity of peripheral blood factors against <i>Candida albicans</i>	226
REVIEWS	
Polyak Yu.M., Polyak M.S. The role of cyanotoxins in human and animal pathology (a review).....	232
Smirnova S.S., Egorov I.A., Golubkova A.A. Purulent-septic infections in puerperas. Part 2. Clinical and pathogenetic characteristics of nosological forms, etiology and antibiotic resistance (literature review).....	245
OBITUARIES	
In memory of Rakhim Musaevich Khaitov	141

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-246>



Оценка эпидемиологической значимости молекулярно-генетических факторов в отношении напряжённости поствакцинального иммунитета против гепатита В

Власенко Н.В.^{1✉}, Чурилова Н.С.¹, Лоскутова Т.А.¹, Миронов К.О.¹, Есьман А.С.¹, Дунаева Е.А.¹, Семененко Т.А.², Родионова З.С.¹, Никитин И.Г.³, Тутельян А.В.¹, Кузин С.Н.¹, Акимкин В.Г.¹

¹Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия;

²Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия;

³Национальный медицинский исследовательский центр «Лечебно-реабилитационный центр», Москва, Россия

Аннотация

Введение. Гепатит В, сохраняя статус социально значимой инфекции, остаётся актуальной проблемой здравоохранения в России. Важной задачей является повышение эффективности действующего комплекса противозидемических мероприятий, в том числе вакцинопрофилактики. После проведения полного курса вакцинации против гепатита В удельный вес лиц с отсутствием или низкой концентрацией поствакцинальных анти-НВs составляет 5–10%. Одной из причин, детерминирующих отсутствие или недостаточность поствакцинального иммунитета против гепатита В, могут быть однонуклеотидные полиморфизмы (ОНП), в том числе определяющие реализацию механизма иммуногенеза. С учётом возможных ассоциаций ОНП с напряжённостью поствакцинального иммунитета, важной проблемой является оценка их эпидемиологической значимости.

Цель работы — определение влияния ОНП генов *IL1B* (*rs1143634*, *rs1143627*), *IL1RN* (*rs4251961*, *rs419598*), *IL6* (*rs1800795*), *IL10* (*rs1800896*), *TULP1* (*rs9380516*), *TLR4* (*rs4986790*), *MERTK* (*rs4374383*) на формирование поствакцинального иммунитета против гепатита В.

Материалы и методы. Изучаемую группу составили медицинские работники Лечебно-реабилитационного центра Минздрава России ($n = 271$) с установленным прививочным анамнезом, наличием данных о возрасте, стаже работы и отделении медицинского учреждения. Серологические исследования по определению наличия и уровня анти-НВs и анти-НВscore класса IgG выполняли методом ИФА с использованием тест-систем «ДС-ИФА-АНТИ-НВs» и «ДС-ИФА-АНТИ-НВс». Генотипирование проводили методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Статистическую обработку полученных данных осуществляли с использованием программы «Statistica 6.0».

Результаты. В ассоциации с напряжённостью поствакцинального ответа против гепатита В установлены статистически значимые различия частот генотипов *CC* (*rs9380516*) ($p = 0,034$; отношение шансов (ОШ) 0,497; 95% ДИ 0,261–0,949) и *CT* ($p = 0,044$; ОШ 1,967; 95% ДИ 1,015–3,812) гена *TULP1* в группе лиц с концентрацией анти-НВs 10–100 МЕ/л. Для этой группы также выявлены различия генотипов *TT/CT* генов *IL10/TULP1* (*rs1800896/rs9380516*) ($p = 0,003$; ОШ = 5,39; 95% ДИ 1,7–17,4) и сочетания генотипов *AA/TT* ОНП *MERTK/IL1RN* (*rs4374383/rs4251961*) ($p = 0,003$; ОШ = 7,96; 95% ДИ 1,7–37,6).

Заключение. В настоящем исследовании показана роль вариантов генотипов в прогнозировании повышенного риска развития слабого поствакцинального иммунного ответа (или его отсутствия) против гепатита В. Ассоциации полиморфизмов ряда генов с низкой концентрацией поствакцинальных анти-НВs целесообразно использовать при разработке сценариев развития эпидемического процесса гепатита В, поскольку выявленные зависимости позволяют дать количественную характеристику рисков формирования слабого иммунитета против данной инфекции на популяционном уровне.

Ключевые слова: однонуклеотидный полиморфизм, поствакцинальный иммунитет, гепатит В, анти-НВs, иммуноферментный анализ, полимеразная цепная реакция

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии участников исследования. Протокол исследования одобрен Локальным этическим комитетом ЦНИИЭ Роспотребнадзора (Протокол № 114 от 22.04.2021).

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

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

Для цитирования: Власенко Н.В., Чурилова Н.С., Лоскутова Т.А., Миронов К.О., Есьман А.С., Дунаева Е.А., Семенов Т.А., Родионова З.С., Никитин И.Г., Тутельян А.В., Кузин С.Н., Акимкин В.Г. Оценка эпидемиологической значимости молекулярно-генетических факторов в отношении напряжённости поствакцинального иммунитета против гепатита В. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022;99(2):149–159. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-246>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-246>

Evaluation of the epidemiological significance of molecular genetic factors in relation to the intensity of post-vaccination immunity against hepatitis B

Natalia V. Vlasenko^{1✉}, Nadezhda S. Churilova¹, Tatiana A. Loskutova¹, Konstantin O. Mironov¹, Anna S. Esman¹, Elena A. Dunaeva¹, Tatiana A. Semenenko², Zinaida S. Rodionova¹, Igor G. Nikitin³, Alexei V. Tutelian¹, Stanislav N. Kuzin¹, Vasily G. Akimkin¹

¹Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia;

²N.F. Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia;

³National Medical Research Center "Treatment and Rehabilitation Center", Moscow, Russia

Abstract

Introduction. Hepatitis B retains the status of socially significant infection and remains a major health problem worldwide, including the Russian Federation. The improvement of the effectiveness of the current complex of preventive measures, especially vaccination, is an important task for public health. Although vaccination against hepatitis B is highly successful, 5% to 10% of individuals do not experience a response to vaccine with an adequate level of antibodies to hepatitis B surface antigen (anti-HBs). One of the key factors determining the absence or insufficiency of post-vaccination immunity against hepatitis B may be the single-nucleotide polymorphisms (SNPs) that change gene sequences, including those that determine the mechanism of immunogenesis. Such genetic changes may affect the signaling pathways and result in significant decrease in antibody response to hepatitis B vaccine. Assessment of epidemiological significance of such SNPs is an important task, considering its possible associations with failure to respond adequately to vaccination.

The aim of the study was to determine the effect of SNPs of *IL1B* (*rs1143634*, *rs1143627*), *IL1RN* (*rs4251961*, *rs419598*), *IL6* (*rs1800795*), *IL10* (*rs1800896*), *TULP1* (*rs9380516*), *TLR4* (*rs4986790*), *MERTK* (*rs4374383*) genes on the formation of post-vaccination immunity against hepatitis B.

Materials and methods. Healthcare workers ($n = 271$) of the Treatment and Rehabilitation Center of the Ministry of Health of the Russian Federation with known vaccination history, data on age, work experience and department of the medical institution were included in this research. The presence and levels of anti-HBs and anti-HBcore IgG antibodies were determined by the ELISA method using the DS-ELISA-ANTI-HBs and DS-ELISA-ANTI-HBc kits, according to the manufacturer's instructions. Genotyping was performed by real time polymerase chain reaction. Statistical analysis of data was carried out using the "Statistica 6.0" software.

Results. Statistically significant differences in the frequencies of *CC* (*rs9380516*) genotypes ($p = 0.034$; OR 0.497; 95% CI 0.261–0.949) and *CT* ($p = 0.044$; OR 1.967; 95% CI 1.015–3.812) of the *TULP1* gene in the group of individuals with anti-HBs concentrations of 10–100 IU/l were found in association with the intensity of the post-vaccination response against hepatitis B. Also, for this group, differences were found in the structure of the *TT/CT* genotype pair of *IL-10/TULP1* genes (*rs1800896/rs9380516*) ($p = 0.003$; OR = 5.39; 95% CI 1.7–17.4) and for the combination of *AA/TT* SNP *MERTK/IL1RN* genotypes (*rs4374383/rs4251961*) ($p = 0.003$; OR = 7.96; 95% CI 1.7–37.6).

Conclusion. Our study revealed that above variants of genotypes could play a role in predicting an increased risk of low (or absence) post-vaccination immune response against hepatitis B. It seems appropriate to use the relationship between the gene polymorphisms and a low concentration of post-vaccination anti-HBs antibodies in assessing scenarios for the development of the epidemic process of hepatitis B, since the identified associations allow to quantify the risks of poor herd immunity against this infection.

Keywords: single nucleotide polymorphism, post-vaccination immunity, hepatitis B, anti-HBs, ELISA, PCR

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the study participants. The research protocol was approved by the Local Ethics Committee of the Central Research Institute for Epidemiology (Protocol No. 114, April 22, 2021).

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Vlasenko N.V., Churilova N.S., Loskutova T.A., Mironov K.O., Esman A.S., Dunaeva E.A., Semenenko T.A., Rodionova Z.S., Nikitin I.G., Tutelian A.V., Kuzin S.N., Akimkin V.G. Evaluation of the epidemiological significance of molecular genetic factors in relation to the intensity of post-vaccination immunity against hepatitis B. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2022;99(2): 149–159. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-246>

Введение

Гепатит В (ГВ) — инфекция, управляемая средствами специфической профилактики, и в системе эпидемиологического надзора реализация национальной программы вакцинопрофилактики в масштабах страны является основным и наиболее эффективным противоэпидемическим мероприятием. С помощью вакцинации в России достигнуто устойчивое и значительное улучшение эпидемиологической ситуации по ГВ. Вместе с тем результаты многочисленных исследований, посвящённых изучению закономерностей и механизмов формирования поствакцинального иммунитета против ГВ, свидетельствуют о том, что у 5–10% лиц, привитых в соответствии с рекомендациями (трехкратно по схеме 0–1–6 мес), антитела отсутствуют (нереспонденты) или их концентрация не превышает протективный уровень 10 МЕ/л [1–3].

Актуально изучение причин, обуславливающих формирование недостаточного уровня иммунного ответа у вакцинированных лиц, поскольку программы вакцинопрофилактики ГВ приняты в большинстве стран мира. Не существует единого мнения о причинах проблемы и способах её решения, поскольку процесс антигенпрезентации и последующих реакций, направленных на формирование как гуморального, так и клеточного иммунитета, представляет собой сложный многоступенчатый процесс.

По мнению Е.С. Abebe и соавт., частичное или полное отсутствие продукции анти-НВs после полного курса иммунизации может быть связано с нарушениями дифференцировки наивных В-лимфоцитов в клетки, секретирующие специфические антитела и плазмобласты [4]. G.A. Kardar и соавт. связывают низкую сероконверсию с дефицитом продукции цитокинов интерлейкина (ИЛ)-2, интерферона- γ и ИЛ-10 в ответ на введение вакцины против ГВ [5]. В исследовании N. Körber и соавт. установлено, что для лиц-нереспондентов характерно подавление экспрессии ИЛ-10 в регуляторных В-лимфоцитах [6]. Введение бустерной дозы вакцины закономерно сопровождалось некоторым повышением концентрации анти-НВs, которое значимо отличалось от данных группы сравнения, состоящей из лиц с нормальной экспрессией ИЛ-10. E. Garner-Spitzer и соавт. также пришли к выводу, что отсутствие иммунологического ответа на введение вакцинных препаратов, содержащих НВsAg, зависит не только от применяемого препарата, но и от генетических характеристик вакцинируемых лиц [7].

Имуногенез представляет собой достаточно сложный механизм, включающий каскад последовательных взаимодействий (сигнальные пути), обеспечивающих формирование иммунитета в ответ на внедрение в организм антигена. Очевидно, что однонуклеотидные полиморфизмы (ОНП), формируя новые нуклеотидные последовательности, могут изменять как последующее функционирование некодирующих областей генов, так и аминокислотный состав транслируемых полипептидов, участвующих в сигнальных путях. Исследования, посвящённые ассоциации ОНП, получили широкое распространение, и в настоящий момент накоплен обширный опыт изучения влияния вариантов строения генов человека в ассоциации с различными патологическими состояниями как неинфекционной [8–10], так и инфекционной [11] природы.

Цель работы — определение влияния ОНП генов *IL1B* (*rs1143634*, *rs1143627*), *IL1RN* (*rs4251961*, *rs419598*), *IL6* (*rs1800795*), *IL10* (*rs1800896*), *TULP1* (*rs9380516*), *TLR4* (*rs4986790*), *MERTK* (*rs4374383*) на формирование поствакцинального иммунитета против ГВ.

Материалы и методы

Исследования проведены на базе лаборатории вирусных гепатитов ЦНИИ Эпидемиологии. Изучаемую группу составили медицинские работники Лечебно-реабилитационного центра Минздрава России ($n = 271$; мужчины/женщины — 56/215; средний возраст 45 ± 10 лет) с установленным прививочным анамнезом, наличием данных о возрасте, стаже работы и отделении медицинского учреждения. Все обследуемые дали информированное согласие; исследование одобрено Локальным этическим комитетом ЦНИИЭ (Протокол № 114 от 22.04.2021).

Серологические исследования по определению уровня анти-НВs и анти-НВscore класса IgG выполняли методом ИФА с помощью набора реагентов «ДС-ИФА-АНТИ-НВs» и «ДС-ИФА-АНТИ-НВc» («Диагностические системы») в соответствии с инструкциями.

Определение ОНП в исследуемой группе проводили в следующих генах: *IL1B* (*rs1143634*, *rs1143627*), *IL1RN* (*rs4251961*, *rs419598*), *IL6* (*rs1800795*), *IL10* (*rs1800896*), *TULP1* (*rs9380516*), *TLR4* (*rs4986790*), *MERTK* (*rs4374383*). При выделении ДНК использовали реагент «Гемолитик» и набор реагентов «Рибо-ПРЕП» («АмплиСенс»). Амплификацию фрагментов генов, содержащих ОНП,

проводили на термоциклере «RotorGene Q 6 plex» («Qiagen»). Методика определения полиморфизмов основана на детекции аллелей ОНП с использованием конформационно блокированных (LNA) аллель-специфичных зондов, детектируемых по 2 или 4 каналам флюоресцентной детекции и разработанных в научной группе разработки новых методов выявления генетических полиморфизмов ЦНИИЭ. Верификация полученных результатов проведена при помощи секвенирования по Сенгеру и пиро-секвенирования [12]. Репрезентативность выборки оценивали путём статистического расчёта с использованием критерия χ^2 Пирсона, различий частот аллелей, определённых в настоящем исследовании, в сравнении с международной базой данных «DbSNP» (NCBI) для группы Caucasians (CEU)¹.

Критерий χ^2 Пирсона рассчитывали с использованием стандартной четырехпольной таблицы для подтверждения либо опровержения гипотезы об ассоциативной связи ОНП и концентрации поствакцинальных анти-НВs. Статистически значимым показатель считали при $p < 0,05$ при одиночном сравнении распределения частот полиморфизмов в исследуемых группах и при $p < 0,005$ для парных комбинаций ОНП.

Результаты

На первом этапе работы всю когорту ($n = 271$) обследовали на наличие анти-НВs методом ИФА с целью исключения из дальнейшего исследования лиц с постморбидным иммунитетом. Всего анти-НВs определили у 48 (17,7%) человек (95% ДИ 13,4–22,8%). Средний возраст этой группы медицинских работников составил 44 ± 10 года при общем стаже профессиональной деятельности 18 ± 11 лет. О проведённой вакцинации против ГВ сообщили 47 человек (у 25 человек сроки завершения полного курса иммунизации превысили 5 лет, а у 22 составили до 5 лет). Анти-НВs выявлены у 36 (76,6%) из них, в том числе у 12 человек — в диапазоне концентраций 10 ± 100 МЕ/л, у 19 — свыше 100 МЕ/л. Ещё у 12 медицинских работников анти-НВs или не обнаружены, или их концентрация зафиксирована на уровне ниже протективного (10 МЕ/л).

Разделение медицинских работников на группы с постморбидным и поствакцинальным иммунитетом к ГВ являлось обязательным этапом настоящей работы, поскольку значительный интерес представляла оценка эффективности профилактических мероприятий. Ещё 15–20 лет назад доля медицинских работников, имевших контакт с вирусом ГВ и стаж профессиональной деятельности свыше 10 лет, достигала 45–50% [13]. Можно констатировать, что в настоящее время риски профессиональ-

ного заражения медицинских работников, сохраняя актуальность, находятся на принципиально другом, значительно более благоприятном уровне.

Исследуемую группу составили 223 медицинских работника, которые, согласно данным серологического исследования, ранее не были инфицированы вирусом ГВ. Средний возраст в этой группе составил 45 ± 10 лет, стаж профессиональной деятельности — 20 ± 11 лет. По результатам количественного определения анти-НВs исследуемая группа была разделена на три подгруппы в зависимости от концентрации анти-НВs: у 55 (24,7%; 95% ДИ 19,2–30,9%) человек — ниже 10 МЕ/л; у 69 (30,9%; 95% ДИ 24,9–37,5%) — 10–100 МЕ/л, у 99 (42,4%; 95% ДИ 37,8–51,2%) — выше 100 МЕ/л. Следует отметить, что в последней подгруппе у 13 человек уровень анти-НВs был выше 15 000 МЕ/л вне зависимости от сроков вакцинации. Можно констатировать наличие закономерности, согласно которой средняя концентрация поствакцинальных анти-НВs снижается с увеличением среднего возраста исследуемой группы лиц. По нашим данным, средний возраст медицинских работников в выделенных подгруппах составил: 41 ± 8 лет в группе выше 100 МЕ/л; 45 ± 10 лет — в когорте 10–100 МЕ/л и 51 ± 8 лет — для концентрации ниже 10 МЕ/л. Гендерный фактор не влиял на формирование поствакцинального иммунитета против вируса ГВ (табл. 1).

Для оценки репрезентативности выборки референс-группы, в качестве которой нами взята группа медицинских работников с концентрацией поствакцинальных анти-НВs > 100 МЕ/л ($n = 99$), проведён сравнительный анализ распределения частот аллелей исследуемых полиморфизмов с использованием международной базы данных «DbSNP» (NCBI) (табл. 2).

Распределение частот генотипов исследуемых полиморфизмов согласуется с равновесием Харди–Вайнберга и соответствует представленным данным по европейской (CEU) популяции в базе данных «DbSNP» (NCBI). Это позволяет использовать данные референс-группы в качестве базовых

Таблица 1. Напряжённость поствакцинального иммунитета против ГВ в зависимости от гендерной принадлежности, % (95% ДИ)

Table 1. Intensity of post-vaccination immunity against hepatitis B depending on gender, % (95% CI)

Анти-НВs, МЕ/л Anti-HBs, IU/liter	Мужчины ($n = 46$) Men ($n = 46$)	Женщины ($n = 175$) Women ($n = 175$)
< 10	19,5 (9,3–33,9)	26,0 (19,9–33,5)
10–100	39,0 (25,1–54,6)	29,0 (22,5–36,5)
> 100	41,5 (27,0–56,7)	45,0 (37,1–52,3)

¹ Database of Single Nucleotide Polymorphisms (dbSNP). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>

Таблица 2. Сравнение частот аллелей референс-группы медицинских работников с базой данных «DbSNP» (NCBI)
Table 2. Comparison of allele frequencies of the reference group of healthcare workers with the database "DbSNP" (NCBI)

ОНП Single nucleotide polymorphism	Ген Gene	Замена Substitution	Частота редкого аллеля Frequency of rare allele		Различия частот аллелей Difference between allele frequencies	
			dbSNP CEU (n = 1000)	референс-группа (n = 99) reference group (n = 99)	χ^2	p
rs1143634	IL1B	G > A	0,247	0,204	1,655	0,199
rs1143627	IL1B	A > G	0,352	0,362	1,350	0,246
rs4251961	IL1RN	T > C	0,379	0,299	3,327	0,069
rs419598	IL1RN	T > C	0,292	0,28	0,103	0,749
rs1800795	IL6	G > C	0,415	0,428	0,124	0,725
rs1800896	IL10	T > C	0,453	0,494	1,158	0,282
rs9380516	TULP1	C > T	0,19	0,159	1,103	0,294
rs4986790	TLR4	A > G	0,056	0,07	1,237	0,267
rs4374383	MERTK	G > A	0,376	0,421	1,497	0,222

для сравнения с результатами других исследуемых групп.

В результате определения наличия или отсутствия ассоциации между концентрацией поствакцинальных антител к HBsAg и изучаемыми ОНП установлены статистически значимые различия частот генотипов *CC* (*rs9380516*) ($p = 0,034$; ОШ 0,497; 95% ДИ 0,261–0,949) и *CT* ($p = 0,044$; ОШ 1,967; 95% ДИ 1,015–3,812) гена *TULP1* в группе медицинских работников с концентрацией анти-HBs 10–100 МЕ/л (табл. 3). Для этой группы также выявлены различия генотипов *TT/CT* генов *IL10/TULP1* (*rs1800896/rs9380516*) ($p = 0,003$; ОШ = 5,39; 95% ДИ 1,7–17,4).

Помимо установленной выше пары ОНП, значимые результаты определены для сочетания генотипов *AA/TT* ОНП *MERTK/IL1RN* (*rs4374383/rs4251961*) ($p = 0,003$; ОШ = 7,96; 95% ДИ 1,7–37,6). При одиночном сравнении распределения частот генотипов генов *MERTK* (*rs4374383*) и *IL1RN* (*rs4251961*) статистически значимых различий не обнаружено. Сформированные комбинации генов, для которых определены связи, не образуют групп сцепления между собой, их наследование осуществляется независимо, и показатель неравновесия сцепления генов составляет 0,0663 для пары *rs1800896/rs9380516* генов *IL10/TULP1* и 0,0294 — для *rs4374383/rs4251961* *MERTK/IL1RN*.

В отличие от группы медицинских работников с наличием специфических антител в диапазоне 10–100 МЕ/л, у лиц в группе с низкой концентрацией анти-HBs (< 10 МЕ/л) не выявлено значимых различий частот аллелей и генотипов полиморфизмов.

Обсуждение

Обобщив данные многочисленных исследований, ряд авторов отметили, что около 10% на-

селения не отвечает на введение вакцины против ГВ по стандартной схеме (0–1–6 мес) выработкой антител к HBsAg на защитном уровне (> 10 МЕ/л). Установлено, что показатель частоты неэффективности проведённой вакцинации связан со старшим возрастом, с наличием коморбидной патологии [14, 15], ожирения, вредных привычек [16], зависит от типа вакцинных препаратов [17] и ряда других причин, приводящих к иммуносупрессии. Кроме того, не исключается значимость иммуногенетических особенностей макроорганизма, поскольку система главного комплекса гистосовместимости играет одну из ведущих ролей в генетическом контроле иммунного ответа в норме и при патологии.

С учётом актуальности проблемы в мире выполнено большое количество исследований, посвящённых изучению влияния ОНП на формирование поствакцинального иммунитета против ГВ, выявлен ряд значимых полиморфизмов. Наибольшее внимание специалистов привлекает система HLA, поскольку существует обоснованное мнение о нарушении первичной презентации антигена у нереспондентов. Так, низкие концентрации анти-HBs (< 10 МЕ/л) чаще сочетаются с вариантами HLA-DRB1*0301, DQB1*1302, DRB1*0701 и DRB1*0401. В свою очередь DRB1*1301, DRB1*0101 и DRB1*1501 [18] чаще выявлены в группах лиц с выраженным поствакцинальным ответом. В исследовании L. Rap и соавт. в результате полногеномного поиска ассоциаций (GWA-исследования) с многократным подтверждением были получены значимые ассоциации ОНП, расположенные в некодирующих областях генов, относящихся к HLA II класса [19]. Среди них *rs477515*, *rs28366298* и *rs13204672* (HLA-DRB1), *rs3763316* (BTNL2).

Значительный интерес представляют данные A. De Silvestri и соавт., доказавших на примере 14 семейных случаев факт наследственной передачи

Таблица 3. Значимые ассоциации в отношении напряжённости поствакцинального иммунитета против ГВ
Table 3. Significant associations regarding the intensity of post-vaccination immunity against hepatitis B

Ген Gene	Генотип Genotype	Концентрация анти-НВs, Ме/л Concentration of anti-HBs, IU/liter		<i>p</i>	ОШ (95% ДИ) OR (95% CI)
		> 100 (<i>n</i> = 99)	10–100 (<i>n</i> = 69)		
<i>TULP1</i> (<i>rs9380516</i>)	CC	0,711	0,55	0,033	0,497 (0,261–0,949)
	CT	0,257	0,405	0,044	1,967 (1,015–3,812)
	TT	0,03	0,043	0,669	1,424 (0,279–7,276)
<i>IL10/TULP1</i> (<i>rs1800896/</i> <i>rs9380516</i>)	CC/CC	0,164	0,173	0,879	1,066 (0,469–2,424)
	CC/CT	0,082	0,058	0,548	0,685 (0,198–2,371)
	CC/TT	0	0,0145	–	–
	CT/CC	0,329	0,217	0,113	0,564 (0,277–1,150)
	CT/CT	0,134	0,159	0,647	1,225 (0,513–2,925)
	CT/TT	0,02	0,028	0,728	0,705 (0,097–5,133)
	TT/CC	0,216	0,159	0,358	0,686 (0,307–1,536)
	TT/CT	0,041	0,188	0,003	5,397 (1,677–17,367)
	TT/TT	0,01	0	–	–
<i>MERTK/IL1RN</i> (<i>rs4374383/</i> <i>rs4251961</i>)	AA/CC	0,02	0,014	0,764	0,691 (0,061–7,778)
	AA/CT	0,124	0,058	0,151	0,431 (0,133–1,398)
	AA/TT	0,021	0,144	0,003	7,966 (1,686–37,634)
	AG/CC	0,061	0,029	0,323	0,448 (0,088–2,288)
	AG/CT	0,144	0,145	0,987	0,993 (0,413–2,388)
	AG/TT	0,299	0,188	0,098	0,536 (0,255–1,129)
	GG/CC	0,02	0,058	0,209	2,892 (0,515–16,259)
	GG/CT	0,124	0,116	0,86	1,089 (0,420–2,826)
	GG/TT	0,175	0,246	0,278	1,519 (0,712–3,242)

Примечание. Жирным шрифтом выделены значимые ассоциации.
Note. Significant associations are highlighted in bold.

варианта гена HLA III класса *C4AQ0*, ассоциированного с угнетением формирования поствакцинального иммунитета после полного курса вакцинации [20].

Слабый серологический ответ на иммунизацию против ГВ, как показано в ряде исследований, также может быть связан с ОНП, не относящимися к главному комплексу гистосовместимости. S. Davila и соавт. установили ассоциативную связь ряда полиморфизмов, таких как *rs6789153*, расположенного рядом с геном транскрипционного фактора *FOXP1*; *rs1654668* гена *LILRB4*, кодирующего иммуноглобулиноподобные рецепторы лейкоцитов; *rs1978270* и *rs7029078*, относящиеся к компоненту комплемента C5, и *rs854692* и *rs854625* гена *CCL15*, кодирующего хемокин C-C лиганд 15 [21]. В исследовании L.P. Pan и соавт. показано наличие связи ОНП *rs12133337* гена *CD3Z*, кодирующего ζ-цепь Т-клеточного поверхностного гликопротеина CD3, со слабым поствакцинальным иммунитетом против ГВ [22]. Обнаружена ассоциация полиморфизмов *rs2243250* и *rs2227284* гена *IL4* с низким уровнем иммунного ответа [23]. Обобщённые данные ли-

тературы по проблеме влияния ОНП на формирование поствакцинального иммунитета против ГВ представлены в **табл. 4**.

Необходимо отметить, что в России исследования по обнаружению влияния ОНП на формирование поствакцинального иммунитета против ГВ до настоящего времени не выполняли, что делает невозможным сравнение полученных нами результатов. Выявлены различия в распределении частот генотипов сочетания двух полиморфных локусов *IL10/TULP1* (*rs1800896/rs9380516*) между группой медицинских работников с концентрацией анти-НВs 10–100 МЕ/л и референс-группой. ОНП *rs9380516* имеет и самостоятельное значение как маркер, указывающий на повышенный риск формирования слабого поствакцинального иммунитета. В настоящий момент невозможно дать чёткое объяснение, каким механизмом обусловлены выявленные связи, поскольку роль гена *TULP1*, а также полиморфизмов, расположенных рядом с этим геном, мало изучена. В научной литературе есть сообщения о связи ОНП *rs9380516* с некоторыми патологическими состояниями человека. Так, A. Sal-

Таблица 4. ОНП, влияющие на механизмы формирования поствакцинального иммунитета против ГВ (данные литературы)

Table 4. SNPs affecting the mechanisms of formation of post-vaccination immunity against hepatitis B (literature data)

Ген Gene	Вариант (ассоциированный аллель) Variant (associated allele)	P; ОШ [95% ДИ] P; OR [95% CI]	Источник Source
<i>HLA-DRB1</i>	*0301	0,01; 0,42 [0,21–0,84]#	[18]
	*0701	0,24; 0,155 [0,14–0,43]#	
	*04	0,009; 0,57 [0,37–0,87]#	
	*1302	0,007; 0,25 [0,09–0,68]#	
<i>BTNL2</i>	<i>rs477515</i> (T)	2,63e-019; 2,05 [1,75–2,41]	[19]
	<i>rs13204672</i> (G)	1,45e-013; 2,01 [1,67–2,43]	
	<i>rs28366298</i> (C)	1,67e2014; 1,77 [1,53–2,05]	
	<i>rs3763316</i> (T)	3,75e-013; 1,84 [1,56–2,17]	
<i>FOXP1</i>	<i>rs6789153</i>	9,2 × 10 ⁻⁶ ; 1,38 [1,2–1,6]	[21]
<i>LILRB4</i>	<i>rs1654668</i> (T)	8 × 10 ⁻⁵ ; 1,34 [1,16–1,56]	
<i>CCL15</i>	<i>rs854692</i> (T)	9,6 × 10 ⁻⁴ ; 1,28 [1,11–1,50]	
	<i>rs854625</i> (A)	1,2 × 10 ⁻³ ; 1,29 [1,11–1,51]	
<i>CD3Z</i>	<i>rs12133337</i> (C)	0,033; 1,28 [1,01–1,61]	[22]
<i>IL4</i>	<i>rs2243250</i> (C)	0,014; 2,04 [1,15–3,64]	[23]
	<i>rs2227284</i> (G)	0,018; 2,25 [1,14–4,44]	

Примечание. #Исследование проведено относительно группы с высокими показателями анти-НВс (> 100 МЕ/л), ввиду чего в данном случае следует интерпретировать значение отношения шансов (ОШ) в обратном порядке относительно группы со сниженным поствакцинальным эффектом.

Note. #The study was conducted on a group with high levels of anti-HBs (> 100 IU/liter), therefore, in this case, the odds ratio (OR) value should be interpreted in reverse order relative to the group with a reduced post-vaccination effect.

maninejad и соавт. [24] и E. Souzeau и соавт. [25] сообщили об ассоциации *rs9380516* с ретиальной дистрофией, a den A.I. Hollander и соавт. — о её связи с некоторыми наследственными болезнями сетчатки глаза [26]. Выраженная связь ОНП *rs9380516* обнаружена с эпителиальным раком мочевого пузыря [27]. Z. Kutalik и соавт. [28], S. Rueger и соавт. [29] обнаружили ассоциативную связь этого ОНП со скоростью прогрессирования фиброза и цирротических изменений печени, обусловленных гепатитом С. С учётом данных литературы и результатов настоящего исследования, указывающих на вариативность иммуногенеза при вакцинации против инфекционных болезней, есть основания предполагать, что продолжение исследований приведёт к обнаружению новых связей ОНП *rs9380516* гена *TULP1*.

Выявленная нами ассоциация сочетания полиморфизмов генов *MERTK/IL1RN* (*rs4374383/rs4251961*) с недостаточной выработкой поствакцинальных анти-НВс, очевидно, связана с нарушениями функций этих генов. Полиморфизм *rs4374383* расположен в гене *MERTK*, кодирующем протоонкогенную тирозинпротеинкиназу MER, являющуюся составной частью семейства TAM (опухоль-ассоциированных макрофагов). Этот фермент выполняет множество функций, малой частью из которых является ингибирование сигнальных путей, запускаемых цитокинами и лигандами TLR, а также уча-

стие в обеспечении клиренса клеток при апоптозе. К настоящему моменту установлена связь G-аллеля *rs4374383* с высокой интенсивностью развития фиброза печени у лиц с гепатитом С [29, 30]. Также показана ассоциация генотипа AA (*rs4374383*) со сниженной экспрессией гена *MERTK*, что определяет его как маркер протективного влияния против развития неалкогольной жировой дистрофии печени [31].

Rs4251961 расположен в промоторной области гена *IL1RN*, кодирующего антагонист рецептора интерлейкина-1 (IL-1RA). Его главная функция состоит в блокировании провоспалительного каскада реакций. На данный момент установлено, что аллель С *rs4251961* (*IL1RN*) ассоциирован с повышением концентрации ряда маркеров системного воспалительного процесса, таких как С-реактивный белок, фибриноген, ИЛ-6 [32]. Полученные в нашем исследовании данные об ассоциации пары вышеуказанных полиморфизмов косвенно согласуются с результатами зарубежных исследований, поскольку генотипы AA *rs4374383* и TT *rs4251961*, по-видимому, характерны для лиц с меньшей активностью воспалительного профиля иммунитета, что и приводит к относительно сниженной иммуногенности вакцинных препаратов.

В настоящем исследовании впервые в России проведён поиск ассоциаций ОНП некоторых генов, участвующих в регулировании отдельных функ-

ций иммунной системы человека, с закономерностями формирования гуморальной составляющей поствакцинального иммунитета против ГВ. Обнаружено, что у группы медицинских работников низкая концентрация поствакцинальных анти-НВs закономерно сочетается с двумя парными ОНП генов *MERTK/IL1RN* (*rs4374383/rs4251961*) и *IL10/TULP1* (*rs1800896/rs9380516*), а также с одиночным ОНП *rs9380516* гена *TULP1*. Необходимо констатировать, что выявленные связи касались только лиц с низким уровнем специфических антител к НВsAg (10–100 МЕ/л) и не распространялись на остальные группы. Как показывают результаты, полученные зарубежными авторами, а также с учётом того, что в нашем исследовании из 9 ОНП выявлены 3 ассоциации, есть основания полагать, что влияние ОНП на формирование поствакцинального иммунитета значительно более многообразно и очевидна необходимость продолжения исследований в этом направлении.

Полученные результаты имеют значение не только с точки зрения индивидуальных особенностей формирования адекватного иммунного ответа на прививку, но и с позиций оценки популяционно-поствакцинального иммунитета. Данные можно трактовать с эпидемиологической точки зрения, поскольку они дают количественную характеристику рисков формирования слабой защищённости населения от ГВ. С учётом того, что в России с 2006 г. в рамках приоритетного Национального проекта «Здоровье» реализуется программа массовой вакцинации против ГВ, главной стратегической задачей которой является достижение максимально возможного уровня популяционного иммунитета, актуально выявление различных факторов, в том числе молекулярно-генетических, негативно влияющих на результаты проводимой вакцинации. Более полные и точные представления по этому предмету, а также по другим аспектам проблемы ГВ, возможно, позволят усовершенствовать систему эпидемиологического надзора. В настоящее время очевидна необходимость усиления противоэпидемической работы против ГВ, поскольку общая эпидемиологическая ситуация, несмотря на позитивные тенденции, далека от благополучной.

Заключение

Основываясь на полученных результатах, можно сделать следующие выводы:

1. В последние годы риск профессионального заражения вирусом ГВ медицинских работников существенно снизился, о чём свидетельствует частота обнаружения анти-НВs_{core} в исследуемой группе медицинских работников — 17,7% (95% ДИ 13,4–22,8%).

2. Частота обнаружения поствакцинальных анти-НВs в протективных концентрациях (> 10 МЕ/л) у медицинских работников составила 75,3%, при

этом высокие концентрации анти-НВs (> 100 МЕ/л) определены у 42,4% из них.

3. Выявлены взаимосвязи некоторых изучаемых ОНП с низкой концентрацией поствакцинальных анти-НВs (10–100 МЕ/л): для сочетаний ОНП *MERTK/IL1RN* (*rs4374383/rs4251961*) и *IL10/TULP1* (*rs1800896/rs9380516*); а также отдельно для ОНП гена *TULP1* *rs9380516*.

4. Полученные данные представляется целесообразным использовать при разработке прогнозных сценариев развития эпидемического процесса ГВ, поскольку выявленные ассоциации ОНП позволяют количественно оценить группу лиц, у которых формируется недостаточно напряжённый поствакцинальный иммунитет.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Meier M.A., Berger C.T. A simple clinical score to identify likely hepatitis B vaccination non-responders – data from a retrospective single center study. *BMC Infect. Dis.* 2020; 20(1): 891. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-05634-y>
- Sjogren M.H. Prevention of hepatitis B in nonresponders to initial hepatitis B virus vaccination. *Am. J. Med.* 2005; 118(Suppl. 10A): 34S–9S. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2005.07.012>
- Pondé R.A.A. Expression and detection of anti-HBs antibodies after hepatitis B virus infection or vaccination in the context of protective immunity. *Arch. Virol.* 2019; 164(11): 2645–58. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04369-9>
- Chekol Abebe E., Asmamaw Dejenie T., Mengie Ayele T., Dagne Baye N., Agegnehu Teshome A., Tilahun Muche Z. The role of regulatory B cells in health and diseases: a systemic review. *J. Inflamm. Res.* 2021; 14: 75–84. <https://doi.org/10.2147/JIR.S286426>
- Kardar G.A., Jeddi-Tehrani M., Shokri F. Diminished Th1 and Th2 cytokine production in healthy adult nonresponders to recombinant hepatitis B vaccine. *Scand. J. Immunol.* 2002; 55(3): 311–4. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.2002.01057.x>
- Körber N., Pohl L., Weinberger B., Grubeck-Loebenstein B., Wawer A., Knolle P.A., et al. Hepatitis B vaccine non responders show higher frequencies of CD24^{high}CD38^{high} regulatory B cells and lower levels of IL-10 expression compared to responders. *Front. Immunol.* 2021; 12: 713351. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.713351>
- Garner-Spitzer E., Wagner A., Paulke-Korinek M., Kollaritsch H., Heinz F.X., Redlberger-Fritz M., et al. Tick-borne encephalitis (TBE) and hepatitis B nonresponders feature different immunologic mechanisms in response to TBE and influenza vaccination with involvement of regulatory T and B cells and IL-10. *J. Immunol.* 2013; 191(5): 2426–36. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300293>
- Качнов В.А., Крюков Е.В., Колубаева С.Н., Кутелев Г.Г., Тыренко В.В. Полиморфизмы генов, ассоциированные с нарушением липидного обмена у людей молодого возраста с риском внезапной сердечной смерти. *Казанский медицинский журнал.* 2021; 102(6): 805–14. <https://doi.org/10.17816/KMJ2021-805>
- Мельникова Е.С., Рымар О.Д., Иванова А.А., Мустафина С.В., Шапкина М.Ю., Мартин Б. и др. Ассоциация полиморфизмов генов *TCF7L2*, *FABP2*, *KCNQ1*, *ADIPOQ* с прогнозом развития сахарного диабета 2-го типа. *Терапевтический архив.* 2020; 92(10): 40–7. <https://doi.org/10.26442/00403660.2020.10.000393>
- Назарова Е.Л., Демьянова В.Т., Шардаков В.И., Зотина Е.Н., Докшина И.А. Ассоциации полиморфизма ряда генов

- врожденного иммунитета с риском развития хронических лимфопролиферативных заболеваний. *Гематология и трансфузиология*. 2016; 61(4): 183–9. <https://doi.org/10.18821/0234-5730/2016-61-4-183-189>
11. Епифанцева Н.В., Витковский Ю.А., Емельянова А.Н. Полиморфизм генов провоспалительных цитокинов при острых кишечных инфекциях. *Инфекция и иммунитет*. 2021; 11(3): 565–9. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-POP-1268>
 12. Миронов К.О., Дунаева Е.А., Дрибноходова О.П., Шипулин Г.А. Опыт использования систем генетического анализа на основе технологии пиросеквенирования. *Справочник заведующего КДЛ*. 2016; (5): 33–42.
 13. Акимкин В.Г., Семенов Т.А. Эпидемиологическая и иммунологическая эффективность вакцинации медицинских работников против гепатита В. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2017; 16(4): 52–7. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2017-16-4-52-57>
 14. Семенов Т.А. Иммунный ответ при вакцинации против гепатита В у лиц с иммунодефицитными состояниями. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2011; (1): 51–8.
 15. Joshi S.S., Davis R.P., Ma M.M., Tam E., Cooper C.L., Ramji A., et al. Reduced immune responses to hepatitis B primary vaccination in obese individuals with nonalcoholic fatty liver disease. *NPJ Vaccines*. 2021; 6(1): 9. <https://doi.org/10.1038/s41541-020-00266-4>
 16. Liu F., Guo Z., Dong C. Influences of obesity on the immunogenicity of hepatitis B vaccine. *Hum. Vaccin. Immunother*. 2017; 13(5): 1014–7. <https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1274475>
 17. Yoda T., Katsuyama H. Analysis of antibody-negative medical students after hepatitis B vaccination in Japan. *Hum. Vaccin. Immunother*. 2021; 17(3): 852–6. <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1788309>
 18. Li Z.K., Nie J.J., Li J., Zhuang H. The effect of HLA on immunological response to hepatitis B vaccine in healthy people: A meta-analysis. *Vaccine*. 2013; 31(40): 4355–61. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.06.108>
 19. Pan L., Zhang L., Zhang W., Wu X., Li Y., Yan B., et al. A genome-wide association study identifies polymorphisms in the HLA-DR region associated with non-response to hepatitis B vaccination in Chinese Han populations. *Hum. Mol. Genet*. 2014; 23(8): 2210–9. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt586>
 20. De Silvestri A., Pasi A., Martinetti M., Belloni C., Tinelli C., Rondini G., et al. Family study of non-responsiveness to hepatitis B vaccine confirms the importance of HLA class III C4A locus. *Genes Immun*. 2001; 2(7): 367–72. <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6363792>
 21. Davila S., Froeling F.E., Tan A., Bonnard C., Boland G.J., Snippe H., et al. New genetic associations detected in a host response study to hepatitis B vaccine. *Genes Immun*. 2010; 11(3): 232–8. <https://doi.org/10.1038/gene.2010.1>
 22. Pan L.P., Zhang W., Zhang L., Wu X.P., Zhu X.L., Yan B.Y., et al. CD3Z Genetic polymorphism in immune response to hepatitis B vaccination in two independent Chinese populations. *PLoS One*. 2012; 7(4): e35303. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035303>
 23. Roh E.Y., Song E.Y., Yoon J.H., Oh S., Chang J.Y., Park H., et al. Effects of interleukin-4 and interleukin-12b gene polymorphisms on hepatitis B virus vaccination. *Ann. Hepatol*. 2017; 16(1): 63–70. <https://doi.org/10.5604/16652681.1226816>
 24. Salmaninejad A., Bedoni N., Ravesh Z., Quinodoz M., Shoebi N., Mojarrad M., et al. Whole exome sequencing and homozygosity mapping reveals genetic defects in consanguineous Iranian families with inherited retinal dystrophies. *Sci. Rep*. 2020; 10(1): 19413. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75841-9>
 25. Souzeau E., Thompson J.A., McLaren T.L., De Roach J.N., Barnett C.P., Lamey T.M., et al. Maternal uniparental isodisomy of chromosome 6 unmasks a novel variant in *TULP1* in a patient with early onset retinal dystrophy. *Mol. Vis*. 2018; 24: 478–84.
 26. den Hollander A.I., Lopez I., Yzer S., Zonneveld M.N., Jansen I.M., Strom T.M., et al. Identification of novel mutations in patients with Leber congenital amaurosis and juvenile RP by genome-wide homozygosity mapping with SNP microarrays. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 2007; 48(12): 5690–8. <https://doi.org/10.1167/iovs.07-0610>
 27. Earp M., Winham S.J., Larson N., Permuth J.B., Sicotte H., Chien J., et al. A targeted genetic association study of epithelial ovarian cancer susceptibility. *Oncotarget*. 2016; 7(7): 7381–9. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7121>
 28. Patin E., Kutalik Z., Guernon J., Bibert S., Nalpas B., Jouanguy E., et al. Genome-wide association study identifies variants associated with progression of liver fibrosis from HCV infection. *Gastroenterology*. 2012; 143(5): 1244–52.e12. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.07.097>
 29. Rüeger S., Bochud P.Y., Dufour J.F., Müllhaupt B., Semela D., Heim M.H., et al. Impact of common risk factors of fibrosis progression in chronic hepatitis C. *Gut*. 2015; 64(10): 1605–15. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-306997>
 30. Jiménez-Sousa M.Á., Gómez-Moreno A.Z., Pineda-Tenor D., Brochado-Kith O., Sánchez-Ruano J.J., Artaza-Varasa T., et al. The myeloid-epithelial-reproductive tyrosine kinase (*MERTK*) *rs4374383* polymorphism predicts progression of liver fibrosis in hepatitis C virus-infected patients: a longitudinal study. *J. Clin. Med*. 2018; 7(12): 473. <https://doi.org/10.3390/jcm7120473>
 31. Petta S., Valenti L., Marra F., Grimaudo S., Tripodo C., Bugianesi E., et al. *MERTK rs4374383* polymorphism affects the severity of fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol*. 2016; 64(3): 682–90. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.10.016>
 32. Reiner A.P., Wurfel M.M., Lange L.A., Carlson C.S., Nord A.S., Carty C.L., et al. Polymorphisms of the IL1-receptor antagonist gene (*IL1RN*) are associated with multiple markers of systemic inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2008; 28(7): 1407–12. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.167437>
- #### REFERENCES
1. Meier M.A., Berger C.T. A simple clinical score to identify likely hepatitis B vaccination non-responders – data from a retrospective single center study. *BMC Infect. Dis*. 2020; 20(1): 891. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-05634-y>
 2. Sjogren M.H. Prevention of hepatitis B in nonresponders to initial hepatitis B virus vaccination. *Am. J. Med*. 2005; 118(Suppl. 10A): 34S–9S. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2005.07.012>
 3. Pondé R.A.A. Expression and detection of anti-HBs antibodies after hepatitis B virus infection or vaccination in the context of protective immunity. *Arch. Virol*. 2019; 164(11): 2645–58. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04369-9>
 4. Chekol Abebe E., Asmamaw Dejenie T., Mengie Ayele T., Dagne Baye N., Agegnehu Teshome A., Tilahun Muche Z. The role of regulatory B cells in health and diseases: a systemic review. *J. Inflamm. Res*. 2021; 14: 75–84. <https://doi.org/10.2147/JIR.S286426>
 5. Kardar G.A., Jeddi-Tehrani M., Shokri F. Diminished Th1 and Th2 cytokine production in healthy adult nonresponders to recombinant hepatitis B vaccine. *Scand. J. Immunol*. 2002; 55(3): 311–4. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.2002.01057.x>
 6. Körber N., Pohl L., Weinberger B., Grubeck-Loebenstein B., Wawer A., Knolle P.A., et al. Hepatitis B vaccine non responders show higher frequencies of CD24^{high}CD38^{high} regulatory B cells and lower levels of IL-10 expression compared to responders. *Front. Immunol*. 2021; 12: 713351. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.713351>

7. Garner-Spitzer E., Wagner A., Paulke-Korinek M., Kollaritsch H., Heinz F.X., Redlberger-Fritz M., et al. Tick-borne encephalitis (TBE) and hepatitis B nonresponders feature different immunologic mechanisms in response to TBE and influenza vaccination with involvement of regulatory T and B cells and IL-10. *J. Immunol.* 2013; 191(5): 2426–36. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300293>
8. Kachnov V.A., Kryukov E.V., Kolyubaeva S.N., Kutelev G.G., Tyrenko V.V. Gene polymorphisms associated with lipid metabolism disorders in young adults with risk of sudden cardiac death. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal.* 2021; 102(6): 805–14. <https://doi.org/10.17816/KMJ2021-805> (in Russian)
9. Mel'nikova E.S., Rymar O.D., Ivanova A.A., Mustafina S.V., Shapkina M.Yu., Martin B. Association of polymorphisms of genes *TCF7L2*, *FABP2*, *KCNQ1*, *ADIPOQ* with the prognosis of the development of type 2 diabetes mellitus. *Terapevticheskiy arkhiv.* 2020; 92(10): 40–7. <https://doi.org/10.26442/00403660.2020.10.000393> (in Russian)
10. Nazarova E.L., Dem'yanova V.T., Shardakov V.I., Zotina E.N., Dokshina I.A. Associations of polymorphism in several innate immunity genes with the risk of the development of chronic lymphoproliferative diseases. *Gematologiya i transfuziologiya.* 2016; 61(4): 183–9. <https://doi.org/10.18821/0234-5730/2016-61-4-183-189> (in Russian)
11. Epifantseva N.V., Vitkovskiy Yu.A., Emel'yanova A.N. Polymorphism of pro-inflammatory cytokine genes in acute intestinal infections. *Infektsiya i immunitet.* 2021; 11(3): 565–9. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-POP-1268>
12. Mironov K.O., Dunaeva E.A., Dribnokhodova O.P., Shipulin G.A. Using genetic analysis system based on pyrosequencing method. *Spravochnik zaveduyushchego KDL.* 2016; (5): 33–42. (in Russian)
13. Akimkin V.G., Semenenko T.A. Epidemiological and immunological efficacy of health workers vaccination against hepatitis B. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika.* 2017; 16(4): 52–7. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2017-16-4-52-57> (in Russian)
14. Semenenko T.A. Immune response after vaccination against hepatitis B in patients with immunodeficiency. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika.* 2011; (1): 51–8. (in Russian)
15. Joshi S.S., Davis R.P., Ma M.M., Tam E., Cooper C.L., Ramji A., et al. Reduced immune responses to hepatitis B primary vaccination in obese individuals with nonalcoholic fatty liver disease. *NPJ Vaccines.* 2021; 6(1): 9. <https://doi.org/10.1038/s41541-020-00266-4>
16. Liu F., Guo Z., Dong C. Influences of obesity on the immunogenicity of hepatitis B vaccine. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2017; 13(5): 1014–7. <https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1274475>
17. Yoda T., Katsuyama H. Analysis of antibody-negative medical students after hepatitis B vaccination in Japan. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2021; 17(3): 852–6. <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1788309>
18. Li Z.K., Nie J.J., Li J., Zhuang H. The effect of HLA on immunological response to hepatitis B vaccine in healthy people: A meta-analysis. *Vaccine.* 2013; 31(40): 4355–61. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.06.108>
19. Pan L., Zhang L., Zhang W., Wu X., Li Y., Yan B., et al. A genome-wide association study identifies polymorphisms in the HLA-DR region associated with non-response to hepatitis B vaccination in Chinese Han populations. *Hum. Mol. Genet.* 2014; 23(8): 2210–9. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt586>
20. De Silvestri A., Pasi A., Martinetti M., Belloni C., Tinelli C., Rondini G., et al. Family study of non-responsiveness to hepatitis B vaccine confirms the importance of HLA class III C4A locus. *Genes Immun.* 2001; 2(7): 367–72. <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6363792>
21. Davila S., Froeling F.E., Tan A., Bonnard C., Boland G.J., Snippe H., et al. New genetic associations detected in a host response study to hepatitis B vaccine. *Genes Immun.* 2010; 11(3): 232–8. <https://doi.org/10.1038/gene.2010.1>
22. Pan L.P., Zhang W., Zhang L., Wu X.P., Zhu X.L., Yan B.Y., et al. CD3Z Genetic polymorphism in immune response to hepatitis B vaccination in two independent Chinese populations. *PLoS One.* 2012; 7(4): e35303. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035303>
23. Roh E.Y., Song E.Y., Yoon J.H., Oh S., Chang J.Y., Park H., et al. Effects of interleukin-4 and interleukin-12b gene polymorphisms on hepatitis B virus vaccination. *Ann. Hepatol.* 2017; 16(1): 63–70. <https://doi.org/10.5604/16652681.1226816>
24. Salmaninejad A., Bedoni N, Ravesh Z, Quinodoz M., Shoebi N., Mojjarrad M., et al. Whole exome sequencing and homozygosity mapping reveals genetic defects in consanguineous Iranian families with inherited retinal dystrophies. *Sci. Rep.* 2020; 10(1): 19413. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75841-9>
25. Souzeau E., Thompson J.A., McLaren T.L., De Roach J.N., Barnett C.P., Lamey T.M., et al. Maternal uniparental isodisomy of chromosome 6 unmasks a novel variant in *TULP1* in a patient with early onset retinal dystrophy. *Mol. Vis.* 2018; 24: 478–84.
26. den Hollander A.I., Lopez I., Yzer S., Zonneveld M.N., Janssen I.M., Strom T.M., et al. Identification of novel mutations in patients with Leber congenital amaurosis and juvenile RP by genome-wide homozygosity mapping with SNP microarrays. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2007; 48(12): 5690–8. <https://doi.org/10.1167/iovs.07-0610>
27. Earp M., Winham S.J., Larson N., Permuth J.B., Sicotte H., Chien J., et al. A targeted genetic association study of epithelial ovarian cancer susceptibility. *Oncotarget.* 2016; 7(7): 7381–9. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7121>
28. Patin E., Kotalik Z., Guernon J., Bibert S., Nalpas B., Jouanguy E., et al. Genome-wide association study identifies variants associated with progression of liver fibrosis from HCV infection. *Gastroenterology.* 2012; 143(5): 1244–52.e12. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.07.097>
29. Rüeger S., Bochud P.Y., Dufour J.F., Müllhaupt B., Semela D., Heim M.H., et al. Impact of common risk factors of fibrosis progression in chronic hepatitis C. *Gut.* 2015; 64(10): 1605–15. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-306997>
30. Jiménez-Sousa M.Á., Gómez-Moreno A.Z., Pineda-Tenor D., Brochado-Kith O., Sánchez-Ruano J.J., Artaza-Varasa T., et al. The myeloid-epithelial-reproductive tyrosine kinase (*MERTK*) rs4374383 polymorphism predicts progression of liver fibrosis in hepatitis C virus-infected patients: a longitudinal study. *J. Clin. Med.* 2018; 7(12): 473. <https://doi.org/10.3390/jcm7120473>
31. Petta S., Valenti L., Marra F., Grimaudo S., Tripodo C., Bugianesi E., et al. *MERTK* rs4374383 polymorphism affects the severity of fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol.* 2016; 64(3): 682–90. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.10.016>
32. Reiner A.P., Wurfel M.M., Lange L.A., Carlson C.S., Nord A.S., Carty C.L., et al. Polymorphisms of the IL1-receptor antagonist gene (*IL1RN*) are associated with multiple markers of systemic inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2008; 28(7): 1407–12. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.167437>

Информация об авторах

Власенко Наталья Викторовна[✉] — н.с. лаб. вирусных гепатитов ЦНИИЭ, Москва, Россия, vlasenko@cmd.su, <https://orcid.org/0000-0002-2388-1483>

Чурилова Надежда Сергеевна — м.н.с. лаб. вирусных гепатитов ЦНИИЭ, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5344-5829>

Лоскутова Татьяна Алексеевна — лаборант лаб. вирусных гепатитов ЦНИИЭ, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1478-665X>

Миронов Константин Олегович — д.м.н., рук. научной группы разработки новых методов выявления генетических полиморфизмов ЦНИИЭ, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8207-9215>

Есьман Анна Сергеевна — н.с. научной группы разработки новых методов выявления генетических полиморфизмов ЦНИИЭ, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5456-7649>

Дунаева Елена Алексеевна — н.с. научной группы разработки новых методов выявления генетических полиморфизмов ЦНИИЭ, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-4477-8506>

Семенов Татьяна Анатольевна — д.м.н., профессор, академик РАЕН, рук. отдела эпидемиологии НИЦЭИМ им. почетного академика Н.Ф. Гамалея, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6686-9011>

Родионова Зинаида Сергеевна — консультант организационно-методического отдела ЦНИИЭ, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0401-279X>

Никитин Игорь Геннадьевич — директор НМИЦ «Лечебно-реабилитационный центр», Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1699-0881>

Тутельян Алексей Викторович — д.м.н., член-корреспондент РАН, зав. лаб. инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи ЦНИИЭ, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2706-6689>

Кузин Станислав Николаевич — д.м.н., профессор, зав. лаб. вирусных гепатитов ЦНИИЭ, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-0616-9777>

Акимкин Василий Геннадиевич — д.м.н., профессор, академик РАН, директор ЦНИИЭ, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-4228-9044>

Участие авторов. Миронов К.О., Есьман А.Е., Дунаева Е.А. — разработка методик для определения аллелей однонуклеотидных полиморфизмов с использованием ПЦР в режиме реального времени и пиросеквенирования. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 25.02.2022;
принята к публикации 22.04.2022;
опубликована 30.04.2022

Information about the authors

Natalia V. Vlasenko[✉] — researcher, Laboratory of viral hepatitis, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, vlasenko@cmd.su, <https://orcid.org/0000-0002-2388-1483>

Nadezhda S. Churilova — junior researcher, Laboratory of viral hepatitis, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5344-5829>

Tatiana A. Loskutova — assistant, Laboratory of viral hepatitis, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1478-665X>

Konstantin O. Mironov — Head, Scientific group for development of new methods of genetic polymorphisms detection, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8207-9215>

Anna S. Esman — researcher, Scientific group for development of new methods of genetic polymorphisms detection, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5456-7649>

Elena A. Dunaeva — researcher, Scientific group for development of new methods of genetic polymorphisms detection, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-4477-8506>

Tatiana A. Semenenko — D. Sci. (Med.), Professor, Head, Epidemiology department, N.F. Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6686-9011>

Zinaida S. Rodionova — consultant, Organizational and methodological department, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0401-279X>

Igor G. Nikitin — Director, National Medical Research Center "Treatment and Rehabilitation Center", Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1699-0881>

Alexei V. Tutelian — D. Sci. (Med.), Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences; Head, Laboratory of infections associated with the provision of medical care, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2706-6689>

Stanislav N. Kuzin — D. Sci. (Med.), Professor, Head, Laboratory of viral hepatitis, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-0616-9777>

Vasily G. Akimkin — D. Sci. (Med.), Professor, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Director, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-4228-9044>

Author contribution. Mironov K.O., Esman A.S., Dunaeva E.A. — development of methods for determining the alleles of single nucleotide polymorphisms using real-time PCR and pyrosequencing. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

The article was submitted 25.02.2022;
accepted for publication 22.04.2022;
published 30.04.2022

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-236>

Распространённость антител к вирусу гепатита E у населения регионов Республики Беларусь

Давыдов В.В.^{1✉}, Жаворонок С.В.¹, Рогачева Т.А.¹, Новик Т.П.¹, Алаторцева Г.И.², Нестеренко Л.Н.², Сидоров А.В.², Лухверчик Л.Н.², Михайлов М.И.^{2,3}, Зверев В.В.^{2,4}

¹Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь;

²Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова, Москва, Россия;

³Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, Москва, Россия;

⁴Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Аннотация

Актуальность. Гепатит E (ГЕ) является зооантропонозом. Основным резервуаром вируса гепатита E (ВГЕ) в Республике Беларусь (РБ) — домашние свиньи, что, в связи с развитой системой свиноводства, предполагает высокий риск распространения инфекции среди населения, однако реальные масштабы циркуляции вируса и закономерности эпидемиологии ГЕ в данном регионе остаются малоизученными.

Цель — изучение серопревалентности ВГЕ, характеризующей эпидемический процесс ГЕ в РБ.

Материалы и методы. В образцах сывороток крови ($n = 2784$), полученных от пациентов инфекционных отделений лечебно-профилактических учреждений ($n = 1669$) и практически здоровых людей ($n = 1114$) из разных регионов РБ, определяли активность аланинаминотрансферазы (АЛТ) кинетическим методом и антитела IgG к ВГЕ методом иммуноферментного анализа.

Результаты. Частота встречаемости анти-ВГЕ IgG в группе условно здоровых людей составила 7,3% (95% ДИ 5,8–9,0). В группе пациентов с поражением печени этот показатель был достоверно выше — 11,2% (95% ДИ 9,6–12,9). Серопревалентность ВГЕ в группах условно здорового населения и пациентов с повышенным уровнем АЛТ не зависела от пола и региона проживания обследуемых лиц. Частота выявления анти-ВГЕ IgG постепенно нарастала по мере увеличения возраста, достигая пиковых значений (в среднем 15,9%) в возрастной группе старше 64 лет.

Выводы. На территории РБ происходит интенсивная циркуляция ВГЕ, при этом эпидемический процесс ГЕ в РБ носит скрытый характер. Реальное распространение серомаркеров ВГЕ среди населения РБ превосходит частоту диагностированных случаев заболевания, что отражает отсутствие настороженности медицинского персонала в отношении ГЕ и указывает на субклиническое течение заболевания у большинства пациентов.

Ключевые слова: гепатит E, IgG, вирус гепатита E, сероэпидемиология

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом БГМУ (протокол № 8 от 26.04.2016).

Источник финансирования. Исследование выполнено в рамках Межгосударственной программы инновационного сотрудничества государств — участников СНГ на период до 2020 года при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (уникальный идентификатор проекта RFMEFI61319X0091) и ГКНТ РБ.

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

Для цитирования: Давыдов В.В., Жаворонок С.В., Рогачева Т.А., Новик Т.П., Алаторцева Г.И., Нестеренко Л.Н., Сидоров А.В., Лухверчик Л.Н., Михайлов М.И., Зверев В.В. Распространённость антител к вирусу гепатита E у населения регионов Республики Беларусь. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022;99(2):160–171.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-236>

Prevalence of antibodies to the hepatitis E virus in the population of the Republic of Belarus

Vladimir V. Davydov^{1✉}, Sergey V. Zhavoronok¹, Tamara A. Rogacheva¹, Tatiana P. Novik¹, Galina I. Alatortseva², Lyubov N. Nesterenko², Alexander V. Sidorov², Liudmila N. Lukhverchik², Mikhail I. Mikhailov^{2,3}, Vitaly V. Zverev^{2,4}

¹Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus;

²I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia;

³Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russia;

⁴I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

Abstract

Rationale. Hepatitis E (HE) is a zoonoanthroposis. Domestic pigs are the main reservoir for hepatitis E virus (HEV) in the Republic of Belarus (RB). Considering the well-developed pig farming, there is a high risk of infection spread among the population; however, the scale of virus circulation and patterns of HE epidemiology in the above region are still insufficiently explored.

The **aim** of the study is to assess HEV seroprevalence specific for the HE epidemic process in RB.

Materials and methods. Serum samples ($n = 2,784$) collected from patients of infectious disease departments at hospitals ($n = 1,669$) and relatively healthy people ($n = 1,114$) from different RB regions were used to measure the activity of alanine aminotransferase (ALT) by a kinetic rate method as well as IgG antibodies to HEV by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Results. In the group of healthy people, anti-HEV IgG were detected in 7.3% (95% CI, 5.8–9.0). In the group of patients with liver disorders, the detection frequency was significantly higher, reaching 11.2% (95% CI, 9.6–12.9). In the groups of healthy people and patients with elevated ALT levels, the HEV seroprevalence did not depend on their gender or the region of residence. The anti-HEV IgG detection frequency gradually increased among older-age patients and reached the peak levels (15.9% on average) in the over-64 age group.

Conclusions. RB is characterized by intensive HEV circulation, while the HE epidemic process is characterized by a latent nature. The actual prevalence of HE seromarkers among the RB population exceeds the frequency of diagnosed cases, suggesting insufficient vigilance of healthcare workers towards HE and subclinical forms of infection in most of the patients.

Keywords: hepatitis E, IgG, hepatitis E virus, seroepidemiology

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Belarusian State Medical University (Protocol 8, April 26, 2016).

Funding source. The research was carried out as part of the Interstate program of innovation cooperation of States — participants of the CIS up to 2020, with the financial support of the Ministry of education and science of the Russian Federation, the project ID RFMEFI61316X0091, and the State Committee for Science and Technology of the Republic of Belarus.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Davydov V.V., Zhavoronok S.V., Rogacheva T.A., Novik T.P., Alatortseva G.I., Nesterenko L.N., Sidorov A.V., Lukhverchik L.N., Mikhailov M.I., Zverev V.V. Prevalence of antibodies to the hepatitis E virus in the population of the Republic of Belarus. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2022;99(2):160–171.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-236>

Введение

Вирус гепатита E (ВГЕ) — это РНК-содержащий вирус семейства *Hepeviridae* [1], имеющий выраженный генетический полиморфизм [2]. Он признан ведущей причиной острого вирусного гепатита в глобальном масштабе. По оценкам, во всём мире около 939 млн человек (1 из 8 жителей) когда-либо были инфицированы ВГЕ [3]. Пять из 8 известных генотипов ВГЕ (ВГЕ-1–ВГЕ-8) могут вызывать инфекцию у человека. Заболевания, вызываемые ВГЕ-1 и ВГЕ-2, являются антропонозами; ВГЕ-3 и

ВГЕ-4 инфицируют животных, но также могут передаваться человеку; ВГЕ-5 и ВГЕ-6 были выделены только из организма диких кабанов; ВГЕ-7 может инфицировать как человека, так и одногорбых верблюдов; ВГЕ-8 был идентифицирован у двугорбых верблюдов, но на сегодняшний день вирусные последовательности ВГЕ-8 у людей не обнаружены. Глобальное распространение ВГЕ имеет различные эпидемиологические закономерности, основанные на экологических и социально-экономических факторах. Территории многих развивающихся стран

являются гиперэндемичными по гепатиту Е (ГЕ), особенно это касается стран Юго-Восточной Азии и Африки, где заболевание проявляется в виде острого гепатита преимущественно у молодых людей. ГЕ обычно представляет собой острое самоизлечиваемое заболевание, за исключением случаев инфицирования беременных женщин и пациентов с хронической патологией печени, у которых смертность достигает 25 и 70% соответственно [4].

В странах с неразвитой инфраструктурой и жарким климатом заболевание вызывается ВГЕ-1 и ВГЕ-2, распространяющимися фекально-оральным путём через загрязнённые источники воды. Случаи заболевания ГЕ возникают как спорадически, так и периодически в виде крупных эпидемий. Ежегодно происходят около 20 млн случаев инфицирования ВГЕ, что приводит к более чем 3 млн клинических случаев и 70 тыс. смертельных исходов [5]. Ранее считалось, что в экономически развитых регионах ГЕ встречается редко и в основном выявляется у туристов, возвращающихся из эндемичных по ГЕ стран. В настоящее время появляется всё больше свидетельств, опровергающих это мнение [6]. Автохтонный ГЕ в развитых странах встречается гораздо чаще, чем считалось ранее, и может быть более распространённым, чем гепатит А [7]. ГЕ чаще встречается среди пожилых мужчин, у которых он вызывает значительную заболеваемость и смертность. Заболевание имеет неблагоприятный прогноз в контексте ранее существовавшего хронического заболевания печени и часто ошибочно диагностируется как лекарственное поражение этого органа. В отличие от завозных инфекций, вызванных ВГЕ-1 и ВГЕ-2, автохтонный ГЕ в большинстве развитых стран вызывается ВГЕ-3 и является зооантропонозной инфекцией, распространённой среди домашних и диких свиней [8]. Инфицирование ВГЕ людей возникает в результате употребления в пищу свинины, не прошедшей достаточной термической обработки, сырой свиной печени и сыровяленых колбасных изделий, а также контакта с животными в процессе профессиональной деятельности или через свиной навоз при загрязнении окружающей среды, приводящем к заражению поверхностных источников воды, контаминации вирусом продуктов растениеводства и его появлению в организме моллюсков-фильтраторов [9]. Во многих странах встречаются случаи заражения ВГЕ-3, связанные с переливанием крови. Хроническая инфекция ВГЕ-3 может развиваться у людей с ослабленным иммунитетом: реципиентов трансплантатов, получающих иммуносупрессивную терапию [10], пациентов с гематологическими злокачественными новообразованиями [11], ВИЧ-инфицированных с низким уровнем Т-лимфоцитов CD4 [12].

Инфекция, вызванная ВГЕ-3 у людей в развитых странах, в основном протекает бессимптомно [14],

но у пациентов с хроническими заболеваниями печени она довольно часто осложняется острой печёночной недостаточностью, смертность от которой может достигать 27% [13]. Авторы исследования, проведённого в Дании, показали, что на фоне критически низкой заболеваемости ГЕ у населения наблюдается высокая встречаемость анamnестических IgG-антител к ВГЕ, достигающая 20%. Данная особенность эпидемиологии ВГЕ характерна для большинства развитых стран и в русскоязычной литературе известна как «парадокс Балаяна» [15].

Республику Беларусь (РБ) относят к регионам с низким уровнем распространения ГЕ [16] с регистрируемой заболеваемостью на уровне 0,02–0,04 на 100 тыс. населения. Специфическая диагностика ГЕ в учреждениях практического здравоохранения до настоящего времени практически не проводится, и судить о распространении ГЕ в РБ не представляется возможным. Случаи манифестных форм ГЕ проходят под другими диагнозами и, вероятно, большинство из них регистрируются как гепатиты с неустановленной этиологией. Ранее было показано, что ГЕ в РБ носит автохтонный характер с возможностью завоза с других территорий [17]. Основным резервуаром ВГЕ в РБ являются домашние свиньи [18]. Вследствие того, что эпидемический процесс ГЕ, вероятно, носит скрытый характер, изучение реальных масштабов циркуляции ВГЕ среди населения и разработка соответствующих противоэпидемических мероприятий, с учётом зооантропонозной природы заболевания, являются актуальными задачами здравоохранения РБ.

Целью настоящего исследования явилось изучение распространённости анamnестических антител IgG к ВГЕ (анти-ВГЕ IgG) у различных групп населения в Брестском и Минском регионах РБ в зависимости от пола и возраста.

Материалы и методы

Протестировано 2784 образца сыворотки крови, полученных от различных групп населения, проживающего в Брестской и Минской областях РБ. В исследовании были представлены люди 6 возрастных когорт: младше 25 лет, 25–34, 35–44, 45–54, 55–64 года и старше 64 лет. Характеристика возрастных диапазонов представлена на **рис. 1**. В каждой возрастной группе были мужчины и женщины, среднее соотношение полов в исследовании составило 1 : 1,13. Половозрастная характеристика исследуемых групп по регионам представлена в **табл. 1**.

В исследовании участвовали две категории лиц. Одна из них включала условно здоровых людей ($n = 1114$), не имеющих жалоб со стороны органов желудочно-кишечного тракта, с содержанием в крови специфического для повреждения печени гепатотропного фермента аланинаминотрансферазы (АЛТ) в пределах клинической нормы (< 53 МЕ/л).

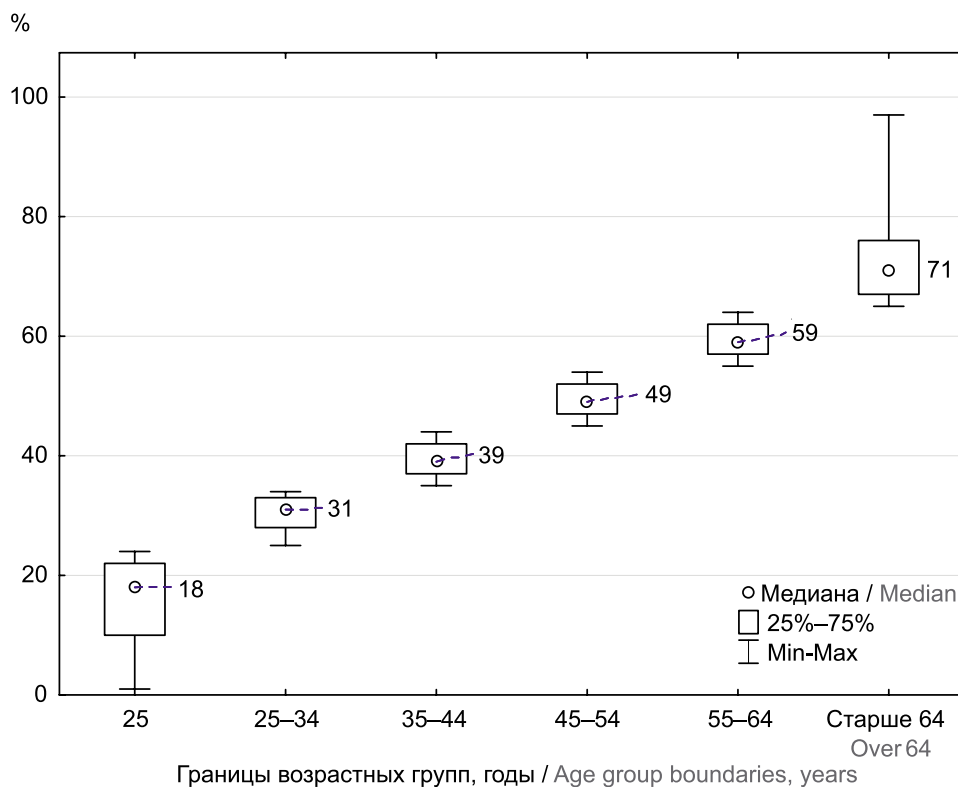


Рис. 1. Характеристика возрастных диапазонов.

Fig. 1. Age cohort profiles.

В другую группу исследования ($n = 1669$) были включены пациенты, проходящие лечение в инфекционных отделениях стационаров, имеющие жалобы со стороны печени, с более чем двукратным повышением уровня АЛТ относительно клинической нормы (> 106 МЕ/л). Дизайн исследования представлен на рис. 2.

Определение активности АЛТ в сыворотке крови проводили при помощи набора реагентов для определения активности аминотрансфераз («Анализ-Х») в соответствии с инструкцией производителя. Анти-ВГЕ IgG в образцах сыворотки крови определяли методом иммуноферментного анализа с использованием набора реагентов «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G» (НПО «Диагностические системы») согласно инструкции производителя. Также была использована разработанная нами новая тест-система для выявления IgG к ВГЕ в сыворотке крови методом непрямого твердофазного иммуноферментного анализа [14]. В качестве антигенов применялись рекомбинантные белки ORF2 и ORF3 ВГЕ-3, разработанные в НИИВС им. И.И. Мечникова [19]. Все положительные результаты, полученные при помощи тест-системы, являющейся нашей разработкой, были верифицированы повторным исследованием образцов в референсной тест-системе «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G».

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета программ

«Statistica for Windows 12.0» («StatSoft Inc.»). Количественные переменные представляли в виде медианы (Me), верхнего и нижнего квартилей (Q_1-Q_3). Полученные данные проверяли на соответствие закону нормального распределения (W-критерий Шапиро–Уилка). При несоответствии последнему использовались методы непараметрической статистики. Значимость различий между группами определяли с помощью U-критерия Манна–Уитни для независимых групп. Взаимосвязь изучаемых показателей оценивали с помощью коэффициента корреляции, который рассчитывали непараметрическим методом Спирмена. Для качественных переменных определяли абсолютную частоту (n), относительную частоту — долю (%) от общего числа случаев в исследуемой группе и 95% доверительный интервал (95% ДИ). Значимость различий долей устанавливали по критерию χ^2 . Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

В 268 из 2784 образцов сыворотки крови, полученных от людей двух изучаемых групп, содержались анти-ВГЕ IgG, что составило 9,6% (95% ДИ 8,5–10,8). В группе пациентов с поражением печени анти-ВГЕ IgG были обнаружены в 187 из 1669 исследованных образцов, что составило 11,2% (95% ДИ 9,6–12,9). В группе условно здоровых граждан анти-ВГЕ IgG были выявлены у 81 из 1114 обследо-

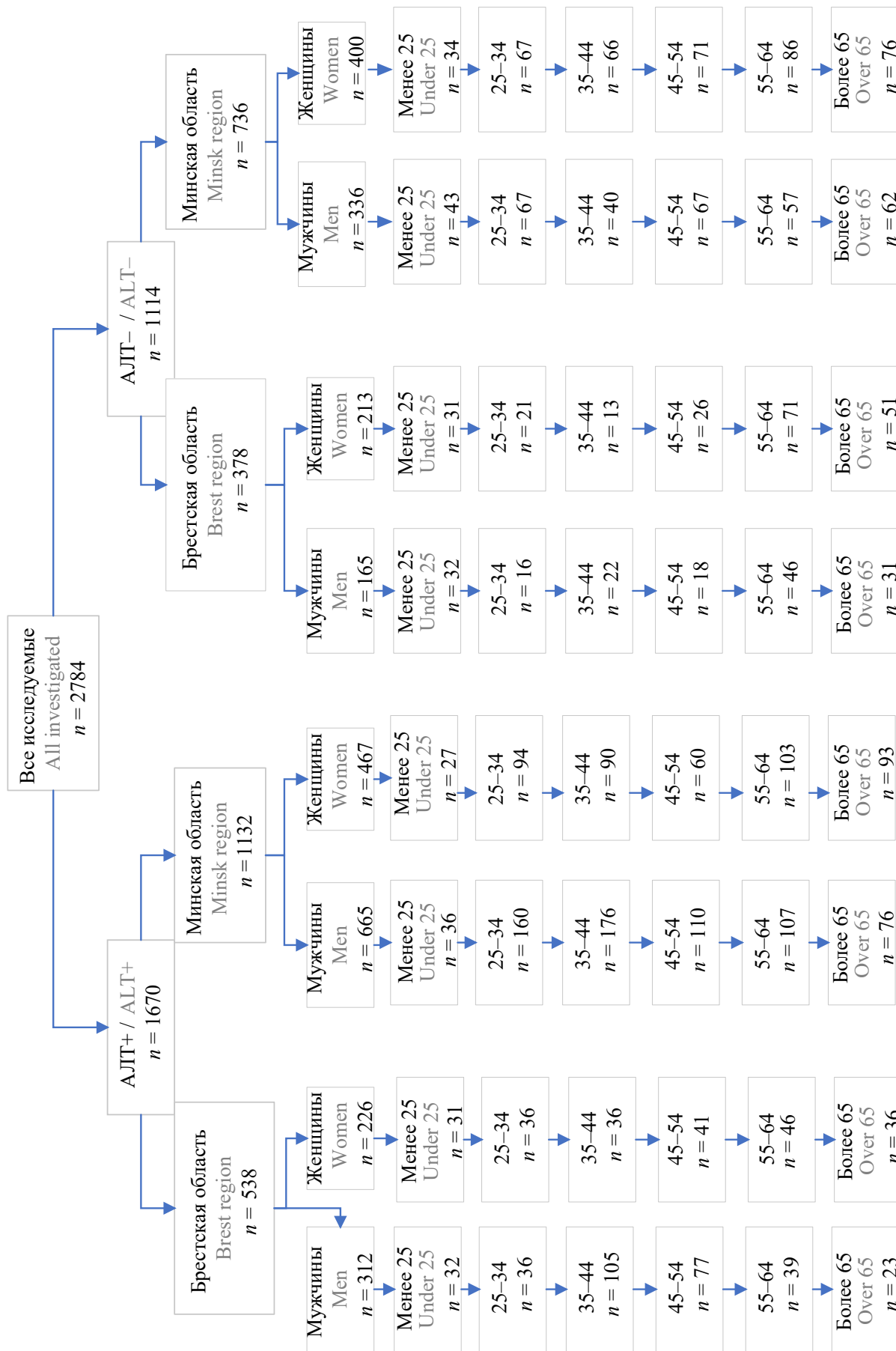


Рис. 2. Дизайн исследования.
Fig. 2. Study design.

Таблица 1. Половозрастная характеристика исследуемых групп
Table 1. Sex and age characteristics of the studied groups

Регион Region	Категория возраста Age category	Пол / Sex		Всего Total
		женский / female	мужской / male	
Брестская область Brest region	< 25	62	64	126
	25–34	57	52	109
	35–44	49	127	176
	45–54	67	95	162
	55–64	117	85	202
	> 64	87	54	141
	Всего / Total	439	477	916
Минская область Minsk region	< 25	61	79	140
	25–34	161	227	388
	35–44	156	216	372
	45–54	131	177	308
	55–64	189	164	353
	> 64	169	138	307
	Всего / Total	867	1001	1868
Итого / Total		1306	1478	2784

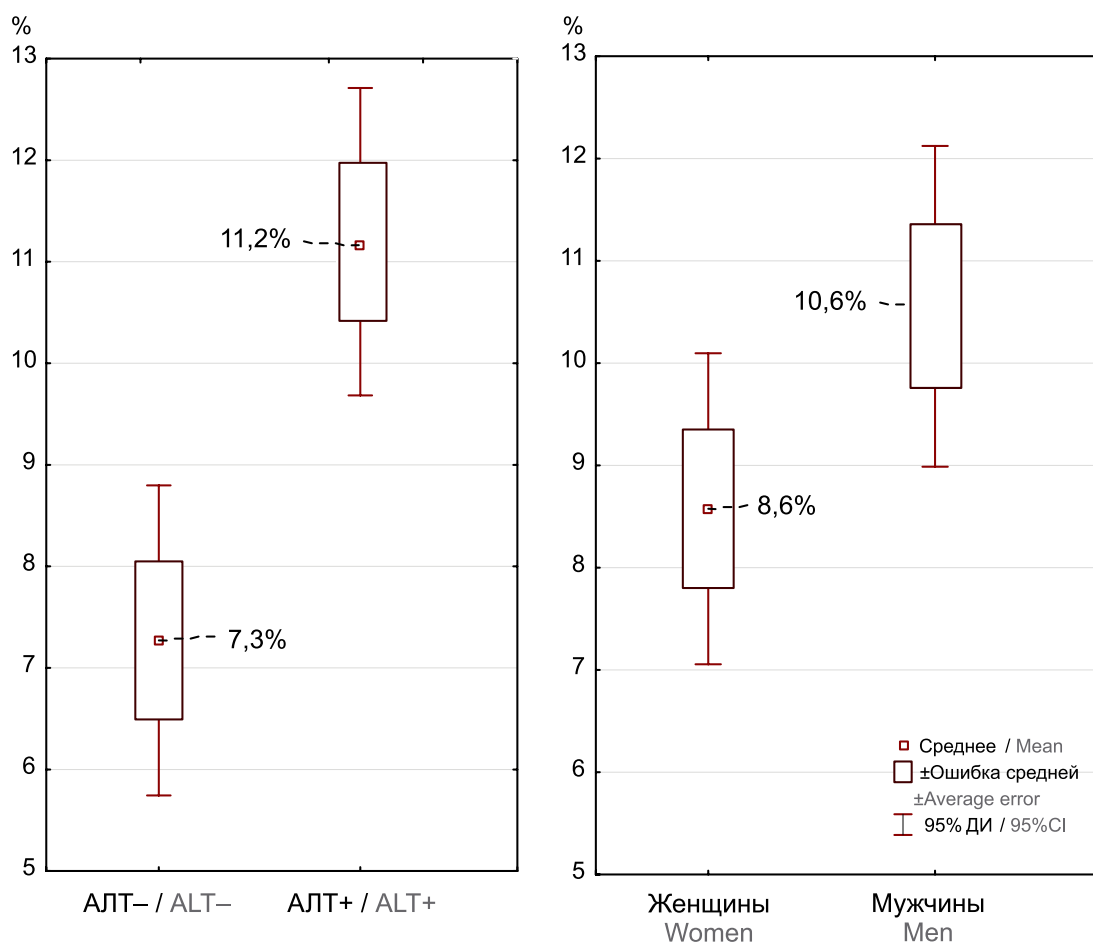


Рис. 3. Частота встречаемости анти-ВГЕ IgG в исследуемых группах.

Fig. 3. Detection frequency of anti-HEV IgG in the studied groups.

ванных, что составило 7,3% (95 ДИ 5,8–9,0). Таким образом, в группе больных с поражением печени, сопровождающимся повышением уровня специфических трансаминаз, по сравнению с группой условно здоровых лиц, показатель встречаемости анamnестических антител анти-ВГЕ IgG был достоверно выше ($\chi^2 = 11,842$; $p = 0,00058$; **рис. 3**).

Общая серопревалентность ВГЕ в обеих группах не зависела от пола (рис. 3). Из 268 серопозитивных лиц 112 были женщинами, что при общем количестве исследуемых женщин 1194 составило 8,6% (95% ДИ 7,2–10,2). Из 1478 исследованных образцов сыворотки крови мужчин серопозитивными оказались 156 (10,6%; 95% ДИ 9,1–12,2). Различия встречаемости анти-ВГЕ IgG у мужчин и женщин в обеих исследованных группах не являются статистически достоверными ($\chi^2 = 3,121$; $p = 0,07728$). При изучении распространённости анamnестических антител к ВГЕ в группе практически здорового населения анти-ВГЕ IgG обнаружены в сыворотке крови 43 из 613 женщин (7,0%; 95% ДИ 5,1–9,5). У женщин из группы пациентов с повышенным уровнем АЛТ этот показатель установлен на уровне 69 из 693 (10,0%; 95% ДИ 7,9–12,4). Таким образом, выявлена более высокая встречаемость анти-ВГЕ IgG в группе женщин с поражением печени, близкая к статистически значимой ($\chi^2 = 3,591$; $p = 0,05810$). Частота обнаружения анamnестических антител к ВГЕ у мужчин имела иной характер. Анти-ВГЕ IgG в образцах, полученных в группе условно здоровых

лиц, обнаружены с частотой 38 из 501 (7,6%; 95% ДИ 5,4–10,4). У пациентов с поражением печени значение этого показателя составляло 118 из 977 (12,1%; 95% ДИ 10,0–14,5) и было достоверно выше, чем в группе условно здоровых лиц ($\chi^2 = 7,0813$; $p = 0,0078$; **рис. 4**).

При изучении серопревалентности ВГЕ в различных регионах РБ установлено, что в Брестской области анти-ВГЕ IgG были выявлены в 80 образцах из 916 исследованных, что составило 8,7% (95% ДИ 6,93–10,87). В Минской области антитела были обнаружены в 188 образцах из 1868 обследованных (10,1%; 95% ДИ 8,68–11,61). Значения частоты обнаружения антител по регионам РБ не имели статистически достоверных различий ($\chi^2 = 1,25$; $p = 0,263392$). В группе женщин из числа практически здоровых лиц этот показатель в Брестской области составил 6,6% (14 из 213; 95% ДИ 3,6–11,0), в Минской области — 7,3% (29 из 400; 95% ДИ 4,9–10,4). У практически здоровых мужчин в данных регионах анти-ВГЕ IgG обнаруживались с частотой 7,3% (12 из 165; 95% ДИ 3,8–12,7) и 7,7% (26 из 336; 95% ДИ 5,1–11,3) соответственно (**рис. 5**).

Анти-ВГЕ IgG у пациентов с поражением печени встречались чаще, но по регионам проживания статистически значимых различий не выявлено. У женщин, проживающих в Брестском регионе, антитела встречались с частотой 8,0% (18 из 226; 95% ДИ 4,7–12,6), в Минском — 10,9% (51 из 467; 95% ДИ 8,1–14,4). У мужчин частота выявления

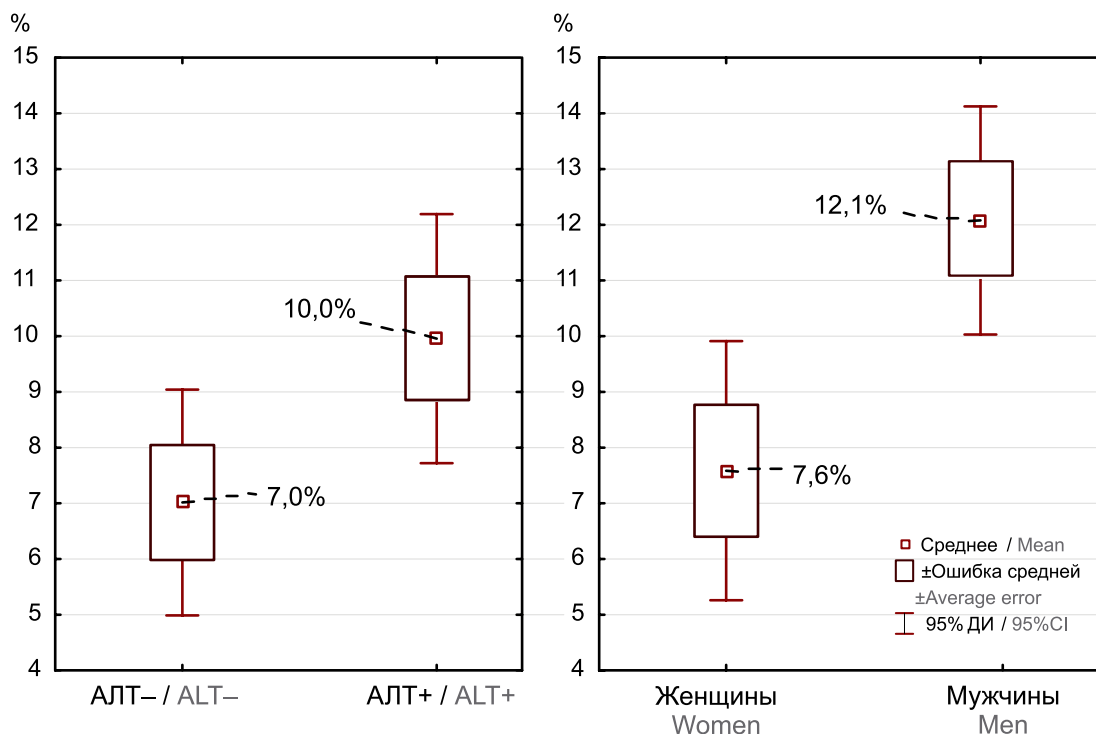


Рис. 4. Частота встречаемости анти-ВГЕ IgG у мужчин и женщин в изучаемых группах.

Fig. 4. Detection frequency of anti-HEV IgG in men and women in the studied groups.

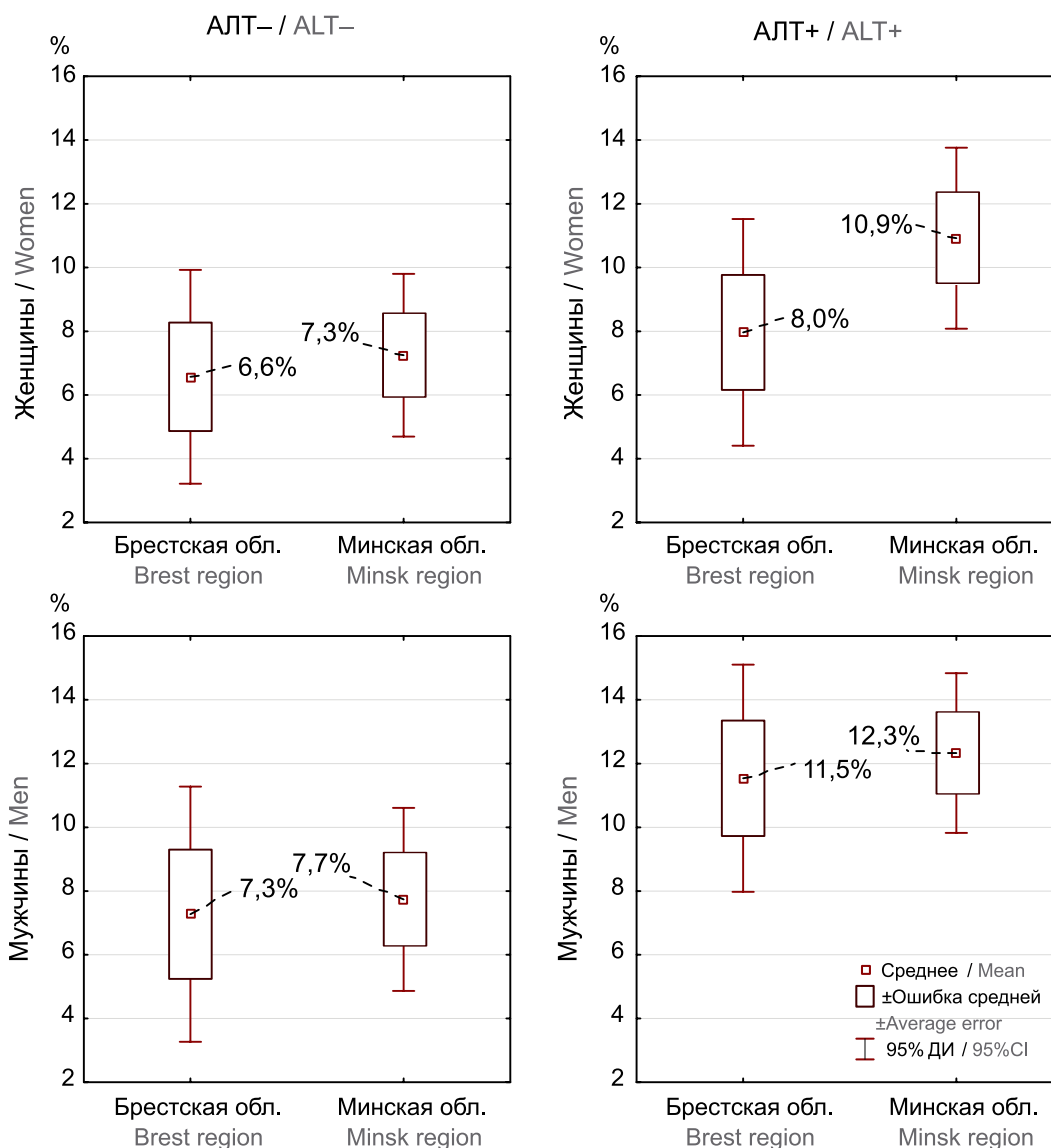


Рис. 5. Частота встречаемости анти-ВГЕ IgG у мужчин и женщин в изучаемых группах в зависимости от региона.
Fig. 5. Detection frequency of anti-HEV IgG among men and women in the studied groups by the region.

анти-ВГЕ IgG зарегистрирована на более высоком уровне, однако достоверных различий в зависимости от региона проживания также не выявлено: показатель по Брестской области составил 11,5% (36 из 312; 95% ДИ 8,1–15,6), по Минской области — 12,3% (82 из 665; 95% ДИ 9,8–15,3). Таким образом, изучение показателя встречаемости антител к ВГЕ в различных клинических группах в зависимости от пола в Брестской и Минской областях не выявило статистически достоверных различий, что, вероятно, свидетельствует о сходных закономерностях эпидемического процесса ГЕ на этих территориях.

Серопревалентность ВГЕ возростала с увеличением возраста людей. При сравнении частот обнаружения анти-ВГЕ IgG у людей соседних возрастных групп статистически значимые отличия выявлены только в группе пациентов с поражением печени (рис. 6).

В возрастной группе старше 64 лет антитела выявлены у 46 из 228 пациентов (20,2%; 95% ДИ 14,8–26,9). Это значение достоверно выше, чем в любой другой возрастной группе пациентов. Например, в группе 55–64 года выявлено достоверно более низкое значение встречаемости анти-ВГЕ IgG — 10,8% (32 из 295; 95% ДИ 7,4–15,3; $\chi^2 = 8,82$; $p = 0,003$). В группе практически здоровых лиц достоверные отличия значений встречаемости анти-ВГЕ IgG выявлены только для двух возрастных групп. В группе 0–24 года выявлены 4 позитивные сыворотки из 140 изученных (2,9%; 95% ДИ 0,8–7,3). В группе старше 64 лет выявлены 25 из 220 серопозитивных лиц (11,4%; 95% ДИ 7,4–16,8), что достоверно выше, чем в младшей группе ($\chi^2 = 7,25$; $p = 0,0071$).

Использование корреляционного анализа Спирмена позволило установить статистически до-

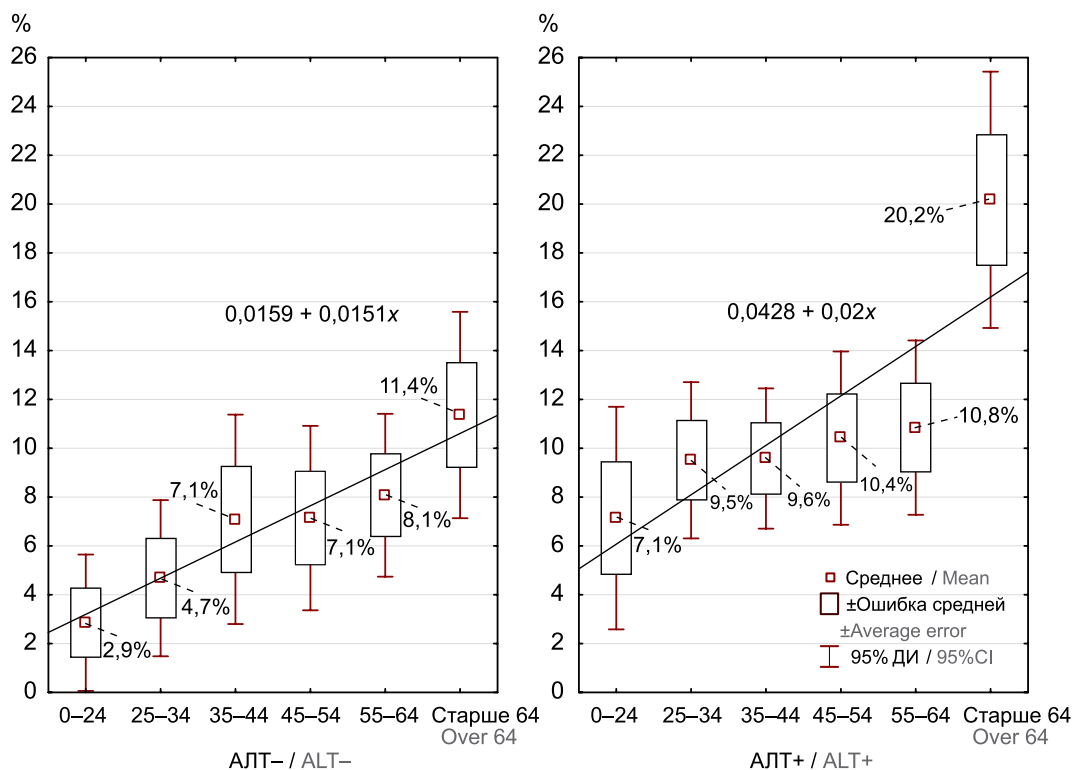


Рис. 6. Частота встречаемости анти-ВГЕ IgG в изучаемых группах в зависимости от возраста.

Fig. 6. Detection frequency of anti-HEV IgG in the studied groups, depending on age.

статистически значимую положительную связь частоты встречаемости анти-ВГЕ IgG с увеличением возраста людей. Наибольшее значение коэффициента корреляции ($n = 977$; $\rho = 0,124$; $p < 0,001$) выявлено в группе с повышенным уровнем АЛТ (АЛТ+) у мужчин (табл. 2). Расчёт коэффициента корреляции произведён на основе сравнения встречаемости анти-ВГЕ IgG в изучаемых группах по мере увеличения возраста обследуемых лиц.

Обсуждение

Проведённые исследования показали, что частота встречаемости анamnестических антител к

ВГЕ в популяции условно здорового населения РБ в среднем составляет 7,3%, что достоверно ниже показателя серопревалентности населения Европейских стран — 9,3% ($\chi^2 = 5,45$; $p = 0,0196$) [3]. Этот показатель в РБ сопоставим с аналогичным показателем в Италии и Швейцарии, где он составляет 7,28 и 7,25% соответственно [3]. В то же время серопревалентность ВГЕ среди практически здоровых жителей РБ достоверно ниже, чем во Франции, Германии, Нидерландах и Польше, являющихся анклавами по ГЕ в Европе, где уровень серопревалентности анти-ВГЕ IgG варьирует от 14,17 до 16,07% [3]. Метаанализ данных литературы свиде-

Таблица 2. Значение коэффициента корреляции Спирмена (ρ) встречаемости анти-ВГЕ IgG и возраста людей в изучаемых группах и его достоверность

Table 2. Spearman's correlation coefficient (ρ) for the detection frequency of anti-HEV IgG and the age of participants, and its significance

Группа / Group	n	ρ	p
Все обследованные / Total number of participants	2784	0,099	< 0,001
АЛТ+ / ALT+	1670	0,099	< 0,001
Мужчины / Men	1478	0,113	< 0,001
Мужчины АЛТ+ / Men ALT+	977	0,124	< 0,001
Мужчины АЛТ- / Men ALT-	501	0,107	< 0,05
Женщины / Women	1306	0,091	< 0,01
Женщины АЛТ+ / Women ALT+	693	0,080	< 0,05
Женщины АЛТ- / Women ALT-	613	0,109	< 0,01

тельствует о том, что у пациентов с острым гепатитом в европейских странах частота положительных результатов выявления анти-ВГЕ IgG составляет 21,5% [3]. Наши исследования показывают, что распространённость специфических антител в группе пациентов, имеющих повышенный уровень трансаминаз, составляет только 11,2%, что, вероятно, свидетельствует о менее значительной роли ВГЕ как фактора развития вирусных гепатитов на обследованных территориях РБ. Однако реальное распространение серомаркеров ГЕ среди населения существенно превосходит частоту диагностированных случаев, что свидетельствует о скрытой интенсивной циркуляции ВГЕ. Можно смело предположить, что низкий уровень регистрации случаев заболевания связан как с недостаточной настороженностью медицинского персонала в отношении ГЕ, так и с субклиническим течением инфекции у большинства пациентов.

Частота выявления анти-ВГЕ в РБ постепенно нарастает по мере увеличения возраста людей, достигая пикового значения 20,2% в возрастной группе лиц старше 64 лет с поражением печени, что может быть обусловлено длительной, более 20 лет, персистенцией антител в организме человека [20], а также эпидемиологическими, клиническими или патогенетическими особенностями ГЕ у людей старшей возрастной группы. Корреляционная положительная связь между увеличением частоты встречаемости анти-ВГЕ IgG и возрастом людей является статистически достоверной. Закономерности процесса сохранения антител в организме человека и возрастание частоты их обнаружения с увеличением количества прожитых лет нуждаются в дальнейшем изучении.

В данном исследовании не выявлено статистически значимых различий распространения антител к ВГЕ в зависимости от региона проживания, что можно объяснить одинаковым уровнем развития инфраструктуры, сходными особенностями занятости и уклада жизни населения, а также, вероятно, сходными механизмами эпидемического процесса ГЕ в центральном и западном регионах РБ.

Пол человека не имеет статистически достоверного влияния на распространённость анти-ВГЕ IgG, что свидетельствует об отсутствии существенных различий в уязвимости мужчин и женщин по отношению к данной инфекции.

Полученные результаты указывают на необходимость широкого внедрения в практику здравоохранения специфической диагностики ВГЕ у пациентов с гепатитом неустановленной этиологии. Необходимо разработка новой и корректировка существующей в РБ системы санитарно-противоэпидемических мероприятий, направленных на предупреждение возникновения и распространения ГЕ с учётом зооантропонозного характера данной инфекции.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Purdy M.A., Harrison T.J., Jameel S., Meng X.J., Okamoto H., Van der Poel W.H.M., et al. ICTV virus taxonomy profile: Hepeviridae. *J. Gen. Virol.* 2017; 98(11): 2645–6. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000940>
2. Primadharsini P.P., Nagashima S., Okamoto H. Genetic variability and evolution of hepatitis E virus. *Viruses.* 2019; 11(5): 456. <https://doi.org/10.3390/v11050456>
3. Li P., Liu J., Li Y., Su J., Ma Z., Bramer W.M., et al. The global epidemiology of hepatitis E virus infection: A systematic review and meta-analysis. *Liver. Int.* 2020; 40(7): 1516–28. <https://doi.org/10.1111/liv.14468>
4. Kamar N., Bendall R., Legrand-Abravanel F., Xia N.S., Ijaz S., Izopet J., et al. Hepatitis E. *Lancet.* 2012; 379(9835): 2477–88. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61849-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61849-7)
5. Rein D.B., Stevens G.A., Theaker J., Wittenborn J.S., Wiersma S.T. The global burden of hepatitis E virus genotypes 1 and 2 in 2005. *Hepatology.* 2012; 55(4): 988–97. <https://doi.org/10.1002/hep.25505>
6. Dalton H.R., Bendall R., Ijaz S., Banks M. Hepatitis E: an emerging infection in developed countries. *Lancet Infect. Dis.* 2008; 8(11): 698–709. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(08\)70255-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(08)70255-X)
7. Dalton H.R., Stableforth W., Hazeldine S., Thurairajah P., Ramnarace R., Warshow U., et al. Autochthonous hepatitis E in Southwest England: a comparison with hepatitis A. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2008; 27(7): 579–85. <https://doi.org/10.1007/s10096-008-0480-z>
8. Zhou J.H., Li X.R., Lan X., Han S.Y., Wang Y.N., Hu Y., et al. The genetic divergences of codon usage shed new lights on transmission of hepatitis E virus from swine to human. *Infect. Genet. Evol.* 2019; 68: 23–9. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.11.024>
9. Khuroo M.S., Khuroo M.S., Khuroo N.S. Transmission of hepatitis E virus in developing countries. *Viruses.* 2016; 8(9): 253. <https://doi.org/10.3390/v8090253>
10. Kamar N., Selves J., Mansuy J.M., Ouezani L., Péron J.M., Guitard J., et al. Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. *N. Engl. J. Med.* 2008; 358(8): 811–7. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0706992>
11. Tavitian S., Péron J.M., Huynh A., Mansuy J.M., Ysebaert L., Huguet F., et al. Hepatitis E virus excretion can be prolonged in patients with hematological malignancies. *J. Clin. Virol.* 2010; 49(2): 141–4. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2010.06.016>
12. Dalton H.R., Bendall R.P., Keane F.E., Tedder R.S., Ijaz S. Persistent carriage of hepatitis E virus in patients with HIV infection. *N. Engl. J. Med.* 2009; 361(10): 1025–7. <https://doi.org/10.1056/NEJMc0903778>
13. Blasco-Perrin H., Madden R.G., Stanley A., Crossan C., Hunter J.G., Vine L., et al. Hepatitis E virus in patients with decompensated chronic liver disease: a prospective UK/French study. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2015; 42(5): 574–81. <https://doi.org/10.1111/apt.13309>
14. Shata M.T., Navaneethan U. The mystery of hepatitis E seroprevalence in developed countries: is there subclinical infection due to hepatitis E virus? *Clin. Infect. Dis.* 2008; 47(8): 1032–4. <https://doi.org/10.1086/591971>
15. Михайлов М.И., Малинникова Е.Ю., Кюреган К.К., Потемкин И.А., Алсалих Н.Д., Исаева О.В. и др. Парадокс Баяляна. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2019; (1): 80–5. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-1-80-85>
16. Жаворонок С.В., Карпов И.А., Михайлов М.И., Арабей А.А., Кашкур Ю.В., Кюреган К.К. и др. Интенсивность эпидемического и эпизоотического процессов инфекции, вызванной вирусом гепатита Е, на территории Республики Беларусь. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение.*

ние. 2019; 8(1): 11–22.

<https://doi.org/10.24411/2305-3496-2019-11001>

17. Давыдов В.В., Жаворонок С.В., Анисько Л.А., Гасич Е.Л., Марчук С.И., Семижон П.А. и др. Изучение рисков завоза гепатита Е в Республику Беларусь. В кн.: Рубникович С.П., Хрыщанович В.Я., ред. *БГМУ в авангарде медицинской науки и практики: Сборник научных трудов*. Минск; 2020: 285–90.
 18. Красочко П.А., Жаворонок С.В., Борисовец Д.С., Красочко П.П., Алатортцева Г.И., Прокопенкова Т.М. и др. Разработка тест-системы для полуколичественного выявления антител у свиней к вирусу гепатита Е в Республике Беларусь. *Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия аграрных наук*. 2020; 58(3): 339–51. <https://doi.org/10.29235/1817-7204-2020-58-3-339-351>
 19. Алатортцева Г.И., Сидоров А.В., Нестеренко Л.Н., Лухверчик Л.Н., Амиантова И.И., Доценко В.В. и др. Рекомбинантный белок, содержащий антигенно-значимые фрагменты белков вируса гепатита Е, используемый в тест-системах для серодиагностики гепатита Е (варианты). Патент РФ № 2711907 С2; 2020.
 20. Кюрегян К.К., Потёмкин И.А., Лопатухина М.А., Попова О.Е., Исаева О.В., Малинникова Е.Ю. и др. Длительность сохранения анamnестических антител к вирусу гепатита Е. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 63(5): 310–4. <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-5-310-314>
- REFERENCES
1. Purdy M.A., Harrison T.J., Jameel S., Meng X.J., Okamoto H., Van der Poel W.H.M., et al. ICTV virus taxonomy profile: Hepviridae. *J. Gen. Virol.* 2017; 98(11): 2645–6. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000940>
 2. Primadharsini P.P., Nagashima S., Okamoto H. Genetic variability and evolution of hepatitis E virus. *Viruses*. 2019; 11(5): 456. <https://doi.org/10.3390/v11050456>
 3. Li P., Liu J., Li Y., Su J., Ma Z., Bramer W.M., et al. The global epidemiology of hepatitis E virus infection: A systematic review and meta-analysis. *Liver. Int.* 2020; 40(7): 1516–28. <https://doi.org/10.1111/liv.14468>
 4. Kamar N., Bendall R., Legrand-Abravanel F., Xia N.S., Ijaz S., Izopet J., et al. Hepatitis E. *Lancet*. 2012; 379(9835): 2477–88. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61849-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61849-7)
 5. Rein D.B., Stevens G.A., Theaker J., Wittenborn J.S., Wiersma S.T. The global burden of hepatitis E virus genotypes 1 and 2 in 2005. *Hepatology*. 2012; 55(4): 988–97. <https://doi.org/10.1002/hep.25505>
 6. Dalton H.R., Bendall R., Ijaz S., Banks M. Hepatitis E: an emerging infection in developed countries. *Lancet Infect. Dis.* 2008; 8(11): 698–709. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(08\)70255-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(08)70255-X)
 7. Dalton H.R., Stableforth W., Hazeldine S., Thurairajah P., Ramnarace R., Warshow U., et al. Autochthonous hepatitis E in Southwest England: a comparison with hepatitis A. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2008; 27(7): 579–85. <https://doi.org/10.1007/s10096-008-0480-z>
 8. Zhou J.H., Li X.R., Lan X., Han S.Y., Wang Y.N., Hu Y., et al. The genetic divergences of codon usage shed new lights on transmission of hepatitis E virus from swine to human. *Infect. Genet. Evol.* 2019; 68: 23–9. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.11.024>
 9. Khuroo M.S., Khuroo M.S., Khuroo N.S. Transmission of hepatitis E virus in developing countries. *Viruses*. 2016; 8(9): 253. <https://doi.org/10.3390/v8090253>
 10. Kamar N., Selves J., Mansuy J.M., Ouezzani L., Péron J.M., Guitard J., et al. Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. *N. Engl. J. Med.* 2008; 358(8): 811–7. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0706992>
 11. Tavitian S., Péron J.M., Huynh A., Mansuy J.M., Ysebaert L., Huguet F., et al. Hepatitis E virus excretion can be prolonged in patients with hematological malignancies. *J. Clin. Virol.* 2010; 49(2): 141–4. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2010.06.016>
 12. Dalton H.R., Bendall R.P., Keane F.E., Tedder R.S., Ijaz S. Persistent carriage of hepatitis E virus in patients with HIV infection. *N. Engl. J. Med.* 2009; 361(10): 1025–7. <https://doi.org/10.1056/NEJMc0903778>
 13. Blasco-Perrin H., Madden R.G., Stanley A., Crossan C., Hunter J.G., Vine L., et al. Hepatitis E virus in patients with decompensated chronic liver disease: a prospective UK/French study. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2015; 42(5): 574–81. <https://doi.org/10.1111/apt.13309>
 14. Shata M.T., Navaneethan U. The mystery of hepatitis E seroprevalence in developed countries: is there subclinical infection due to hepatitis E virus? *Clin. Infect. Dis.* 2008; 47(8): 1032–4. <https://doi.org/10.1086/591971>
 15. Mikhaylov M.I., Malinnikova E.Yu., Kyuregyan K.K., Potemkin I.A., Alsalkh N.D., Isaeva O.V., et al. Balayan paradox. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2019; (1): 80–5. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-1-80-85> (in Russian)
 16. Zhavoronok S.V., Karpov I.A., Mikhaylov M.I., Arabey A.A., Kashkur Yu.V., Kyuregyan K.K., et al. Epidemiological and epizootic intensity of HEV in Belarus. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie*. 2019; 8(1): 11–22. <https://doi.org/10.24411/2305-3496-2019-11001> (in Russian)
 17. Davydov V.V., Zhavoronok S.V., Anisko L.A., Gasich E.L., Marchuk S.I., Semizhon P.A., et al. Study of the risks of importing hepatitis E to the Republic of Belarus. In: Rubnikovich S.P., Khryshchanovich V.Ya., eds. *BSMU in the Vanguard of Medical Science and Practice: A Collection of Scientific Papers [BGMU v avangarde meditsinskoy nauki i praktiki: Sbornik nauchnykh trudov]*. Minsk; 2020: 285–90. (in Russian)
 18. Krasochko P.A., Zhavoronok S.V., Borisovets D.S., Krasochko P.P., Alatorstseva G.I., Prokopenkova T.M., et al. Development of ELISA test kits for semi-quantitative detection of anti-HEV antibodies in pigs in the republic of Belarus. *Izvestiya Natsional'noy akademii nauk Belarusi. Seriya agrarnykh nauk*. 2020; 58(3): 339–51. <https://doi.org/10.29235/1817-7204-2020-58-3-339-351> (in Russian)
 19. Alatorstseva G.I., Sidorov A.V., Nesterenko L.N., Lukhverchik L.N., Amiantova I.I., Dotsenko V.V., et al. Recombinant protein containing antigen-significant fragments of hepatitis E virus proteins, used in test systems for hepatitis e serodiagnosis (embodiments). Патент РФ № 2711907 С2; 2020. (in Russian)
 20. Kyuregyan K.K., Potemkin I.A., Lopatukhina M.A., Popova O.E., Isaeva O.V., Malinnikova E.Yu., et al. The duration of preservation of anamnestic antibodies to hepatitis e virus. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2018; 63(5): 310–4. <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-5-310-314> (in Russian)

Информация об авторах

Давыдов Владимир Витольдович[✉] — к.б.н., доцент, зав. каф. биологии БГМУ, Минск, Республика Беларусь, davidovvv@bsmu.by, <https://orcid.org/0000-0002-5672-9509>

Information about the authors

Vladimir V. Davydov[✉] — Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor, Head, Department of biology, Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus, davidovvv@bsmu.by, <https://orcid.org/0000-0002-5672-9509>

Жаворонок Сергей Владимирович — д.м.н., профессор, профессор каф. инфекционных болезней БГМУ, Минск, Республика Беларусь, <https://orcid.org/0000-0001-9727-1103>

Рогачева Тамара Альбертовна — к.м.н., ассистент каф. инфекционных болезней БГМУ, Минск, Республика Беларусь, <https://orcid.org/0000-0003-2231-1785>

Алаторцева Галина Ивановна — к.б.н., зав. лаб. клонирования вирусных геномов НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9887-4061>

Новик Татьяна Петровна — к.б.н., доцент каф. биологии БГМУ, Минск, Республика Беларусь, <https://orcid.org/0000-0002-3220-9592>

Нестеренко Любовь Николаевна — к.х.н., в.н.с. лаб. клонирования вирусных геномов НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-3825-3906>

Сидоров Александр Викторович — к.б.н., зав. лаб. генетики ДНК-содержащих вирусов НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-3561-8295>

Лухверчик Людмила Николаевна — к.м.н., в.н.с. лаб. клонирования вирусных геномов НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2997-8892>

Михайлов Михаил Иванович — д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, зав. лаб. вирусных гепатитов НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия; руководитель Института молекулярной и персонифицированной медицины РМАНПО, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6636-6801>

Зверев Виталий Васильевич — д.б.н., профессор, академик РАН, научный руководитель НИИВС им. И.И. Мечникова Москва, Россия; зав. каф. микробиологии, вирусологии, иммунологии ПМГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-0017-1892>

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

Статья поступила в редакцию 05.02.2022;
принята к публикации 18.03.2022;
опубликована 29.04.2022

Sergey V. Zhavoronok — D. Sci. (Med.), Professor, Department of infectious diseases, Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus, <https://orcid.org/0000-0001-9727-1103>

Tamara A. Rogacheva — Cand. Sci. (Med.), assistant, Department of infectious diseases, Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus, <https://orcid.org/0000-0003-2231-1785>

Galina I. Alatorseva — Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory for cloning viral genomes, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9887-4061>

Tatyana P. Novik — Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor, Belarusian state medical university, Minsk, Republic of Belarus, <https://orcid.org/0000-0002-3220-9592>

Lyubov N. Nesterenko — Cand. Sci. (Chem.), senior researcher, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3825-3906>

Aleksander V. Sidorov — Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of DNA-containing viruses genetics, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3561-8295>

Lyudmila N. Lukhverchik — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Federal State Budgetary Scientific Institution I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2997-8892>

Mikhail I. Mikhailov — D. Sci. (Med.), Professor, Corresponding Member of the RAS, Head, Laboratory of viral hepatitis, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia; scientific director, Institute of Molecular and Personalized Medicine, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6636-6801>

Vitaly V. Zverev — D. Sci. (Biol.), Professor, Full Member of the RAS, scientific director, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia; Head, Department of microbiology, virology, immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-0017-1892>

Author contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

The article was submitted 05.02.2022;
accepted for publication 18.03.2022;
published 29.04.2022

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-225>

Оценка интенсивности дегрануляции и изменений фенотипа нейтрофилов по уровню экспрессии $Fc_{\gamma}RIIIb$ в крови больных COVID-19 и реконвалесцентов

Кравцов А.Л.[✉], Бугоркова С.А., Ключева С.Н., Гончарова А.Ю.,
Кожевников В.А., Чумачкова Е.А., Портенко С.А., Щербакова С.А.

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Россия

Аннотация

Введение. Тяжесть течения COVID-19 коррелирует с относительным содержанием в крови пациентов специфической популяции нейтрофильных гранулоцитов (НГ) низкой плотности, клетки которой характеризуются сниженной гранулярностью, высокой неоднородностью по экспрессии $Fc_{\gamma}RIIIb$ (CD16) и склонностью к спонтанному аутолизису (нетозу).

Цель исследования — сравнить интенсивность дегрануляции НГ и экспрессию $Fc_{\gamma}RIIIb$ на этих клетках в крови больных COVID-19 и реконвалесцентов.

Материалы и методы. С помощью проточной цитометрии исследовали лейкоциты крови 40 пациентов с диагнозом COVID-19, 33 реконвалесцентов и 20 здоровых доноров (контроль). Для идентификации НГ (CD16⁺-гранулоцитов) и оценки поверхностной экспрессии молекулярного триггера нетоза $Fc_{\gamma}RIIIb$ применяли одноцветный реагент меченых моноклональных антител CD16-FITC. Иммунофенотипирование лимфоцитов осуществляли с использованием двух четырехцветных реагентов. Кроме того, в каждом образце цельной крови, окрашенном по Lyse/No-Wash-протоколу, определяли содержание клеточного дебриса. Присутствие в крови нейтрофилов на стадии нетоза подтверждали с помощью микроскопии. Продукцию цитокинов клетками определяли на автоматическом иммуноферментном анализаторе.

Результаты. На фоне характерных изменений субпопуляционного состава лимфоцитов и продукции цитокинов в крови больных COVID-19 с острой пневмонией, гипоксией и тахикардией, в сравнении с реконвалесцентами, перенёсшими тяжёлую и среднетяжёлую форму болезни, зарегистрирована более интенсивная дегрануляция НГ (в 2,6 раза), более высокая степень неоднородности по экспрессии CD16 (в 1,8 раза) и повышенная интенсивность лейкоцитоллиза (в 1,6 раза). У реконвалесцентов степень различий с контролем по данным показателям зависела от тяжести ранее перенесённого заболевания.

Заключение. Характер изменения изученных в работе показателей у пациентов с COVID-19 в острый период болезни и в период реконвалесценции подтверждает возможный механизм развития осложнений вследствие нарушения баланса между активностью высвобождаемой из гранул НГ эластазы и её плазменным ингибитором α_1 -антитрипсином.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, COVID-19, дегрануляция нейтрофилов, нейтрофилы низкой плотности, нетоз, экспрессия $Fc_{\gamma}RIIIb$ нейтрофилами, проточная цитометрия

Этическое утверждение. Исследование проводилось на основании добровольного информированного согласия пациентов. Протокол исследования одобрен Комиссией по биоэтике при РосНИПЧИ «Микроб» (протокол № 9 от 21.10.2020).

Источник финансирования. Исследование выполнено при поддержке бюджетного финансирования в рамках темы НИР АААА-А21-121012090061-9.

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

Для цитирования: Кравцов А.Л., Бугоркова С.А., Ключева С.Н., Гончарова А.Ю., Кожевников В.А., Чумачкова Е.А., Портенко С.А., Щербакова С.А. Оценка интенсивности дегрануляции и изменений фенотипа нейтрофилов по уровню экспрессии $Fc_{\gamma}RIIIb$ в крови больных COVID-19 и реконвалесцентов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022;99(2):172–184.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-225>

Assessment of neutrophil degranulation intensity and changes in neutrophil phenotype by FC_γR11b expression level in blood of patients with COVID-19 and convalescents

Aleksandr L. Kravtsov[✉], Svetlana A. Bugorkova, Svetlana N. Klyueva, Anastasia Yu. Goncharova, Vitaly A. Kozhevnikov, Elena A. Chumachkova, Svetlana A. Portenko, Svetlana A. Scherbakova

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia

Abstract

Introduction. Disease severity in hospitalized COVID-19 patients correlates with the relative content in the blood of a specific low-density neutrophilic granulocyte (NG) population, whose cells are characterized by reduced granularity, high heterogeneity in the expression of FC_γR11b (CD16) and a tendency to spontaneous autolysis (netosis).

The aim of the study was to compare the intensity of NG degranulation and the FC_γR11b expression by these cells in blood of patients with COVID-19 and convalescents.

Materials and methods. The blood leukocytes of 40 patients diagnosed with COVID-19, 33 convalescents and 20 healthy donors (control) were examined using flow cytometry. To identify NG (CD16⁺-granulocytes) and to assess the surface expression of the netosis molecular trigger (FC_γR11b), a single-color reagent of labeled monoclonal antibodies CD16-FITC was used. Immunophenotyping of lymphocytes was performed using two four-color reagents. In addition, cell debris content was determined in each Lyse/No-Wash-stained whole blood sample. The presence of neutrophils at the stage of netosis was confirmed by microscopy. Cytokine production was determined on an automatic enzyme immunoassay analyzer.

Results. Against the background of characteristic changes in the lymphocyte subpopulation composition and cytokine production, in blood of COVID-19 patients with acute pneumonia, hypoxia and tachycardia a more intense degranulation of NG (2.6 times), higher degree of CD16 expression heterogeneity (1.8 times) and an increased leukocytolysis intensity (1.6 times) were observed compared to convalescents who have undergone severe and moderate forms of the disease. In convalescents, the degree of differences of these indicators compared to control values varied in concordance with the disease severity.

Conclusion. The nature of changes in the parameters studied in COVID-19 patients in the acute phase of the disease and during the period of convalescence confirms the possible mechanism of the development of complications due to an imbalance between the activity of elastase released from NG granules and its plasma inhibitor α₁-antitrypsin.

Keywords: SARS-CoV-2, COVID-19, neutrophil degranulation, low density neutrophils, netosis, FC_γR11b expression by neutrophils, flow cytometry

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe" (protocol No. 9, October 21, 2020).

Funding source. The study was supported by budget funding within the framework of the research topic No AAA-A-21-121012090061-9.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Kravtsov A.L., Bugorkova S.A., Klyueva S.N., Goncharova A.Yu., Kozhevnikov V.A., Chumachkova E.A., Portenko S.A., Shcherbakova S.A. Assessment of neutrophil degranulation intensity and changes in neutrophil phenotype by FC_γR11b expression level in blood of patients with COVID-19 and convalescents. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2022;99(2):172–184.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-225>

Введение

Новая коронавирусная инфекция COVID-19 (CoronaVirus Disease 2019), вызываемая РНК-содержащим вирусом SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus 2), оказалась серьёзным вызовом для здравоохранения вследствие недостаточной изученности молекулярных механизмов её патогенеза. Полноценное понимание патофизиологических механизмов поражения при

COVID-19 сердечно-сосудистой системы на сегодняшний день не сформировано [1]. До конца не ясно, почему критически тяжёлая форма COVID-19 с грубыми нарушениями гемостаза, проявляющимися в виде диссеминированного внутрисосудистого свёртывания крови и острого респираторного дистресс-синдрома, развивается в организме лишь у 5% пациентов, заражённых SARS-CoV-2 [2]. Мало изучен относительный вклад различных типов кле-

ток иммунной системы в развитие характерных для COVID-19 инфекционных осложнений, и прежде всего это касается нейтрофильных гранулоцитов (НГ) — самой многочисленной и мобильной популяции лейкоцитов крови человека [3, 4].

Повышенный интерес к изучению роли НГ в иммуно- и патогенезе COVID-19 исследователи стали проявлять с конца 2020 г., что объясняют установлением способности SARS-CoV-2 оказывать на нейтрофилы прямое стимулирующее воздействие, запускающее в условиях *in vitro* процесс аутолизиса этих клеток с образованием ДНК-сетей нейтрофильных внеклеточных ловушек (Neutrophil Extracellular Traps — NETs) [5, 6]. Эту способность подтверждают результаты многочисленных клинических исследований, и, согласно современной гипотезе, нетоз (NETosis) может играть в патогенезе новой коронавирусной инфекции ключевую роль [2].

По мнению российских специалистов, повышенное содержание NETs в мазках крови, окрашенных по Романовскому–Гимзе (более 16%), может служить критерием негативного прогноза течения COVID-19 и риска летального исхода [7]. Для быстрой детекции NETs, количественной оценки интенсивности дегрануляции нейтрофилов и характеристики изменённого протетического фенотипа этих клеток за рубежом начинают применять объективные проточно-цитометрические методы исследования лейкоцитов в микрообъёмах цельной крови пациентов. Эти методы не требуют разделения популяций лейкоцитов в градиенте плотности и позволяют быстро проводить иммунофенотипирование в суммарной лейкоцитарной популяции как лимфоцитов, так и гранулоцитов [8–10].

С помощью проточной цитометрии недавно установлено, что в крови пациентов с диагнозом COVID-19 появляется особая специфическая популяция нейтрофилов низкой плотности (Low Density Neutrophils — LDNs) со сниженной степенью гранулярности и сниженным уровнем экспрессии на клетку Fc γ R3b (CD16). Доля таких клеток (CD16^{INT}-LDNs), характеризующихся гиперпродукцией провоспалительных цитокинов (интерлейкина (ИЛ)-6, ИЛ-8, фактора некроза опухоли- α (ФНО- α)) и лейкоцитарных протеиназ, а также склонностью к спонтанному формированию NETs, нарастала в крови при негативном прогнозе COVID-19, достигая максимума перед смертью больного. При благоприятном прогнозе относительное содержание CD16^{INT}-LDNs в процессе терапии в крови снижалось. У реконвалесцентов клетки данной популяции присутствовали в крови в различном количестве [4], но причины этих различий не изучены.

Цель настоящей работы — сравнить интенсивность дегрануляции нейтрофилов и экспрессию ими Fc γ R3b в крови больных COVID-19 и реконвалесцентов.

Материалы и методы

Оценку степени гранулярности лейкоцитов и их иммунофенотипирование в крови пациентов с диагнозом COVID-19, подтверждённым выявлением РНК SARS-CoV-2 методом ПЦР, проводили летом 2020 г., в период 1-й волны эпидемии COVID-19 в Саратовской области.

Клинический материал (кровь) поступал в пробирках с гепарином из профильных медицинских организаций г. Саратова и г. Энгельса в течение 3 ч. Забор материала производили на основании письменного согласия пациентов на участие в исследовании, проводимом в рамках плановой научной тематики учреждения, одобренной локальным этическим комитетом РосНИПЧИ «Микроб».

Группы для наблюдения формировали на основании анализа совокупных данных: среди больных в остром периоде заболевания (согласно данным пульсоксиметрии, результатам измерения перед забором крови температуры тела, частоты сердечных сокращений (ЧСС), частоты дыхательных движений (ЧДД) и результатам КТ/R⁰) по степени тяжести течения инфекции; среди реконвалесцентов по степени тяжести течения ранее перенесённой коронавирусной инфекции (через 1 нед – 3 мес после болезни) [11]. Для сравнения была взята группа здоровых доноров (20 человек) в возрасте 23–50 лет. При выполнении работы были обследованы 93 человека, которые были распределены на 6 групп (**табл. 1**).

Прогрессирование болезни до альвеолярной стадии с развитием индуцированной SARS-CoV-2-пневмонии подтверждалось с помощью компьютерной томографии (КТ) и/или обзорной рентгенографии органов грудной клетки. У 34 (85%) из 40 обследуемых пациентов мужского (30%) и женского (70%) пола в возрасте 17–92 года (медиана 60 [минимум–максимум — 51–71]) с острым течением заболевания зарегистрированы КТ-признаки поражения лёгких различной степени (КТ1–КТ4). У пациентов из группы II доля лиц с показателями КТ2, КТ3 и КТ4 составляла 52,9, 41,2 и 5,9% соответственно. Среди больных из группы III доля лиц с показателями КТ1 и КТ2 составляла 76,5 и 23,5% соответственно. У реконвалесцентов (33 человека, 24% мужчин и 76% женщин в возрасте 30–65 лет (52 [46–58]) анализировали результаты КТ, полученные в острый период болезни. Документальное подтверждение проведённого КТ-исследования было представлено 19 (57,6%) добровольцами. Если у ранее перенёвших COVID-19 (группа V) в момент госпитализации в стационар доля лиц с КТ2–КТ3 составляла 53,8%, то среди пациентов, получавших амбулаторную помощь (группа VI), лишь у 6 добровольцев по результатам КТ установлены поражения лёгких 1-й и 2-й степени.

Имунофенотипирование лейкоцитов проводили в микрообъёмах цельной крови с помощью

Таблица 1. Описание групп
Table 1. Description of the study groups

Обозначение группы Name of group	Группа Group	Описание Description
I (n = 20)	Группа сравнения Comparison group	Практически здоровые доноры с нормальной температурой, SpO ₂ > 97%, ЧДД < 20 в 1 мин, ЧСС < 80 уд/мин Conditionally healthy donors with normal temperature, SpO ₂ > 97%, RR < 20 in 1 min, and HR < 80 bpm
II (n = 17)	Пневмония с дыхательной недостаточностью Respiratory pneumonia	Лица с нарушенной дыхательной функцией лёгких и изменённым состоянием сердечно-сосудистой системы: SpO ₂ ≤ 93%, ЧДД > 30 в 1 мин, ЧСС > 90 уд/мин при температуре > 38°C Persons with impaired respiratory function of the lungs and changes in the state of cardiovascular system: SpO ₂ ≤ 93%, RR > 30 in 1 min, and HR > 90 bpm at temperatures > 38°C
III (n = 17)	Пневмония без дыхательной недостаточности Pneumonia without respiratory distress	Лица без нарушения дыхательной функции, с температурой < 38°C, SpO ₂ > 95%, ЧДД < 25 в 1 мин, ЧСС < 90 уд/мин Persons without respiratory impairment, with temperature < 38°C, SpO _{2p} > 95%, RR < 25 in 1 min, and HR < 90 bpm
IV (n = 6)	ОРВИ Acute respiratory viral infection	Только признаки ОРВИ, отсутствие пневмонии Only signs of acute respiratory viral infection, no pneumonia
V (n = 15)	Реконвалесценты после тяжёлого/среднетяжёлого течения COVID-19 Reconvalescents after a severe/moderate course of COVID-19	Лица, завершившие лечение COVID-19 в условиях стационара, с нормальной температурой и нормальными значениями показателей SpO ₂ , ЧДД и ЧСС Patients who completed COVID-19 treatment in a clinical setting with normal temperature, SpO ₂ , HR, and RR
VI (n = 18)	Реконвалесценты после лёгкого течения COVID-19 Reconvalescents after a mild course of COVID-19	Лица, успешно завершившие курс лечения COVID-19 в амбулаторных условиях, с нормальной температурой и нормальными значениями SpO ₂ , ЧДД и ЧСС Individuals who successfully completed COVID-19 outpatient treatment, with normal temperature, SpO ₂ , HR, and RR

Примечание. SpO₂ — показатель насыщения артериальной крови кислородом (сатурация).

Note. SpO₂ — arterial oxygen saturation index (saturation); RR — respiratory rate; HR — heart rate.

процедуры Lyse/No-Wash («BD Bioscience»), исключая потерю клеток и клеточного дегриса при окраске образцов флюоресцирующими реагентами [12, 13]. Использовали два четырехцветных реагента меченых моноклональных антител Cyto-Stat CD45-FITC, CD4-PE, CD8-ECD, CD3-PC5 и Cyto-Stat CD45-FITC, CD56-PE, CD19-ECD, CD3-PC5 («Beckman Coulter») для быстрого определения в крови методом проточной цитометрии относительного содержания Т-лимфоцитов (CD45⁺CD3⁺CD19⁻), В-лимфоцитов (CD45⁺CD3⁻CD19⁺), Т-лимфоцитов-хелперов (CD45⁺CD3⁺CD4⁺), цитотоксических Т-клеток (CD45⁺CD3⁺CD8⁺), NK-клеток (CD45⁺CD3⁻CD56⁺) и NKT-клеток (CD45⁺CD3⁺CD56⁺). Индивидуальные значения иммунорегуляторных индексов вычисляли как отношение числа хелперов (индукторов) к числу цитотоксических Т-клеток (супрессоров). Повреждённые лейкоциты идентифицировали и подсчитывали в крови как клеточный дегрис — объекты с низким уровнем экспрессии на клетку общего лейкоцитарного антигена CD45 [13].

В гейте гранулоцитов крови с помощью одноцветного реагента CD16-FITC («Beckman Coulter») идентифицировали нейтрофилы (CD16⁺-гранулоциты) и устанавливали долю НГ в суммарной гранулоцитарной популяции. Определяли средний уровень экспрессии Fc_γRIIIb (CD16) на поверхности нейтро-

филов (Mean Fluorescence Intensity — MFI, в условных единицах — каналах цитометра), а также оценивали неоднородность (CV, %) отдельных клеток по данному параметру [4, 14]. Степень гранулярности НГ определяли в условных единицах интенсивности бокового светорассеяния (Mean Side Scatter Intensity — MSSI) [3]. Дегрануляцию этих клеток в крови каждого обследуемого оценивали (в %) по отношению к среднему значению гранулярности (M) в контроле [15].

Для измерения интенсивности светорассеяния и иммунофлюоресценции отдельных клеток в потоке использовали проточный цитофлюориметр «DakoCytomation» с программным обеспечением «Summit v.4.3 Built 2445» [14]. Присутствие в исследуемых образцах цельной крови нейтрофилов, находящихся на стадии аутолизиса (нетоза), подтверждали результатами микроскопической детекции NETs в мазках крови («Olympus CX41»), окрашенных по Романовскому–Гимзе в соответствии с методикой [7]. Спонтанную и индуцированную конканавалином А продукцию цитокинов клетками крови определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием коммерческих наборов для детекции интерферона-γ (ИФН-γ), ФНО-α (ЗАО «Вектор-Бест») и ИЛ-17А («eBioscience»). Результаты учитывали на автоматическом иммуноферментном

анализаторе «Lazurit» («Dynex Technologies») при длине волны 450 нм [16].

Полученные данные статистически обрабатывали с использованием стандартного пакета программ «Microsoft Office Excel 2016», «Statistica 10.0» («StatSoft Inc.»). В исследуемых группах данные представляли в виде медианы (Me) и квартильных отклонений (Q_{25} – Q_{75}). Для расчёта межгрупповых ассоциаций использовали U-критерий Манна–Уитни. Связи между показателями оценивали с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Значение $p < 0,05$ считали статистически значимым.

Результаты

У пациентов с COVID-19 в острый период заболевания и в период реконвалесценции доля НГ в суммарной популяции гранулоцитов крови была выше, чем у относительно здоровых доноров. При этом у больных и перенёсших COVID-19 регистрировали снижение гранулярности этих клеток (дегрануляция), степень выраженности которой была максимальной в группе II — у пациентов на фоне пневмонии с дыхательной недостаточностью (табл. 2).

На рис. 1 представлены частотные распределения отдельных лейкоцитов по степени грану-

лярности и уровню экспрессии клетками общего специфического лейкоцитарного антигена (CD45), наглядно иллюстрирующие факт 48% дегрануляции нейтрофилов в крови одного из пациентов группы II. Кроме того, на рис. 1 хорошо видно, что в периферической крови больного COVID-19 содержится в 2,6 раза больше клеточного дебриса, чем у здоровых доноров. Визуальный микроскопический анализ мазков крови на присутствие NETs подтвердил известный факт активации в крови больных COVID-19 процесса аутолизиса НГ (нетоза).

У больных (в группах II, III, IV) и реконвалесцентов, относящихся к группе V, интенсивность дегрануляции нейтрофилов составила в сравнении с показателями у здоровых доноров в среднем 48,8, 28,1, 23,9 и 18,7% соответственно. Достоверные изменения по показателю гранулярности, а также по содержанию в крови клеточного дебриса частично сохранялись в крови реконвалесцентов группы V до 3 мес после перенесённого заболевания. У пациентов группы II интенсивность лейкоцитоллиза в крови была в 1,8 раза выше, чем у лиц группы III, при отсутствии сдвигов по данному параметру у пациентов группы I (табл. 2). Сравнение данных в исследуемых группах выявило сильную обратную корреляционную связь между индивидуальными

Таблица 2. Относительное содержание в крови гранулоцитов (нейтрофилов) и степень их гранулярности, экспрессия $Fc\gamma RIIIb$ (CD16) нейтрофилами больных COVID-19 и реконвалесцентов, Me [Q_{25} – Q_{75}]

Table 2. Relative content of blood granulocytes (neutrophils) and the level of its granularity, expression of $Fc\gamma RIIIb$ (CD16) by blood neutrophils of COVID-19 patients and convalescents, Me [Q_{25} – Q_{75}]

Показатель Parameter	Группа / Group					
	I (n = 20)	II (n = 17)	III (n = 17)	IV (n = 6)	V (n = 15)	VI (n = 18)
Содержание в крови гранулоцитов, % Granulocyte content in the blood, %	61,4 [57–64,6]	54,3 [48–60]*	46,3 [42–61]*	62 [48–70]	53 [48–65]	60 [50–71]
Доля нейтрофилов в гранулоцитарной популяции, % Neutrophils in granulocyte population, %	85 [82–90]	95 [91–97]*	94 [90–98]*	93 [91–95]*	94 [92–95]*	92 [91–93]*
Гранулярность нейтрофилов, MSSl ($\times 10^2$) Neutrophil granularity, MSSl ($\times 10^2$)	51 [49,8–54,8]	28 [22,9–35,4]**	38 [34,1–39,2]**	39 [38,7–40,9]**	42 [41,2–48,0]**	48 [46,2–50,3]*
Экспрессия нейтрофилами CD16, MFI Expression CD16 by neutrophils, MFI	344 [318–364]	119 [94–139]**	169 [160–185]**	200 [178–225]**	183 [158–199]**	212 [198–228]**
Коэффициент вариации по экспрессии CD16 нейтрофилами, % Coefficient of variation for CD16 expression, %	22 [20–28]	81 [61–98]**	49 [40–66]**	52 [46–58]**	38 [28–50]**	30 [23–32]**
Клеточный дебрис (лизис лейкоцитов крови), % Cell debris (blood leukocytolysis), %	4,6 [4,0–7,2]	14 [10,5–18,3]*	8,5 [6,0–12,6]**	7,7 [5,6–11,4]**	9,4 [8,8–12,2]**	6,4 [5,8–10,1]*

Примечание. * $p < 0,05$ по сравнению с группой I; ** $p < 0,05$ по сравнению с группой II.

Note. * $p < 0,05$ in comparison with the group I; ** $p < 0,05$ in comparison with the group II.

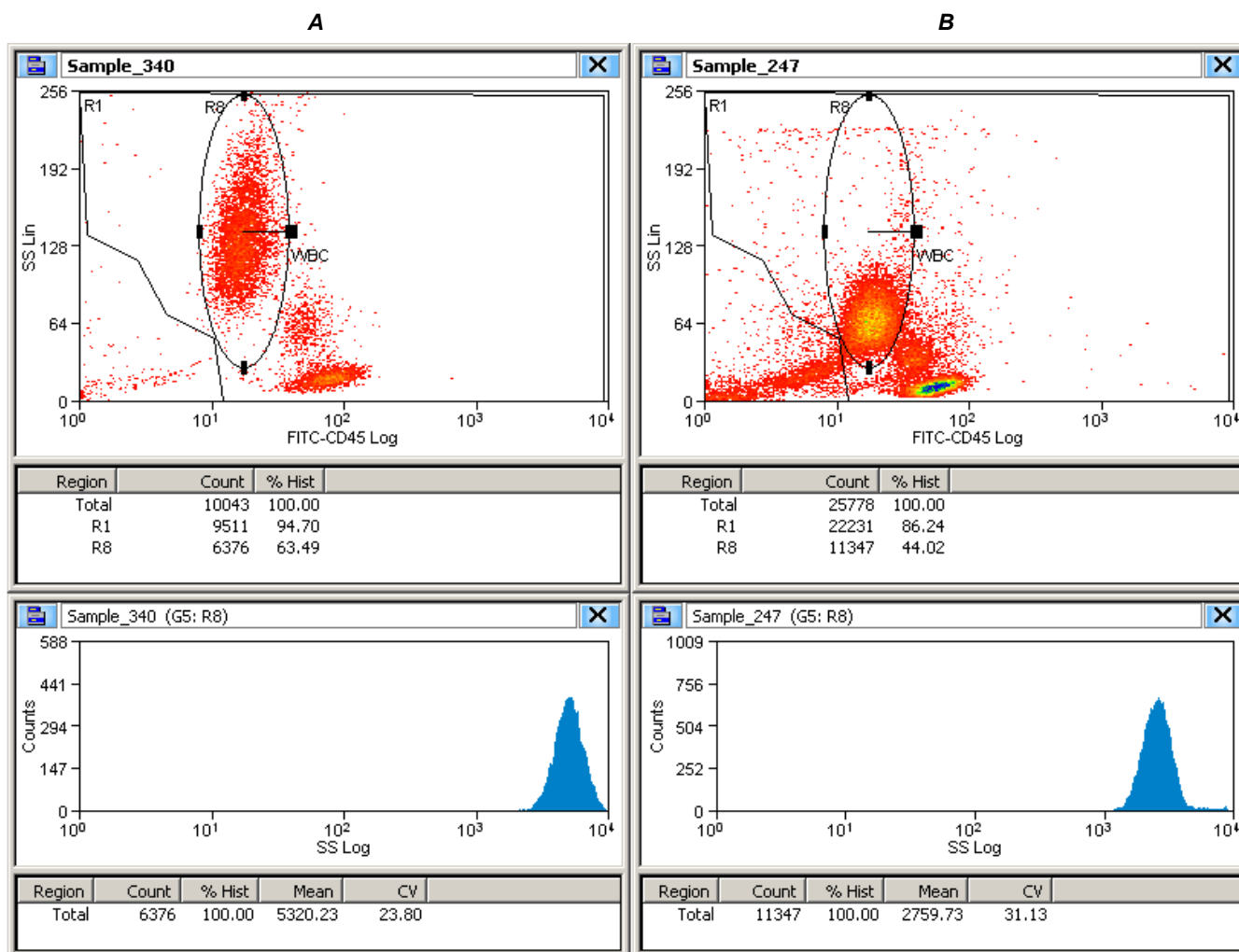


Рис. 1. Интенсивная дегрануляция нейтрофилов и активация лейкоцитолитической реакции в крови больного среднетяжёлой формой COVID-19 (B) в сравнении с результатом анализа лейкоцитов крови здорового донора (A).

На опытной и контрольной цитограммах (сверху) гранулоциты крови (нейтрофилы) локализируются в регионе R8, отделяясь по интенсивности бокового светорассеяния (степени своей гранулярности — SS), от лимфоцитов и моноцитов. Под каждой цитограммой представлено частотное распределение отдельных клеток в гейте гранулоцитов (в регионе R8) по степени гранулярности в логарифмическом режиме измерения для количественной оценки интенсивности дегрануляции нейтрофилов в опытном образце (в данном случае $100\% \times (5320 - 2759)/5320 = 48\%$). Вне региона R1 на цитограммах учитываются сигналы от клеточного дебриса (лизированных лейкоцитов), доля которых в крови больного (Total – R1 = $100\% - 86,24\% = 13,76\%$) существенно выше, чем в контроле ($100\% - 94,7\% = 5,3\%$).

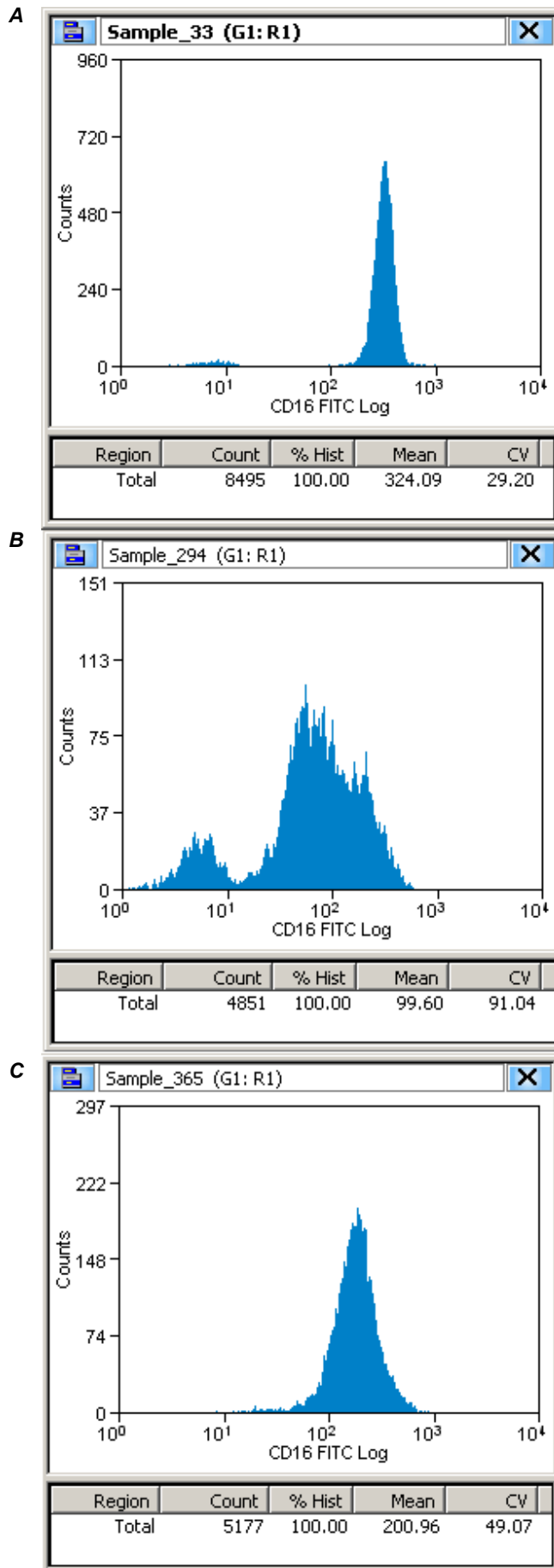
Fig. 1. Intensive neutrophil degranulation and leukocytolysis activation in the blood of patient with a moderate to severe form of COVID-19 (B) in comparison with the result of the healthy donor blood leukocyte analysis (A).

On the experimental and control cytograms (top), blood granulocytes (neutrophils) are localized in the R8 region, separating from monocytes and lymphocytes by the degree of their granularity (light Side Scatter intensity — SS). Under each cytogram the frequency distribution of individual cells in the gate of granulocytes (in the R8 region) according to the degree of granularity is shown in logarithmic measurement mode to estimate the neutrophil degranulation intensity in the studied sample (in this case, $5320 - 2759/5320 = 48\%$). Outside the R1 region of cytograms the signals from cellular debris (lysed leukocytes) are taken into account. The proportion of this signals in the patient's blood (Total – R1 = $100\% - 86,24\% = 13,76\%$) is significantly higher than in the control ($100\% - 94,7\% = 5,3\%$).

показателями сатурации (SpO_2) и интенсивности дегрануляции нейтрофилов периферической крови ($r = -0,97$; $p = 0,00001$), а также сильную прямую корреляцию между ЧСС и содержанием в крови клеточного дебриса ($r = 0,8$; $p = 0,00016$).

Средний уровень экспрессии $Fc\gamma RIIIb$ (CD16) на поверхности НГ больных COVID-19 на фоне пневмонии с признаками дыхательной недостаточности (группа II) был в 3 раза ниже нормы. В периферической крови пациентов с пневмонией

(группы II и III) появлялись НГ как с низким ($CD16^{LOW}$), так и, преимущественно, с промежуточным значением данного параметра ($CD16^{INT}$), которые отсутствовали в образцах цельной крови здоровых доноров группы I (рис. 2). В крови реконвалесцентов нейтрофилы с фенотипом $CD16^{INT}$ присутствовали, но в сравнительно небольшом количестве. В результате степень неоднородности НГ у больных и ранее перенёсших COVID-19 пациентов различалась по уровню экспрессии CD16 на клет-



ку (табл. 2), что регистрировали в виде различий в значениях коэффициентов вариации гистограмм, представленных в качестве примера на рис. 2. Между индивидуальными значениями CV и ЧДД была выявлена сильная прямая корреляционная зависимость ($r = 0,85$; $p = 0,00001$).

Отмечали подавление индуцированной секреции ИФН- γ клетками крови больных COVID-19, но не реконвалесцентов. Спонтанная продукция ФНО- α в кровь пациентов с тяжёлой формой пневмонии была выше, чем в кровь здоровых доноров и лиц групп III и IV. Однако после неспецифической Т-клеточной стимуляции этот провоспалительный цитокин присутствовал в крови больных COVID-19 и реконвалесцентов в меньшем количестве, чем в крови здоровых доноров. У всех больных, в отличие от реконвалесцентов, был зарегистрирован повышенный уровень индуцированной секреции клетками крови IL-17A (табл. 3).

Изменениям в нейтрофилах крови больных COVID-19 и реконвалесцентов, а также сдвигам в уровне секреции цитокинов сопутствовали изменения в относительном содержании некоторых основных субпопуляций лимфоцитов (табл. 4): снижалась доля Т-хелперов в группе II и повышалось относительное содержание цитотоксических Т-клеток в группе III; снижалась доля В-клеток в группах II, III и V, а также NK-клеток в группах II и III.

Обсуждение

Экспериментальные данные, полученные при выполнении настоящей работы, согласуются с современными представлениями о роли индуцируемой SARS-CoV-2 секреторной азурофильной дегрануляции нейтрофилов в патогенезе COVID-19 [3, 5]. При новой коронавирусной инфекции чрезмерная дегрануляция НГ, сопутствующая интенсивному нетозу, нарушает регуляцию внеклеточной активности лейкоцитарной эластазы (ЛЭ) её плаз-

Рис. 2. Экспрессия $Fc\gamma RIIIb$ (CD16) нейтрофилами крови здорового донора (А), больного тяжёлой формой COVID-19 (В) и реконвалесцента (С). Различия в степени неоднородности клеточных популяций по данному параметру.

На каждой гистограмме результат распределения клеток по интенсивности иммунофлюоресценции получен в условиях гейтирования по области R1 (G1:R1), в которой популяция гранулоцитов крови отделялась от моноцитов и гранулоцитов по параметрам прямого и бокового светорассеяния [14].

Fig. 2. The expression of $Fc\gamma RIIIb$ (CD16) by blood neutrophils of a healthy donor (A), a patient with severe form of COVID-19 (B) and a convalescent (C). The differences in level of cell population heterogeneity for this parameter.

On each histogram, the cell distribution by the cell immunofluorescence intensity was obtained under gating conditions over the R1 (G1:R1) region, into which the blood granulocyte population was separated from monocytes and granulocytes by means of forward and side light scattering parameters [14].

Таблица 3. Уровень цитокинов в крови больных COVID-19 и реконвалесцентов, Ме [Q₂₅–Q₇₅]
Table 3. The level of cytokines in blood of COVID-19 patients and convalescents, Me [Q₂₅–Q₇₅]

Показатель Parameter	Группа / Group					
	I (n = 20)	II (n = 17)	III (n = 17)	IV (n = 6)	V (n = 15)	VI (n = 18)
Спонтанная продукция ИФН-γ, пг/мл Spontaneous production of IFN-γ, pg/ml	3,6 [0,8–14,7]	0,5 [0–2,7]	1,5 [0,3–3,7]	3,0 [2,8–3,5]	0 [0–6,8]	0 [0–9,6]
Индукцированная продукция ИФН-γ Induced production of IFN-γ, pg/ml	346 [174–1045]	44 [11–179]*	89 [20–320]*	122 [95–170]*	492 [277–1047]	442 [324–1046]
Спонтанная продукция ФНО-α, пг/мл Spontaneous production of TNF-α, pg/ml	0 [0–0]	11,5 [2,5–57]*	2,2 [1,4–16,9]*	3,0 [2,5–3,2]*	0 [0–1,4]	0 [0–0]
Индукцированная продукция ФНО-α, пг/мл Induced production of TNF-α, pg/ml	383 [369–413]	135 [11–234]*	58 [9–284]*	64 [33–98]*	263 [234–371]	262 [218–264]
Спонтанная продукция ИЛ-17А, пг/мл Spontaneous production of IL-17A, pg/ml	0,5 [0–1,2]	0 [0–0,4]	0 [0–0,6]	0,4 [0–0,8]	1,0 [0–1,1]	0,9 [0–1,0]
Индукцированная продукция ИЛ-17А, пг/мл Induced production of IL-17A, pg/ml	53 [31–66]	116 [10–269]*	122 [54–332]*	218 [200–311]*	40 [28–93]	45 [29–72]

Примечание. *p < 0,05 по сравнению с группой I.
Note. *p < 0,05 in comparison with the group I.

Таблица 4. Относительное содержание основных субпопуляций лимфоцитов в крови больных COVID-19 и реконвалесцентов
Table 4. The relative content of the main lymphocyte subpopulations in the blood of COVID-19 patients and convalescents

Показатель Parameter	Группа / Group					
	I (n = 20)	II (n = 17)	III (n = 17)	IV (n = 6)	V (n = 15)	VI (n = 18)
Содержание в крови лимфоцитов, % Lymphocyte content in the blood, %	32 [27,1–36,3]	23 [11,6–31,0]*	32 [18,0–49,4]	30 [24,5–40,0]	36 [29–43,4]	32 [23–41,2]
Т-клетки (CD45 ⁺ CD3 ⁺), % T-cells (CD45 ⁺ CD3 ⁺), %	68 [66,4–71,7]	69 [60,4–75,0]	69 [60,5–79,0]	66 [62,4–80,0]	67 [62,5–74,0]	71 [65,0–76,2]
В-клетки (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD19 ⁺), % B-cells (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD19 ⁺), %	9,8 [8,6–12,0]	4,0 [2,4–5,6]*	5,0 [3,8–7,3]*	6,6 [3,7–7,9]	5,2 [4,4–6,6]*	7,8 [6,8–9,6]
Т-хелперы (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺), % T-helpers (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺), %	42 [38,2–46,0]	23 [13,3–30,0]*	38 [28,0–41,8]	40 [31,0–47,6]	41 [37–50]	44 [38,0–51,2]
Цитотоксические Т-клетки (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺), % Cytotoxic T-cells (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺), %	25 [20,6–28,0]	21 [15,0–41,2]	33 [22,7–39,0]*	25 [19,3–31,0]	21 [18,6–27,0]	22 [17,3–24,0]
Иммунорегуляторный индекс Immunoregulatory index	1,6 [1,3–2,4]	0,8 [0,7–1,4]*	1,3 [0,9–1,6]*	1,6 [1,1–2,4]	2,2 [1,6–2,6]	2,0 [1,4–3,0]
Натуральные киллеры NK-клеток (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD56 ⁺) NK-cells (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD56 ⁺)	7,9 [6,5–10,0]	3,2 [2,5–6,8]*	2,6 [1,8–5,5]*	7,7 [6,6–8,3]	6,5 [2,4–8,9]	7,8 [5,4–8,6]
Т-клетки с маркером NK-клеток (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD56 ⁺) NKT-cells (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD56 ⁺)	0,8 [0,5–1,7]	2,4 [0,9–2,3]	1,0 [0,4–1,9]	2,0 [1,4–2,2]	1,6 [1,5–3,4]	1,2 [0,6–3,9]

Примечание. *p < 0,05 по сравнению с группой I.
Note. *p < 0,05 in comparison with the group I.

менным ингибитором α_1 -антитрипсином (ААТ) [2, 10]. Выраженный дисбаланс в системе ЛЭ–ААТ, характерный для всех пациентов с тяжёлой формой течения COVID-19 [17], приводит к развитию в организме «протеолитического шторма», тесно связанного с «цитокиновым штормом», и, как следствие, к интенсивному повреждению эндотелия сосудов, очень быстрому разрушению эластина лёгочной ткани и деградации ключевых белков плазмы крови, ответственных за регуляцию процесса коагуляции [18].

Поэтому мониторинг интенсивности дегрануляции нейтрофилов в крови, а также в назальной и лаважной жидкостях больных COVID-19 является актуальной медицинской проблемой, решаемой в настоящее время как с помощью биохимических методов определения внеклеточной активности ЛЭ [17, 19], так и на основе альтернативных проточно-цитометрических методов оценки дегрануляции, обеспечивающих получение необходимой информации без использования длительного и трудоёмкого биохимического анализа [3, 10]. В наших исследованиях применялся способ оценки дегрануляции НГ по интенсивности бокового светорассеяния, который даёт результаты, эквивалентные биохимическому анализу по уровню высвобождаемой из гранул активности ЛЭ [15], а также другому известному цитометрическому способу оценки данного показателя по экспрессии CD63 на клеточной поверхности [3].

Активность ЛЭ в плазме крови нами не определялась, но на основании выводов ранее проведённых L.A. Sklar и соавт. сравнительных цитометрических и биохимических исследований [15], а также анализа имеющихся литературных данных [20] причину нарушения дыхательной функции лёгких и тахикардию у пациентов из группы II можно объяснить дисбалансом в системе ЛЭ–ААТ. Чем выше интенсивность дегрануляции НГ и, как следствие, концентрация ЛЭ в плазме, тем выше вероятность развития при COVID-19 тяжёлых инфекционных осложнений, приводящих к летальному исходу [10, 17]. Причём вероятность эта резко увеличивается при врождённом дефиците ААТ, когда концентрация ингибитора ЛЭ в плазме в 10 раз ниже нормы. Носителей такой врождённой патологии в США и странах Европы около 5%, что, видимо, неслучайно совпадает с относительным количеством зарегистрированных в этих странах случаев развития критически тяжелой формы COVID-19 [21]. У пациентов с острым респираторным дистресс-синдромом и синдромом диссеминированного внутрисосудистого свёртывания крови, у которых на фоне гипоксии развивалась множественная недостаточность органов, концентрация ЛЭ в крови более 593 пг/мл, что в 12 раз превышает значение данного показателя, характерное для здоровых доноров [10].

Наличие в аминокислотной последовательности S-белка SARS-CoV-2 специфических сайтов расщепления сериновыми лейкоцитарными протеиназами (ЛЭ и протеиназой 3) является особенностью возбудителя COVID-19, отличающей его от SARS-CoV [22]. Высокую скорость распространения наиболее опасных для людей штаммов SARS-CoV-2 объясняют повышенной чувствительностью их S-белка к расщеплению ЛЭ на этапе проникновения вируса в клетки организма-хозяина [23]. Поэтому регистрация интенсивной дегрануляции НГ в крови пациентов с диагнозом COVID-19 может быть аргументом в пользу выбора стратегии лечения коронавирусной инфекции, основанной на использовании препаратов ингибитора ААТ [24, 25] и других ингибиторов ЛЭ [2, 10, 18]. При решении актуальной проблемы комплексной кардиологической и респираторной реабилитации реконвалесцентов [11] результаты определения и сравнительного анализа индивидуальных показателей интенсивности дегрануляции могут быть использованы для прогнозирования постинфекционных осложнений.

Неоднородность нейтрофилов крови больных COVID-19 по уровню экспрессии Fc γ RIIb (CD16) на клетку некоторые исследователи объясняют миграцией в кровяное русло незрелых форм НГ (клеток с фенотипом CD16^{LOW}) из костномозгового резерва [8]. Однако результаты более поздних исследований S. Morrissay и соавт. [4], а также наши экспериментальные данные свидетельствуют о том, что в крови пациентов с диагнозом COVID-19, наряду с клетками, имеющими фенотип CD16^{LOW}, циркулируют преимущественно нейтрофилы с фенотипом CD16^{INT}. Согласно S. Morrissay и соавт., это функционально зрелые НГ, активируемые SARS-CoV-2 в кровяном русле, которые относятся к особой провоспалительной (пронетотической) популяции LDNs [4]. Установлено, что CD16^{INT}-LDNs, присутствующие как в периферической крови, так и в лаважной жидкости пациентов с тяжёлым и среднетяжёлым течением COVID-19, играют существенную роль в развитии системного воспаления и коагулопатии.

По данным Z. Paraskova и соавт., активированные нейтрофилы больных COVID-19 продуцируют в плазму крови больше молекул ФНО- α и ИЛ-6, чем мононуклеары, и являются, возможно, основным источником этих двух цитокинов при «цитокиновом шторме» [3]. В пользу предположения чешских учёных свидетельствует повышенная спонтанная продукция ФНО- α в кровь пациентов из группы II, зарегистрированная в настоящей работе на фоне повышенной доли в крови НГ и существенно сниженного относительного количества Т-лимфоцитов-хелперов. Кроме того, результаты нашей работы согласуются с хорошо известным фактом сниженной продукции ИФН- γ Т-клетками больных COVID-19 [26, 27]. При стимуляции Т-лимфоцитов

в крови пациентов с ковидной пневмонией повышался в условиях *in vitro* уровень продукции в плазму ИЛ-17, а не ИФН- γ , что подтверждают выводы работы S. De Biasi и соавт. [28].

Рецептор Fc γ RIIIb выполняет на поверхности НГ крови человека важную физиологическую функцию распознавания IgG в составе иммунных комплексов антиген–антитело и является, как известно, молекулярным триггером нетоза [29] при сепсисе и системных аутоиммунных заболеваниях, связанных с воспалением сосудов и тромботическими осложнениями (васкулиты, болезнь Кавасаки, фосфолипидный синдром, красная волчанка и др.) [30–32]. В патогенезе таких болезней существенную роль играют аутоантитела к продуктам распада нейтрофилов, входящим в состав NETs [2], которые присутствуют в крови больных COVID-19 и стимулируют процесс образования тромбов в сосудах различных органов путём активации аутолизиса НГ и секреции в плазму ДНК-сетей NETs [33]. Нетоз запускается, вероятно, через рецептор Fc γ RIIIb, т.к. склонность к аутолизису циркулирующих в крови клеток популяции CD16^{INT}-LDNs на сегодняшний день при COVID-19 достоверно установлена и коррелирует с гиперкоагуляцией [4]. При наличии в организме переболевших COVID-19 стимулирующих нетоз аутоантител повышается вероятность развития постинфекционных осложнений, связанных с нарушением регуляции процесса внутрисосудистой коагуляции [2], и литературные данные подтверждают распространённость таких нарушений среди реконвалесцентов [11].

Сложность идентификации и изучения популяции LDNs, появляющейся в крови пациентов с жизненно опасными инфекционными осложнениями, определяется тем, что морфологически LDNs мало отличаются от мононуклеаров. При градиентном центрифугировании лейкоцитов крови эти клетки попадают не во фракцию, где должны накапливаться нейтрофилы, а во фракцию лимфоцитов и моноцитов более низкой плотности [30, 34].

Имунофенотипирование лейкоцитов в образцах цельной крови пациентов решает эту проблему путём идентификации и дифференцирования клеток популяции LDNs по их пренетотическому фенотипу CD16^{INT}. Однако в работах зарубежных исследователей [4, 30] для этого применялся протокол окраски, согласно которому после процедуры лизиса эритроцитов в FACS Lysing Solution («BD Bioscience») лейкоциты осаждались из лизирующего раствора центрифугированием, чтобы отделить целые неповреждённые клетки от клеточного дебриса. На проточном цитометре исследовались лейкоциты, ресуспендированные в фосфатно-солевом буфере. В таких условиях исключалась возможность детекции в крови нейтрофилов, находящихся на стадии аутолизиса (нетоза), несмотря на то что факт

повышенного содержания NETs в крови больных COVID-19 в настоящее время установлен и имеет большое значение с точки зрения прогнозирования исхода инфекционного процесса [7].

В нашей работе применялся другой протокол окраски лейкоцитов в образцах цельной крови человека (Lyse/No-Wash), согласно которому окрашенные реагентами лейкоциты не осаждаются из FACS Lysing Solution центрифугированием, а исследуются на цитометре непосредственно в этом растворе, разработанном для оптимального лизиса в крови только эритроцитов с одновременной фиксацией лейкоцитов присутствующим в FACS Lysing Solution формальдегидом. Применение Lyse/No-Wash-протокола позволило регистрировать повышенное содержание клеточного дебриса в крови больных COVID-19 и реконвалесцентов, связанное, по данным Д.В. Кассиной и соавт. [7] и Y. Zuo и соавт. [33], с активацией нетоза в кровеносных сосудах. Результаты сравнительных клинических испытаний двух протоколов свидетельствуют о том, что они не различаются по чувствительности и разрешающей способности [13]. Однако в случае выбранного нами протокола выше производительность и информативность анализа (с точки зрения возможности контроля показателей лейкоцитолита и цитотоксичности), а также полностью исключаются любые клеточные потери, что важно учитывать при стандартизации цитологических исследований в клинических условиях.

Заключение

Характер изменения изученных в работе показателей у пациентов с COVID-19 в острый период болезни и в период реконвалесценции подтверждает возможный механизм развития осложнений при этом заболевании, связанный с нарушением баланса между активностью высвобождаемой из гранул НГ эластазы и её плазменным ингибитором α_1 -антитрипсином.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Петриков С.С., Иванников А.А., Васильченко М.К., Эсауленко А.Н., Алиджанова Х.Г. COVID-19 и сердечно-сосудистая система. Часть 1. Патофизиология, патоморфология, осложнения, долгосрочный прогноз. *Журнал им. Н.В. Склифосовского «Неотложная медицинская помощь»*. 2021; 10(1): 14–26. <https://doi.org/10.23934/2223-9022-2021-10-1-14-26>
2. Thierry A., Roch B. Neutrophil Extracellular traps and by-products play a key role in COVID-19: pathogenesis, risk factors, and therapy. *J. Clin. Med.* 2020; 9(9): 2942. <https://doi.org/10.3390/jcm9092942>
3. Paraskova Z., Zentsova I., Bloomfield M., Vrabцова P., Smetanova J., Kloepferk A., et al. Disharmonic inflammatory signatures in COVID-19: augmented neutrophils but impaired monocytes and dendritic cells' responsiveness. *Cell.* 2020; 9(10): 2206. <https://doi.org/10.3390/cells9102206>

4. Morrissy S., Geller A.E., Hu X., Tieri D., Ding C., Klaes C.K., et al. A specific low-density neutrophil population correlates with hypercoagulation and disease severity in hospitalized COVID-19 patients. *JCI Insight*. 2021; 6(9): e148435.
5. Cavalcante-Silva L.H.A., Carvalho D.C.M., Lima É.A., Galvão J.G.F.M., da Silva J.S.F., Sales-Neto J.M., et al. Neutrophils and COVID-19: The road so far. *Int. Immunopharmacol.* 2021; 90: 107233. <https://doi.org/10.1916/j.intimp.2020.107233>
6. Veras F.P., Poutelli M.C., Silva C.M., Toller-Kawahisa J.E., de Lima M., Nascimento D.C., et al. SARS-CoV-2 triggered neutrophil extracellular traps mediated COVID-19 pathology. *J. Exp. Med.* 2020; 217(12): e20201129. <https://doi.org/10.1084/jem.20201129>
7. Кассина Д.В., Василенко И.А., Гурьев А.С., Волков А.Ю., Метелин В.Б. Нейтрофильные внеклеточные ловушки: значение для диагностики и прогноза COVID-19. *Альманах клинической медицины*. 2020; 48(S1): S43–50. <https://doi.org/10.18786/2072-0505-2020-48-029>
8. Carissimo G., Xu W., Kwok I., Abdad M.Y., Chan Y.H., Fong S.W., et al. Whole blood immunophenotyping uncovers immature neutrophil-to-VD2 T-cell ratio as an early marker for severe COVID-19. *Nat. Commun.* 2020; 11(1): 5243. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19080-6>
9. Schneck E., Mallek F., Schiederich S., Kramer E., Markmann M., Hecker M., et al. Flow cytometry based quantification of neutrophil extracellular traps shows an association with hypercoagulation in septic shock and hypocoagulation in postsurgical systemic inflammation – a proof – of – concept study. *J. Clin. Med.* 2020; 9(1): 174. <https://doi.org/10.3390/jcm9010174>
10. Guéant J.L., Guéant-Rodrigues R.M., Fromonot J., Oussalah A., Louis H., Chery C., et al. Elastase and exacerbation of neutrophil innate immunity are involved in multi-visceral manifestations of COVID-19. *Allergy*. 2021; 76(6): 1846–58. <https://doi.org/10.1111/all.14746>
11. Бубнова М.Г., Шляхто Е.В., Аронов Д.М., Белевский А.С., Герасименко М.Ю., Глезер М.Г. и др. Новая коронавирусная болезнь COVID-19: особенности комплексной кардиологической и респираторной реабилитации. *Российский кардиологический журнал*. 2021; 26(5): 4487. <https://doi.org/10.15829/1560-4071-2021-4487>
12. Direct Immunofluorescence Staining of Whole Blood using a Lyse/No-Wash Procedure. BD Bioscience Resources and Tools. Available at: <https://www.bdbioscience.com/en-us/resources/protocols/stain-lyse-no-wash>
13. Vera E.J., Chew Y.V., Nicholson L., Bruns H., Anderson P., Chen H.T., et al. Standardization of flow cytometry for whole blood immunophenotyping of islet transplant and transplant clinical trial recipients. *PLoS One*. 2019; 14(5): e0217163. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217163>
14. Кравцов А.Л., Бугоркова С.А., Ключева С.А., Кожевников В.А., Кудрявцева О.М. Определение экспрессии FcγRIIIb (CD16) на поверхности нейтрофилов крови привитых против чумы людей. *Молекулярная медицина*. 2020; 18(2): 33–8. <https://doi.org/10.29296/24999490-2020-02-06>
15. Sklar L.A., Oades Z.G., Finney D.A. Neutrophil degranulation detected by right angle light scattering: spectroscopic methods suitable for simultaneous analyses of degranulation or shape change, elastase release, and cell aggregation. *J. Immunology*. 1984; 133(3): 1483–7.
16. Ключева С.Н., Бугоркова С.А., Гончарова А.Ю., Кравцов А.Л., Кудрявцева О.М., Санджиев Д.Н. и др. Комплексный анализ корреляционных взаимосвязей между показателями гуморального и клеточного иммунитета у лиц, вакцинированных против чумы. *Инфекция и иммунитет*. 2019; 9(1): 135–46. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2019-1-135-146>
17. Zerimech F., Jourdian M., Ouraed B., Bouche-careilh M., Sen-did B., Dauhamel A., et al. Proteinase-antiproteinase imbalance in patients with severe COVID-19. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2021; 59(8): 000010151520210137. <https://doi.org/10.1515/cclm-2021-0137>
18. Fornasari P.M. COVID-19: Neutrophils «unfriendly fire» imbalance proteolytic cascades triggering clinical worsening and viral sepsis. Potential role explanation for convalescent plasma as «fire hose». *J. Blood Res. Hematol. Dis.* 2020; 5: 2. [https://doi.org/10.37532/jbrhd.2020.5\(2\).120](https://doi.org/10.37532/jbrhd.2020.5(2).120)
19. Akgun E., Tuzuner M.B., Suhin B., Kilercik K.M., Kulah S., Cakiroglu H.V., et al. Proteins associated with neutrophil degranulation are upregulated in nasopharyngeal swabs from SARS-CoV-2 patients. *PLoS One*. 2020; 15(10): e0240012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240012>
20. Кравцов А.Л., Бугоркова С.А. Роль плазменного ингибитора сериновых лейкоцитарных протеиназ в защите организма от COVID-19. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021; 98(5): 567–78. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-160>
21. Yoshikura H. Epidemiological correlation between COVID-19 and epidemiological prevalence of α-1 antitrypsin deficiency in the world. *Glob. Health Med.* 2020; 3(2): 73–81. <https://doi.org/10.35772/ghm.2020.01068>
22. Mustofa Z., Zhanapiya A., Kalbacher H., Burster T. Neutrophil elastase and proteinase 3 cleavage sites are adjacent to the polybasic sequence within the proteolytic sensitive activation loop of the SARS-CoV-2 spike protein. *ACS Omega*. 2021; 6(10): 7181–5. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c00363>
23. Pokhrel S., Kraemer B.R., Lee L., Samardzic K., Mochly-Rosen D. Increased elastase sensitivity and decreased intramolecular interactions in the more transmissible 501Y.V1 and 501Y.V2 SARS-CoV-2 variants' spike protein – an in silico analysis. *PLoS One*. 2021; 16(5): e0251426. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251426>
24. Bai H., Hippensteel J., Leavitt A., Maloney J.P., Beckham D., Garcia C., et al. Hypothesis: alpha-1-antitrypsin is a promising treatment option for COVID-19. *Med. Hypothesis*. 2021; 146: 110394. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.110394>
25. Oguntuyo K.Y., Stevens C.S., Siddiquey M., Schilke R.M., Woodland M.D., Zang H.S., et al. In plain sight: the role of alpha-1 antitrypsin in COVID-19 pathogenesis and therapeutics. *bioRxiv*. 2020. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2020.08.14.248880>
26. Бавькин А.С. Клеточный и молекулярный уровень стратегии COVID-19 по индукции иммунодефицита. Возможные терапевтические решения. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021; 98(4): 450–7. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-119>
27. Giamarellos-Bourboulis E.J., Netea M.G., Rovina N., Akinosoglou K., Automadou A., Antonakos N., et al. Complex immune dysregulation in COVID-19 patients with severe respiratory failure. *Cell Host Microbe*. 2020; 27(6): 992–1000. e3. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.04.009>
28. De Biasi S., Meschiari M., Gibellini L., Bellinazzi C., Borella R., Fidauza L., et al. Marked T-cell activation, senescence, exhaustion and skewing toward TH17 in patients with COVID-19 pneumonia. *Nat. Commun.* 2020; 11(1): 3434. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17292-4>
29. Aleman O.R., Mora N., Cortes-Vieyra R., Uribe-Querol E., Rosales C. Differential use of human Fcγ-receptors for inducing neutrophil extracellular traps formation. *J. Immunol. Res.* 2016; 2016: 2908034. <https://doi.org/10.1155/2016/2908034>
30. Mhaonaigh A.U., Coughlan A.U., Dwivedi A., Hartnett J., Cabral J., Moran B., et al. Low density granulocytes in ANCA vasculitis are heterogeneous and hypo-responsive to antimyeloperoxidase autoantibody. *Front. Immunol.* 2019; 10: 2603. <https://doi.org/10.3399/fimmu.2019.02603>

31. Hara T., Yamamura K., Sakai Y. The up-to date pathophysiology of Kawasaki disease. *Clin. Transl. Immunol.* 2021; 10(5): e1284. <https://doi.org/10.1002/cti2.1284>
 32. Seman B.G., Robinson C.M. The enigma of low density granulocytes in humans: complexities in the characterization and function of LDGs during disease. *Pathogens.* 2021; 10(9): 1091. <https://doi.org/10.3390/pathogens10091091>
 33. Zuo Y., Estes S.K., Ali R.A., Gandhi A.A., Yalavarthi S., Shi H., et al. Prothrombotic autoantibodies in serum from patients hospitalized with COVID-19. *Sci. Transl. Med.* 2020; 12(570): eabd3876. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abd3876>
 34. Cloke T., Munder M., Tayler J., Müller I., Kropf P. Characterization of a novel population of low-density granulocytes associated with disease severity in HIV-1 infection. *PLoS One.* 2012; 7(11): e48939. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048939>
- REFERENCES
1. Petrikov S.S., Ivannikov A.A., Vasil'chenko M.K., Esaulenko A.N., Alidzhanova Kh.G. COVID-19 and cardiovascular system. Part 1. Pathophysiology, pathomorphology, complications, long-term prognosis. *Zhurnal im. N.V. Sklifosovskogo «Neotlozhnaya meditsinskaya pomoshch'».* 2021; 10(1): 14–26. <https://doi.org/10.23934/2223-9022-2021-10-1-14-26> (in Russian)
 2. Thierry A., Roch B. Neutrophil Extracellular traps and by-products play a key role in COVID-19: pathogenesis, risk factors, and therapy. *J. Clin. Med.* 2020; 9(9): 2942. <https://doi.org/10.3390/jcm9092942>
 3. Paraskova Z., Zentsova I., Bloomfield M., Vrabcova P., Smetanova J., Klocker A., et al. Disharmonic inflammatory signatures in COVID-19: augmented neutrophils but impaired monocytes and dendritic cells' responsiveness. *Cell.* 2020; 9(10): 2206. <https://doi.org/10.3390/cells9102206>
 4. Morrissay S., Geller A.E., Hu X., Tieri D., Ding C., Klaes C.K., et al. A specific low-density neutrophil population correlates with hypercoagulation and disease severity in hospitalized COVID-19 patients. *JCI Insight.* 2021; 6(9): e148435.
 5. Cavalcante-Silva L.H.A., Carvalho D.C.M., Lima É.A., Galvão J.G.F.M., da Silva J.S.F., Sales-Neto J.M., et al. Neutrophils and COVID-19: The road so far. *Int. Immunopharmacol.* 2021; 90: 107233. <https://doi.org/10.1916/j.intimp.2020.107233>
 6. Veras F.P., Poutelli M.C., Silva C.M., Toller-Kawahisa J.E., de Lima M., Nascimento D.C., et al. SARS-CoV-2 triggered neutrophil extracellular traps mediated COVID-19 pathology. *J. Exp. Med.* 2020; 217(12): e20201129. <https://doi.org/10.1084/jem.20201129>
 7. Kassina D.V., Vasilenko I.A., Gur'ev A.S., Volkov A.Yu., Metelin V.B. Neutrophil extracellular traps: diagnostic and prognostic value in Covid-19. *Al'manakh klinicheskoy meditsiny.* 2020; 48(S1): S43–50. <https://doi.org/10.18786/2072-0505-2020-48-029> (in Russian)
 8. Carissimo G., Xu W., Kwok I., Abdad M.Y., Chan Y.H., Fong S.W., et al. Whole blood immunophenotyping uncovers immature neutrophil-to-VD2 T-cell ratio as an early marker for severe COVID-19. *Nat. Commun.* 2020; 11(1): 5243. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19080-6>
 9. Schneck E., Mallek F., Schiederich S., Kramer E., Markmann M., Hecker M., et al. Flow cytometry based quantification of neutrophil extracellular traps shows an association with hypercoagulation in septic shock and hypocoagulation in post-surgical systemic inflammation – a proof – of – concept study. *J. Clin. Med.* 2020; 9(1): 174. <https://doi.org/10.3390/jcm9010174>
 10. Guéant J.L., Guéant-Rodrigues R.M., Fromont J., Oussalah A., Louis H., Chery C., et al. Elastase and exacerbation of neutrophil innate immunity are involved in multi-visceral manifestations of COVID-19. *Allergy.* 2021; 76(6): 1846–58. <https://doi.org/10.1111/all.14746>
 11. Bubnova M.G., Shlyakhto E.V., Aronov D.M., Belevskiy A.S., Gerasimenko M.Yu., Glezer M.G., et al. Coronavirus disease 2019: features of comprehensive cardiac and pulmonary rehabilitation. *Rossiyskiy kardiologicheskiy zhurnal.* 2021; 26(5): 4487. <https://doi.org/10.15829/1560-4071-2021-4487> (in Russian)
 12. Direct Immunofluorescence Staining of Whole Blood using a Lyse/No-Wash Procedure. BD Bioscience Resources and Tools. Available at: <https://www.bdbioscience.com/en-us/resources/protocols/stain-lyse-no-wash>
 13. Vera E.J., Chew Y.V., Nicholson L., Bruns H., Anderson P., Chen H.T., et al. Standardization of flow cytometry for whole blood immunophenotyping of islet transplant and transplant clinical trial recipients. *PLoS One.* 2019; 14(5): e0217163. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217163>
 14. Kravtsov A.L., Bugorkova S.A., Klyueva S.A., Kozhevnikov V.A., Kudryavtseva O.M. Determination of FcγRIIIb (CD16) expression on the surface of blood neutrophils in anti-plague vaccinated people. *Molekulyarnaya meditsina.* 2020; 18(2): 33–8. <https://doi.org/10.29296/24999490-2020-02-06> (in Russian)
 15. Sklar L.A., Oades Z.G., Finney D.A. Neutrophil degranulation detected by right angle light scattering: spectroscopic methods suitable for simultaneous analyses of degranulation or shape change, elastase release, and cell aggregation. *J. Immunology.* 1984; 133(3): 1483–7.
 16. Klyueva S.N., Bugorkova S.A., Goncharova A.Yu., Kravtsov A.L., Kudryavtseva O.M., Sandzhiev D.N., et al. Complex analysis of correlation interrelations between indicators of humoral and cellular immunity in persons vaccinated against plague. *Infektsiya i immunitet.* 2019; 9(1): 135–46. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2019-1-135-146> (in Russian)
 17. Zerimech F., Jourdan M., Ouraed B., Bouche-careilh M., Sennid B., Dauhamel A., et al. Proteinase-antiproteinase imbalance in patients with severe COVID-19. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2021; 59(8): 000010151520210137. <https://doi.org/10.1515/ccim-2021-0137>
 18. Fornasari P.M. COVID-19: Neutrophils «unfriendly fire» imbalance proteolytic cascades triggering clinical worsening and viral sepsis. Potential role explanation for convalescent plasma as «fire hose». *J. Blood Res. Hematol. Dis.* 2020; 5: 2. [https://doi.org/10.37532/jbrhd.2020.5\(2\).120](https://doi.org/10.37532/jbrhd.2020.5(2).120)
 19. Akgun E., Tuzuner M.B., Suhin B., Kilercik K.M., Kulah S., Cakiroglu H.V., et al. Proteins associated with neutrophil degranulation are upregulated in nasopharyngeal swabs from SARS-CoV-2 patients. *PLoS One.* 2020; 15(10): e0240012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240012>
 20. Kravtsov A.L., Bugorkova S.A. The role of plasma serine leukocyte proteinase inhibitor in the body's defense against covid-19. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2021; 98(5): 567–78. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-160> (in Russian)
 21. Yoshikura H. Epidemiological correlation between COVID-19 and epidemic prevalence of α-1 antitrypsin deficiency in the world. *Glob. Health Med.* 2020; 3(2): 73–81. <https://doi.org/10.35772/ghm.2020.01068>
 22. Mustofa Z., Zhanapiya A., Kalbacher H., Burster T. Neutrophil elastase and proteinase 3 cleavage sites are adjacent to the polybasic sequence within the proteolytic sensitive activation loop of the SARS-CoV-2 spike protein. *ACS Omega.* 2021; 6(10): 7181–5. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c00363>
 23. Pokhrel S., Kraemer B.R., Lee L., Samardzic K., Mochly-Rosen D. Increased elastase sensitivity and decreased intramolecular interactions in the more transmissible 501Y.V1 and 501Y.V2 SARS-CoV-2 variants: spike protein – an in silico analysis. *PLoS One.* 2021; 16(5): e0251426. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251426>

24. Bai H., Hippensteel J., Leavitt A., Maloney J.P., Beckham D., Garcia C., et al. Hypothesis: alpha-1-antitrypsin is a promising treatment option for COVID-19. *Med. Hypothesis*. 2021; 146: 110394. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.110394>
25. Oguntuyo K.Y., Stevens C.S., Siddiquey M., Schilke R.M., Woodlard M.D., Zang H.S., et al. In plain sight: the role of alpha-1 antitrypsin in COVID-19 pathogenesis and therapeutics. *bioRxiv*. 2020. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2020.08.14.248880>
26. Bavykin A.S. Cell and molecular level of strategy of COVID-19 to induce immunodeficiency. Possible therapeutic solutions. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2021; 98(4): 450–7. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-119> (in Russian)
27. Giamarellos-Bourboulis E.J., Netea M.G., Rovina N., Akinosoglou K., Automadou A., Antonakos N., et al. Complex immune dysregulation in COVID-19 patients with severe respiratory failure. *Cell Host Microbe*. 2020; 27(6): 992–1000.e3. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.04.009>
28. De Biasi S., Meschiari M., Gibellini L., Bellinazzi C., Borella R., Fidausa L., et al. Marked T-cell activation, senescence, exhaustion and skewing toward TH17 in patients with COVID-19 pneumonia. *Nat. Commun*. 2020; 11(1): 3434. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17292-4>
29. Aleman O.R., Mora N., Cortes-Vieyra R., Uribe-Querol E., Rosales C. Differential use of human Fcγ-receptors for inducing neutrophil extracellular traps formation. *J. Immunol. Res*. 2016; 2016: 2908034. <https://doi.org/10.1155/2016/2908034>
30. Mhaonaigh A.U., Coughlan A.U., Dwivedi A., Hartnett J., Cabral J., Moran B., et al. Low density granulocytes in ANCA vasculitis are heterogeneous and hypo-responsive to anti-myeloperoxidase autoantibody. *Front. Immunol*. 2019; 10: 2603. <https://doi.org/10.3399/fimmu.2019.02603>
31. Hara T., Yamamura K., Sakai Y. The up-to date pathophysiology of Kawasaki disease. *Clin. Transl. Immunol*. 2021; 10(5): e1284. <https://doi.org/10.1002/cti2.1284>
32. Seman B.G., Robinson C.M. The enigma of low density granulocytes in humans: complexities in the characterization and function of LDGs during disease. *Pathogens*. 2021; 10(9): 1091. <https://doi.org/10.3390/pathogens10091091>
33. Zuo Y., Estes S.K., Ali R.A., Gandhi A.A., Yalavarthi S., Shi H., et al. Prothrombotic autoantibodies in serum from patients hospitalized with COVID-19. *Sci. Transl. Med*. 2020; 12(570): eabd3876. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abd3876>
34. Cloke T., Munder M., Tayler J., Müller I., Kropf P. Characterization of a novel population of low-density granulocytes associated with disease severity in HIV-1 infection. *PLoS One*. 2012; 7(11): e48939. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048939>

Информация об авторах

Кравцов Александр Леонидович — д.б.н., в.н.с. отдела иммунологии РосНИПЧИ «Микроб», Саратов, Россия, kravzov195723@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-9016-6578>

Бугоркова Светлана Александровна — д.м.н., г.н.с. отдела иммунологии РосНИПЧИ «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7548-4845>

Клюева Светлана Николаевна — к.б.н., н.с. отдела иммунологии РосНИПЧИ «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5550-6063>

Гончарова Анастасия Юрьевна — к.м.н., н.с. отдела иммунологии РосНИПЧИ «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9994-7936>

Кожевников Виталий Александрович — м.н.с. отдела иммунологии РосНИПЧИ «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7267-7027>

Чумачкова Елена Арнольдовна — н.с. отдела эпидемиологии РосНИПЧИ «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6866-0169>

Портенко Светлана Анатольевна — к.б.н., зав. отделом диагностики инфекционных болезней РосНИПЧИ «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-8334-9173>

Щербакоева Светлана Анатольевна — д.б.н., заместитель директора по научной и противоэпидемической работе РосНИПЧИ «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1143-4069>

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

Статья поступила в редакцию 27.12.2021;
принята к публикации 15.03.2022;
опубликована 29.04.2022

Information about the authors

Aleksandr L. Kravtsov — D. Sci. (Biol.), leading researcher, Department of immunology, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia, kravzov195723@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-9016-6578>

Svetlana A. Bugorkova — D. Sci. (Med.), Deputy head, Department of immunology, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7548-4845>

Svetlana N. Klyueva — Cand. Sci. (Biol.), Researcher, Department of immunology, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5550-6063>

Anastasia Y. Goncharova — Cand. Sci. (Med.), Researcher, Department of immunology, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9994-7936>

Vitaly A. Kozhevnikov — junior researcher, Department of immunology, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7267-7027>

Elena A. Chumachkova — Researcher, Department of epidemiology, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6866-0169>

Svetlana A. Portenko — Cand. Sci. (Biol.), Head, Department of diagnostics of infectious diseases, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-8334-9173>

Svetlana A. Scherbakova — D. Sci. (Biol.), Deputy director for scientific and anti-epidemic work, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1143-4069>

Author contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

The article was submitted 27.12.2021;
accepted for publication 15.03.2022;
published 29.04.2022



Использование ПЦР-РВ как теста, подтверждающего отсутствие остаточной нейровирулентности штаммов для живых противовирусных вакцин

Шамсутдинова О.А.^{1✉}, Карал-оглы Д.Д.¹, Лаврентьева И.Н.²

¹Научно-исследовательский институт медицинской приматологии, Сочи, Россия

²Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

Аннотация

Введение. Учитывая особую важность заключения о безопасности применения противовирусных вакцин, содержащих хоть и ослабленные, но живые вирусы, с возможным сохранением остаточной нейровирулентности весьма актуальной представляется разработка дополнительных, подтверждающих стабильность аттенуации тестов, основанных на современных методах лабораторной диагностики.

Цель исследования — оценка возможности использования метода ПЦР-РВ в качестве дополнительного теста при контроле остаточной нейровирулентности аттенуированных вакцинных штаммов вируса краснухи.

Материалы и методы. В работе использовали живые аттенуированные вакцинные штаммы вируса краснухи «Орлов-В» и RA27/3. Исследование проводили на 11 клинически здоровых обезьянах вида *Macaca mulatta* массой 3–5 кг, родившихся и содержащихся в питомнике НИИМП. Клиническим материалом служили образцы тканей различных отделов ЦНС, региональных лимфатических узлов, паренхиматозных органов, плазма и спинномозговая жидкость экспериментальных животных. Контроль экстраневральной диссеминации вакцинных штаммов проводили с использованием вирусологического (реакция цитопатического действия) и молекулярно-биологического методов (ПЦР-РВ).

Результаты. Установлено отсутствие инфекционного вируса в ЦНС, периферических органах и плазме крови обезьян, заражённых вакцинными штаммами, что свидетельствует о высоком уровне аттенуации штаммов «Орлов-В» и RA27/3 вируса краснухи. Также выявлено, что аналитическая чувствительность метода ПЦР-РВ превышает аналитическую чувствительность реакции цитопатического действия на 1,7–3,3 Ig при определении содержания вируса краснухи в тканях ЦНС и периферических органах инокулированных животных.

Заключение. Сравнительный анализ экспериментальных данных показал, что выявление вируса краснухи методом ПЦР-РВ имеет ряд преимуществ — это специфичность, чувствительность и меньшая длительность реакции. В связи с этим метод ПЦР-РВ может быть использован в качестве дополнительного теста при доклинической оценке специфической безопасности, а именно экстраневральной диссеминации аттенуированных вакцинных штаммов, что крайне необходимо при контроле качества и безопасности применения живых краснушных вакцин.

Ключевые слова: аттенуация, вирус краснухи, вакцинные штаммы, цитопатическое действие, полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

Этическое утверждение. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23.07.2010). Обращение с животными проводилось в строгом соответствии с Правилами содержания и ухода за нечеловекообразными приматами (ГОСТ 33216-2014). Протокол исследования одобрен Комиссией по биоэтике НИИМП (протокол № 16 от 14.08.2019).

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

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

Для цитирования: Шамсутдинова О.А., Карал-оглы Д.Д., Лаврентьева И.Н. Использование ПЦР-РВ как теста, подтверждающего отсутствие остаточной нейровирулентности штаммов для живых противовирусных вакцин. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022;99(2):185–192.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-238>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-238>

The utility of real-time PCR as a test for confirmation of the absence of residual neurovirulence of strains for live antiviral vaccines

Olga A. Shamsutdinova^{1✉}, Dgina D. Karal-ogly¹, Irina N. Lavrent'eva²¹Research Institute of medical Primatology, Sochi, Russia²Saint-Petersburg Pasteur Institute, Saint Petersburg, Russia

Abstract

Introduction. Taking into account the particular importance of the assurance of the safety of antiviral vaccines containing, albeit attenuated, but live viruses, that can possibly retain the residual neurovirulence, it is important to develop additional tests to confirm the stability of attenuation using modern methods of laboratory diagnostics. **The aim** of the study was to assess the possibility of using the RT-PCR method as an additional test for monitoring the residual neurovirulence of attenuated rubella virus vaccine strains.

Materials and methods. We used live attenuated vaccine strains of rubella virus "Orlov-V" and RA27/3. The study was carried out on 11 clinically healthy monkeys of the species *Macaca mulatta* weighing 3–5 kg, born and kept in the nursery of the Research Institute of Medical Primatology. The clinical material studied was tissue samples from various parts of the central nervous system (CNS), regional lymph nodes, parenchymal organs, plasma and cerebrospinal fluid of experimental animals. Control of extraneural dissemination of vaccine strains was carried out using virological (cytopathic action) and molecular biological methods (RT-PCR).

Results. The absence of an infectious virus in the CNS, peripheral organs and blood plasma of monkeys infected with vaccine strains was demonstrated, which indicates a high level of attenuation of rubella virus strains "Orlov-B" and RA27/3. The analytical sensitivity of the RT-PCR method was found to exceed the analytical sensitivity of the cytopathic reaction by 1.7–3.3 lg when determining the content of rubella virus in the tissues of the CNS and peripheral organs of inoculated animals.

Conclusion. Comparative analysis of experimental data showed that the detection of rubella virus by real-time PCR has a number of advantages due its specificity, sensitivity and a shorter turnaround time. In this connection, the RT-PCR method can be used as an additional test in the preclinical assessment of specific safety, namely, extraneural dissemination of attenuated vaccine strains, which is essential for quality and safety control of live rubella vaccines.

Keywords: *attenuation, rubella virus, vaccine strains, cytopathic action, PCR-RT*

Ethics approval. Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, July 23, 2010). The research protocol was approved by the Bioethics Commission of the Research Institute of Medical Primatology (Protocol 16, August 14, 2019).

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Shamsutdinova O.A., Karal-ogly D.D., Lavrent'eva I.N. The utility of real-time PCR as a test for confirmation of the absence of residual neurovirulence of strains for live antiviral vaccines. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2022;99(2):185–192.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-238>

Введение

Золотым стандартом оценки специфической безопасности аттенуированных штаммов живых вакцин является гистологическое исследование головного и спинного мозга экспериментальных животных в тесте интрацеребрального заражения [1]. При этом важным показателем уровня их аттенуации признан контроль экстраневральной диссеминации вакцинных штаммов. Так, по данным ранее проведённых исследований, при низком уровне аттенуации штаммов вируса краснухи (ВК) вирус может не только размножаться в клетках ЦНС, распространяться по отделам ЦНС, но и преодолевать

гематоэнцефалический барьер, поражая периферические органы обезьян. Для выявления ВК в вирусосодержащем материале исследователи применяют классический прямой метод индикации — реакцию цитопатического действия (ЦПД) [2].

Особенностью индикации ВК является вариабельность проявления его цитодеструктивного действия на клетки. Размножение аттенуированных штаммов ВК с отчётливо выраженным ЦПД наблюдается лишь в культурах клеток ВНК-21 и РК-13 [3]. Другой недостаток этого метода — длительность; реакция ЦПД ВК на чувствительную клеточную линию занимает 10–12 сут.

Актуальной представляется разработка дополнительных подтверждающих стабильность аттенуации тестов на базе современных методов лабораторной диагностики. Молекулярно-биологический метод — ПЦР-РВ, основанный на прямой идентификации генетического материала возбудителя и характеризующийся высокой чувствительностью и специфичностью, широко используется в различных диагностических и научно-исследовательских центрах. Так, показана возможность использования метода ПЦР-РВ для контроля титра вакцинных штаммов РНК-содержащих вирусов в процессе производства вакцин и оценки подлинности живых вакцин [4–6].

Целью данного исследования является оценка возможности использования метода ПЦР-РВ в качестве дополнительного теста при контроле остаточной нейровирулентности аттенуированных вакцинных штаммов ВК.

Материалы и методы

В работе использовали живые аттенуированные вакцинные штаммы ВК: «Орлов-В» [7] из коллекции НИИЭМ им. Пастера и RA27/3, входящий в состав коммерческой живой аттенуированной вакцины производства НПО «Микроген».

Перевиваемая клеточная линия — культура клеток почки хомяка (ВНК-21) — была получена из музея культур клеток НИИЭМ им. Пастера.

Исследование проводили на 11 клинически здоровых обезьянах вида *Macaca mulatta* массой 3–5 кг, родившихся и содержащихся в питомнике НИИМП. В опыт отбирали животных, не содержащих в сыворотке крови нейтрализующих антител к ВК. Обезьяны были рандомизированы на 3 группы методом случайных чисел. Обращение с животными проводилось в строгом соответствии с Правилами содержания и ухода за нечеловекообразными приматами (ГОСТ 33216-2014). Протокол исследования одобрен Комиссией по биоэтике ФГБНУ «НИИ МП» (Протокол № 16 от 14.08.2019).

Животным интрацеребрально вводили по 0,5 мл следующих препаратов: в 1-й группе ($n = 4$) — вакцинный штамм «Орлов-В» с инфекционной активностью $4,7 \lg \text{ТЦД}_{50}/0,5 \text{ мл}$; во 2-й ($n = 2$) — вакцинный штамм RA27/3 с инфекционной активностью $4,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/0,5 \text{ мл}$, входящий в состав культуральной живой вакцины против краснухи («НПО «Микроген»); в 3-й ($n = 1$) — растворитель для лиофилизированной коммерческой вакцины против краснухи (вода для инъекций); в 4-й ($n = 4$) — низкоаттенуированный штамм ВК «Орлов-14» с инфекционной активностью $3,8$ и $4,7 \lg \text{ТЦД}_{50}/0,5$. Вирусосодержащий материал вводили обезьянам по методу [8].

После экспериментальной обезьян выводили из опыта под глубоким наркозом, вводя в паховую вену животного 1 мл золетила («Valdepharm») и 4 мл кси-

лы («Interchemie Werken de Adelaar Eesti AS»). После того как животное входило в глубокий сон, в эту же вену вводили 5 мл листенона («Takeda Austria GmbH»), что приводило к полной остановке сердца.

Клиническим материалом исследования от экспериментальных животных служили образцы тканей различных отделов ЦНС (головной мозг, шейный и поясничный отделы спинного мозга), региональных лимфатических узлов (подчелюстных и заднешейных), паренхиматозных органов (лёгкое, печень, селезёнка), плазма и спинномозговая жидкость. Забор спинномозговой жидкости (ликвора) проводили непосредственно перед выделением головного и спинного мозга из мозжечково-мозговой цистерны (*cisternamagna, c. cerebellomedullaris*). Во время проведения аутопсии образцы исследуемых тканей помещали в индивидуальные стерильные пробирки типа «Эппендорф» и хранили при температуре не выше -68°C для проведения вирусологического и молекулярно-биологического исследований.

Титрование штаммов ВК по ЦПД проводили в культуре клеток ВНК-21. С этой целью из различных отделов ЦНС и паренхиматозных органов готовили 10% суспензию, растерев образцы ткани в стерильной фарфоровой ступке, после чего к суспензии добавляли физиологический раствор в соотношении 1 : 9 и центрифугировали 10 мин при 1000 об/мин. Полученную надосадочную жидкость использовали для приготовления последовательных 10-кратных разведений от 10^{-1} до 10^{-8} . Каждое из разведений вносили по 100 мкл в 4 лунки 96-луночного планшета. Инфицированные и контрольные культуры клеток инкубировали в термостате с 5% CO_2 при 35°C . Учет результатов проводили на 12-е сутки по реакции ЦПД. Титр ВК рассчитывали по методу Рида и Менча.

Для проведения молекулярно-биологического исследования использовали метод ПЦР с гибридизационно-флюоресцентной детекцией, состоящий из трех этапов: экстракции РНК из исследуемого материала, обратной транскрипции РНК и амплификации фрагмента кДНК с гибридизационно-флюоресцентной детекцией.

Ткани головного мозга, шейный и поясничный отделы спинного мозга, подчелюстные и заднешейные лимфатические узлы, лёгкое, печень и селезёнку гомогенизировали в стерильной ступке, готовили 10% суспензию на физиологическом растворе («МОСФАРМ») и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин. Полученную надосадочную жидкость использовали для проведения экстракции РНК.

Выделение РНК из 10% суспензии образцов тканей ЦНС, паренхиматозных органов, а также спинномозговой жидкости и плазмы периферической крови проводили с помощью коммерческих наборов: «РИБО-сорб», «РИБО-золь-С», «РИБО-

Таблица 1. Наборы, используемые для проведения экстракции РНК из исследуемого материала**Table 1.** Kits used for RNA extraction from test material

Клинический материал Clinical material	Название набора Name of the kit
Головной мозг, спинной мозг (шейный и поясничный отделы) Brain, spinal cord (cervical and lumbar sections)	«AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kit»
Периферические органы: лёгкое, печень, селезёнка, заднешейные и подчелюстные лимфатические узлы, а также спинномозговая жидкость Peripheral organs: lung, liver, spleen, posterior cervical and submandibular lymph nodes, and cerebrospinal fluid	«РИБО-золь-С» + «РИБО-преп» "RIBO-sol-S" + "RIBO-prep"
Плазма периферической крови Plasma of peripheral blood	«РИБО-сорб» "RIBO-sorb"

преп» (ЦНИИ Эпидемиологии) и «AllPrepDNA/RNA/miRNA Universal Kit» («Qiagen») (табл. 1). Все этапы экстракции РНК выполняли согласно инструкции производителя для соответствующего комплекта реагентов.

Для проведения реакции обратной транскрипции использовали набор реагентов для получения кДНК на матрице РНК «РЕВЕРТА-Л» (ЦНИИ Эпидемиологии).

Для проведения ПЦР с гибридационно-флюоресцентной детекцией продуктов амплификации использовали набор реагентов «АмплиСенс® Rubellavirus-FL» (ЦНИИ Эпидемиологии). Аналитическая чувствительность тест-системы составляла 400 копий/мл. Исследование проводили на амплификаторе «Rotor-Gene 6000» («Corbett Research»).

Учёт результатов ПЦР-анализа проводили на основании наличия или отсутствия пересечения кривой флюоресценции с установленной на уровне 0,03 пороговой линией и последующего сравнения величины сигнала (Ct) в исследуемых образцах относительно контрольных (ПКО Rubellavirus-rec и ВКО STI-87-rec). Положительными считали образцы, у которых кривая флюоресценции имела типичный для ПЦР-РВ S-образный вид, однократно пересекалась с пороговой линией в области достоверного прироста флюоресценции и значение порогового цикла (Ct) не превышало 35. Отрицательными по содержанию РНК ВК считали образцы, кривая флюоресценции которых не пересекала пороговую линию [9].

В качестве положительного контроля (помимо контролей, заложенных в тест-системах) параллельно с исследуемыми образцами методом ПЦР-РВ были исследованы образцы тканей ЦНС и внутренних органов обезьян *M. mulatta*, интрацеребрально получивших 0,5 мл жидкости с низкоаттенуированным штаммом ВК «Орлов-14». Обезьяны ($n = 2$), получившие штамм с инфекци-

онной активностью 4,7 lg ТЦД₅₀/0,5 мл, были выведены из эксперимента на 2-е и 12-е сутки; получившие штамм с инфекционной активностью 3,8 lg ТЦД₅₀/0,5 мл ($n = 2$) были выведены из эксперимента на 21-е и 28-е сутки (4-я группа).

Результаты

Выявление ВК в исследуемых отделах ЦНС и периферических органах обезьян проводили стандартным методом по ЦПД. У животных 1-й группы ВК был выявлен только в головном мозге у 1 обезьяны, умерщвлённой на 2-е сутки после заражения (табл. 2). В то же время на 12, 21 и 28-е сутки после интрацеребральной инокуляции вакцинным штаммом «Орлов-В» ВК не был выявлен ни в одном из исследуемых органов. Результаты, полученные при исследовании органов животных 2-й и 3-й групп, указывают на отсутствие ВК в различных отделах ЦНС и периферических органах обезьян.

При анализе результатов молекулярно-биологического метода выявлено, что среди животных 1-й группы, заражённых вакцинным штаммом «Орлов-В», РНК ВК была выявлена только в головном мозге у обезьяны, умерщвлённой на 2-е сутки после инокуляции (табл. 3). При этом у других животных данной группы РНК ВК не выявлена ни в исследованных отделах ЦНС, ни во внутренних органах и плазме обезьян.

Сходные данные были получены при исследовании клинического материала от обезьян 2-й группы. Так, на 12-е и 28-е сутки эксперимента в образцах тканей экспериментальных животных, как и в образцах тканей отрицательной контрольной обезьяны (3-я группа), пороговый цикл не определялся, что свидетельствовало об отсутствии РНК ВК в исследуемых образцах.

У животных 4-й группы во все сроки наблюдения РНК ВК отсутствовала в лёгких и печени. На 2, 12 и 21-е сутки эксперимента РНК ВК была выявлена в исследованных отделах ЦНС, внутренних органах и плазме крови обезьян. В то же время на 28-е сутки после заражения ни в одном из исследуемых образцов не выявлено РНК ВК.

Таким образом, полученные результаты показывают отсутствие ВК в ЦНС, периферических органах и плазме крови обезьян, заражённых вакцинными штаммами, что свидетельствует о высоком уровне аттенуации штаммов «Орлов-В» и RA27/3 ВК. Получено также хорошее совпадение результатов определения содержания ВК в тканях ЦНС и периферических органах инокулированных животных вирусологическим и молекулярно-биологическим методами исследования.

Обсуждение

Классическим прямым вирусологическим методом индикации ВК является культуральный

Таблица 2. Инфекционная активность ВК в ЦНС и периферических органах обезьян, ТЦД₅₀/мл
Table 2. Infectious activity of the rubella virus in the CNS and peripheral organs of monkeys, TCD₅₀/ml

Исследуемый образец Tested sample	Группа / Group											
	1-я / 1 st			2-я / 2 nd			3-я / 3 rd		4-я / 4 th			
ID животного Animal ID	44154	38976	43764	39029	41876	38429	36518	42716	42884	43389	43419	
Срок исследования, сут Day of experiment	2	12	21	28	12	28	28	2	12	21	28	
Головной мозг Brain	2,5	0	0	0	0	0	0	3,1	4,0	0	0	
Шейный отдел спинного мозга Cervical spinal cord	0	0	0	0	0	0	0	2,9	3,2	0	0	
Поясничный отдел спинного мозга Lumbar spinal cord	0	0	0	0	0	0	0	0	1,8	0	0	
Спинально-мозговая жидкость Cerebrospinal fluid	0	0	0	0	0	0	0	0	2,4	0	0	
Подчелюстные лимфатические узлы Submandibular lymph nodes	Н/д N/a	0	0	0	0	0	0	0	0	2,6	0	
Заднешейные лимфатические узлы Posteriorcervical lymph nodes	Н/д N/a	0	0	0	0	0	0	0	2,3	1,8	0	
Лёгкое Lung	Н/д N/a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Селезёнка Spleen	Н/д N/a	0	0	0	0	0	0	0	2,0	2,0	0	
Печень Liver	Н/д N/a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Примечание. Н/д — образец ткани не исследовался.
Note. N/a — tissue sample was not tested.

метод (выделение вируса на модели чувствительных клеточных культур). По данным литературы, выделение ВК *in vitro* обеспечивает широкий круг первичных, диплоидных и перевиваемых клеточных культур птичьего, животного и человеческого происхождения [10]. Основной причиной ЦПД ВК в культуре клеток является нарушение метаболизма клеток. Неструктурные вирусные белки р150 и р90 блокируют синтез РНК клетки-хозяина, что ведёт к подавлению синтеза клеточных белков, нарушению структуры клеточных мембран, лизосом и митохондрий [11]. В результате освобождаются и активируются клеточные лизосомальные ферменты, которые и вызывают деструкцию клеточных компонентов и развитие ЦПД в культуре клеток.

Однако особенностью индикации ВК является вариабельность проявления его цитодеструктивного действия на клетки. Так, при использовании невысококочувствительных культур клеток ВК может вызвать нелитическую продуктивную инфекцию. Отчётливая реакция клеток на заражение ВК может наблюдаться лишь в весьма ограниченном круге клеточных культур. ЦПД ВК на монослой клеток наблюдают в первичной культуре клеток почки кролика и амниона человека. Из перевиваемых линий клеток это клетки почек детёнышей хомяка (ВНК-21), а также обезьяньего (Vero) и кроличьего (RK-13) происхождения.

Преимущество метода выделения ВК на модели чувствительных клеточных культур заключается в том, что данный метод обеспечивает выделение живого возбудителя, что является достоверным подтверждением результата. По данным различных авторов, чувствительность культурального метода диагностики ВК колеблется в пределах 50–80%, при этом специфичность метода составляет 100% [12]. К недостаткам метода относятся длительность и субъективность оценки результата, необходимость проведения слепых пассажей, вариабельность и интенсивность проявления ЦПД ВК в культуре клеток.

Развитие молекулярной биологии — открытие генетического кода, изучение структуры и роли РНК как хранилища генетической информации у ряда вирусов — дало новые возможности в изучении и диагностике ВК.

Разработка метода ПЦР послужила поворотным моментом в развитии молекулярной диагностики постнатальной и врожденной краснухи. В настоящее время для выявления РНК ВК в образцах биологического материала метод амплификации нуклеиновых кислот остаётся наиболее распространённым в клинической лабораторной практике [13, 14]. Разработано значительное количество коммерческих тест-систем как для качественной, так и для количественной идентификации РНК ВК.

Таблица 3. Результаты выявления РНК ВК в аутопсийном материале от обезьян, Сt**Table 3.** Results of detection of rubella virus RNA in autopsy material from monkeys, Сt

Исследуемый образец Tested sample	Группа / Group											
	1-я / 1 st			2-я / 2 nd			3-я / 3 rd		4-я / 4 th			
ID животного Animal ID	44154	38976	43764	39029	41876	38429	36518	42716	42884	43389	4341	
Срок исследования, сут Day of experiment	2	12	21	28	12	28	28	2	12	21	28	
Головной мозг Brain	26,3	0	0	0	0	0	0	26,7	30,4	0	0	
Шейный отдел спинного мозга Cervical spinal cord	0	0	0	0	0	0	0	38,3	34,6	0	0	
Поясничный отдел спинного мозга Lumbar spinal cord	0	0	0	0	0	0	0	0	36,4	0	0	
Спинальная жидкость Cerebrospinal fluid	0	0	0	0	0	0	0	0	27,2	0	0	
Подчелюстные лимфатические узлы Submandibular lymph nodes	Н/д N/a	0	0	0	0	0	0	Н/д N/a	0	26,7	0	
Заднешейные лимфатические узлы Posteriorcervical lymph nodes	Н/д N/a	0	0	0	0	0	0	Н/д N/a	27,1	33,3	0	
Лёгкое Lung	Н/д N/a	0	0	0	0	0	0	Н/д N/a	0	0	0	
Селезёнка Spleen	Н/д N/a	0	0	0	0	0	0	Н/д N/a	27,2	27,0	0	
Печень Liver	Н/д N/a	0	0	0	0	0	0	Н/д N/a	0	0	0	
Плазма Plasma	Н/д N/a	0	0	0	0	0	0	0	27,1	33,5	0	

Примечание. Н/д — образец ткани не исследовался.

Note. N/a — tissue sample was not tested.

Наиболее распространённым методом детекции ВК является метод ПЦР-РВ. Одним из преимуществ данного метода является то, что процессы амплификации и детекции амплификации ВК происходят одновременно в одной пробирке, что сокращает вероятность ложноположительных результатов из-за перекрёстной контаминации исследуемых образцов. Данному методу также присущи высокая чувствительность, специфичность, быстрота получения результатов и возможность автоматизации процесса постановки реакции [15]. Метод ПЦР-РВ активно применяется для оценки безопасности и эффективности живых противовирусных вакцин, в частности, для аттенуированных вакцинных штаммов вирусов гриппа, кори и краснухи [16–18].

В данной работе мы провели сравнительный анализ результатов, полученных при определении ВК в исследуемых образцах по ЦПД и методом ПЦР-РВ. Полученные данные указывают, что аналитическая чувствительность метода ПЦР-РВ превышает аналитическую чувствительность реакции ЦПД на 1,7–3,3 Ig. Классический метод выделения ВК имеет ряд недостатков: длительность, субъективность анализа и зависимость от внешних факторов. В отличие от него, выявление ВК методом

ПЦР-РВ имеет ряд преимуществ: специфичность, чувствительность и меньшую длительность реакции. Таким образом, метод ПЦР-РВ может быть использован в качестве дополнительного теста при доклинической оценке специфической безопасности, а именно экстраневральной диссеминации аттенуированных вакцинных штаммов, что крайне необходимо при контроле качества живых противовирусных вакцин.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Максимова О.А., Попов В.Ф., Бектемиров Т.А., Григорьева Л.В., Юнасова Т.Н., Каплунова О.П. и др. Сравнительная оценка нейровирулентности отечественной и зарубежных живых паротитных вакцин. *Вопросы вирусологии*. 2001; 46(5): 31–5.
2. Шамсутдинова О.А., Булгин Д.В., Карал-оглы Д.Д., Лаврентьева И.Н. Изучение морфологических изменений в ЦНС и внутренних органах обезьян *Macaca mulatta* при интрацеребральном введении низкоаттенуированного штамма вируса краснухи. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2021; 171(5): 651–5. <https://doi.org/10.47056/0365-9615-2021-171-5-651-655>
3. Ziyacifar F., Soleimani S. Characterizing the BHK-21 C5 cell line and determining cellular sensitivity to rubella virus compared with the routine cell(RK13). *Arch. Razi. Inst.* 2021; 76(3): 461–9. <https://doi.org/10.22092/ari.2020.342274.1458>

4. Забияка Ю.И., Файзулов Е.Б., Борисова Т.К., Никонова А.А., Зверев В.В. Экспресс-метод оценки титра вируса краснухи в вирусосодержащей жидкости с помощью ПЦР-РВ. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2010; (5): 57–62.
 5. Бинятова А.С., Мыца Е.Д., Чертова Н.В., Волкова Р.А., Саркисян К.А., Ильясова Т.Н. и др. Использование наборов реагентов для ОТ-ПЦР в реальном времени для оценки подлинности вакцин против кори, паротита и краснухи. *БИО-препараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2018; 18(4): 249–56.
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-4-249-256>
 6. Mantel N., Aguirre M., Gulia S., Girerd-Chambaz Y., Colombani S., Moste C., et al. Standardized quantitative RT-PCR assays for quantitation of yellow fever and chimeric yellow fever-dengue vaccines. *J. Virol. Methods*. 2008; 151(1): 40–6.
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.03.026>
 7. Лаврентьева И.Н., Сухобаевская Л.П., Жебрун А.Б. Штамм вируса краснухи для получения медицинских иммунологических препаратов (МИБП). Патент РФ № 2081912; 1995.
 8. Общая фармакопейная статья ОФС.1.7.2.0010.15. Оценка специфической безопасности производственных штаммов и посевных вирусосов кори, паротита и краснухи. М.; 2018.
 9. Домонова Э.А., Шипулина О.Ю., Кувяда Д.А., Ларичев В.Ф., Сафонова А.П., Бурчик М.А. и др. Выявление РНК вируса краснухи в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2012; (1): 60–7.
 10. Юнасова Т.Н., Бинятова А.С., Фадейкина О.В., Саркисян К.А., Мовсесянц А.А., Игнатъев Г.М. и др. Анализ качества отечественной вакцины для профилактики краснухи. *Вопросы вирусологии*. 2018; 63(2): 90–6.
<https://doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-2-90-96>
 11. Sakata M., Katoh H., Otsuki N., Okamoto K., Nakatsu Y., Lim C.K., et al. Heat shock protein 90 ensures the integrity of rubella virus p150 protein and supports viral replication. *J. Virol.* 2019; 93(22): e01142–19.
<https://doi.org/10.1128/JVI.01142-19>
 12. Best J.M. Rubella. *Semin. Fetal. Neonatal. Med.* 2007; 12(3): 182–92. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2007.01.017>
 13. Cooray S., Warren L., Jin L. Improved RT-PCR for diagnosis and epidemiological surveillance of rubella. *J. Clin. Virol.* 2006; 35(1): 73–80.
<https://doi.org/10.1016/j.jcv.2004.12.020>
 14. Mace M., Cointe D., Six C., Levy-Bruhl D., du Chatelet I.P., Ingrand D., et al. Diagnostic value of reverse transcription-PCR of amniotic fluid for prenatal diagnosis of congenital rubella infection in pregnant women with confirmed primary rubella infection. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(10): 4818–20.
<https://doi.org/10.1128/JCM.42.10.4818-4820.2004>
 15. Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю. *ПЦР в реальном времени*. М.: БИНОМ, Лаборатория знаний; 2009.
 16. Osterholm M.T., Kelley N.S., Sommer A., Belongia E.A. Efficacy and effectiveness of influenza vaccines: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* 2012; 12(1): 36–44. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70295-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70295-X)
 17. Greenwood K.P., Hafiz R., Ware R.S., Lambert S.B. A systematic review of human-to-human transmission of measles vaccine virus. *Vaccine*. 2016; 34(23): 2531–6.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.03.092>
 18. Лаврентьева И.Н., Шамсутдинова О.А., Чугуева И.И., Карал-оглы Д.Д., Вышемирский О.И. Изучение тератогенности вакцинного штамма вируса краснухи «Орлов-В» (*Matonaviridae: Rubivirus: Rubellavirus*) в опыте на обезьянах макак-резус. *Вопросы вирусологии*. 2020; 65(6): 357–63.
<https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-6-6>
- ## REFERENCES
1. Maksimova O.A., Popov V.F., Bektemirov T.A., Grigor'eva L.V., Yunasova T.N., Kaplunova O.P., et al. Comparative assessment of the neurovirulence of domestic and foreign live mumps vaccines. *Voprosy virusologii*. 2001; 46(5): 31–5. (in Russian)
 2. Shamsutdinova O.A., Bulgin D.V., Karal-ogly D.D., Lavrent'eva I.N. Study of morphological changes in the CNS and internal organs of *Macaca mulatta* monkeys after intracerebral injection of a low-attenuated rubella virus strain. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2021; 171(5): 651–5.
<https://doi.org/10.47056/0365-9615-2021-171-5-651-655> (in Russian)
 3. Ziyaeifar F., Soleimani S. Characterizing the BHK-21 C5 cell line and determining cellular sensitivity to rubella virus compared with the routine cell(RK13). *Arch. Razi. Inst.* 2021; 76(3): 461–9. <https://doi.org/10.22092/ari.2020.342274.1458>
 4. Zabiya Yu.I., Fayzuloev E.B., Borisova T.K., Nikonova A.A., Zverev V.V. Express method for assessing the rubella virus titer in virus-containing fluid using real-time PCR. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2010; (5): 57–62. (in Russian)
 5. Binyatova A.S., Mytsa E.D., Chertova N.V., Volkova R.A., Sarkisyan K.A., Ilyasova T.N., et al. Using real-time RT-PCR reagent kits for identity testing of measles, mumps and rubella vaccines. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie*. 2018; 18(4): 249–56.
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-4-249-256> (in Russian)
 6. Mantel N., Aguirre M., Gulia S., Girerd-Chambaz Y., Colombani S., Moste C., et al. Standardized quantitative RT-PCR assays for quantitation of yellow fever and chimeric yellow fever-dengue vaccines. *J. Virol. Methods*. 2008; 151(1): 40–6.
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.03.026>
 7. Lavrent'eva I.N., Sukhobaevskaya L.P., Zhebrun A.B. Rubella virus strain for the production of medical immunobiological preparations (MIBP). Patent RF N 2081912; 1995. (in Russian)
 8. General pharmacopoeia article OFS.1.7.2.0010.15. Assessment of the specific safety of industrial strains and seed viruses of measles, mumps and rubella. Moscow; 2018. (in Russian)
 9. Domonova E.A., Shipulina O.Yu., Kuevda D.A., Larichev V.F., Safonova A.P., Burchik M.A., et al. Detection of rubella virus RNA in clinical material by real time polymerase chain reaction method. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2012; (1): 60–7. (in Russian)
 10. Yunasova T.N., Binyatova A.S., Fadeykina O.V., Sarkisyan K.A., Movsesyants A.A., Ignat'ev G.M., et al. Analysis of the quality of national vaccine against rubella. *Voprosy virusologii*. 2018; 63(2): 90–6. <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-2-90-96> (in Russian)
 11. Sakata M., Katoh H., Otsuki N., Okamoto K., Nakatsu Y., Lim C.K., et al. Heat shock protein 90 ensures the integrity of rubella virus p150 protein and supports viral replication. *J. Virol.* 2019; 93(22): e01142–19.
<https://doi.org/10.1128/JVI.01142-19>
 12. Best J.M. Rubella. *Semin. Fetal. Neonatal. Med.* 2007; 12(3): 182–92. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2007.01.017>
 13. Cooray S., Warren L., Jin L. Improved RT-PCR for diagnosis and epidemiological surveillance of rubella. *J. Clin. Virol.* 2006; 35(1): 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2004.12.020>
 14. Mace M., Cointe D., Six C., Levy-Bruhl D., du Chatelet I.P., Ingrand D., et al. Diagnostic value of reverse transcription-PCR of amniotic fluid for prenatal diagnosis of congenital rubella infection in pregnant women with confirmed primary rubella infection. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(10): 4818–20.
<https://doi.org/10.1128/JCM.42.10.4818-4820.2004>
 15. Rebrikov D.V., Samatov G.A., Trofimov D.Yu. *Real-Time PCR [PcTcR v real'nom vremeni]*. Moscow: BINOM, Laboratoriya znaniy; 2009. (in Russian)

16. Osterholm M.T., Kelley N.S., Sommer A., Belongia E.A. Efficacy and effectiveness of influenza vaccines: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* 2012; 12(1): 36–44. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70295-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70295-X)
17. Greenwood K.P., Hafiz R., Ware R.S., Lambert S.B. A systematic review of human-to-human transmission of measles vaccine virus. *Vaccine.* 2016; 34(23): 2531–6. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.03.092>
18. Lavrent'eva I.N., Shamsutdinova O.A., Chugueva I.I., Karal-ogly D.D., Vyshemirskiy O.I. Study of the teratogenicity of the vaccine strain of the Rubella virus «Orlov-V» (*Matonaviridae: Rubivirus: Rubella virus*) in experience on rhesus macaques. *Voprosy virusologii.* 2020; 65(6): 357–63. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-6-6> (in Russian)

Информация об авторах

Шамсутдинова Ольга Анатольевна[✉] — н.с. лаб. иммунологии и биологии клетки НИИМП, Сочи, Россия, shamsutdinova-o-a@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2742-3965>

Карал-оглы Джина Джинаровна — к.б.н., зам. директора по научной работе НИИМП, Сочи, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3606-1668>

Лаврентьева Ирина Николаевна — д.м.н., зав. лаб. экспериментальной вирусологии НИИЭМ им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2188-6547>

Участие авторов. Шамсутдинова О.А. — концепция и дизайн исследования, проведение эксперимента, сбор, анализ интерпретация данных, подготовка текста; Карал-оглы Д.Д. — концепция и дизайн исследования; Лаврентьева И.Н. — концепция и дизайн исследования, анализ и интерпретация данных, подготовка текста.

Статья поступила в редакцию 09.01.2022;
принята к публикации 11.03.2022;
опубликована 29.04.2022

Information about the authors

Olga A. Shamsutdinova[✉] — researcher, Laboratory of immunology and cell biology, Research Institute of Medical Primatology, Sochi, Russia, shamsutdinova-o-a@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2742-3965>

Dgina D. Karal-ogly — Cand. Sci. (Biol.), Depute Director, Research Institute of medical Primatology, Sochi, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3606-1668>

Irina N. Lavrent'eva — D. Sci. (Med.), Head, Laboratory of experimental virology, Saint-Petersburg Pasteur Institute, Saint Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2188-6547>

Author contribution. Shamsutdinova O.A. — research concept and design, conducting of the experiments, collection, analysis and interpretation of the data, preparing of the text; Karal-ogly D.D. — research concept and design; Lavrent'eva I.N. — research concept and design, analysis and interpretation of the data, preparing of the text.

The article was submitted 09.01.2022;
accepted for publication 11.03.2022;
published 29.04.2022



Дифференциация подвидов *Francisella tularensis* методом INDEL-типирования

Сорокин В.М.[✉], Водопьянов А.С., Цимбалистова М.В., Павлович Н.В.

Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия

Аннотация

Введение. *Francisella tularensis*, этиологический агент туляремии, относится к факультативным внутриклеточным патогенам, вызывающим тяжёлое заболевание у многих видов животных и человека, и является агентом биотерроризма категории А. В настоящее время *F. tularensis* делится на четыре подвида: *F. tularensis* subsp. *tularensis* (*nearctica*), *F. tularensis* subsp. *holarctica*, *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*, *F. tularensis* subsp. *novicida*, которые различаются по патогенности и географическому распределению. Исторически такое разделение было обусловлено различным ареалом циркуляции штаммов, их отличиями в биохимической активности и патогенностью для разных хозяев. Биохимическое определение подвидов весьма трудоёмко и требует работы с живыми культурами микроорганизма, что и определяет необходимость разработки новых молекулярно-генетических подходов для генотипирования штаммов *F. tularensis*.

Целью настоящего исследования является разработка способа дифференциации подвидов и отдельных групп *F. tularensis* на основе INDEL-типирования. Задачи исследования: создание локальной базы данных нуклеотидных последовательностей штаммов *F. tularensis* разных подвидов, поиск INDEL-маркеров, значимых для дифференциации подвидов возбудителя туляремии, конструирование праймеров для детекции INDEL-маркеров с помощью ПЦР, оптимизация набора INDEL-маркеров и выяснение филогенетических связей между изученными штаммами.

Материалы и методы. Локальную базу данных нуклеотидных последовательностей штаммов *F. tularensis* разных подвидов, представленных в базе данных GenBank, создавали с помощью авторского программного обеспечения. Детекцию INDEL-маркеров в геномах штаммов локальной базы данных проводили с помощью программы «GeneExpert». Конструирование праймеров и ПЦР *in silico* осуществляли при помощи программы «Primer3Plus» и авторской программы «VirtualPCR», кластерный анализ и построение филогенетического дерева — программы «GrapeTree».

Результаты и обсуждение. Использование предложенных 5 INDEL-маркеров для генотипирования 29 изученных штаммов разных подвидов из базы данных GenBank позволило обнаружить 9 индивидуальных генотипов с высоким индексом разнообразия (DI = 0,85). Отмечено не только соответствующее разделение подвидов *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* и *novicida* по разным кластерам, но и внутривидовое деление на группы штаммов. Дифференциация подвидов *F. tularensis* подтверждена *in vitro* на коллекции штаммов разных подвидов музея живых культур Ростовского-на-Дону противочумного института.

Заключение. Впервые разработана схема дифференциации подвидов *F. tularensis* на основе метода INDEL-типирования, позволяющая *in vitro* без необходимости секвенирования штаммов идентифицировать как подвиды *F. tularensis* (*tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* и *novicida*), так и группы штаммов внутри подвидов. Метод защищен патентом. Топология филогенетического дерева INDEL-генотипов штаммов *F. tularensis* коррелирует со схемами эволюции туляремийного микроба, представленными ранее. Предлагаемый метод может быть применён для комбинированного типирования штаммов *F. tularensis* совместно с MLVA- или SNP-типированием.

Ключевые слова: *Francisella tularensis*, subspecies, INDEL, MLVA, SNP, филогенетический анализ

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

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

Для цитирования: Сорокин В.М., Водопьянов А.С., Цимбалистова М.В., Павлович Н.В. Дифференциация подвидов *Francisella tularensis* методом INDEL-типирования. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2022;99(2):193–202.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-189>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-189>

Differentiation of the *Francisella tularensis* subspecies by the INDEL typing method

Vladimir M. Sorokin[✉], Aleksey S. Vodopyanov, Marina V. Tsimbalistova, Natalya V. Pavlovich

Rostov-on-Don Plague Control Research Institute, Rostov-on-Don, Russia

Abstract

Background. *Francisella tularensis*, the etiological agent of tularemia, belongs to the facultative intracellular pathogens that cause severe disease in humans and many species of animals, and is a category A bioterrorism agent. Currently, *F. tularensis* is divided into four subspecies: *F. tularensis* subsp. *tularensis* (nearctica), *F. tularensis* subsp. *holarctica*, *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*, *F. tularensis* subsp. *novicida*, which differ in their pathogenicity and geographical distribution. Historically, this division was due to the different distribution area of strains, their differences in biochemical activity and pathogenicity for different hosts. The biochemical identification of subspecies is very laborious and requires work with live cultures of the microorganism, which determines the need to develop new molecular genetic approaches for genotyping *F. tularensis* strains.

The aim of this study is to develop a method for differentiating subspecies and individual groups of *F. tularensis* based on INDEL typing. Research objectives: creation of a local database of nucleotide sequences of *F. tularensis* strains of different subspecies, search for INDEL markers that are significant for the differentiation of subspecies of the causative agent of tularemia, designing primers for the detection of INDEL markers using PCR, optimization of the set of INDEL markers and elucidation of phylogenetic relationships between the studied strains based on the proposed INDEL typing method.

Materials and methods. The local database of nucleotide sequences of *F. tularensis* strains of different subspecies for comparative analysis of *F. tularensis* genomes presented in the GenBank database was created using the author's software. Detection of INDEL markers in the genomes of strains of the local database was carried out using the GeneExpert program. Primer design and *in silico* PCR were performed using the Primer3Plus software and the proprietary VirtualPCR software. Cluster analysis and construction of a phylogenetic tree were performed using the GrapeTree program.

Results and discussion. The implementation of the proposed five INDEL markers for genotyping of 29 studied strains of different subspecies from the GenBank database made it possible to detect 9 individual genotypes with a high diversity index (DI = 0.85). Not only the corresponding division of the *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica*, and *novicida* subspecies into different clusters was noted, but also the intraspecific division into groups of strains was observed. Differentiation of *F. tularensis* subspecies was confirmed *in vitro* for the collection of strains of different subspecies of the Collection of Living Cultures of the Rostov-on-Don Plague Control Research Institute.

Conclusion. For the first time, the *F. tularensis* subspecies differentiation system based on the INDEL typing method has been developed, which allows *in vitro* identification of both *F. tularensis* subspecies (*tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* and *novicida*) and groups of strains within subspecies without the need for strain sequencing. The method is protected by a patent.

The topology of the INDEL phylogenetic tree of genotypes of *F. tularensis* strains correlates with the patterns of evolution of the tularemia microbe presented earlier. The proposed method can be used for combined typing of *F. tularensis* strains together with MLVA or SNP typing.

Keywords: *Francisella tularensis*, subspecies, INDEL, MLVA, SNP, phylogenetic analysis

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Sorokin V.M., Vodopyanov A.S., Tsimbalistova M.V., Pavlovich N.V. Differentiation of the *Francisella tularensis* subspecies by the INDEL typing method. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology* = *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2022;99(2):193–202.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-189>

Введение

Francisella tularensis, этиологический агент туляремии, относится к факультативным внутриклеточным патогенам, вызывающим тяжёлое заболевание у многих видов животных и человека [1], и является агентом биотерроризма категории А [2]. В настоящее время *F. tularensis* делится на четыре подвида: *tularensis* (*nearctica*), *holarctica*, *mediasiatica*,

novicida, которые различаются по патогенности и географическому распределению [3]. Исторически такое разделение было обусловлено различным ареалом циркуляции штаммов, отличиями в их биохимической активности и патогенности для разных хозяев [4, 5]. *F. novicida*, официально признанный четвёртым подвигом вида *F. tularensis*, обладает высокой гомологией ДНК с другими подвидами

F. tularensis, но не является возбудителем типичной туляремийной инфекции [3]. Высоковирулентные штаммы *F. tularensis* subsp. *tularensis* (тип А) распространены только в Северной Америке, а менее патогенные штаммы *F. tularensis* subsp. *holarctica* (тип В) циркулируют в основном в Северном полушарии. *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* по степени вирулентности близка *F. tularensis* subsp. *holarctica*, но географически ограничена только Центральной Азией [3]. Однако недавно выявлено расширение ареала её обитания с изоляцией штаммов на территории России [6]. *F. tularensis* subsp. *novicida* относится к слабопатогенному для человека подвиду, который редко выделяется в Северной Америке [3] и в одном случае был выделен в Австралии [7].

Все упомянутые подвиды различаются по степени их генетического полиморфизма. Редко встречающиеся подвиды (*F. tularensis* subsp. *mediasiatica* и *F. tularensis* subsp. *novicida*) проявляют высокий полиморфизм [8], но из-за небольшого количества исследованных штаммов их реальное генетическое разнообразие до сих пор в полной мере не изучено. Доминирующие и высоковирулентные подвиды (*F. tularensis* subsp. *tularensis* и *F. tularensis* subsp. *holarctica*) значительно различаются по уровню генетического полиморфизма. Например, *F. tularensis* subsp. *tularensis* представлен двумя генетически различными субпопуляциями (А.І и А.ІІ) с различным географическим распространением [3, 8–11]. Это подтверждено с помощью многих молекулярно-генетических методов, включая полногеномный анализ однонуклеотидного полиморфизма (SNP) [3], мультилокусное секвенирование-типирование [11], риботипирование [12], пульс-гель-электрофорез (PFGE) [10, 12], анализ регионов различия [13], полиморфизма длины амплификационных фрагментов [12, 14] и канонических INDEL-маркеров [15], мультилокусный анализ полиморфизма числа tandemных повторов (MLVA) [8, 16]. Напротив, с помощью этих же методов было показано, что *F. tularensis* subsp. *holarctica* проявляет гораздо меньший генетический полиморфизм, что, наряду с широким географическим распространением, позволяет предположить более позднее происхождение этого подвида с дальнейшим его распространением по Северному полушарию [3, 8, 9, 13, 17]. Развитие метода MLVA-типирования позволило создать инструменты для адекватной дифференциации штаммов возбудителя туляремии и упростило межлабораторное сравнение полученных данных [8, 16, 18, 19]. Ранние методы молекулярного генотипирования *F. tularensis* обладали рядом недостатков: низкими чувствительностью и разрешающей способностью, слабой межлабораторной воспроизводимостью. Современный метод SNP-типирования требует предварительного секвенирования ДНК, что до сих пор не стало рутинным методом

исследования вследствие высокой трудоёмкости и затрат. Важное ограничение, присущее MLVA-типированию, — это риск ошибочной оценки родства между штаммами на больших генетических расстояниях. К тому же ни один из этих методов не предусматривает алгоритма дифференциации подвидов *F. tularensis*.

В последние годы значительно выросло число публикаций, посвящённых как модификации существующих методов дифференциации штаммов *F. tularensis*, так и их практическому применению для анализа популяций возбудителя туляремии, циркулирующих на различных территориях [20–28]. Тем не менее до настоящего времени актуальной остаётся разработка методов дифференциации подвидов и отдельных групп *F. tularensis* [26].

Целью настоящего исследования является разработка способа дифференциации подвидов и отдельных групп *F. tularensis* на основе INDEL-типирования.

Материалы и методы

Локальную базу данных нуклеотидных последовательностей штаммов *F. tularensis* разных подвидов для сравнительного анализа геномов *F. tularensis*, представленных в базе данных GenBank, создавали с помощью авторского программного обеспечения.

Детекцию всех INDEL-маркеров в геномах штаммов локальной базы данных с предустановленным размером более 7 п.н. осуществляли с помощью программы «GeneExpert». Конструирование праймеров и проведение ПЦР *in silico* осуществляли при помощи программы «Primer3Plus» и авторской программы «VirtualPCR». Кластерный анализ и построение филогенетического дерева проводили с использованием программы «GrapeTree» (алгоритм NJ) [29]. Для оптимизации набора INDEL-локусов с целью получения максимального числа индивидуальных генотипов была использована программа «Automated Selection of Typing Target Subsets» («AuSeTTS») [30].

Для детекции INDEL-локусов реакцию проводили отдельно для каждого из 5 локусов. Температура отжига — 55°C для всех локусов: ft263, ft278, ft502, ft1779, ft09. Продукты амплификации анализировали в 8% полиакриламидном геле и определяли размер амплифицированных фрагментов по стандарту молекулярных масс с помощью программы «Quantity One».

Результаты

Для сравнительного анализа геномов *F. tularensis*, представленных в базе данных GenBank, с помощью авторского программного обеспечения создана локальная база данных нуклеотидных последовательностей 29 штаммов *F. tularensis* разных

Таблица 1. Праймеры, использованные в исследовании**Table 1.** Primers used in the study

INDEL-локус / INDEL locus	Праймеры / Primers	Фрагмент, п.н. / Fragment, bp
ft263	AAAAATACTGGTACTGTTAATGTTATCTTTC TATTTACCAGCAGCAACGA	62/69
ft278	TTTGTGATGATTATGATTTTGCAG TGGTTGAGTTTATCACTATGCTCA	59/74
ft502	ATCATTGGTTTTGCCTACGG TGCAACACCTAAAGCTGCAA	201/339
ft1779	GCCTTTTCAGTTCTTGAAATTGT TTTGAGATTCGTGTAGTGTACTTGTG	98/107/950
ft09	CCGCAGAAGTTATTGGCTGT ACAGGATCACCTAACGCAGT	134/235

подвидов. С помощью программы «GeneExpert» проведено попарное сравнение более 1800 открытых рамок считывания в геномах штаммов локальной базы данных для детекции всех INDEL-маркеров с предустановленным размером более 7 п.н. Обнаружено 13 локусов, содержащих INDEL-маркеры, значимые для дифференциации подвидов воз-

будителя туляремии. Были сконструированы праймеры, позволяющие детектировать INDEL-маркеры в 13 локусах.

Тестирование результатов ПЦП *in silico* по 13 локусам с помощью программы «AuSeTTs» позволило обнаружить у 29 изученных штаммов из базы данных GenBank 9 индивидуальных генотипов с вы-

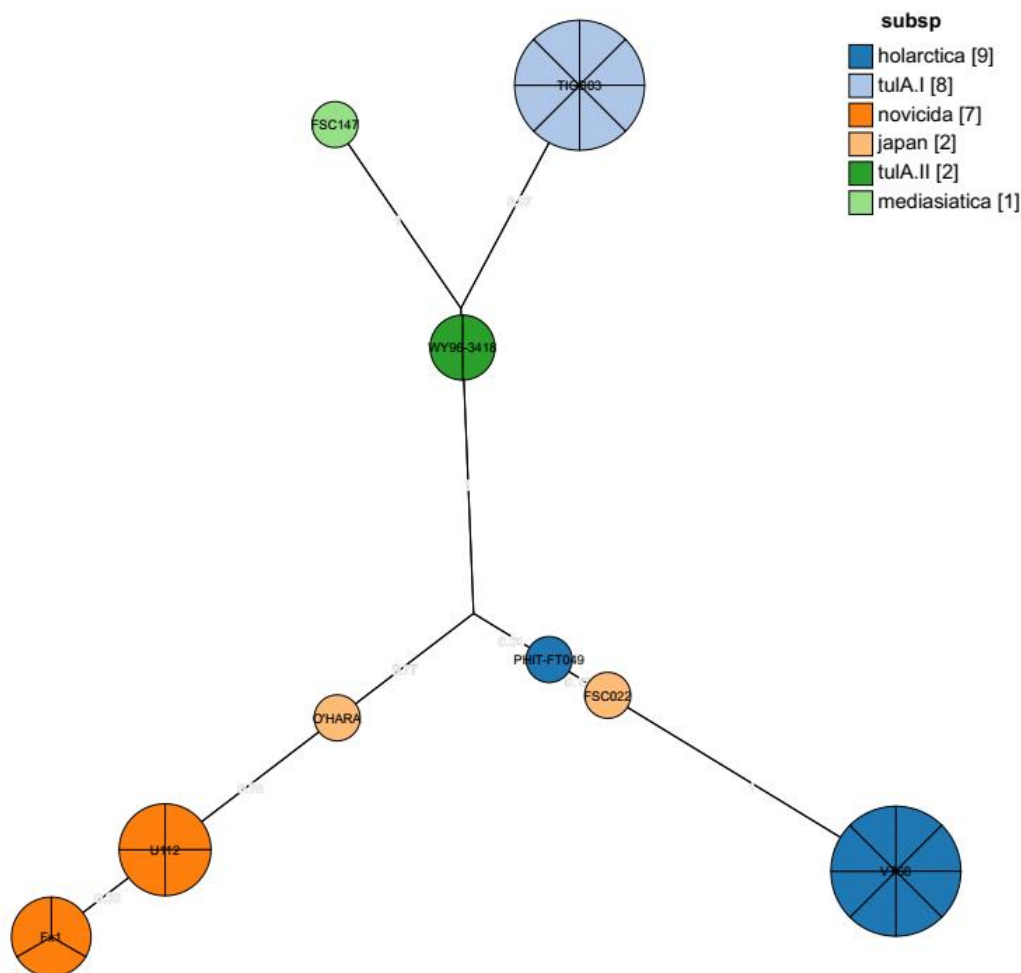


Рис. 1. Филогенетическое дерево INDEL-генотипов 29 штаммов *F. tularensis* разных подвидов, построенное по алгоритму NJ.

Fig. 1. Phylogenetic tree of INDEL genotypes for 29 *F. tularensis* strains of different subspecies, built using the NJ algorithm.

Таблица 2. Распределение INDEL-маркеров в геноме 29 штаммов *F. tularensis* разных подвидов
Table 2. Distribution of INDEL markers in the genome of 29 *F. tularensis* strains of different subspecies

Штаммы Strains	Подвид Subspecies	INDEL-локусы (фрагмент, п.н.) / INDEL loci (fragment, bp)				
		ft263	ft278	ft502	ft1779	ft09
AL97-2214	<i>novicida</i>	69	74	0	107	0
AZ06-7470	<i>novicida</i>	69	74	0	107	235
D9876	<i>novicida</i>	69	74	0	107	235
F6168	<i>novicida</i>	69	74	0	107	0
Fx1	<i>novicida</i>	69	74	0	107	0
PA10-7858	<i>novicida</i>	69	74	0	107	235
U112	<i>novicida</i>	69	74	0	107	235
425	<i>holarctica</i>	62	0	339	950	235
F92	<i>holarctica</i>	62	0	339	950	235
FSC200	<i>holarctica</i>	62	0	339	950	235
FTNF002-00	<i>holarctica</i>	62	0	339	950	235
FTT1	<i>holarctica</i>	62	0	339	950	235
LVS	<i>holarctica</i>	62	0	339	950	235
OSU18	<i>holarctica</i>	62	0	339	950	235
PHIT-FT049	<i>holarctica</i>	69	0	339	950	235
VT68	<i>holarctica</i>	62	0	339	950	235
FSC147	<i>mediasiatica</i>	69	59	339	98	134
MA00-2987	<i>tular.A.I</i>	69	59	201	98	235
NE061598	<i>tular.A.I</i>	69	59	201	98	235
NR-21734(SchuS4)	<i>tular.A.I</i>	69	59	201	98	235
NR-21736(SchuS4)	<i>tular.A.I</i>	69	59	201	98	235
NR-21737(SchuS4)	<i>tular.A.I</i>	69	59	201	98	235
SHU-S4	<i>tular.A.I</i>	69	59	201	98	235
TI0902	<i>tular.A.I</i>	69	59	201	98	235
TIGB03	<i>tular.A.I</i>	69	59	201	98	235
WY-00W4114	<i>tular.A.II</i>	69	59	339	98	235
WY96-3418	<i>tular.A.II</i>	69	59	339	98	235
FSC022	<i>hol.bv jap.</i>	69	74	339	950	235
O-HARA	<i>hol.bv jap.</i>	69	74	339	0	235

соким индексом разнообразия ($DI = 0,85$) [36]. Для оптимизации набора INDEL-локусов с целью получения максимального числа индивидуальных генотипов была использована программа «AuSeTTS» [30]. В результате удалось сократить число используемых INDEL-локусов до 5 без потери разрешающей способности метода (9 индивидуальных генотипов с индексом разнообразия $DI = 0,85$). Все праймеры, использованные в данном исследовании, и размер соответствующих продуктов амплификации приведены в **табл. 1**.

Для каждого локуса разные аллели четко разделяются при использовании электрофореза в 8% полиакриламидном геле и могут быть легко идентифицированы.

Результаты виртуального ПЦР-типирования 29 штаммов *F. tularensis* из базы данных GenBank разных подвидов по пяти избранным INDEL-локусам представлены в **табл. 2**.

Проведена кластеризация выявленных INDEL-генотипов 29 штаммов из базы данных GenBank и построено филогенетическое дерево с помощью программы «GrapeTree» (алгоритм NJ) [29] (**рис. 1**).

Отмечено соответствующее разделение подвидов *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* и *novicida* по разным кластерам, причём подвид *tularensis* чётко разделён на подгруппы А.І и А.ІІ. Штаммы подвида *novicida* образуют кластер, разделённый на 2 группы, 3 штамма *holarctica bv japonica* представлены

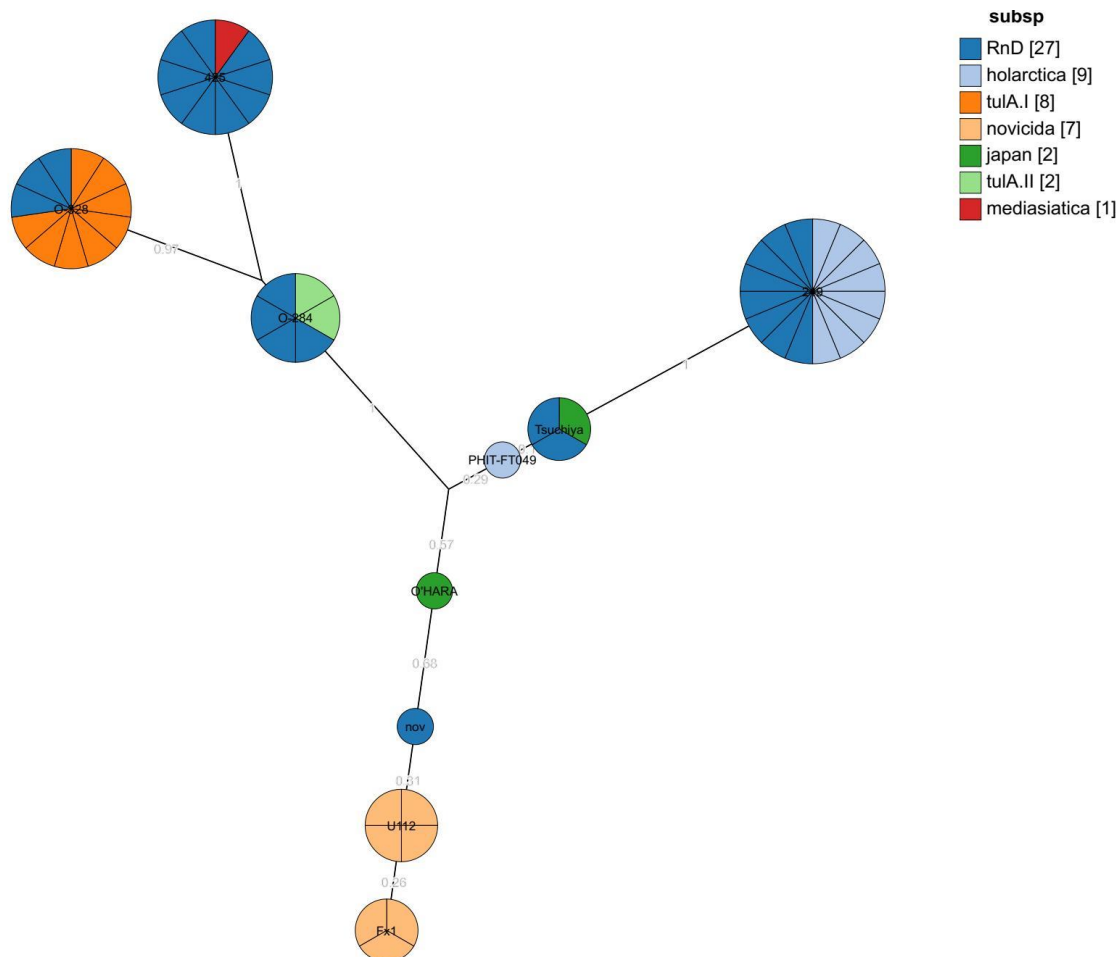


Рис. 2. Филогенетическое дерево INDEL-генотипов 29 штаммов *F. tularensis* из базы данных GenBank и 27 штаммов *F. tularensis* (МЖК), построенное по алгоритму NJ.

Fig. 2. Phylogenetic tree of INDEL genotypes for 29 strains of *F. tularensis* from the GenBank database and 27 strains of *F. tularensis* (Collection of Living Cultures), constructed using the NJ algorithm.

3 индивидуальными генотипами, 2 из которых принадлежат генетической линии *holarctica*. Точную принадлежность штамма O'HARA трудно определить из-за отсутствия данных по одному из локусов в базе данных GenBank.

Для верификации *in vitro* предлагаемой схемы INDEL-типирования исследованы 27 штаммов *F. tularensis* разных подвидов из музея живых культур (МЖК) Ростовского-на-Дону противочумного института методом ПЦР с использованием сконструированных праймеров. Для определения филогенетических связей между штаммами из базы данных GenBank и 27 штаммами *F. tularensis* из МЖК проведён кластерный анализ INDEL-генотипов и построено совместное филогенетическое дерево (рис. 2).

Итак, INDEL-генотип всех 9 штаммов подвида *holarctica* из МЖК совпадает с таковым у штаммов из базы данных GenBank, генотип всех 9 штаммов (МЖК) подвида *mediasiatica* идентичен генотипу единственного штамма из базы данных GenBank

этого подвида (FSC147), что подтверждает особенность штаммов этого подвида. Штаммы подвида *tularensis* (МЖК) впервые удастся *in vitro* разделить на группы А.І и А.ІІ (табл. 3). Генотип двух «японских» штаммов (*holarctica* bv *japonica*) идентичен генотипу штамма FSC022 и представляет, наряду со штаммом PHIT-FT049, отдельный кластер bv *japonica*. Единственный штамм *F. novicida* из МЖК относится к кластеру штаммов подвида *novicida*, представленному 2 группами штаммов. Принадлежность штамма O'HARA по-прежнему остаётся неопределённой.

Обсуждение

INDEL-типирование штаммов *F. tularensis* было впервые предложено в 2007 г. [15], когда MLVA являлся единственным методом с высокой разрешающей способностью на уровне штаммов по сравнению с методом PFGE. Метод MLVA был успешно применён во многих эпидемиологических исследованиях [8, 9, 31]. В методе используется обезза-

Таблица 3. Распределение подвидов и групп 27 штаммов *F. tularensis* разных подвидов при анализе 5 INDEL-маркеров *in vitro*

Table 3. Distribution of subspecies and groups of 27 strains of *F. tularensis* of different subspecies in the analysis of 5 INDEL markers *in vitro*

Штаммы (МЖК) Strains (Collection of Living Cultures)	Подвид по паспорту до типирования Subspecies according to passport before typing	Подвид после типирования Subspecies according to passport after typing
Schu	<i>tularensis</i>	<i>tularensis</i> A.I
503	<i>holarctica</i>	<i>holarctica</i>
15vac	<i>holarctica</i>	<i>holarctica</i>
nov	<i>novicida</i>	<i>novicida</i>
240	<i>mediasiatica</i>	<i>mediasiatica</i>
543	<i>mediasiatica</i>	<i>mediasiatica</i>
210	<i>holarctica</i>	<i>holarctica</i>
211	<i>holarctica</i>	<i>holarctica</i>
251	<i>holarctica</i>	<i>holarctica</i>
256	<i>holarctica</i>	<i>holarctica</i>
257	<i>holarctica</i>	<i>holarctica</i>
249	<i>holarctica</i>	<i>holarctica</i>
261	<i>tularensis</i>	<i>tularensis</i> A.II
Acole	<i>tularensis</i>	<i>tularensis</i> A.II
Nevada	<i>tularensis</i>	<i>tularensis</i> A.II
O-402	<i>tularensis</i>	<i>tularensis</i> A.I
O-328	<i>tularensis</i>	<i>tularensis</i> A.I
O-284	<i>tularensis</i>	<i>tularensis</i> A.II
122	<i>mediasiatica</i>	<i>mediasiatica</i>
120	<i>mediasiatica</i>	<i>mediasiatica</i>
150	<i>mediasiatica</i>	<i>mediasiatica</i>
60	<i>mediasiatica</i>	<i>mediasiatica</i>
A-61	<i>mediasiatica</i>	<i>mediasiatica</i>
148	<i>mediasiatica</i>	<i>mediasiatica</i>
425	<i>mediasiatica</i>	<i>mediasiatica</i>
Japonica	<i>hol. bv japonica</i>	<i>hol. bv japonica</i>
Tsuchiya	<i>hol. bv japonica</i>	<i>hol. bv japonica</i>

раженная культура и, в противоположность PFGE, результаты MLVA представляют собой дискретные цифровые значения, обеспечивающие сравнительный анализ данных, полученных в разных лабораториях. Важное ограничение, присущее MLVA, — это риск ошибочной оценки родства между штаммами на больших генетических расстояниях. Высокая мутабельность MLVA-маркеров [32, 33] может вызывать эффекты гомоплазии, т.е. мутационные изменения по причинам, отличным от общего происхождения. INDEL-маркеры проявляют более низкую степень вариабельности и, следовательно, могут быть использованы при создании иерархической схемы типирования наряду с методом MLVA,

тем более что оба метода основаны на фрагментарном анализе, минимизируя время и затраты на исследование. При анализе нуклеотидных последовательностей 5 штаммов *F. tularensis* разных подвидов авторами [15] были обнаружены 280 INDEL-маркеров, из них более 70% не превышали размер 20 п.н. Для окончательного варианта схемы INDEL-типирования было отобрано 38 INDEL-локусов. Комбинированный способ объединил INDEL-типирование по 38 локусам и MLVA-типирование по 25 VNTR-локусам, ранее предложенное А. Johansson и соавт. [8]. Это исследование показало, что канонические INDEL-маркеры могут быть интегрированы в эволюционный анализ на больших генетических расстояниях, тогда как MLVA-типирование обеспечивает хорошую разрешающую способность для родственных штаммов. Позднее INDEL-типирование совместно с SNP-типированием было широко использовано для дифференциации штаммов *F. tularensis* в различных регионах мира [34, 35].

На наш взгляд, эта схема при всей своей эффективности чрезвычайно трудоёмкая и затратная для текущих исследований, поэтому мы предприняли усилия по её модификации для упрощённого и ускоренного определения подвидов штаммов *F. tularensis*. Для отбора INDEL-маркеров мы использовали расширенный набор штаммов (29) разных подвидов из базы данных GenBank, включающий единственный штамм подвида *mediasiatica* (FSC147). Основными условиями для выбора INDEL-маркеров являлись размер не менее 7 п.н. и значимость для дифференциации подвидов. На завершающем этапе были отобраны 5 маркеров, позволивших выявить у 29 штаммов *F. tularensis* из базы данных GenBank 9 индивидуальных генотипов с индексом разнообразия (DI = 0,85). Филогенетический анализ продемонстрировал разделение подвидов *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* и *novicida* по разным кластерам, причём подвид *tularensis* чётко разделен на подгруппы А.І и А.ІІ. Не удалось установить точную принадлежность штамма O'HARA, очевидно, из-за отсутствия данных по одному из локусов в базе данных GenBank. Важно отметить, что топология разных подвидов полностью коррелирует со схемами эволюции туляремийного микроба, построенными ранее при анализе постепенной утраты регионов различия и при полногеномном секвенировании [3].

Предлагаемая нами схема INDEL-типирования была апробирована *in vitro* на 27 штаммах *F. tularensis* разных подвидов из МЖК (табл. 3). Показано, что штаммы подвида *holarctica* составляют единый кластер со штаммами этого подвида из базы данных GenBank, а штаммы подвида *mediasiatica* подтверждают существование обособленного кластера этого подвида, включающего единственный штамм из базы данных GenBank (рис. 2). При кла-

стеризации подвида *tularensis* штаммы из МЖК впервые удаётся *in vitro* разделить на группы А.I и А.II (табл. 3). Генотип «японских» штаммов *holarctica* bv *японика* (МЖК) совпадает с генотипом штамма FSC022, который вместе со штаммом RHIT-FT049 входит в отдельный кластер bv *японика*. Музейный штамм *F. novicida* принадлежит кластеру штаммов подвида *novicida*.

Заключение

Таким образом, нами впервые разработана схема дифференциации подвигов *F. tularensis* на основе метода INDEL-типирования, позволяющая *in vitro* без необходимости секвенирования штаммов идентифицировать как подвигов *F. tularensis* (*tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* и *novicida*), так и группы штаммов внутри подвигов. Топология филогенетического дерева INDEL-генотипов штаммов *F. tularensis* коррелирует со схемами эволюции туляремийного микроба [3]. Способ защищён патентом [37]. Предлагаемый метод может быть применён для комбинированного типирования штаммов *F. tularensis* совместно с MLVA- или SNP-типированием.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Hopla C.E., Hopla A.K. Tularemia. In: Beran G.W., ed. *Handbook of Zoonoses*. Boca Raton, FL.: CRC Press; 1994: 113–26.
- Centers for Disease Control and Prevention, Office of Inspector General, Department of Health and Human Services (HHS). Possession, use, and transfer of select agents and toxins. Final rule. *Fed. Regist.* 2017; 82(12): 6278–94.
- Keim P., Johansson A., Wagner D.M. Molecular epidemiology, evolution, and ecology of *Francisella*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2007; 1105: 30–66. <https://doi.org/10.1196/annals.1409.011>
- Олсуфьев Н.Г., Мешерякова И.С. Внутривидовая таксономия возбудителя туляремии *Francisella tularensis*. *Журнал гигиены эпидемиологии микробиологии иммунологии*. 1982; (26): 291–9.
- Олсуфьев Н.Г. *Таксономия, микробиология и лабораторная диагностика возбудителя туляремии*. М.: Медицина; 1975.
- Мокриевич А.Н., Тимофеев В.С., Кудрявцева Т.Ю., Уланова Г.И., Карбышева С.Б., Миронова Р.И. и др. Выделение среднеазиатского подвида туляремийного микроба на территории Алтайского края. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2013; (1): 66–9. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2013-1-66-69>
- Whipp M.J., Davis J.M., Lum G., de Boer J., Zhou Y., Bearden S.W., et al. Characterization of a *novicida*-like subspecies of *Francisella tularensis* isolated in Australia. *J. Med. Microbiol.* 2003; 52(Pt. 9): 839–42. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.05245-0>
- Johansson A., Farlow J., Larsson P., Dukerich M., Chambers E., Bystrom M., et al. Worldwide genetic relationships among *Francisella tularensis* isolates determined by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. *J. Bacteriol.* 2004; 186(17): 5808–18. <https://doi.org/10.1128/JB.186.17.5808-5818.2004>
- Farlow J., Wagner D.M., Dukerich M., Stanley M., Chu M., Kubota K., et al. *Francisella tularensis* in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 2005; 11(12): 1835–41. <https://doi.org/10.3201/eid1112.050728>
- Staples J.E., Kubota K.A., Chalcraft L.G., Mead P.S., Petersen J.M. Epidemiologic and molecular analysis of human tularemia, United States, 1964–2004. *Emerg. Infect. Dis.* 2006; 12(7): 1113–8. <https://doi.org/10.3201/eid1207.051504>
- Svensson K., Larsson P., Johansson D., Bystrom M., Forsman M., Johansson A. Evolution of subspecies of *Francisella tularensis*. *J. Bacteriol.* 2005; 187(11): 3903–8. <https://doi.org/10.1128/JB.187.11.3903-3908.2005>
- Fey P.D., Dempsey M.M., Olson M.E., Chrustowski M.S., Engle J.L., Jay J.J., et al. Molecular analysis of *Francisella tularensis* subspecies *tularensis* and *holarctica*. *Am. J. Clin. Pathol.* 2007; 128(6): 926–35. <https://doi.org/10.1309/JN3NTHK4VVVWVKJT4A>
- Dempsey M.P., Niefeldt J., Ravel J., Hinrichs S., Crawford R., Benson A.K. Paired-end sequence mapping detects extensive genomic rearrangement and translocation during divergence of *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* and *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* populations. *J. Bacteriol.* 2006; 188(16): 5904–14. <https://doi.org/10.1128/JB.00437-06>
- García Del Blanco N., Dobson M.E., Vela A.I., De La Puente V.A., Gutiérrez C.B., Hadfield T.L., et al. Genotyping of *Francisella tularensis* strains by pulsed field gel electrophoresis, amplified fragment length polymorphism fingerprinting, and 16S rRNA gene sequencing. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(8): 2964–72. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.8.2964-2972.2002>
- Larsson P., Svensson K., Karlsson L., Guala D., Granberg M., Forsman M., et al. Canonical insertion-deletion markers for rapid DNA typing of *Francisella tularensis*. *Emerg. Infect. Dis.* 2007; 13(11): 1725–32. <https://doi.org/10.3201/eid1311.070603>
- Farlow J., Smith K.L., Wong J., Abrams M., Lytle M., Keim P. *Francisella tularensis* strain typing using multiple-locus, variable number tandem repeat analysis. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39(9): 3186–92. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.9.3186-3192.2001>
- Vogler A.J., Birdsell D., Price L.B., Bowers J.R., Beckstrom-Sternberg S.M., Auerbach R.K., et al. Phylogeography of *Francisella tularensis*: global expansion of a highly fit clone. *J. Bacteriol.* 2009; 191(8): 2474–84. <https://doi.org/10.1128/jb.01786-08>
- Johansson A., Goransson I., Larsson P., Sjostedt A. Extensive allelic variation among *Francisella tularensis* strains in a short sequence tandem repeat region. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39(9): 3140–6. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.9.3140-3146.2001>
- Vogler A.J., Birdsell D., Wagner D.M., Keim P. An optimized, multiplexed multi-locus variable-number tandem repeat analysis system for genotyping *Francisella tularensis*. *Lett. Appl. Microbiol.* 2009; 48(1): 140–4. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.2008.02484.x>
- Timofeev V., Bakhteeva I., Titareva G., Kopylov P., Christy D., Mokrievich A., et al. Russian isolates enlarge the known geographic diversity of *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica*. *PLoS One*. 2017; 12(9): e0183714. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183714>
- Sissonen S., Rossow H., Karlsson E., Hemmila H., Henttonen H., Isomursu M., et al. Phylogeography of *Francisella tularensis* subspecies *holarctica* in Finland, 1993–2011. *Infect. Dis.* 2015; 47(10): 701–6. <https://doi.org/10.3109/23744235.2015.1049657>
- Dwibedi C., Birdsell D., Larkeryd A., Myrtennas K., Ohrman C., Nilsson E., et al. Long-range dispersal moved *Francisella tularensis* into Western Europe from the East. *Microb. Genom.* 2016; 2(12): e000100. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000100>
- Myrtennas K., Marinov K., Johansson A., Niemcewicz M., Karlsson E., Bystrom M., et al. Introduction and persistence of tularemia in Bulgaria. *Infect. Ecol. Epidemiol.* 2016; 6: 32838. <https://doi.org/10.3402/iee.v6.32838>
- Schulze C., Heuner K., Myrtennas K., Karlsson E., Jacob D., Kutzer P., et al. High and novel genetic diversity of *Francisel-*

- la tularensis* in Germany and indication of environmental persistence. *Epidemiol. Infect.* 2016; 144(12): 3025–36. <https://doi.org/10.1017/S0950268816001175>
25. Pilo P. Phylogenetic lineages of *Francisella tularensis* in animals. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2018; 8: 258. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00258>
 26. Larson M.A., Sayood K., Bartling A.M., Meyer J.R., Starr C., Baldwin J., et al. Differentiation of *Francisella tularensis* subspecies and subtypes. *J. Clin. Microbiol.* 2020; 58(4): e01495–19. <https://doi.org/10.1128/JCM.01495-19>
 27. Öhrman C., Sahl J.W., Sjödin A., Unekliint I., Ballard R., Karlsson L., et al. Reorganized genomic taxonomy of *Francisellaceae* enables design of robust environmental PCR assays for detection of *Francisella tularensis*. *Microorganisms.* 2021; 9(1): 146. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010146>
 28. Koene M., Rijks J., Maas M., Ruuls R., Engelsma M., van Tulden P., et al. Phylogeographic distribution of human and hare *Francisella tularensis* subsp. *Holarctica* strains in the Netherlands and its pathology in European brown hares (*Lepus europaeus*). *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2019; 9: 11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00011>
 29. Zhou Z., Alikhan N.F., Sergeant M.J., Luhmann N., Vaz C., Francisco A.P., et al. GrapeTree: visualization of core genomic relationships among 100,000 bacterial pathogens. *Genome Res.* 2018; 28(9): 1395–404. <https://doi.org/10.1101/gr.232397.117>
 30. O'Sullivan M.V., Sintchenko V., Gilbert G.L. Software for selecting the most informative sets of genomic loci for multi-target microbial typing. *BMC Bioinformatics.* 2013; 14: 148. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-148>
 31. Johansson A., Göransson I., Larsson P., Sjöstedt A. Extensive allelic variation among *Francisella tularensis* strains in a short-sequence tandem repeat region. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39(9): 3140–6. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.9.3140-3146.2001>
 32. Vogler A.J., Keys C., Nemoto Y., Colman R.E., Jay Z., Keim P. Effect of repeat copy number on variable-number tandem repeat mutations in *Escherichia coli* O157:H7. *J. Bacteriol.* 2006; 188(12): 4253–63. <https://doi.org/10.1128/JB.00001-06>
 33. Vogler A.J., Keys C.E., Allender C., Bailey I., Girard J., Pearson T., et al. Mutations, mutation rates, and evolution at the hypervariable VNTR loci of *Yersinia pestis*. *Mutat. Res.* 2007; 616(1-2): 145–58. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2006.11.007>
 34. Svensson K., Granberg M., Karlsson L., Neubauerova V., Forsman M., Johansson A. A real-time PCR array for hierarchical identification of *Francisella* isolates. *PLoS One.* 2009; 4(12): e8360. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008360>
 35. Karlsson E., Svensson K., Lindgren P., Byström M., Sjödin A., Forsman M., et al. The phylogeographic pattern of *Francisella tularensis* in Sweden indicates a Scandinavian origin of *Eurosi-berian tularaemia*. *Environ. Microbiol.* 2013; 15(2): 634–45. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12052>
 36. Hunter P.R., Gaston M.A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 1988; 26(11): 2465–6. <https://doi.org/10.1128/jcm.26.11.2465-2466.1988>
 37. Сорокин В.М., Водопьянов А.С., Цимбалистова М.В., Павлович Н.В. Способ дифференциации штаммов *Francisella tularensis* путем молекулярно-генетического типирования. Патент РФ № 2 756 854С1; 2021.
- REFERENCES
1. Hopla C.E., Hopla A.K. Tularemia. In: Beran G.W., ed. *Handbook of Zoonoses*. Boca Raton, FL.: CRC Press; 1994: 113–26.
 2. Centers for Disease Control and Prevention, Office of Inspector General, Department of Health and Human Services (HHS). Possession, use, and transfer of select agents and toxins. Final rule. *Fed. Regist.* 2017; 82(12): 6278–94.
 3. Keim P., Johansson A., Wagner D.M. Molecular epidemiology, evolution, and ecology of *Francisella*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2007; 1105: 30–66. <https://doi.org/10.1196/annals.1409.011>
 4. Olsuf'ev N.G., Meshcheryakova I.S. Intraspecific taxonomy of the causative agent of tularemia *Francisella tularensis*. *Zhurnal gigieny epidemiologii mikrobiologii immunologii.* 1982; (26): 291–9. (in Russian)
 5. Olsuf'ev N.G. *Taxonomy, Microbiology and Laboratory Diagnostics of the Causative Agent of Tularemia [Taksonomiya, mikrobiologiya i laboratornaya diagnostika vzbuditeleya tulyaremii]*. Moscow: Meditsina; 1975. (in Russian)
 6. Mokrievich A.N., Timofeev V.S., Kudryavtseva T.Yu., Ulanova G.I., Karbysheva S.B., Mironova R.I., et al. Isolation of central asian subspecies of tularemia agent in the altai territory. *Problemy osobo opasnykh infektsiy.* 2013; (1): 66–9. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2013-1-66-69> (in Russian)
 7. Whipp M.J., Davis J.M., Lum G., de Boer J., Zhou Y., Bearden S.W., et al. Characterization of a novicida-like subspecies of *Francisella tularensis* isolated in Australia. *J. Med. Microbiol.* 2003; 52(Pt. 9): 839–42. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.05245-0>
 8. Johansson A., Farlow J., Larsson P., Dukerich M., Chambers E., Bystrom M., et al. Worldwide genetic relationships among *Francisella tularensis* isolates determined by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. *J. Bacteriol.* 2004; 186(17): 5808–18. <https://doi.org/10.1128/JB.186.17.5808-5818.2004>
 9. Farlow J., Wagner D.M., Dukerich M., Stanley M., Chu M., Kubota K., et al. *Francisella tularensis* in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 2005; 11(12): 1835–41. <https://doi.org/10.3201/eid1112.050728>
 10. Staples J.E., Kubota K.A., Chalcraft L.G., Mead P.S., Petersen J.M. Epidemiologic and molecular analysis of human tularemia, United States, 1964–2004. *Emerg. Infect. Dis.* 2006; 12(7): 1113–8. <https://doi.org/10.3201/eid1207.051504>
 11. Svensson K., Larsson P., Johansson D., Bystrom M., Forsman M., Johansson A. Evolution of subspecies of *Francisella tularensis*. *J. Bacteriol.* 2005; 187(11): 3903–8. <https://doi.org/10.1128/JB.187.11.3903-3908.2005>
 12. Fey P.D., Dempsey M.M., Olson M.E., Chrustowski M.S., Engle J.L., Jay J.J., et al. Molecular analysis of *Francisella tularensis* subspecies tularensis and holarctica. *Am. J. Clin. Pathol.* 2007; 128(6): 926–35. <https://doi.org/10.1309/JN3NTHK4VVWVKJT4A>
 13. Dempsey M.P., Nietfeldt J., Ravel J., Hinrichs S., Crawford R., Benson A.K. Paired-end sequence mapping detects extensive genomic rearrangement and translocation during divergence of *Francisella tularensis* subsp. tularensis and *Francisella tularensis* subsp. holarctica populations. *J. Bacteriol.* 2006; 188(16): 5904–14. <https://doi.org/10.1128/JB.00437-06>
 14. García Del Blanco N., Dobson M.E., Vela A.I., De La Puente V.A., Gutiérrez C.B., Hadfield T.L., et al. Genotyping of *Francisella tularensis* strains by pulsed field gel electrophoresis, amplified fragment length polymorphism fingerprinting, and 16S rRNA gene sequencing. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(8): 2964–72. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.8.2964-2972.2002>
 15. Larsson P., Svensson K., Karlsson L., Guala D., Granberg M., Forsman M., et al. Canonical insertion-deletion markers for rapid DNA typing of *Francisella tularensis*. *Emerg. Infect. Dis.* 2007; 13(11): 1725–32. <https://doi.org/10.3201/eid1311.070603>
 16. Farlow J., Smith K.L., Wong J., Abrams M., Lytle M., Keim P. *Francisella tularensis* strain typing using multiple-locus, variable number tandem repeat analysis. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39(9): 3186–92. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.9.3186-3192.2001>
 17. Vogler A.J., Birdsell D., Price L.B., Bowers J.R., Beckstrom-Sternberg S.M., Auerbach R.K., et al. Phylogeography of *Francisella tularensis*: global expansion of a highly fit clone. *J. Bacteriol.* 2009; 191(8): 2474–84. <https://doi.org/10.1128/jb.01786-08>

18. Johansson A., Goransson I., Larsson P., Sjöstedt A. Extensive allelic variation among *Francisella tularensis* strains in a short sequence tandem repeat region. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39(9): 3140–6. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.9.3140-3146.2001>
19. Vogler A.J., Birdsell D., Wagner D.M., Keim P. An optimized, multiplexed multi-locus variable-number tandem repeat analysis system for genotyping *Francisella tularensis*. *Lett. Appl. Microbiol.* 2009; 48(1): 140–4. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.2008.02484.x>
20. Timofeev V., Bakhteeva I., Titareva G., Kopylov P., Christia-ny D., Mokrievich A., et al. Russian isolates enlarge the known geographic diversity of *Francisella tularensis* subsp. mediasiatica. *PLoS One.* 2017; 12(9): e0183714. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183714>
21. Sissonen S., Rossow H., Karlsson E., Hemmila H., Henttonen H., Isomursu M., et al. Phylogeography of *Francisella tularensis* subspecies holarctica in Finland, 1993–2011. *Infect. Dis.* 2015; 47(10): 701–6. <https://doi.org/10.3109/23744235.2015.1049657>
22. Dwibedi C., Birdsell D., Larkeryd A., Myrtennas K., Ohrman C., Nilsson E., et al. Long-range dispersal moved *Francisella tularensis* into Western Europe from the East. *Microb. Genom.* 2016; 2(12): e000100. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000100>
23. Myrtennas K., Marinov K., Johansson A., Niemcewicz M., Karlsson E., Bystrom M., et al. Introduction and persistence of tularemia in Bulgaria. *Infect. Ecol. Epidemiol.* 2016; 6: 32838. <https://doi.org/10.3402/iee.v6.32838>
24. Schulze C., Heuner K., Myrtennas K., Karlsson E., Jacob D., Kutzer P., et al. High and novel genetic diversity of *Francisella tularensis* in Germany and indication of environmental persistence. *Epidemiol. Infect.* 2016; 144(12): 3025–36. <https://doi.org/10.1017/S0950268816001175>
25. Pilo P. Phylogenetic lineages of *Francisella tularensis* in animals. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2018; 8: 258. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00258>
26. Larson M.A., Sayood K., Bartling A.M., Meyer J.R., Starr C., Baldwin J., et al. Differentiation of *Francisella tularensis* sub-species and subtypes. *J. Clin. Microbiol.* 2020; 58(4): e01495–19. <https://doi.org/10.1128/JCM.01495-19>
27. Öhrman C., Sahl J.W., Sjödin A., Uneklikt I., Ballard R., Karlsson L., et al. Reorganized genomic taxonomy of Francisellaceae enables design of robust environmental PCR assays for detection of *Francisella tularensis*. *Microorganisms.* 2021; 9(1): 146. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010146>
28. Koene M., Rijks J., Maas M., Ruuls R., Engelsma M., van Tulden P., et al. Phylogeographic distribution of human and hare *Francisella tularensis* subsp. holarctica strains in the Netherlands and its pathology in European brown hares (*Lepus europaeus*). *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2019; 9: 11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00011>
29. Zhou Z., Alikhan N.F., Sergeant M.J., Luhmann N., Vaz C., Francisco A.P., et al. GrapeTree: visualization of core genomic relationships among 100,000 bacterial pathogens. *Genome Res.* 2018; 28(9): 1395–404. <https://doi.org/10.1101/gr.232397.117>
30. O'Sullivan M.V., Sintchenko V., Gilbert G.L. Software for selecting the most informative sets of genomic loci for multi-target microbial typing. *BMC Bioinformatics.* 2013; 14: 148. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-148>
31. Johansson A., Göransson I., Larsson P., Sjöstedt A. Extensive allelic variation among *Francisella tularensis* strains in a short-sequence tandem repeat region. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39(9): 3140–6. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.9.3140-3146.2001>
32. Vogler A.J., Keys C., Nemoto Y., Colman R.E., Jay Z., Keim P. Effect of repeat copy number on variable-number tandem repeat mutations in *Escherichia coli* O157:H7. *J. Bacteriol.* 2006; 188(12): 4253–63. <https://doi.org/10.1128/JB.00001-06>
33. Vogler A.J., Keys C.E., Allender C., Bailey I., Girard J., Pearson T., et al. Mutations, mutation rates, and evolution at the hyper-variable VNTR loci of *Yersinia pestis*. *Mutat. Res.* 2007; 616(1–2): 145–58. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2006.11.007>
34. Svensson K., Granberg M., Karlsson L., Neubauerova V., Forsman M., Johansson A. A real-time PCR array for hierarchical identification of *Francisella* isolates. *PLoS One.* 2009; 4(12): e8360. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008360>
35. Karlsson E., Svensson K., Lindgren P., Byström M., Sjödin A., Forsman M., et al. The phylogeographic pattern of *Francisella tularensis* in Sweden indicates a Scandinavian origin of *Eurosi-berian tularaemia*. *Environ. Microbiol.* 2013; 15(2): 634–45. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12052>
36. Hunter P.R., Gaston M.A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 1988; 26(11): 2465–6. <https://doi.org/10.1128/jcm.26.11.2465-2466.1988>
37. Sorokin V.M., Vodopyanov A.S., Tsimbalistova M.V., Pavlovich N.V. Method of differentiation of *Francisella tularensis* strains by molecular genetic typing. Patent RF № 2 756 854C1; 2021. (in Russian)

Информация об авторах

Сорокин Владимир Михайлович[✉] — к.б.н., с.н.с. лаб. туляремии Ростовского-на-Дону противочумного института, Ростов-на-Дону, Россия, soroka53@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1835-1496>

Водопьянов Алексей Сергеевич — к.м.н., и.о. зав. группой вирусологии Ростовского-на-Дону противочумного института, Ростов-на-Дону, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9056-3231>

Цимбалистова Марина Викторовна — к.м.н., с.н.с. лаб. туляремии Ростовского-на-Дону противочумного института, Ростов-на-Дону, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-4091-649X>

Павлович Наталья Владимировна — д.м.н., г.н.с., и.о. зав. лаб. туляремии Ростовского-на-Дону противочумного института, Ростов-на-Дону, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8287-4294>

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

Статья поступила в редакцию 12.08.2021;
принята к публикации 07.04.2022;
опубликована 30.04.2022

Information about the authors

Vladimir M. Sorokin[✉] — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of tularemia, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute, Rostov-on-Don, Russia, soroka53@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1835-1496>

Alexey S. Vodopyanov — Cand. Sci. (Med.), Deputy head, Group of virology, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute, Rostov-on-Don, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9056-3231>

Marina V. Tsimbalistova — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Laboratory of tularemia, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute, Rostov-on-Don, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-4091-649X>

Natalya V. Pavlovich — D. Sci. (Med.), major researcher, Deputy head, Laboratory of tularemia, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute, Rostov-on-Don, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8287-4294>

Author contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

The article was submitted 12.08.2021;
accepted for publication 07.04.2022;
published 30.04.2022



Безопасность и иммуногенность препарата живой коклюшной вакцины ГамЖВК интраназального применения на экспериментальной модели детёнышей обезьян вида павиан гамадрил

Джидарян А.А.¹, Матуа А.З.¹, Медкова А.Ю.², Семин Е.Г.², Синяшина Л.Н.²,
Дьяков И.Н.^{2,3}, Чернышова И.Н.^{2,3}, Кубрава Д.Т.¹, Амичба А.А.¹,
Конджария И.Г.¹, Миквабиа З.Я.¹, Каратаев Г.И.^{✉2}

¹Научно-исследовательский институт экспериментальной патологии и терапии Академии наук Абхазии, Сухум, Абхазия;

²Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия;

³Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова, Москва, Россия

Аннотация

Введение. В ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России разработана живая коклюшная вакцина ГамЖВК интраназального применения для профилактики коклюша, предназначенная для вакцинации детей младенческого возраста и ревакцинации всех возрастных групп населения. Доклинические исследования на сосунках мышей и крыс и взрослых обезьянах, а также клинические исследования на взрослых добровольцах показали безопасность и эффективность препарата ГамЖВК. Расширение области применения препарата ГамЖВК для вакцинации младенцев требует проведения дополнительных доклинических исследований безопасности и иммуногенности на наиболее адекватной экспериментальной модели детёнышей обезьян вида павиан гамадрил (*Papio hamadryas*).

Цель исследования: изучение безопасности и иммуногенности препарата ГамЖВК при интраназальном одно-, двух и трёхкратном введении детёнышам обезьян *P. hamadryas*.

Материалы и методы. В работе использовали 3 детёнышей обезьян *P. hamadryas* 1–2-месячного возраста, содержащихся в изолированном вольере вместе с матерями. Измерены показатели общего и биохимического анализов крови до и после иммунизации, а также экспериментальной инфекции. В сыворотках крови матерей и детёнышей определяли в динамике значения специфических антител класса IgG методом ИФА и титры общих противокклюшных антител в реакции агглютинации.

Результаты. Интраназальная иммунизация препаратом ГамЖВК детёнышей обезьян *P. hamadryas* привела к формированию специфического гуморального иммунного ответа антител класса IgG (коклюшный токсин + филаментозный гемагглютинин), увеличению титра общих противокклюшных антител в реакции агглютинации, не вызывала местных и общих реакций организма и не изменяла показатели общего и биохимического анализов крови. Экспериментальная инфекция иммунизированных препаратом ГамЖВК детёнышей обезьян *P. hamadryas* не вызывала изменений лабораторных показателей крови и клинических проявлений, характерных для коклюшной инфекции.

Ключевые слова: коклюш, живая коклюшная вакцина, интраназальное применение, обезьяны вида павиан гамадрил, *Papio hamadryas*, экспериментальная модель, иммуногенность, безопасность

Этическое утверждение. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23.07.2010). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Научно-исследовательского института экспериментальной патологии и терапии (Протокол № 3 от 16.02.2018).

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

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

Для цитирования: Джидарян А.А., Матуа А.З., Медкова А.Ю., Семин Е.Г., Синяшина Л.Н., Дьяков И.Н., Чернышова И.Н., Кубрава Д.Т., Амичба А.А., Конджария И.Г., Миквабиа З.Я., Каратаев Г.И. Безопасность и иммуногенность препарата живой коклюшной вакцины ГамЖВК интраназального применения на экспериментальной модели детёнышей обезьян вида павиан гамадрил. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022;99(2):203–214.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-190>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-190>

Safety and immunogenicity of live intranasal pertussis vaccine GamLVP in the experimental infant hamadryas baboon model

Anush A. Djidaryan¹, Alisa Z. Matua¹, Alisa Yu. Medkova², Evgeniy G. Semin², Lyudmila N. Sinyashina², Ilya N. Dyakov^{2,3}, Irina N. Chernyshova^{2,3}, Dzhenni T. Kubrava¹, Astanda A. Amichba¹, Irina G. Kondzariya¹, Zurab Ya. Mikvabiya¹, Gennadiy I. Karataev^{2✉}

¹Research Institute of Experimental Pathology and Therapy of the Academy of Sciences of Abkhazia, Sukhum, Abkhazia;

²National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia;

³I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. The Gamaleya National Center of Epidemiology and Microbiology has developed a live intranasal pertussis vaccine, GamLVP, for protection against whooping cough. It is indicated for vaccination of infants and revaccination of adults of all age groups. Preclinical studies on suckling mice or rats and adult monkeys as well as clinical trials involving adult volunteers demonstrated safety and efficacy of the GamLVP vaccine. The expansion of the GamLVP vaccine to be used for vaccination of infants requires additional preclinical studies to assess its safety and immunogenicity in the most suitable experimental model of infant hamadryas baboons (*Papio hamadryas*).

The **aim** of the study was to assess safety and immunogenicity of the GamLVP vaccine administered intranasally for a single dose, two-dose, and three-dose immunization of *P. hamadryas* infants.

Materials and methods. The study was performed in three 1–2-month-old *P. hamadryas* infants kept, together with their mothers, in a separate cage. The results of the complete blood count and biochemical profile tests were measured before and after the immunization and experimental infection. The enzyme immunoassay (EIA) was used to detect any changes in the levels of specific IgG antibodies in sera from the mothers and infants; the agglutination test (AT) was used to measure titers of total anti-pertussis antibodies.

Results. The intranasal immunization of *P. hamadryas* infants with the GamLVP vaccine triggered development of a specific humoral immune response mediated by IgG antibodies (pertussis toxin + filamentous hemagglutinin), increased titers of total agglutinating anti-pertussis antibodies, caused no local and systemic reactions, caused no changes in the complete blood count and biochemical profile. The experimental infection of the GamLVP-immunized *P. hamadryas* infants did not cause any changes in the laboratory blood test values and any clinical manifestations typical of the pertussis infection.

Keywords: *pertussis, live pertussis vaccine, intranasal administration, hamadryas baboons, Papio hamadryas, experimental model, immunogenicity, safety*

Ethics approval. Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23 July 2010). The research protocol was approved by the Ethics Committee of RIEPT (Protocol No. 3, February 16, 2018).

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Djidaryan A.A., Matua A.Z., Medkova A.Yu., Semin E.G., Sinyashina L.N., Dyakov I.N., Chernyshova I.N., Kubrava D.T., Amichba A.A., Kondzariya I.G., Mikvabiya Z.Ya., Karataev G.I. Safety and immunogenicity of live intranasal pertussis vaccine GamLVP in the experimental infant hamadryas baboon model. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2022;99(2):203–214. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-190>

Введение

Коклюш — высококонтагиозное инфекционное заболевание, передающееся воздушно-капельным путём и вызываемое бактериями *Bordetella pertussis*. Несмотря на успехи вакцинопрофилактики, коклюш продолжает оставаться серьёзной проблемой здравоохранения во всём мире. Разработка и внедрение в практику здравоохранения во второй половине XX в. цельноклеточных коклюшных вакцин (ЦКВ) снизили заболеваемость до единич-

ных случаев на 100 тыс. населения. Эпидемиологический эффект от вакцинации позволил отнести коклюш к категории управляемых инфекций и сформировать общепринятое мнение, что это заболевание находится под сдерживающим контролем прививок. В то же время, наряду со снижением заболеваемости коклюшем, многолетняя массовая иммунизация ЦКВ выявила нежелательные побочные реакции и поствакцинальные осложнения. В ряде стран в 1990-х гг. инициировали отмену вак-

цинации против коклюша, следствием чего стало резкое увеличение заболеваемости, в том числе в тяжёлых формах со смертельным исходом. В экономически развитых странах ЦКВ были заменены на менее реактогенные бесклеточные коклюшные вакцины (БКВ) [1].

Тем не менее заболеваемость коклюшем неуклонно растёт и за последние 20 лет увеличилась почти в 10 раз [1]. Ежегодно регистрируется около 1 млн смертельных случаев, связанных с коклюшем — шестой инфекцией по частоте детской смертности. Наблюдается подъём заболеваемости коклюшем и в странах с высоким уровнем охвата прививками декретированного населения, в том числе в экономически развитых странах [1]. В России наблюдается рост заболеваемости коклюшем с локальными вспышками и формированием очагов разной интенсивности в школьных коллективах. По данным Роспотребнадзора, в 2019 г. число заболевших коклюшем увеличилось почти на 40%¹, и стало в 2,7 раза больше в сравнении с 2018 г.

Поствакцинальный иммунитет, индуцированный современными ЦКВ и БКВ, оказался недостаточно продолжительным, что способствует, по-видимому, росту числа восприимчивых к возбудителю коклюша подростков и взрослых. Увеличивающиеся случаи атипичных форм течения заболевания затрудняют диагностику коклюша. Взрослые являются резервуаром бактерий *B. pertussis* для младенцев и детей старшего возраста, а дети — для взрослых. Наличие неконтролируемого источника коклюшной инфекции, особенно в семьях с новорождёнными и в детских организованных коллективах, диктует необходимость проведения максимально ранней иммунизации и ревакцинации всех возрастных групп населения. Однако в настоящее время вакцинацию против коклюша БКВ или ЦКВ начинают не ранее 2–3-месячного возраста. Иммунизация включает три внутримышечные инъекции с интервалом 1,5 мес и ревакцинацию в 18 мес. Современные вакцины не рекомендуют для новорождённых и детей первых 2 месяцев жизни — наиболее уязвимого возраста для коклюшной инфекции и развития тяжёлых форм заболевания.

В настоящее время увеличивается доля циркулирующих бактерий *B. pertussis* с мутациями в генах, ответственных за синтез протективных антигенов, кодирующих белки, входящие в состав БКВ. Для ревакцинации подростков и взрослых используют только аАКДС (АКДС с бесклеточным коклюшным компонентом). Однако последние исследования выявили бóльшую эффективность бустерной

вакцинации в случае праймирования иммунитета у детей 1-го года жизни АКДС, содержащей ЦКВ, в сравнении с БКВ. Тем не менее в обоих случаях антитела сохранялись не более 1–3 лет, а ревакцинация не обеспечивала противобактерийной защиты. Согласно современным представлениям, для эрадикации возбудителя коклюша необходим не только, а скорее всего, не столько гуморальный иммунный ответ, но клеточный ответ, опосредованный Т-хелперами Th1 и Th17 [1]. В прямых экспериментах на приматах показано, что защита от вирулентных бактерий *B. pertussis* формируется после перенесённой коклюшной инфекции, в меньшей степени от иммунизации ЦКВ, после инъекционной вакцинации обезьян БКВ противобактерийный иммунитет не обнаруживали [2, 3].

Альтернативой ЦКВ и БКВ в настоящее время является разработанный в НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи препарат ГамЖВК (живая вакцина интраназального применения для профилактики коклюша для интраназального применения на основе рекомбинантных аттенуированных бактерий возбудителя коклюша [4]). Подобная рекомбинантная живая коклюшная вакцина разработана и во Франции [5]. Обе живые рекомбинантные коклюшные вакцины находятся в настоящее время на разных стадиях клинических испытаний на взрослых добровольцах. По завершении клинических исследований и получения разрешительных документов препарат ГамЖВК предполагается использовать для ревакцинации подростков и взрослых. Однако в условиях роста заболеваемости коклюшем требуются более интенсивные исследования, направленные на скорейшее внедрение безопасной, удобной для применения интраназальной вакцины, обеспечивающей противобактерийный иммунитет, в практику вакцинации наиболее уязвимой категории — новорождённых и младенцев первых месяцев жизни. В связи с этим, учитывая требования, предъявляемые к препаратам, применяемым для лечения и профилактики заболеваний детей раннего возраста и решения вопроса о проведении клинических исследований препарата ГамЖВК для детей младшего возраста, необходимо проведение доклинических исследований на экспериментальных моделях младенцев лабораторных животных.

Безопасность препарата ГамЖВК была продемонстрирована нами в экспериментах с сосунками мышей и крыс [6]. Второй признанной экспериментальной моделью, наиболее адекватной человеку, являются приматы [7, 8]. Поскольку нами разработана экспериментальная модель коклюшной инфекции на обезьянах вида макак резус (*Macaca mulatta*) и павиан гамадрил (*Papio hamadryas*) и получены доказательства безопасности, иммуногенности и противобактерийной активности препарата ГамЖВК при использовании половозрелых особей

¹ Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2020 году». URL: https://www.rospotrebnadzor.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID = 18266

[8–10], представляется возможным и целесообразным провести доклинические исследования препарата ГамЖВК на младенцах обезьян.

Цель исследования: изучение безопасности и иммуногенности препарата ГамЖВК при интраназальном 1-, 2- и 3-кратном введении детёнышам обезьян вида *P. hamadryas*.

Материалы и методы

Лиофильно высушенный препарат ГамЖВК (живая коклюшная вакцина интраназального применения для профилактики коклюша) приготовлен на производстве ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи и содержит 5×10^9 живых аттенуированных бактерий *B. pertussis* [4].

Суспензию культуры вирулентных бактерий *B. pertussis* 475 готовили непосредственно перед введением. Бактерии *B. pertussis* 475 культивировали на казеино-угольном агаре с кровью в течение 24–36 ч, смывали 0,85% раствором NaCl для приготовления суспензии по стандарту оптической плотности, равной 50 МОЕ. Количество живых бактерий *B. pertussis* 475 определяли методом подсчёта КОЕ на среде с кровью в течение 3–4 сут. Культура с мутностью 50 МОЕ соответствовала количеству порадка 10^{10} КОЕ.

Использовали 3 здоровых детёнышей обезьян *P. hamadryas* в возрасте 5–7 нед, рождённых здоровыми матерями. Номера животных: 32295, 32322, 32317. Детёныши были рождены и содержались вместе с матерями в питомнике НИИЭПит (г. Сухум). В сыворотках крови матерей и детёнышей специфических коклюшных антител не зарегистрировано. В ротоносоглотке ДНК *B. pertussis* не выявлено. Перед отбором животных в исследование по теме 1.8. «Оценка безопасности и иммуногенности препарата живой коклюшной вакцины ГамЖВК интраназального применения на экспериментальной модели младенцев павианов гамадрилов» было получено одобрение приматологической комиссии (Протокол № 4 от 12.02.2018), а проведение эксперимента, исходя из утверждённого плана работы, с соблюдением норм и стандартов по использованию лабораторных животных, было одобрено этическим комитетом НИИЭПит (Протокол № 3 от 16.02.2018). В ходе эксперимента ни одна обезьяна не пострадала.

За состоянием здоровья экспериментальных обезьян наблюдали при ветеринарном осмотре. Обследование матерей и детёнышей включало клинический анализ крови, анализ сыворотки крови на наличие антител к бактериям *B. pertussis*, физикальный осмотр ротоглотки и взвешивание; взятие мазков из зева и носоглотки для анализа; взвешивание детёнышей, их осмотр ветеринарным врачом, определение общего соматического здоровья, состояния ротоглотки, поведения и реакций на внешние факторы.

Экспериментальную работу с животными проводили в соответствии с ГОСТ 33218-2014 РФ и правилами работы с лабораторными животными [12].

Иммунизацию, взятие крови и назофарингеальных мазков у детёнышей проводили без наркоза. Матерей вводили в медикаментозный сон внутримышечным введением 0,03–0,04 мл золетила («Virbac») в концентрации 100 мг/мл (с премедикацией ксилазингидрохлоридом, 20 мг/мл).

Непосредственно перед интраназальным введением во флакон с препаратом ГамЖВК добавляли 0,70 мл стерильного 0,85% раствора NaCl. Лиофилизат растворялся в течение 1 мин, флакон слегка встряхивали и вводили суспензию интраназально по 0,3 мл в каждую ноздрю через шприц объёмом 2 мл с распыляющей насадкой («Shenzhen Bona Pharma Technology»).

Суспензию вирулентных бактерий *B. pertussis*, содержащую 10^{10} КОЕ, вводили по 0,50 мл также в каждую ноздрю.

Детёнышей фиксировали ручную, в положении лёжа на спине и удерживали до полного поступления жидкости в носовые полости. Матерям вирулентные бактерии вводили с использованием наркоза и прижимных клеток [8].

Кровь для анализа у детёнышей брали из паховой вены. Назофарингеальные мазки и ротоглоточные аспираты забирали с помощью назофарингеальных зондов и ротоглоточных тампонов. Кровь и аспираты от матерей отбирали по описанной ранее схеме, с использованием наркоза и прижимных клеток [8].

Образцы крови обрабатывали на автоматическом гематологическом анализаторе «Micros ES 60» («Horibo ABX»). Количество глюкозы измеряли глюкометром «Accu-Chek» («Roche»).

Анализ сыворотки крови на присутствие специфических иммуноглобулинов проводили с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием набора реагентов для определения IgG антител к *B. pertussis* («RIDASCREEN Bordetella IgG»). Для этого заменили Sero G HD конъюгат антител кролика к IgG обезьяны («Abscam»). Адаптированная тест-система, скорее всего, не может быть использована для количественного анализа IgG, но пригодна для оценки динамики изменения показателя. В реакции прямой агглютинации (РПА) применяли набор «Диагностикум коклюшный жидкий» («Эколаб»).

Для молекулярно-биологического анализа использовали ДНК *B. pertussis*, выделенную из смывов заднеглоточных и назофарингеальных зондов. Осадки из этих препаратов после центрифугирования обрабатывали раствором гуанидинтиоцианата с последующей сорбцией ДНК на магнитном сорбенте («Promega») [13, 14]. Для определения количества геном-эквивалентов ДНК *B. pertussis* в аспира-

тах использована разработанная и валидированная нами тест-система полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) [13, 14].

Дизайн исследования

Трём детёнышам *P. hamadryas* интраназально с помощью аэрозольного ингалятора вводили суспензию аттенуированных бактерий *B. pertussis* в количестве 5×10^9 КОЕ (1 доза вакцины ГамЖВК). Первую реиммунизацию проводили через 3,0–3,5 мес после иммунизации, вторую реиммунизацию — ещё через 3,0–3,5 мес. Через 12 мес после второй реиммунизации детёнышей экспериментально инфицировали изогенными вирулентными бактериями возбудителя коклюша (*B. pertussis* 475).

Биоматериал собирали в динамике в следующие сроки:

- перед иммунизацией (фоновые значения) — контрольная точка (к.т.) 1.0;
- через 1 ч после иммунизации (только мазок);
- на 3-й день после иммунизации;
- через 1 нед после иммунизации — к.т. 1.1;
- через 2 нед после иммунизации — к.т. 1.2;
- через 1 мес после иммунизации — к.т. 1.3;
- через 1,5 мес после иммунизации — к.т. 1.4;
- через 2 мес после иммунизации — к.т. 1.5;
- перед первой реиммунизацией — к.т. 2.0;
- через 1 ч после первой реиммунизации (мазок);
- через 3 дня после первой реиммунизации;
- через 1 нед после первой реиммунизации — к.т. 2.1;
- через 2 нед после первой реиммунизации — к.т. 2.2;
- через 1 мес после первой реиммунизации — к.т. 2.3;
- через 1,5 мес после первой реиммунизации — к.т. 2.4;
- через 3–4 мес после первой реиммунизации — к.т. 2.5;
- перед второй реиммунизацией — к.т. 3.0;
- через 1 ч после второй реиммунизации (мазок);
- через 1 нед после второй реиммунизации — к.т. 3.1;
- через 2 нед после второй реиммунизации — к.т. 3.2;
- через 1 мес после второй реиммунизации — к.т. 3.3;
- через 1,5 мес после второй реиммунизации — к.т. 3.4;
- через 3 мес после второй реиммунизации — к.т. 3.5.

В те же сроки, кроме точки «1 ч после введения препарата», брали биоматериал и у матерей. Через 12 мес после второй реиммунизации было проведено экспериментальное инфицирование животных вирулентными изогенными бактериями *B. pertussis*

475. Материал для анализа отбирали в те же сроки, что и после иммунизации.

Результаты

Разработка экспериментальной модели коклюшной инфекции на детёнышах обезьян

Результаты экспериментов с детёнышами обезьян недостаточно описаны в литературе. По этой причине на первом этапе было необходимо определить саму возможность и методы работы с обезьянами младенческого возраста (в 1–2-месячном возрасте). Для решения этой задачи, учитывая социальные особенности поведения животных в семьях с детёнышами, а также имеющийся отрицательный опыт изоляции детёнышей от матерей, было принято решение по изоляции от семьи матерей с детёнышами. Учитывая объём анализов, прежде всего крови, необходимый для оценки безопасности препаратов и оценки развития коклюшной инфекции, в качестве модели были выбраны наиболее крупные, доступные для экспериментов обезьяны вида *P. hamadryas*.

Все обезьяны на начало эксперимента находились в состоянии клинического и соматического здоровья и были серонегативными к антигенам *B. pertussis*. За самками наблюдали во время их беременности и после рождения детёнышей. Даты рождения детёнышей отличались у разных самок, в связи с этим иммунизацию и соответствующее обследование обезьян проводили в разное время.

В эксперимент были включены 3 самки обезьян *P. hamadryas*, каждая со своим детёнышем. Нумерация обезьян осуществлялась в месячном возрасте в связи с невозможностью более раннего отлучения детёнышей от матери. В документах отмечали номер регистрации матери, отца, расположение семьи и номер детёныша. По достижении малышами месячного возраста мать с детёнышем загоняли в прижизненную клетку. Мать вводили в медикаментозный сон, а детёныша переносили в манипуляционную комнату для осуществления всех требуемых процедур. Все манипуляции с детёнышем проводили на заранее подготовленной одноразовой пелёнке. Перенос детёныша и все манипуляции контролировал ветеринарный врач. Манипуляции со спящей матерью (взятие мазков, крови, осмотр врачом) проводили в отдельной комнате. Детёныша возвращали матери до её пробуждения. Матери с детёнышами, участвующие в эксперименте, находились в общем помещении (загоне), отдельно от остальных членов семей на протяжении всего времени наблюдения.

Безопасность интраназального введения обезьян ГамЖВК

Для решения поставленной задачи нами разработан следующий дизайн исследования. Препарат

ГамЖВК вводили в положении лёжа на спине интраназально в каждую ноздрю через шприц с распылителем-актуатором по 0,3 мл суспензии, содержащей $4-5 \times 10^9$ КОЕ.

Детёнышам проводили первичную иммунизацию в возрасте 1 мес и в более позднем возрасте — 2 реиммунизации с интервалом 3,0–3,5 мес. Через 12 мес после второй реиммунизации детёнышей экспериментально инфицировали изогенными вирулентными бактериями возбудителя коклюша.

Критериями оценки безопасности препарата ГамЖВК и введения вирулентных бактерий *B. pertussis* 475 служило отсутствие отклонений от нормы клинического анализа крови, состояния здоровья обезьян — отсутствие местных реакций, потери массы и изменения поведения. За поведением детёнышей и матерей регулярно наблюдали на протяжении всего срока эксперимента.

На протяжении всего периода наблюдения не было выявлено отклонений в состоянии здоровья и развитии детёнышей, в том числе не было обнаружено признаков кашля, изменения температуры и нарушения прироста массы, местных реакций на каждое из трёх интраназальных введений ГамЖВК и экспериментальное инфицирование. Результаты общего клинического анализа крови в первые 2 нед наблюдения — сроки, определённые как наиболее значимые по результатам предыдущих исследований на взрослых животных, приведены в **таблице**. Не было отмечено значимого изменения СОЭ и общего соматического состояния и анализов крови у матерей (результаты приведены только после экспериментальной инфекции), находящихся в постоянном контакте с иммунизированными детёнышами.

Иммуногенность ГамЖВК после интраназального введения детёнышам обезьян и их экспериментального инфицирования *B. pertussis*

Во всех описанных нами ранее исследованиях анализ сыворотки крови обезьян на присутствии специфических иммуноглобулинов проводили с помощью наборов реагентов («RIDASCREEN Bordetella IgG»), предназначенных для ИФА сыворотки крови человека [6, 8–10]. Для адаптации тест-системы к иммуноглобулинам произведена замена конъюгата антител кролика к IgG человека, входящего в набор, на конъюгат антител кролика к IgG обезьяны. Подбор рабочих разведений конъюгата и анализируемой сыворотки был проведён в результате постановок контрольных реакций ИФА с использованием планшетов со специфическими антигенами — коклюшным токсином (КТ) и filamentозным гемагглютинином (ФГА) — и конъюгата антител кролика к IgG обезьяны. В качестве стандарта использованы отобранные и охарактеризованные ранее сыворотки крови контрольных обезьян и обезьян, экспериментально инфицированных вирулентными бактериями *B. pertussis*. Для постановки реакции ИФА на модифицированном наборе определено рабочее разведение конъюгата 1 : 40 000 и сыворотки крови 1 : 20.

На **рис. 1** представлены результаты определения оптической плотности (ОП) в лунках планшет ИФА, содержащих разведённые сыворотки иммунизированных обезьян, в динамике после первого интраназального введения ГамЖВК и двух реиммунизаций. Значения ОП принимали в качестве характеристики содержания антител IgG в исследуемом образце. После первой иммунизации толь-

Биохимический анализ крови павианов гамадрилов после интраназальной иммунизации аттенуированными бактериями *B. pertussis* и экспериментальной инфекции вирулентными бактериями *B. pertussis* 475

Biochemical profile test results for hamadryas baboons after the intranasal immunization with attenuated bacteria *B. pertussis* and the experimental infection with virulent bacteria *B. pertussis* 475

Интраназальная инокуляция Intranasal inoculation		Срок исследования, сут Timing, days	Глюкоза, ммоль/л Glucose, mmol/L	Лейкоциты, × 1000 Leukocytes, × 1000	Лимфоциты, % Lymphocytes, %
Первая иммунизация детёнышей First immunization of infants		Фон / Background	6,8 ± 0,8	10,8 ± 2,9	59,5 ± 7,4
		7	7,5 ± 1,2	11,5 ± 1,7	50,7 ± 3,7
		14	6,7 ± 0,7	10,1 ± 1,5	63,5 ± 7,8
Первая реиммунизация детёнышей Repeat immunization of infants		Фон / Background	7,4 ± 1,6	9,5 ± 2,2	35,5 ± 2,0
		7	6,3 ± 0,9	13,4 ± 3,7	29,5 ± 5,2
		14	6,7 ± 1,4	12,1 ± 4,9	22,9 ± 6,3
Экспериментальная инфекция бактериями <i>B. pertussis</i> 475 иммунизированных детёнышей и взрослых обезьян Experimental infection of immunized infants and adult monkeys with <i>B. pertussis</i> bacteria 475	детёныши infants monkeys	Фон / Background	6,5 ± 0,8	13,8 ± 3,1	58,5 ± 10,7
		7	6,1 ± 0,3	10,2 ± 1,7	40,5 ± 12,4
		14	7,0 ± 1,2	13,0 ± 1,7	41,7 ± 9,5
Экспериментальная инфекция матерей Experimental infection of mothers	матери mothers	Фон / Background	7,5 ± 0,5	20,5 ± 3,6	31,5 ± 2,0
		7	8,0 ± 1,5	11,9 ± 4,7	35,0 ± 2,0
		14	7,7 ± 1,0	10,6 ± 0,7	31,0 ± 2,0

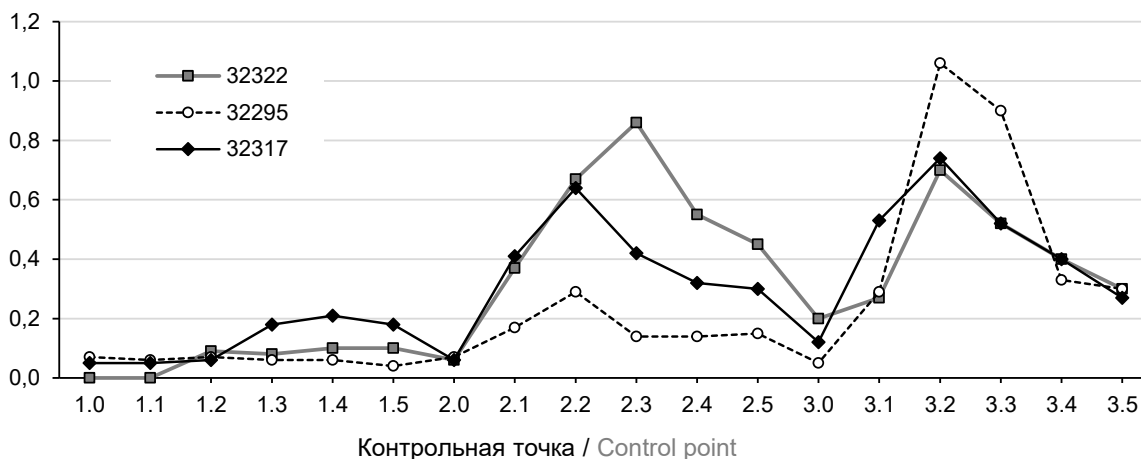


Рис. 1. Динамика изменения количества специфических коклюшных иммуноглобулинов класса IgG (КТ + ФГА) в сыворотке крови детёнышей обезьян после интраназального введения ГамЖВК.

По оси ординат — ОП в лунке (среднее из 2 повторов), отн. ед.

Fig. 1. Changes in the level of specific pertussis IgG immunoglobulins (PT + FHA) in sera from infant monkeys after the intranasal application of the GamLVP vaccine.

Vertical axis — OD in the well (the mean of 2 repeats), rel. units.

ко у одного детёныша зарегистрировано некоторое количество фоновых антител IgG, достигающее максимума к 28–43-му дню. После 2 последующих реиммунизаций значимый рост специфических IgG наблюдался спустя 1 нед и достигал максимума через 14–30 дней после первой реиммунизации и 7–14 дней — после второй.

В РПА определяли титры противокклюшных антител, образовавшихся в ответ на интраназальное введение препарата ГамЖВК. Для постановки реакции использовали суспензию бактерий *B. pertussis* и различные разведения сыворотки крови иммунизи-

рованных обезьян. После первой иммунизации агглютинация сывороткой практически отсутствовала, тогда как после двух реиммунизаций быстро нарастала и достигала максимума через 14–30 дней (**рис. 2**).

Через 12 мес после второй реиммунизации было проведено экспериментальное инфицирование животных вирулентными изогенными бактериями *B. pertussis* 475. Количество специфических IgG (КТ + ФГА) и титр агглютинации у матерей и детёнышей после экспериментальной инфекции достигали максимума уже к 14-му дню и сохранялись на высоком уровне до конца наблюдения (**рис. 3, 4**).

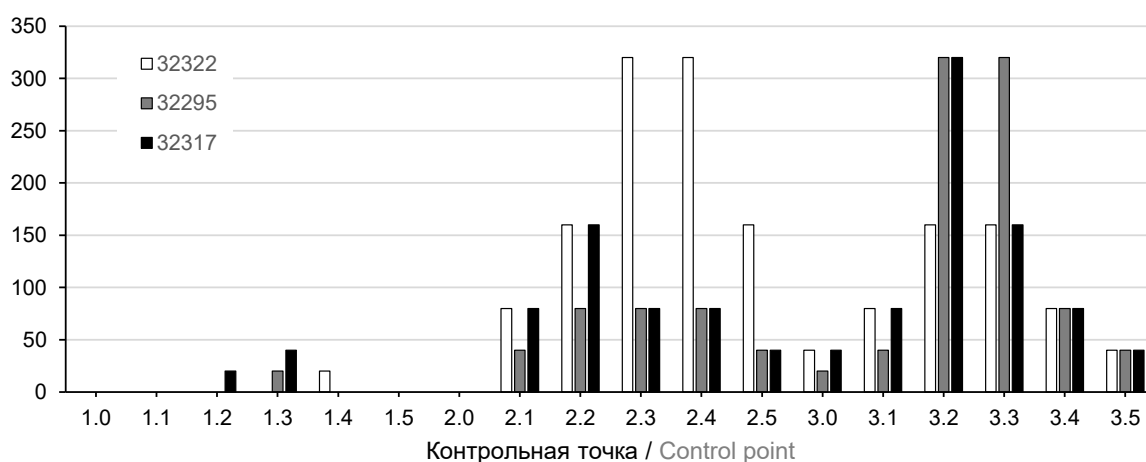


Рис. 2. Динамика изменения титров агглютинации с сывороткой крови младенцев обезьян в РПА после интраназального введения препарата ГамЖВК.

По оси ординат — максимальные титры агглютинации с бактериями *B. pertussis*. Агглютинация контрольных культур *B. pertussis* с сывороткой крови матерей 31949, 31993 отсутствовала.

Fig. 2. Changes in titers of agglutination with sera from infant monkeys in DAT after intranasal immunization with the GamLVP vaccine.

Vertical axis — the highest titers of agglutination with bacteria *B. pertussis*. Agglutination of control *B. pertussis* cultures with sera from mothers 31949, 31993 was absent.

Обсуждение

Проведённые нами ранее доклинические исследования показали, что неоднократное интраназальное введение препарата ГамЖВК взрослым

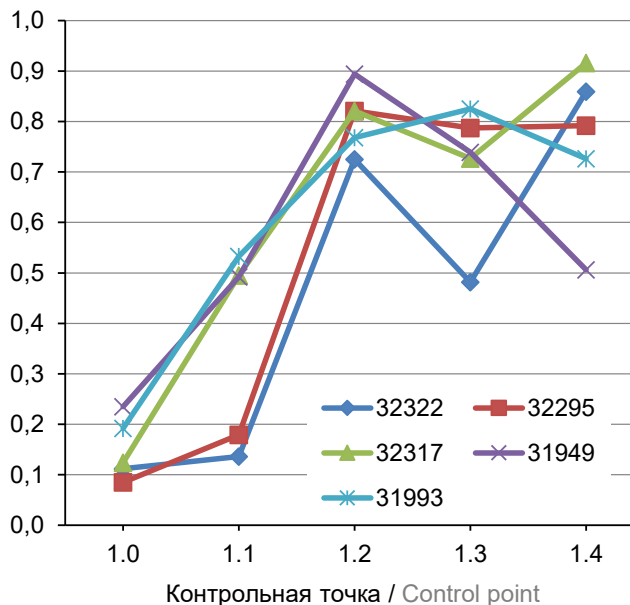


Рис. 3. Динамика изменения количества специфических коклюшных иммуноглобулинов класса IgG (КТ + ФГА) в сыворотках крови у иммунизированных младенцев обезьян и их матерей после экспериментального инфицирования вирулентными бактериями *B. pertussis* 475.

По оси абсцисс — ОП в лунке, отн. ед.; 31949 — мать детёныша 32317; 31993 — мать детёныша 32295.

Fig. 3. Changes in the levels of specific pertussis IgG immunoglobulins (PT + FHA) in sera from immunized infant monkeys and their mothers after the experimental infection with virulent bacteria *B. pertussis* 475.

Horizontal axis — OD in the well, rel. units; 31949 — the infant's mother 32317; 31993 — the infant's mother 32295.

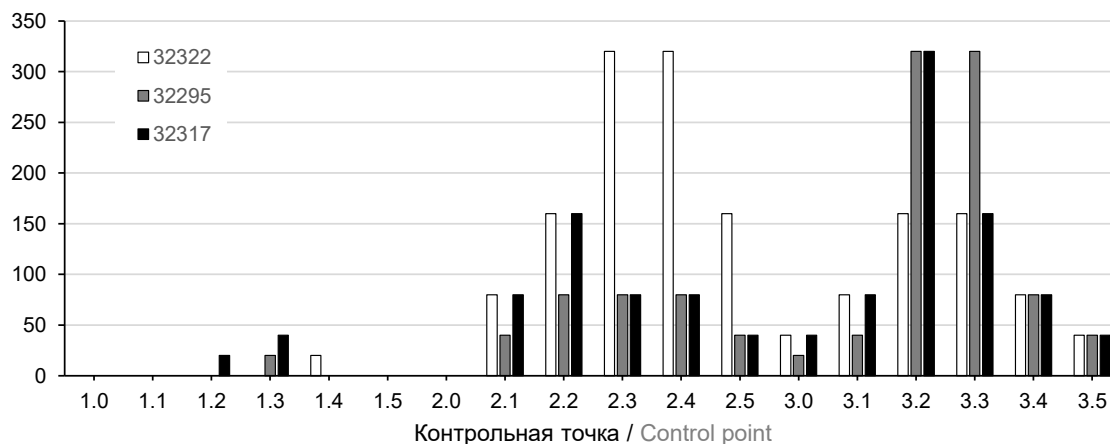


Рис. 4. Динамика изменения титров агглютинации в сыворотках крови у иммунизированных младенцев обезьян и их матерей после экспериментального инфицирования вирулентными бактериями *B. pertussis* 475.

По оси абсцисс — ОП в лунке, отн. ед.; 31949 — мать детёныша 32317; 31993 — мать детёныша 32295.

Fig. 4. Changes in agglutination titers in sera from immunized infant monkeys and their mothers after the experimental infection with virulent bacteria *B. pertussis* 475.

Horizontal axis — OD in the well, rel. units; 31949 — the infant's mother 32317; 31993 — the infant's mother 32295.

обезьянам не вызывало отклонений от нормы соматического здоровья и изменения поведения. Последующее экспериментальное инфицирование вирулентными бактериями *B. pertussis* иммунизированных обезьян не приводило к формированию клинических и лабораторных показателей течения коклюшной инфекции [8–10]. Полученные нами данные указывали на безопасность, хорошую переносимость и иммуногенность препарата ГамЖВК. Результаты 2 этапов клинического исследования ГамЖВК на здоровых добровольцах подтвердили сделанный вывод.

Экспериментальное инфицирование нативных (контрольных, неиммунизированных) обезьян сопровождалось развитием ряда клинических симптомов и лабораторных показателей развития коклюшной инфекции и формирования иммунного ответа, соответствующих течению коклюша у людей [8–10]. Наблюдения за детёнышами и матерями *P. hamadryas*, проведённые в настоящем исследовании, также не выявили отклонения от нормы или динамических изменений измеренных параметров, в том числе увеличения количества лимфоцитов и снижения уровня глюкозы, характерных при развитии коклюшной инфекции у обезьян и человека. Из-за невозможности отбора более 1 мл крови удалось выполнить только общий анализ крови и определить глюкозу с помощью глюкометра. Представленные результаты подтверждают безопасность и хорошую переносимость ГамЖВК — отсутствие местных и общих реакций, стабильность всех измеренных показателей: общего и биохимического анализов крови после трехкратного интраназального введения детёнышам *P. hamadryas*.

Особенностью работы с использованной экспериментальной моделью является ограничение

на взятие необходимых для исследования объёмов крови в возрасте 1 мес, а также физиологическая и психологическая привязанность матерей и детёнышей. Это обстоятельство было учтено при выборе параметров для анализа, особенно после первичной иммунизации. В качестве приоритетных для оценки показателей безопасности и иммуногенности выбраны приведённые в работе показатели. На следующем этапе предполагается провести оценку недостающих параметров безопасности (аланин- и аспаратаминотрансферазы).

Предыдущий этап исследования с использованием половозрелых обезьян показал, что экспериментальное инфицирование после иммунизации препаратом ГамЖВК вирулентными бактериями *B. pertussis* приводит к формированию защитной реакции организма, проявляющейся в выраженном росте специфических IgG, достигающем максимума спустя 7–14 дней после вторичной иммунизации или повторного инфицирования, и ускоренному выведению бактерий *B. pertussis* из ротоносоглотки [8]. Аналогичную картину наблюдали после реиммунизации обезьян препаратом ГамЖВК [8–10]. При клинических исследованиях ГамЖВК также наблюдали нарастающий после повторной вакцинации добровольцев иммунный ответ [15].

Для характеристики иммунного ответа детёнышей обезьян нами использована тест-система «RIDASCREEN Bordetella IgG», предназначенная для ИФА сыворотки крови человека [6, 8–10]. Однако приобретённые у того же производителя тест-системы другого лота не выявляли антител IgG в сероположительных сыворотках крови взрослых обезьян видов *P. hamadryas* и *M. mulatta*. Консультации с производителем позволили предположить, что отрицательный результат связан с отсутствием связывания конъюгата к IgG человека у нового лота набора с иммуноглобулином обезьяны. Этот результат потребовал замены конъюгата человека на конъюгат обезьяны *M. mulatta*. На рис. 1 представлены результаты измерения специфических коклюшных антител класса IgG с помощью модифицированной нами тест-системы. Наблюдаемая на рис. 1 картина не имеет принципиальных отличий от динамики нарастания IgG-антител после иммунизации взрослых обезьян и добровольцев [6, 8–10]. Как и в первом случае, только у части обезьян зарегистрированы некоторое количество фоновых антител IgG после первой иммунизации и значительное нарастание при реиммунизациях.

Ещё одним используемым в настоящее время методом определения иммуногенности коклюшных вакцин является определение титров агглютинации с суспензией бактерий *B. pertussis* с разведениями сывороток крови иммунизированных людей и животных. Значение 1 : 160 заложено в национальном стандарте России в качестве определяющего

при оценке защитной активности ЦКВ при полном курсе первичной вакцинации детей². Результаты, представленные на рис. 2, показывают, что динамика изменения титров агглютинации качественно не отличается от изменения количества антител IgG в сыворотке крови обезьян. У 2 из 3 детёнышей после первичной иммунизации не зарегистрировано роста титра в РПА и сывороточных специфических коклюшных антител класса IgG. У детёныша № 32317 через 1,5 мес зарегистрировали четырёхкратное увеличение антител IgG в сравнении с базовым значением и рост титра в ПА до значения 1 : 40. Через 3 мес количество IgG и значение титра агглютинации снизились до исходного уровня.

Повторное введение вакцины (реиммунизация) всем 3 детёнышам обезьян привело к значительно более раннему росту антител IgG в сыворотке крови. У всех детёнышей значимый рост IgG отмечали уже через 1 нед с максимумом на 2–4 нед. Через 6 мес после первичной иммунизации только одна обезьяна сохраняла уровень IgG достоверно выше исходного. Результаты третьего введения (вторая реиммунизация) принципиально не отличались от второго, как и после экспериментального инфицирования, подобно взрослым обезьянам. При этом у детёнышей значения титров антител IgG достигали максимума после первичного введения несколько позже (через 14–28 дней), чем у взрослых обезьян (7–14 дней). После второй реиммунизации IgG у детёнышей выходили на максимум уже через 7–14 дней. Следует отметить, что реиммунизации через 3,0–3,5 мес при последующем выраженном бустерном эффекте проводились на фоне низкого, близкого к фоновому уровню IgG. После повторных введений ГамЖВК детёнышам у контактировавших с ними матерей не было зарегистрировано значительного роста IgG и увеличения титра агглютинации в РПА.

Таким образом, интраназальная иммунизация детёнышей обезьян *P. hamadryas* препаратом ГамЖВК приводила к формированию противокклюшного иммунного ответа, характеризующегося нарастанием количества специфических IgG (КТ + ФГА) и титров антител в РПА. Бустерный эффект повторной иммунизации свидетельствовал о целесообразности реиммунизации с целью достижения максимального защитного эффекта. Полученные результаты соответствовали описанным нами ранее у взрослых обезьян [8–10] и позволяют предположить, что, несмотря на невысокие средние

² Методические указания «3.1. Профилактика инфекционных болезней. Организация и проведение серологического мониторинга состояния коллективного иммунитета к инфекциям, управляемым средствами специфической профилактики (дифтерия, столбняк, коклюш, корь, краснуха, эпидемический паротит, полиомиелит, гепатит В)».

URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200088401>

значения уровня антител IgG (КТ + ФГА) в ИФА и общих противокклюшных антител в РПА, первичная иммунизация детёнышей обезьян препаратом ГамЖВК способна обеспечивать защитный иммунный ответ при повторном контакте с коклюшной инфекцией. Эффективность одно- или двукратно-го первичного введения препарата ГамЖВК для формирования напряжённого и более продолжительного противобактерийного иммунитета предполагается изучать в дальнейших исследованиях при помощи экспериментальной модели обезьян и в клинических исследованиях на здоровых добровольцах.

Через 12 мес после второй реиммунизации проведено экспериментальное инфицирование детёнышей обезьян вирулентными изогенными бактериями *B. pertussis* 475. Динамика изменения содержания антител IgG (КТ + ФГА) у детёнышей соответствовала описанной нами ранее у взрослых обезьян [9]. Особенный интерес представлял быстрый и значительный рост антител IgG в сыворотке крови матерей при их практическом отсутствии на протяжении всего срока после иммунизации детёнышей. Рост титров антител в сыворотке матерей отмечен примерно в те же сроки, что и у детёнышей, — на 14-й и 28-й дни после инфекции (рис. 4), но был менее выраженным и быстрее возвращался к первоначальному уровню. Быстрое увеличение уровня специфических антител в сыворотке крови матерей после экспериментального инфицирования свидетельствует о возможной пассивной иммунизации матерей при тесном контакте с иммунизированными детёнышами. В пользу такого предположения свидетельствует отсутствие лабораторных показателей и клинических признаков коклюшной инфекции у матерей после экспериментальной инфекции вирулентными бактериями.

Напряжённость и длительность формирования защитного иммунитета от коклюша после вакцинации и/или перенесённой инфекции оценивается по наличию гуморального и клеточного противобактерийного ответа. Во втором случае, говоря о противокклюшном иммунитете, прежде всего оценивают индуцированную продукцию интерферона и интерлейкина-17 полиморфноядерными клетками крови [1]. Такая работа была проведена нами ранее в доклинических экспериментах со взрослыми обезьянами и осуществляется в настоящее время в рамках клинических исследований на здоровых добровольцах [9, 15]. Однако наиболее адекватное представление о защитном потенциале препарата ГамЖВК, с нашей точки зрения, может дать сравнительный показатель времени элиминации бактерий *B. pertussis* (вирулентных и/или аттенуированных) у иммунизированных и нативных животных.

В дальнейшем планируется изучение структуры популяции аттенуированных бактерий

B. pertussis и их персистенции в организме. Скорость элиминации бактерий *B. pertussis* и динамика измерения количества их ДНК в назофарингеальных и ротоглоточных аспиратах будет изучена с помощью метода ПЦР-РВ и созданной нами тест-системы.

Заключение

Отсутствие местных и общих реакций организма у детёнышей обезьян вида *P. hamadryas*, а также стабильность показателей клинических анализов крови и выраженный бустерный эффект после реиммунизации и экспериментального инфицирования свидетельствуют о наличии защитной реакции организма детёнышей, иммунизированных препаратом ГамЖВК, от коклюшной инфекции и подтверждают его безопасность при интраназальном введении. Наличие бустерного антительного ответа после экспериментального инфицирования у неиммунизированных матерей, которые находились в тесном контакте с иммунизированными детёнышами, указывает на формирование у матерей противобактерийного иммунного ответа.

Созданный нами препарат ГамЖВК на основе аттенуированных бактерий *B. pertussis* представляется наиболее перспективным для формирования коллективного иммунитета против коклюша и так называемого семейного «коккона».

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Kilgore P.E., Salim A.M., Zervos M.J., Schmitt H.J. Pertussis: microbiology, disease, treatment, and prevention. *Clin. Microbiol. Rev.* 2016; 29(3): 449–85. <https://doi.org/10.1128/cmr.00083-15>
2. Warfel J.M., Zimmerman L.I., Merkel T.J. Comparison of three whole-cell pertussis vaccines in the baboon model of pertussis. *Clin. Vaccine Immunol.* 2015; 23(1): 47–54. <https://doi.org/10.1128/cvi.00449-15>
3. Warfel J.M., Zimmerman L.I., Merkel T.J. Acellular pertussis vaccines protect against disease but fail to prevent infection and transmission in a nonhuman primate model. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2014; 111(2): 787–92. <https://doi.org/10.1073/pnas.1314688110>
4. Сёмин Е.Г., Синяшина Л.Н., Медкова А.Ю., Каратаев Г.И. Конструирование рекомбинантных аттенуированных бактерий *Bordetella pertussis* генотипа *ptxP3*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2018; (4): 33–41. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-4-33-41>
5. Li R., Lim A., Ow S.T., Phoon M.C., Loch C., Chow V.T., et al. Development of live attenuated *Bordetella pertussis* strains expressing the universal influenza vaccine candidate M2e. *Vaccine.* 2011; 29(33): 5502–11. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.05.052>
6. Синяшина Л.Н., Сёмин Е.Г., Медкова А.Ю., Сюндюкова Р.А., Каратаев Г.И. Доклиническое исследование токсичности и безопасности кандидатной живой коклюшной вакцины интраназального применения. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2018; 17(6): 98–108. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2018-17-6-98-108>
7. Warfel J.M., Beren J., Kelly V.K., Lee G., Merkel T.J. Nonhuman primate model of pertussis. *Infect. Immun.* 2012; 80(4): 1530–6. <https://doi.org/10.1128/iai.06310-11>

8. Кубрава Д.Т., Медкова А.Ю., Сinyaшина Л.Н., Шевцова З.В., Матуа А.З., Конджария И.Г. и др. Экспериментальный коклюш у обезьян. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2013; 68(8): 28–33. <https://doi.org/10.15690/vramn.v68i8.720>
9. Медкова А.Ю., Сinyaшина Л.Н., Амичба А.А., Семин Е.Г., Шевцова З.В., Матуа А.З. и др. Доклинические исследования безопасности, иммуногенности и защитной активности аттенуированных бактерий *Bordetella pertussis* на экспериментальной модели *Macaca mulatta*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020; 97(4): 312–23. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-4-3>
10. Каратаев Г.И., Сinyaшина Л.Н., Медкова А.Ю., Семин Е.Г., Шевцова З.В., Матуа А.З. и др. Инсерционная инактивация оперона вирулентности в популяции персистирующих бактерий *Bordetella pertussis*. *Генетика*. 2016; 52(4): 422–30. <https://doi.org/10.7868/S0016675816030085>
11. Медкова А.Ю., Лиджиева А.А., Семин Е.Г., Сinyaшина Л.Н., Сюндюкова Р.А., Дьяков И.Н. и др. Клинические исследования безопасности и переносимости живой вакцины интраназального применения для профилактики коклюша. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021; 10(1): 114–9. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-1-114-119>
12. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Eighth Edition*. Washington: The National Academies Press; 2011.
13. Медкова А.Ю., Сinyaшина Л.Н., Румянцева Ю.П., Воронина О.Л., Кунда М.С., Каратаев Г.И. Накопление авирулентных инсерционных Bvg-мутантов *Bordetella pertussis* при экспериментальной инфекции лабораторных мышей. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2013; (4): 22–6.
14. Нестерова Ю.В., Медкова А.Ю., Бабаченко И.В., Семин Е.Г., Калисникова Е.Л., Сinyaшина Л.Н. и др. Клинико-диагностическое значение генетических маркеров *Bordetella pertussis* у контактных лиц в семейных очагах. *Журнал инфектологии*. 2019; 11(1): 17–24. <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2019-11-1-17-24>
15. Медкова А.Ю., Лиджиева А.А., Семин Е.Г., Сinyaшина Л.Н., Сюндюкова Р.А., Снегирёва Н.А. и др. Иммуногенность препарата «Живая вакцина интраназального применения для профилактики коклюша» (ГамЖВК) при однократном применении у здоровых добровольцев. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021; 98(6): 706–20. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-194>
- bacteria of *ptxP3* genotype. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2018; (4): 33–41. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-4-33-41> (in Russian)
5. Li R., Lim A., Ow S.T., Phoon M.C., Loch C., Chow V.T., et al. Development of live attenuated *Bordetella pertussis* strains expressing the universal influenza vaccine candidate M2e. *Vaccine*. 2011; 29(33): 5502–11. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.05.052>
6. Sinyashina L.N., Semin E.G., Medkova A.Yu., Syundyukova R.A., Karataev G.I. Pre-clinical toxicity study and safety assessment of candidate live pertussis vaccine for intranasal administration. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika*. 2018; 17(6): 98–108. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2018-17-6-98-108> (in Russian)
7. Warfel J.M., Beren J., Kelly V.K., Lee G., Merkel T.J. Nonhuman primate model of pertussis. *Infect. Immun.* 2012; 80(4): 1530–6. <https://doi.org/10.1128/iai.06310-11>
8. Kubrava D.T., Medkova A.Yu., Sinyashina L.N., Shevtsova Z.V., Matua A.Z., Kondzhariya I.G., et al. Cough of nonhuman primate. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk*. 2013; 68(8): 28–33. <https://doi.org/10.15690/vramn.v68i8.720> (in Russian)
9. Medkova A.Yu., Sinyashina L.N., Amichba A.A., Semin E.G., Shevtsova Z.V., Matua A.Z., et al. Preclinical studies of safety, immunogenicity and protective activity of attenuated *Bordetella pertussis* bacteria on the *Macaca mulatta* model. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(4): 312–23. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-4-3> (in Russian)
10. Karataev G.I., Sinyashina L.N., Medkova A.Yu., Semin E.G., Shevtsova Z.V., Matua A.Z., et al. Insertional inactivation of virulence operon in population of persistent *Bordetella pertussis* bacteria. *Genetika*. 2016; 52(4): 422–30. <https://doi.org/10.7868/S0016675816030085> (in Russian)
11. Medkova A.Yu., Lidzheva A.A., Semin E.G., Sinyashina L.N., Syundyukova R.A., D'yakov I.N., et al. A clinical study of the safety and tolerability of live nasal vaccines for the prevention of pertussis. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv*. 2021; 10(1): 114–9. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-1-114-119> (in Russian)
12. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Eighth Edition*. Washington: The National Academies Press; 2011.
13. Medkova A.Yu., Sinyashina L.N., Rummyantseva Yu.P., Voronina O.L., Kunda M.S., Karataev G.I. Accumulation of avirulent *Bordetella pertussis* Bvg mutants in the course of experimental whooping cough in mice. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya*. 2013; (4): 22–6. (in Russian)
14. Nesterova Yu.V., Medkova A.Yu., Babachenko I.V., Semin E.G., Kalisnikova E.L., Sinyashina L.N., et al. Clinical-diagnostic value of *Bordetella pertussis* genetic markers in contact persons in familial foci. *Zhurnal infektologii*. 2019; 11(1): 17–24. <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2019-11-1-17-24> (in Russian)
15. Medkova A.Yu., Lidzheva A.A., Semin E.G., Sinyashina L.N., Syundyukova R.A., Snegireva N.A., et al. Immunogenicity of the drug «Live intranasal vaccine for the prevention of pertussis» (GamLPV) with a single use in healthy volunteers. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2021; 98(6): 706–20. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-194> (in Russian)

Информация об авторах

Джидарян Ануш Ашотовна — старший лаборант с высшим образованием лаб. иммунологии и вирусологии НИИЭПит, Сухум, Абхазия, <https://orcid.org/0000-0002-8792-5289>

Матуа Алиса Зауровна — к.б.н., зам. директора по научной работе, зав. лаб. иммунологии и вирусологии НИИЭПит, Сухум, Абхазия, <https://orcid.org/0000-0003-3275-0941>

Медкова Алиса Юрьевна — к.м.н., с.н.с. лаб. генетики бактерий ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1509-0622>

Сёмин Евгений Григорьевич — н.с. лаб. генетики бактерий ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6696-8362>

Синяшина Людмила Николаевна — д.м.н., в.н.с. лаб. генетики бактерий ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1708-5453>

Дьяков Илья Николаевич — к.б.н., в.н.с., зав. лаб. биосинтеза иммуноглобулинов НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5384-9866>

Чернышова Ирина Николаевна — к.м.н., с.н.с. лаб. биосинтеза иммуноглобулинов НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5053-2433>

Кубрава Джэнни Тамазовна — м.н.с. лаб. иммунологии и вирусологии НИИЭПит, Сухум, Абхазия, <https://orcid.org/0000-0001-9104-4014>

Амичба Астанда Арнольдовна — м.н.с. лаб. иммунологии и вирусологии НИИЭПит, Сухум, Абхазия, <https://orcid.org/0000-0002-4986-1392>

Конджария Ирина Георгиевна — к.б.н., с.н.с. лаб. иммунологии и вирусологии НИИЭПит, Сухум, Абхазия, <https://orcid.org/0000-0003-3707-4874>

Миквабия Зураб Ясонович — д.м.н., профессор, директор НИИЭПит, Сухум, Абхазия, <https://orcid.org/0000-0002-0729-6516>

Каратаев Геннадий Иванович — д.б.н., в.н.с., рук. лаб. генетики бактерий ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, karataevgi@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8771-6092>

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

Статья поступила в редакцию 13.08.2021;
принята к публикации 18.03.2022;
опубликована 30.04.2022

Information about the authors

Anush A. Djidaryan — senior laboratory assistant with higher education, Laboratory of virology and immunology, Research Institute of Experimental Pathology and Therapy, Sukhum, Abkhazia, <https://orcid.org/0000-0002-8792-5289>

Alisa Z. Matua — Cand. Sci. (Biol.), Deputy Director of science, Head, Laboratory of immunology and virology, Research Institute of Experimental Pathology and Therapy, Sukhum, Abkhazia, <https://orcid.org/0000-0003-3275-0941>

Alisa Yu. Medkova — senior researcher of I, Laboratory of bacteria genetics, Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1509-0622>

Evgeniy G. Semin — researcher, Laboratory of bacteria genetics, Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1708-5453>

Lyudmila N. Sinyashina — D. Sci. (Med.), leading researcher, Laboratory of bacteria genetics, Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1708-5453>

Ilya N. Dyakov — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Head, Laboratory of biosynthesis of immunoglobulins, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5384-9866>

Irina N. Chernyshova — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Laboratory of biosynthesis of immunoglobulins, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5053-2433>

Dzhenni T. Kubrava — junior researcher, Laboratory of virology and immunology, Research Institute of Experimental Pathology and Therapy, Sukhum, Abkhazia, <https://orcid.org/0000-0001-9104-4014>

Astanda A. Amichba — junior researcher, Laboratory of virology and immunology, Research Institute of Experimental Pathology and Therapy, Sukhum, Abkhazia, <https://orcid.org/0000-0002-4986-1392>

Irina G. Kondzariya — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of virology and immunology, Research Institute of Experimental Pathology and Therapy, Sukhum, Abkhazia, <https://orcid.org/0000-0003-3707-4874>

Zurab Ya. Mikvabiya — D. Sci. (Med.), Professor, Director, Research Institute of Experimental Pathology and Therapy, Sukhum, Abkhazia, <https://orcid.org/0000-0002-0729-6516>

Gennadiy I. Karataev — D. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of bacteria genetics, Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8771-6092>

Author contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

The article was submitted 13.08.2021;
accepted for publication 18.03.2022;
published 30.04.2022



Ретроспективный серологический анализ распространения флавивирусных лихорадок и лихорадки Чикунгунья в Никарагуа — авидность специфических антител как инструмент дифференциальной диагностики

Отрашевская Е.В., Казакова Е.В., Жиренкина Е.Н., Трухин В.П., Игнатъев Г.М.✉

Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток ФМБА России,
Санкт-Петербург, Россия

Аннотация

Введение. Арбовирусные инфекции представляют собой проблему для здравоохранения не только отдельных стран, но и всего мира в связи с повторяющимися вспышками в последнее десятилетие.

Целью настоящей работы было серологическое исследование распространённости вирусов денге (ДЕНВ), Зика (ЗИКВ), жёлтой лихорадки (ЖЛВ) и Чикунгунья (ЧИКВ) на примере ограниченной выборки в Никарагуа.

Материалы и методы. Одновременно были исследованы 200 образцов сывороток крови, собранные в Никарагуа. Использовались доступные коммерческие диагностические наборы, а также *in house*-методы. Антитела (АТ) в положительных образцах сывороток оценивали по уровню авидности после обработки 8М мочевиной.

Результаты. АТ к одному или к нескольким вирусам одновременно имели 85 (42,5%) образцов. Индекс авидности (ИА) $\geq 30\%$ был у 46 (23%) образцов, содержащих АТ только к одному вирусу. Из 39 (19,5%) образцов, содержащих АТ к нескольким вирусам, только 19 (9,5%) образцов содержали АТ с ИА $\geq 30\%$ сразу к нескольким вирусам; 16 (8,0%) образцов имели АТ с высоким ИА к ДЕНВ и одновременно АТ с ИА $< 30\%$ к ЗИКВ и/или к ЖЛВ.

Обсуждение. Результаты анализа сывороток в тестах иммуноферментного анализа были скорректированы, т.к. только АТ с высоким ИА подтверждают инфицирование в анамнезе. Анализ авидности специфических АТ способствовал не только подтверждению случаев сочетанного или последовательного инфицирования в анамнезе, но и выявлению феномена кросс-реактивности АТ к флавивирусам. Наличие кросс-реактивных АТ, с одной стороны, мешает получить истинную картину инфицирования популяции флавивирусами, а с другой стороны, может увеличивать риск антителозависимого усиления заболевания, которое известно при вторичной лихорадке денге и при последовательном заражении ДЕНВ и ЗИКВ.

Заключение. Анализ авидности специфических АТ позволил подтвердить инфицирование в прошлом, в том числе несколькими вирусами, а также дифференцировать АТ с низкой авидностью, которые, вероятно, отражают феномен кросс-реактивности АТ к флавивирусам.

Ключевые слова: вирус Зика, вирус денге, вирус Чикунгунья, вирус желтой лихорадки, авидность, кросс-реактивность антител

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

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

Для цитирования: Отрашевская Е.В., Казакова Е.В., Жиренкина Е.Н., Трухин В.П., Игнатъев Г.М. Ретроспективный серологический анализ распространения флавивирусных лихорадок и лихорадки Чикунгунья в Никарагуа — авидность специфических антител как инструмент дифференциальной диагностики. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022;99(2):215–224.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-196>

Original article
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-196>

The study of flaviviruses and Chikungunya virus seroprevalence in Nicaragua — virus-specific antibody avidity assay as a tool for differential diagnosis

Alena V. Atrasheuskaya, Elena V. Kazakova, Ekaterina N. Zhirenkina,
Victor P. Trukhin, Georgy M. Ignatyev[✉]

Saint-Petersburg Scientific Research Institute of Vaccines and Serums, Saint Petersburg, Russia

Abstract

Introduction. Arboviral infections are a rising public health concern not only for some individual countries, but also for the entire world due to the repeated outbreaks over the past decade.

The aim was to conduct a seroprevalence study of Dengue (DENV), Zika (ZIKV), Yellow fever (YFV) and Chikungunya (CHIKV) viruses using a limited number of samples in Nicaragua.

Materials and methods. Total 200 serum samples collected previously in Nicaragua were analyzed simultaneously. Commercially available diagnostic kits, as well as *in-house* methods were used. The avidity of antibodies (IgG) in positive serum samples was assessed after the treatment with 8M urea.

Results. 85 serum samples (42.5%) contained IgG antibodies to one or several viruses simultaneously. IgG antibodies only to one virus were detected in 46 serum samples (23%) with the avidity index (AI) $\geq 30\%$. Among 39 samples (19.5%) that contained IgG antibodies to several viruses, only in 19 samples (9.5%) IgG antibodies with high AI ($\geq 30\%$) to several viruses were detected. In 16 serum samples (8.0%), IgG antibodies to DENV with a high AI and antibodies to ZIKV and/or YFV with a low AI $< 30\%$ were detected.

Discussion. The results obtained in ELISA testing were corrected, since only IgG antibodies with a high AI confirm the past infection. The analysis of the specific IgG antibody avidity helped not only to confirm the cases of combined or sequential infection in the past, but also to discriminate the cross-reactive IgG antibodies induced by closely related DENV, ZIKV and YFV. The presence of cross-reactive IgG antibodies, on the one hand, make it difficult to determine the real seroprevalence of flavivirus infections, and, on the other hand, may increase the risk of antibody-dependent enhancement (ADE) of the disease, which is well-known for the secondary Dengue fever and for the consecutive infection with DENV and ZIKV.

Conclusion. The analysis of virus-specific antibody avidity made it possible not only to distinguish recent from the past infection, but also to discriminate the cross-reactive antibodies with the low avidity.

Keywords: Zika, Dengue, Chikungunya, Yellow fever viruses, IgG avidity and cross-reactivity

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Atrasheuskaya A.V., Kazakova E.V., Zhirenkina E.N., Trukhin V.P., Ignatyev G.M. The study of flaviviruses and Chikungunya virus seroprevalence in Nicaragua — virus-specific antibody avidity assay as a tool for differential diagnosis. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2022;99(2):215–224.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-196>

Введение

Арбовирусные инфекции представляют собой проблему для здравоохранения не только отдельных стран, но и всего мира в связи с повторяющимися вспышками в последнее десятилетие. Заражение вирусом денге (ДЕНВ) когда-то было редкостью, а теперь лихорадка денге считается одной из наиболее распространённых арбовирусных инфекций в мире, передача которой происходит в 128 странах, где риску подвергаются почти 4 млрд человек. ДЕНВ на данном этапе не просто эндемичен, а «гиперэндемичен» во многих регионах тропиков и субтропиков [1]. Очередное появление вируса Чикунгуния (ЧИКВ) в Карибском бассейне в 2013 г. привело к его быстрому распространению в 45 странах

Северной, Центральной и Южной Америки [2]. После этого глобальное внимание привлёк вирус Зика (ЗИКВ), также из-за быстрого распространения в 22 странах Северной и Южной Америки с момента его первого обнаружения в 2015 г. в Бразилии [2–4].

Комары — главный переносчик этих инфекционных заболеваний. Комары *Aedes aegypti* ответственны за распространение инфекций в городских районах, а комары *A. albopictus* являются основным вектором распространения в сельской местности. Такие факторы, как глобальное потепление, выруб-ка лесов и урбанизация, ведут к росту распространения арбовирусных инфекций. Учитывая возрастающее количество случаев и социально-экономическое влияние вспышек арбовирусных инфекций,

оценка их истинного бремени на систему здравоохранения представляет крайне важную задачу. Ситуация осложняется тем, что арбовирусные инфекции симптоматически, особенно на начальной стадии, часто очень схожи, что затрудняет постановку клинического диагноза, особенно когда одновременно циркулируют несколько арбовирусов [3–5]. Арбовирусные инфекции нередко протекают субклинически, бессимптомно проходят до 75% случаев ДЕНВ, до 25% — ЧИКВ и до 80% — ЗИКВ [1, 3, 6]. Клинические проявления и симптомы в начале заболевания проявляются как неспецифическое и лёгкое лихорадочное состояние с мышечными болями, артралгиями, иногда с сыпью или конъюнктивитом/ретроорбитальной болью. Верификация клинического диагноза происходит в основном при попадании пациента в клинику уже в тяжёлом состоянии. Таким образом, установление окончательного диагноза в эндемичной зоне совместной циркуляции арбовирусных инфекций является проблемой, учитывая схожесть симптомов и вероятность перекрёстной реакции в серологических тестах, что затрудняет определение реального влияния этих вирусов на население многих субтропических и тропических стран и истинных масштабов эпидемий [3, 6, 7]. Данные о распространённости арбовирусных инфекций важны для понимания не только их географического распространения, но и влияния на глобальную заболеваемость и смертность. Такая информация имеет решающее значение для определения оптимального распределения имеющихся ресурсов здравоохранения для борьбы с инфекционными заболеваниями и оценки воздействия стратегии профилактики, например, вакцинации.

ДЕНВ, ЗИКВ и вирус жёлтой лихорадки (ЖЛВ) относятся к одному семейству *Flaviviridae*. Их родство может вызывать перекрёстную реакцию в серологических тестах, затрудняя клиническую диагностику [7–9]. В 1948–1952 гг. до Никарагуа докатилась «волна» жёлтой лихорадки из Панамы. В преддверии эпидемии в стране были иммунизированы 112 тыс. сельских жителей [10, 11]. Данный факт не позволяет исключить циркуляцию 3 вирусов одного семейства в Никарагуа.

Появление в 2014 г. лихорадки Чикунгунья в Никарагуа и последовавшая вслед за этим в 2015–2016 гг. масштабная вспышка привлекла внимание региональных эпидемиологов и врачей, т.к. это заболевание нередко сопровождается поражением скелетно-мышечной системы, последствия которой могут длиться от нескольких месяцев до года и даже приводить к утрате трудоспособности [12, 13]. Проведено несколько достаточно масштабных клинико-лабораторных исследований распространённости лихорадки Чикунгунья [13], а также исследований по дифференциальной молекулярно-биологической и клинической диагностике лихо-

радок денге, Зика и Чикунгунья [12–14] в Никарагуа. В клиническом исследовании, проведённом в 2016 г., в более чем 20% случаев выявлено сочетанное инфицирование 2–3 арбовирусами, что часто определяло тяжесть клинического течения заболевания [13].

Серологические исследования иммунитета населения дополняют традиционные клинические и лабораторные исследования и являются альтернативным подходом к мониторингу не только уровня иммунитета в популяции к тому или иному инфекционному агенту, но и распространённости инфицирования этими агентами, что, соответственно, позволяет оценить их влияние на здравоохранение.

Целью настоящей работы было серологическое исследование распространённости ДЕНВ, ЗИКВ, ЖЛВ и ЧИКВ на примере ограниченной выборки в Никарагуа.

Материалы и методы

Для проведения слепого скринингового исследования были использованы образцы сывороток крови, собранные в 2019 г. (до пандемии COVID-19) от лиц старше 18 лет перед проведением кампании по вакцинации против гриппа на территории Никарагуа. Образцы были зашифрованы и хранились при –70°C для последующего одномоментного исследования. Отбор 200 образцов сывороток для настоящего исследования был произведён вслепую. Таким образом, возраст и пол участников, анамнестические данные о перенесённых ранее заболеваниях, в том числе передающихся комарами (лихорадка денге, Зика, Чикунгунья, жёлтая лихорадка), не учитывались. В ходе проведения кампании по вакцинации за участниками проводился пассивный мониторинг в течение 28 дней, что исключает наличие образцов от лиц с острыми инфекционными заболеваниями.

Все сыворотки были исследованы на наличие антител (АТ) к вирусу SARS-CoV-2, а также к ЗИКВ, ЧИКВ, ДЕНВ и ЖЛВ с использованием метода иммуноферментного анализа (ИФА). В работе использовали следующие доступные коммерческие диагностические наборы в соответствии с инструкциями производителей:

- «БиоСкрин-Чикунгунья (IgG)» («Биосервис») — для определения АТ (IgG) к вирусу Чикунгунья;
- «БиоСкрин-Денге (IgG)» («Биосервис») — для определения АТ (IgG) к вирусу денге;
- «Anti-Zika Virus ELISA (IgG)» («Euroimmun AG») — для определения АТ (IgG) к ЗИКВ.
- «Qualitative Human Yellow Fever Virus Antibody IgG (YFV-IgG) ELISA Kit» («MyBioSource Inc.») — для определения АТ (IgG) к ЖЛВ.

Все сыворотки с неоднозначными результатами в каком-либо тесте оценивались повторно. Сыворотки, положительные в одном тесте, оценивали

как моносыыворотки, положительные в нескольких тестах — как полисыыворотки.

АТ в положительных образцах сыывороток оценивали по уровню авидности по ранее описанной методике [14] с 8М мочевиной. Индекс авидности (ИА) рассчитывали как отношение оптической плотности при проведении ИФА до и после обработки мочевиной.

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием стандартного пакета программ «Microsoft Office Excel 2016» и пакета программ «StatTech». Данные ИА специфических АТ представлены в виде среднего арифметического значения (M) и стандартного отклонения среднего (SD). Достоверность различий сравниваемых величин оценивали с помощью критерия Манна–Уитни, с двумя хвостами распределения (U -test) при сравнении двух групп. При малой выборке в группе (< 3) достоверность различий сравниваемых величин оценивали с помощью t -критерия Стьюдента, непарного, с двумя хвостами распределения (t -test). Различия считали статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

Из 200 исследованных образцов сыывороток 115 (57,5%) оказались отрицательными во всех тестах. Из 85 положительных образцов сыывороток (42,5% от общего числа) 53 образца оказались положительными в тесте с ЧИКВ (26,5% от общего числа; 62,4% от числа положительных образцов); 41 образец был положительным в тесте с ДЕНВ (20,5% от общего числа; 48,2% от числа положительных образцов); 25 образцов были положительными в тесте с ЖЛВ (12,5% от общего числа; 29,4% от числа положительных образцов); 24 образца были положительными в тесте с ЗИКВ (12,0% от общего числа; 28,2% от числа положительных образцов).

В табл. 1 представлены результаты тестирования образцов сыывороток крови в 4 тестах ИФА. АТ только к одному вирусу были обнаружены в 46 образцах сыывороток (23% от общего числа; 54,1% от числа положительных образцов). Остальные 39 образцов сыывороток (19,5% от общего числа; 45,9% от числа положительных образцов) содержали АТ к 2–4 вирусам одновременно. Четыре образца имели АТ ко всем используемым в данном исследовании вирусам. В табл. 1 представлены все варианты сочетания АТ сразу к нескольким вирусам в одном образце. Наличие АТ к ДЕНВ одновременно с АТ к другим вирусам наблюдалось чаще всего (28 образцов). Наличие АТ к ЗИКВ одновременно с АТ к другим вирусам наблюдалось в 18 образцах, практически так же, как и сочетание АТ к ЖЛВ с АТ к другим вирусам (17 образцов).

Полученные результаты могли бы свидетельствовать о достаточно частом сочетанном и/или по-

следовательном инфицировании в различных комбинациях, однако проведенный анализ авидности представил результаты несколько в ином ракурсе. Результаты оценки авидности специфических АТ в образцах с положительным результатом только в одном тесте ИФА представлены в табл. 2. Все образцы моносыывороток имели ИА специфических АТ $\geq 30\%$, за исключением одного образца, у которого ИА в тесте с ЖЛВ был 28%. Таким образом, этот показатель (ИА $\geq 30\%$) был расценен как высокий, свидетельствующий о перенесенном заболевании.

Результаты оценки авидности специфических АТ в образцах с положительным результатом в нескольких тестах ИФА представлены в табл. 3. В образцах полисыывороток самый высокий ИА был у АТ к ЧИКВ, причём на том же уровне, что и в соответствующих образцах моносыывороток ($p > 0,05$). Из 39 образцов полисыывороток ИА $\geq 30\%$ наблюдался только к ЧИКВ и ДЕНВ одновременно. Таких образцов было 15. Данный результат позволяет предположить наличие в анамнезе сочетанного или последовательного инфицирования ДЕНВ и ЧИКВ.

В 3 образцах с высоким ИА АТ к ЧИКВ (48–63%) были также обнаружены АТ к ЗИКВ с низким ИА ($\leq 30\%$); и в 1 образце с высоким ИА АТ к ЧИКВ (62%) были обнаружены также АТ к ЖЛВ с ИА = 30%. Результаты исследования этих 4 образцов позволяют предположить наличие в анамнезе сочетанного или последовательного инфицирования, т.к. ЧИКВ не относится к флавивирусам и перекрёстная реакция в ИФА маловероятна.

Таким образом, 19 образцов продемонстрировали наличие АТ к ЧИКВ и одновременно наличие АТ к 1 из 3 флавивирусов, что представляет 9,5% от общего числа образцов и 22,4% от числа положительных образцов. То есть из 39 положительных образцов в нескольких тестах ИФА только в 19 образцах можно предположить наличие сочетанных или последовательных контактов с несколькими вирусами в анамнезе.

В 16 образцах полисыывороток были обнаружены АТ к ДЕНВ с высоким ИА (32–52%) и сопутствующими АТ к ЗИКВ или к ЖЛВ с низким ИА ($\leq 24\%$). Интересно, что в данной группе образцов ИА АТ к ДЕНВ был достоверно выше ($p < 0,01$), чем аналогичный показатель в группе моносыывороток (табл. 3). Полученные в этих 16 образцах (18,8% от всех положительных образцов) результаты позволяют предположить наличие в анамнезе ДЕНВ-инфекции и наличие перекрёстных АТ в ИФА с ЗИКВ и ЖЛВ. На наш взгляд, перекрёстную реакцию можно объяснить наличием высокоавидных АТ к ДЕНВ. Интересно, что в 10 образцах с АТ с ИА $\geq 30\%$ к ДЕНВ обнаруживались АТ с низким ИА сразу и к ЖЛВ, и к ЗИКВ. Ни один образец сыыворотки не имел высокого ИА АТ ($\geq 30\%$) к флавивирусам в нескольких тестах одновременно.

Таблица 1. Результаты тестирования образцов сывороток крови на наличие АТ к ЧИКВ, ДЕНВ, ЖЛВ и ЗИКВ
Table 1. Results of serum samples testing for antibodies to CHIKV, DENV, YFV and ZIKV

Результаты исследований образцов в 4 тестах ИФА Samples' results in 4 ELISA tests	<i>n</i>	Доля от общего количества образцов (<i>n</i> = 200), % % from total number of samples (<i>n</i> = 200)	Доля от общего количества положительных образцов (<i>n</i> = 85), % % from number of positive samples (<i>n</i> = 85)	Доля от образцов, положительных к нескольким вирусам (<i>n</i> = 39), % % from number of samples positive in several tests (<i>n</i> = 39)
Образцы, отрицательные во всех тестах Samples negative in all tests	115	57,5	–	–
Образцы положительные Positive samples	85	42,5	–	–
Образцы, положительные в одном тесте ИФА Samples positive in one test	46	23,0	54,1	–
ЧИКВ / CHIKV	33	16,5	38,8	–
ДЕНВ / DENV	8	4,0	9,4	–
ЖЛВ / YFV	4	2,0	4,7	–
ЗИКВ / ZIKV	1	0,5	1,2	–
Образцы, положительные в нескольких тестах ИФА Samples positive in several tests	39	19,5	45,9	–
образцы, положительные в 2 тестах ИФА samples positive in two tests	25	12,5	29,4	64,1
ДЕНВ + ЗИКВ DENV + ZIKV	7	3,5	8,2	17,9
ДЕНВ + ЖЛВ DENV + YFV	7	3,5	8,2	17,9
ЧИКВ + ДЕНВ CHIKV + DENV	5	2,5	5,9	12,8
ЧИКВ + ЗИКВ CHIKV + ZIKV	3	1,5	3,5	7,7
ЧИКВ + ЖЛВ CHIKV + YFV	1	0,5	1,2	2,6
ЖЛВ + ЗИКВ YFV + ZIKV	1	0,5	1,2	2,6
образцы, положительные в 3 тестах ИФА samples positive in three tests	10	5,0	11,8	25,6
ДЕНВ + ЖЛВ + ЗИКВ DENV + YFV + ZIKV	4	2,0	4,7	10,2
ЧИКВ + ДЕНВ + ЖЛВ CHIKV + DENV + YFV	3	1,5	3,5	7,7
ЧИКВ + ДЕНВ + ЗИКВ CHIKV + DENV + ZIKV	2	1,0	2,4	5,2
ЧИКВ + ЗИКВ + ЖЛВ CHIKV + ZIKV + YFV	1	0,5	1,2	2,6
образцы, положительные в 4 тестах ИФА samples positive in 4 tests	4	2,0	4,7	10,3

Четыре образца, не содержащие АТ к ДЕНВ, имели АТ и к ЖЛВ, и к ЗИКВ одновременно. Причём ИА к ЗИКВ был 28–30% при ИА к ЖЛВ 18–20% соответственно. Можно предположить, что более высокий ИА свидетельствует об инфицировании в анамнезе, а более низкий ИА — о кросс-реактивности специфических АТ. Однако только динами-

ческое наблюдение помогло бы подтвердить данное предположение.

Таким образом, из 200 проанализированных образцов сывороток в 53 (26,5%) случаях имелись АТ к ЧИКВ с высоким ИА, что свидетельствует об инфицировании в анамнезе. На основании наличия специфических АТ с высоким ИА к ДЕНВ в 33 об-

Таблица 2. Результаты анализа ИА в образцах сывороток, положительных в одном тесте ИФА**Table 2.** Results of AI analysis in serum samples positive in one ELISA test

Тест ИФА / ELISA test	Количество положительных образцов Number of positive samples	ИА, % / AI, %	
		пределы / range	$M \pm SD$
«БиоСкрин-Чикунгунья (IgG)» «BioScreen-Chikungunya (IgG)»	33	38–66	54,4 ± 8,2
«БиоСкрин-Денге (IgG)» «BioScreen-Dengue (IgG)»	8	30–38	32,0 ± 2,6
«YFV-IgG»	4	28–33*	30,3 ± 2,5**
«Anti-Zika Virus ELISA (IgG)»	1	30	30

Примечание. *В одном образце ИА составил 60%; **без учёта образца с ИА 60%.

Note. *In one sample AI was as high as 60%; **excluding sample with AI 60%.

Таблица 3. Результаты анализа ИА в образцах сывороток, положительных в нескольких тестах ИФА**Table 3.** Results of AI analysis in serum samples positive in several ELISA tests

Тест ИФА / ELISA test	Количество положительных образцов Number of positive samples	ИА, % / AI, %	
		пределы / range	$M \pm SD$
«БиоСкрин-Чикунгунья (IgG)» «BioScreen-Chikungunya (IgG)»	19	40–63	53,2 ± 7,9*
«БиоСкрин-Денге (IgG)» «BioScreen-Dengue (IgG)»	31	36–52	39,9 ± 6,2**
«YFV-IgG»	21	14–30	23,3 ± 5,9***
«Anti-Zika Virus ELISA (IgG)»	23	14–32	19,3 ± 3,7****

Примечание. *–**** — сравнение с соответствующими показателями в образцах сывороток, положительных в одном тесте ИФА, в табл. 1. * $p > 0,05$ (U-test), ** $p < 0,001$ (U-test), *** $p < 0,05$ (U-test), **** $p < 0,05$ (t-test).

Note. *–**** — in comparison with the corresponding parameters in the samples positive in one ELISA test, shown in Table 1. * $p > 0.05$ (U-test), ** $p < 0.001$ (U-test), *** $p < 0.05$ (U-test), **** $p < 0.05$ (t-test).

разцах (16,5% от общего числа образцов и 38,8% от числа положительных образцов) можно сделать вывод об инфицировании ДЕНВ в анамнезе. Контакт с ЖЛВ или вакцинацию в анамнезе с большой долей вероятности можно предположить в 5 случаях (2,5% от общего числа образцов и 5,9% от числа положительных образцов), о чём свидетельствуют 4 образца моносывороток и 1 образец сыворотки с АТ и к ЧИКВ, и к ЖЛВ. Контакт с ЗИКВ весьма вероятен был в 4 случаях (2,0% от общего числа образцов и 2,4% от числа положительных образцов), о чём свидетельствуют 1 образец моносыворотки и 3 образца сывороток с АТ и к ЗИКВ, и к ЧИКВ. Обнаруженные в 19 образцах сывороток сочетания АТ, при исключении перекрёстной реакции на основании анализа avidности специфических АТ, продемонстрировали вероятность сочетанного или последовательного инфицирования несколькими вирусами в 22,4% положительных образцов сывороток.

Обсуждение

Жёлтая лихорадка и лихорадка денге — «старые» инфекционные заболевания, и исторически они были серьёзными проблемами для общественного здравоохранения. ДЕНВ и ЖЛВ вызывали ши-

роко распространённые эпидемии в XVII–XIX вв. и в начале XX в. Первоначальное географическое распространение ДЕНВ и ЖЛВ было тесно связано с судоходством и торговлей, что привело к глобальному распространению комаров *Aedes* из Африки в другие части тропиков в XVII–XVIII вв. [15, 16]. Случаи жёлтой лихорадки с фатальным исходом были документально зарегистрированы в Никарагуа в 1952 г. [10, 11]. Лихорадка денге, причём все 4 серотипа ДЕНВ, постоянно регистрируется в Никарагуа с 1985 г. [16–18]. Лихорадка Чикунгунья впервые была зарегистрирована в Никарагуа в 2014 г. С 2016 г. ЗИКВ циркулирует на территории страны, когда впервые был зарегистрированы автохтонные случаи лихорадки Зика [9].

В проведённом ретроспективном исследовании из 200 образцов сывороток, собранных в Никарагуа в 2019 г., значительное число (42,5%) содержало АТ к одному или нескольким арбовирусам; из них 62,4% содержали АТ с высоким уровнем avidности к ЧИКВ. Данный результат достаточно ожидаем, учитывая эпидемию лихорадки Чикунгунья в 2015–2016 гг. В исследовании, которое проводилось в разгар этой эпидемии в 2015 г. в Манагуа и окрестностях, серологическая распространённость инфицирования ЧИКВ в зависимости от района достига-

ла 1,5—17,5% [12]. Известно, что с возрастом количество серопозитивных лиц становится всё больше [6, 12]. В нашем исследовании образцы сывороток были собраны от лиц старше 18 лет в разных районах Никарагуа и после 2 лет эпидемии. Этими факторами можно объяснить достаточно большую долю сывороток, положительных к ЧИКВ, — 26,5%. На втором месте, также ожидаемо, были образцы с АТ и высоким ИА к ДЕНВ — 16,5%. В Никарагуа в период первой вспышки ЧИКВ также собирались образцы сывороток от пациентов, обратившихся за медицинской помощью, с первичным диагнозом лихорадки Зика, денге и Чикунгунья, и, ожидаемо, больше всего было инфицированных ЧИКВ, но количество пациентов, инфицированных ДЕНВ, также было незначительно меньше [9]. В этом же исследовании при анализе случаев обращения за медицинской помощью зарегистрировано 41,7–50,5% случаев сочетанного инфицирования разными вирусами. Также случаев госпитализации было достоверно больше среди пациентов с сочетанным инфицированием относительно таковых с моноинфекцией — 83,3% против 64% соответственно [9]. В нашем исследовании при исключении перекрёстной реакции методом анализа avidности специфические АТ к двум вирусам одновременно были обнаружены в 22,4% образцов сывороток от числа положительных. Ни один из образцов не содержал АТ с ИА $\geq 30\%$ сразу к 3 или 4 вирусам.

В целом результаты данного ретроспективного исследования подтвердили распространённость лихорадки Чикунгунья и лихорадки денге, а также одновременное циркулирование не только ДЕНВ и ЧИКВ на территории Никарагуа. Ранее J.J. Waggoner и соавт. продемонстрировали инфицирование пациентов ЧИКВ и ДЕНВ, а также ЗИКВ, в том числе сочетанное [9]. Одновременное циркулирование ЧИКВ, ДЕНВ, ЗИКВ, а также вероятность появления ЖЛВ не только создаёт сложную эпидемическую ситуацию в стране, но и доставляет много проблем для местного здравоохранения. Достаточно большое количество серологических исследований циркуляции ЧИКВ одновременно с флавивирусами, а также работ по разработке дифференциальной клинической и лабораторной диагностики лихорадок со схожими начальными клиническими симптомами проводится исследователями в странах Центральной и Южной Америки [9, 14, 19–21], а также Европы, учитывая активный мировой туризм [6, 14].

Усиление аффинности и соответствующие изменения avidности IgG в течение инфекционного процесса дают возможность предположить период, прошедший с момента первичного контакта с возбудителем инфекционного заболевания. На ранних стадиях иммунного ответа появляются IgG с низкой avidностью, которая растёт с течением времени и

свидетельствует о формировании зрелого специфического иммунного ответа [22].

Исследования, проведённые с начала до середины 1980-х гг., привели к использованию avidности IgG в качестве инструмента не только в клинической диагностике [23–25]. Исследователи флавивирусных инфекций используют avidность IgG для дискриминации первичной и вторичной лихорадки денге [19], дифференцирования недавнего и давнего инфицирования вирусом Западного Нила [26], изучения иммунного ответа при острой и хронической формах лихорадки Чикунгунья [12], а также анализа кросс-реактивности между АТ к флавивирусам с целью оценки распространённости той или иной лихорадки в регионе [14, 21, 27].

Ограниченное серологическое исследование распространённости инфицирования арбовирусами мы дополнили анализом avidности специфических АТ для дискриминации реального инфицирования в анамнезе от кросс-реактивности АТ к флавивирусам ДЕНВ, ЖЛВ и ЗИКВ. Поскольку в нашем исследовании все лица находились под пассивным наблюдением и ни у одного привитого на момент вакцинации и в течение 28 дней после вакцинации не отмечалось признаков или жалоб, характерных для острого инфекционного заболевания, можно предположить, что специфические АТ с низким ИА в том или ином тесте ИФА свидетельствовали не об острой стадии инфекционного заболевания, а, скорее всего, явились результатом их кросс-реактивности. Однако следует отметить, что исследование образцов сывороток было однократным и мы не можем исключить вариант течения бессимптомного инфекционного процесса, что особенно характерно для лихорадки Зика.

Распространение лихорадки Зика привело к необходимости разработки высокоспецифических ИФА-тест-систем с низким уровнем кросс-реактивности, в частности, между IgG к ДЕНВ (всем 4 типам) и ЗИКВ, т.к. на ранних этапах эти инфекции трудноразличимы клинически, а серология из-за кросс-реактивности АТ не всегда даёт реальную картину, притом что инфицирование ЗИКВ ассоциировано с врождённой микроцефалией, мертворождением и развитием синдрома Гийена–Барре у взрослых [28, 29].

Для дифференциальной лабораторной диагностики флавивирусных лихорадок были разработаны мультиплексная тест-система «pan-Flavi» [14], тест-система «Anti-Zika Virus ELISA (IgG)» («Euroimmun AG»), в которых, как и в описанных ранее методах [19, 21], используются NS1-антигены. Это позволило с определённой степенью достоверности дискриминировать флавивирусы между собой в серологических тестах [8, 14]. В нашем исследовании мы использовали коммерческую тест-систему «Anti-Zika Virus ELISA (IgG)», кото-

рая ранее применялась для серологической характеристики лихорадки Зика, в том числе для анализа авидности специфических АТ [27]. Для определения АТ к ДЕНВ и ЖЛВ мы использовали имеющиеся коммерческие тест-системы. В них в качестве антигена служит инактивированный вирус, что, безусловно, повлияло на результат в ИФА-тестах. Однако, по нашему мнению, анализ авидности специфических АТ к ДЕНВ и ЖЛВ позволяет минимизировать ошибку, т.к. кросс-реактивные АТ, как правило, являются низкоавидными и, соответственно, выявляются после обработки мочевиной.

Результат анализа авидности значительно зависит от молярности использованной мочевины [14, 21, 27]. Ранее W. Ya. Tsai и соавт. выявили, что 4М, 6М и 8М мочевины практически одинаково влияют на авидность специфических АТ к ЗИКВ [21]. В большинстве исследований авидности АТ к флавивирусам, как и в нашем исследовании, используется 8М мочевины [14, 19, 21, 27].

Изначально мы определили, что образцы сывороток, содержащие АТ только к одной инфекции, имели ИА специфических АТ $\geq 30\%$, и далее мы приняли этот уровень за высокий, характерный для постинфекции. Полученные нами результаты сопоставимы с ранее опубликованными, где на клинических данных пороговый уровень ИА АТ к ЗИКВ и ДЕНВ в одних исследованиях был определён как 24,5% [19], а в других исследованиях — 28% [21]. Известно, что ИА растёт с течением времени вплоть до 6 мес от момента заболевания [19, 21], выходя затем на плато [22].

Очень насущно стоит вопрос о стандартизации метода оценки авидности АТ, т.к. использование разных антигенов, буферов, конъюгатов в значительной степени влияет на результат и возможность сравнения результатов разных исследователей [22]. Для ряда инфекционных заболеваний, например для краснухи, разработаны протоколы для тестирования авидности IgG с использованием стандартизированных тестов и систем. Для флавивирусных инфекций на данном этапе решением проблемы стандартизации метода оценки авидности АТ может быть создание соответствующих панелей аттестованных сывороток. Такие панели могли бы обеспечить общий стандарт, по которому можно было бы не только проводить оценку авидности специфических АТ, но и разработать общую категоризацию авидности [14].

В популяциях с высокой распространённостью флавивирусных инфекций крайне не просто бывает не только клинически, но и лабораторно оценить инфекционный статус из-за кросс-реактивности АТ к флавивирусам между собой, которая с течением времени только усиливается. Крайне важно дифференцировать острое течение лихорадки Зика от лихорадки денге в анамнезе в связи с опасностью ли-

хорадки Зика для беременных женщин, а также неврологическими последствиями заболевания [8, 14, 19, 21, 27]. Для флавивирусных инфекций проведение дифференциальной лабораторной диагностики важно также для прогноза развития инфекционного процесса [6]. Предполагается, что присутствие перекрестно-реактивных антител, появившихся в результате предшествующих контактов с гетерологичными флавивирусами, во время последующего инфицирования способствует развитию тяжёлых форм заболевания [8, 19, 21, 28]. Так называемый феномен антителозависимого усиления заболевания известен при вторичной лихорадке денге, а также при последовательном заражении ДЕНВ и ЗИКВ [8, 19, 28, 30].

В нашем исследовании в 16 (8,0%) образцах сывороток крови, обладающих АТ с высоким уровнем ИА к ДЕНВ, были обнаружены АТ с низким ИА к ЖЛВ и/или к ЗИКВ, что позволяет расценить их как кросс-реактивные или как свидетельствующие о бессимптомном течении, прежде всего, лихорадки Зика. Только анализ данных образцов в динамике позволил бы дифференцировать происхождение АТ с низким ИА. Однако оба варианта являются фактором риска для последующего инфицирования гетерологичным флавивирусом, циркулирующим на территории Никарагуа.

Заключение

Проведённое исследование подтвердило распространённость на территории Никарагуа лихорадок Чикунгунья и денге.

Метод анализа авидности АТ к флавивирусным инфекциям, будучи достаточно простым и применимым в любой лаборатории, является информативным для эпидемиологического серологического мониторинга и получения реальной картины распространения флавивирусов при их одновременном циркулировании.

Применение метода анализа авидности специфических АТ позволило подтвердить инфицирование ЧИКВ и ДЕНВ в прошлом, а также дифференцировать АТ с высокой авидностью к ДЕНВ, что свидетельствует об инфицировании в анамнезе, от АТ к ЖЛВ и ЗИКВ с низкой авидностью, которые, вероятно, являются проявлением феномена кросс-реактивности. Таким образом, метод анализа авидности может быть вспомогательным для дифференциальной клинической диагностики и для прогнозирования течения инфекционного процесса.

Информативность и простота исполнения метода анализа авидности специфических АТ, тем не менее, требует его стандартизации для широкого внедрения в практику не только в странах с одновременной циркуляцией нескольких флавивирусов. Необходимо также учитывать распространённый туризм в страны Центральной и Южной Америки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Bhatt S., Gething P.W., Brady O.J., Messina J.P., Farlow A.W., Moyes C.L., et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013; 496(7446): 504–7. <https://doi.org/10.1038/nature12060>
2. Petersen L.R., Jamieson D.J., Powers A.M., Honein M.A. Zika Virus. *N. Engl. J. Med.* 2016; 374(16): 1552–63. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1602113>
3. Staples J.E., Breiman R.F., Powers A.M. Chikungunya fever: an epidemiological review of a re-emerging infectious disease. *Clin. Infect. Dis.* 2009; 49(6): 942–48. <https://doi.org/10.1086/605496>
4. Barreto F.K.A., Alencar C.H., Araújo F.M.C., Oliveira R.M.A.B., Cavalcante J.W., Lemos D.R.Q., et al. Seroprevalence, spatial dispersion and factors associated with flavivirus and chikungunya infection in a risk area: a population-based seroprevalence study in Brazil. *BMC Infect. Dis.* 2020; 20(1): 881. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-05611-5>
5. Beatty M.E., Beutels P., Meltzer M.I., Shepard D.S., Hombach J., Hutubessy R., et al. Health economics of dengue: a systematic literature review and expert panel's assessment. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2011; 84(3): 473–88. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0521>
6. Fritzell C., Rousset D., Adde A., Kazanji M., Van Kerkhove M.D., Flamand C. Current challenges and implications for dengue, chikungunya and Zika seroprevalence studies worldwide: A scoping review. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2018; 12(7): e0006533. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006533>
7. Sirohi D., Chen Z., Sun L., Klose T., Pierson T.C., Rossmann M.G., Kuhn R.J. The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. *Science*. 2016; 352(6284): 467–70. <https://doi.org/10.1126/science.aaf5316>
8. Stettler K., Beltramello M., Espinosa D.A., Graham V., Cassotta A., Bianchi S., et al. Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection. *Science*. 2016; 353(6301): 823–6. <https://doi.org/10.1126/science.aaf8505>
9. Waggoner J.J., Gresh L., Vargas M.J., Ballesteros G., Tellez Y., Soda K.J., et al. Viremia and clinical presentation in Nicaraguan patients infected with Zika virus, chikungunya virus, and Dengue virus. *Clin. Infect. Dis.* 2016; 63(12): 1584–90. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw589>
10. Elton N.W. Progress of sylvan yellow fever wave in Central America; Nicaragua and Honduras. *Am. J. Public Health Nations Health*. 1952; 42(12): 1527–34. <https://doi.org/10.2105/ajph.42.12.1527>
11. Elton N.W. Public health aspects of the campaign against yellow fever in Central America. *Am. J. Public Health Nations Health*. 1952; 42(2): 170–4. <https://doi.org/10.2105/ajph.42.2.170>
12. Anfasa F., Lim S.M., Fekken S., Wever R., Osterhaus A.D.M.E., Martina B.E.E. Characterization of antibody response in patients with acute and chronic chikungunya virus disease. *J. Clin. Virol.* 2019; 117: 68–72. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2019.06.001>
13. Kuan G., Ramirez S., Gresh L., Ojeda S., Melendez M., Sanchez N., et al. Seroprevalence of anti-chikungunya virus antibodies in children and adults in Managua, Nicaragua, after the first chikungunya epidemic, 2014–2015. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016; 10(6): e0004773. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004773>
14. Rönnerberg B., Gustafsson Å., Vapalahti O., Emmerich P., Lundkvist Å., Schmidt-Chanasit J., et al. Compensating for cross-reactions using avidity and computation in a suspension multiplex immunoassay for serotyping of Zika versus other flavivirus infections. *Med. Microbiol. Immunol.* 2017; 206(5): 383–401. <https://doi.org/10.1007/s00430-017-0517-y>
15. Monath T.P. *The Arboviruses: Ecology and Epidemiology. Yellow Fever, vol. V.* Boca Raton: CRC Press; 1988: 139–231.
16. Gubler D.J. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. In: Gubler D.J., Kuno G., eds. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. London: CAB International; 1997: 1–22.
17. Harris E., Videa E., Pérez L., Sandoval E., Téllez Y., Pérez M.L., et al. Clinical, epidemiologic, and virologic features of dengue in the 1998 epidemic in Nicaragua. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2000; 63(1-2): 5–11. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2000.63.5>
18. Kouri G., Valdéz M., Arguello L., Guzmán M.G., Valdés L., Soler M., et al. Dengue epidemic in Nicaragua, 1985. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*. 1991; 33(5): 365–71. (in Spanish)
19. Furuya A.K.M., Hunt D., George K.S., Dupuis A.P., Kramer L.D., Shi P.Y., et al. Use of the immunoglobulin G avidity assay to differentiate between recent Zika and past dengue virus infections. *Clin. Sci. (Lond.)* 2019; 133(7): 859–67. <https://doi.org/10.1042/CS20180874>
20. Silva M.M.O., Tauro L.B., Kikuti M., Anjos R.O., Santos V.C., Gonçalves T.S.F., et al. Concomitant transmission of dengue, chikungunya, and Zika viruses in Brazil: Clinical and epidemiological findings from surveillance for acute febrile illness. *Clin. Infect. Dis.* 2019; 69(8): 1353–9. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy1083>
21. Tsai W.Y., Youn H.H., Tyson J., Brites C., Tsai J.J., Pedroso C., et al. Use of urea wash ELISA to distinguish Zika and dengue virus infections. *Emerg. Inf. Dis.* 2018; 24(7): 1355–9. <https://doi.org/10.3201/eid2407.171170>
22. Hazell S.L. Clinical utility of avidity assays. *Expert Opin. Med. Diagn.* 2007; 1(4): 511–9. <https://doi.org/10.1517/17530059.1.4.511>
23. Lehtonen O.P., Meurman O.H. An ELISA for the estimation of high-avidity and total specific IgG and IgM antibodies to rubella virus. *J. Virol. Methods*. 1982; 5(1): 1–10. [https://doi.org/10.1016/0166-0934\(82\)90091-x](https://doi.org/10.1016/0166-0934(82)90091-x)
24. Narita M., Matsuzono Y., Takekoshi Y., Yamada S., Itakura O., Kubota M., et al. Analysis of mumps vaccine failure by means of avidity testing for mumps virus-specific immunoglobulin G. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1998; 5(6): 799–803. <https://doi.org/10.1128/CDLI.5.6.799-803.1998>
25. Tuokko H. Detection of acute measles infections by indirect and mu-capture enzyme immunoassays for immunoglobulin M antibodies and measles immunoglobulin G antibody avidity enzyme immunoassay. *J. Med. Virol.* 1995; 45(3): 306–11. <https://doi.org/10.1002/jmv.1890450312>
26. Prince H.E., Lapé-Nixon M., Busch M.P., Tobler L.H., Foster G.A., Stramer S.L. Utilization of follow-up specimens from viremic blood donors to assess the value of West Nile virus immunoglobulin G avidity as an indicator of recent infection. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2005; 12(9): 1123–6. <https://doi.org/10.1128/CDLI.12.9.1123-1126.2005>
27. Amaro F., Sánchez-Seco M.P., Vázquez A., Alves M.J., Zé-Zé L., Luz M.T., et al. The Application and interpretation of IgG avidity and IgA ELISA tests to characterize Zika virus infections. *Viruses*. 2019; 11(2): 179. <https://doi.org/10.3390/v11020179>
28. Malafa S., Medits I., Aberle J.H., Aberle S.W., Haslwanter D., Tsouchnikas G., et al. Impact of flavivirus vaccine-induced immunity on primary Zika virus antibody response in humans. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2020; 14(2): e0008034. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008034>
29. Parra B., Lizarazo J., Jiménez-Arango J.A., Zea-Vera A.F., González-Manrique G., Vargas J., et al. Guillain-Barre syndrome associated with Zika virus infection in Colombia. *N. Engl. J. Med.* 2016; 375(16): 1513–23. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1605564>
30. Halstead S.B. Dengue antibody-dependent enhancement: knowns and unknowns. *Microbiol. Spectr.* 2014; 2(6). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.aid-0022-2014>

Информация об авторах

Отрашевская Елена Викторовна — главный специалист отдела научных исследований и опытно-конструкторских работ СПбНИИВС, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2491-4072>

Казакова Елена Владимировна — зам. директора по управлению персоналом и организационному проектированию СПбНИИВС, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-0218-6641>

Жиренкина Екатерина Николаевна — к.м.н., зам. директора по научной работе СПбНИИВС, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0810-5985>

Трухин Виктор Павлович — к.ю.н., директор СПбНИИВС, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6635-363X>

Игнатъев Георгий Михайлович[✉] — д.м.н., проф., рук. кафедры иммунобиотехнологии СПбНИИВС, Санкт-Петербург, Россия, marburgman@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9731-3681>

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

Статья поступила в редакцию 07.09.2021;
принята к публикации 04.04.2022;
опубликована 30.04.2022

Information about the authors

Alena V. Atrasheuskaya — senior specialist of R&D department, Saint-Petersburg Scientific Research Institute of Vaccines and Serums, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2491-4072>

Elena V. Kazakova — Head HR and organizational designer, Saint-Petersburg Scientific Research Institute of Vaccines and Serums, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-0218-6641>

Ekaterina N. Zhirenkina — Cand. Sci. (Med.), Deputy Director for science, Scientific Research Institute of Vaccines and Serums, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0810-5985>

Victor P. Trukhin — Director, Saint-Petersburg Scientific Research Institute of Vaccines and Serums, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6635-363X>

Georgy M. Ignatyev[✉] — D. Sci. (Med.), Prof., Head, Department of immunobiotechnology, Saint-Petersburg Scientific Research Institute of Vaccines and Serums, St. Petersburg, Russia, marburgman@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9731-3681>

Author contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

The article was submitted 07.09.2021;
accepted for publication 04.04.2022;
published 30.04.2022



Активность факторов периферической крови против *Candida albicans*

Годовалов А.П.[✉], Боев И.А.

Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера, Пермь, Россия

Аннотация

Введение. Колонизация разных биотопов человека дрожжеподобными грибами рода *Candida* встречается достаточно часто. При этом клиническая картина воспалительного процесса развивается не в каждом случае, что предполагает формирование уникального симбиоза между микроскопическими грибами и клетками организма человека, поддержание которого во многом зависит от активности иммунной системы. Основная масса исследований противогрибковой активности иммунной системы человека сконцентрирована вокруг патологических состояний, и практически не уделяется внимания таковой у здоровых лиц. Показано, что факторы иммунитета человека могут, с одной стороны, способствовать формированию биоплёнок *C. albicans*, а с другой стороны — принимают самое активное участие в их разрушении.

Цель исследования — изучение кандидацидной, антибиоплёночной, фагоцитарной и радикалпродуцирующей активности периферической крови здоровых доноров при использовании в качестве объекта клеток *C. albicans*.

Материалы и методы. От 32 практически здоровых доноров получали пробы периферической крови, изучали микоцидную активность, поглотительную и радикалпродуцирующую способность лейкоцитов, а также эффект сыворотки крови на биомассу плёнки. Для опсонизации клеток *C. albicans* использовали иммуноглобулины класса G (IgG) согласно апробированной ранее методике.

Результаты. Показана слабая микоцидная активность периферической крови здоровых доноров. Опсонизация *C. albicans* IgG существенно повышает эту функцию крови. В ранней фазе контакта с *C. albicans* дрожжеподобные клетки поглощают главным образом нейтрофильные лейкоциты, а мононуклеарные лейкоциты практически не участвуют в процессе фагоцитоза. Вероятно, их активность проявляется в более поздний период. Опсонизация *C. albicans* стимулирует поглотительную активность лейкоцитов, что отражается в увеличении среднего числа поглощённых объектов на один лейкоцит. Показано, что опсонины могут участвовать в усилении радикалпродуцирующей активности лейкоцитов. Так, инактивация белков системы комплемента нивелирует стимулирующий эффект опсонизации *C. albicans*.

Заключение. Таким образом, IgG и белки системы комплемента вносят существенный вклад в подавление патогенной активности *C. albicans*.

Ключевые слова: *C. albicans*, микоцидная активность, биоплёнка, фагоцитоз, «респираторный взрыв», лейкоциты

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Пермского государственного медицинского университета им. акад. Е.А. Вагнера (протокол № 11 от 24.11.2021).

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

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

Для цитирования: Годовалов А.П., Боев И.А. Активность факторов периферической крови против *Candida albicans*. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2022;99(2):225–230.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-211>

Activity of peripheral blood factors against *Candida albicans*

Anatoly P. Godovalov[✉], Iosif A. Boev

Academician E.A. Vagner Perm State Medical University, Perm, Russia

Abstract

Introduction. Currently, the colonization of various human biotopes by yeast-like fungi of the genus *Candida* is considered a relatively frequent phenomenon. At the same time, the clinical manifestations of the inflammatory process do not develop in every case, which implies the formation of a unique symbiosis between microscopic fungi and cells of the human body, the maintenance of which largely depends on the activity of the immune system. The main part of researches on the antifungal activity of the human immune system is concentrated around pathological conditions, and practically no attention is paid to such in healthy individuals. It has been shown that human immunity factors can, on the one hand, for example, contribute to the formation of *C. albicans* biofilms, and, on the other hand, take an active part in their destruction.

The **aim** of the investigation was to evaluate the candidacid, antibiofilm, phagocytic and radical-producing activities of peripheral blood of healthy donors using *C. albicans* cells as an object.

Materials and methods. Peripheral blood samples were obtained from 32 healthy donors, mycidal activity, absorption and radical-producing abilities of leukocytes, as well as the effect of blood serum on film biomass were assessed. For opsonization of *C. albicans* cells, immunoglobulins G were used according to the previously approved method.

Results. A weak mycocidal activity of the peripheral blood of healthy donors was shown. Opsonization of *C. albicans* with immunoglobulin G significantly increases this blood function. In the early phase of contact with *C. albicans*, yeast-like cells mainly absorb by neutrophilic leukocytes, and mononuclear cells practically do not participate in the process of phagocytosis, probably their activity manifests itself in a later period. Opsonization of *C. albicans* stimulates the absorption activity of leukocytes, which is reflected in an increase in the average number of absorbed objects per leukocyte. It has been shown that opsonins can participate in enhancing the radical-producing activity of leukocytes. Thus, inactivation of proteins of the complement system levels the stimulating effect of *C. albicans* opsonization.

Conclusion. Immunoglobulins G and proteins of the complement system make a significant contribution to the suppression of the pathogenic activity of *C. albicans*.

Keywords: *C. albicans*, mycidal activity, biofilm, phagocytosis, "respiratory burst", leukocytes

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Academician E.A. Vagner Perm State Medical University (Protocol No. 11, November, 24, 2021).

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Godovalov A.P., Boev I.A. Activity of peripheral blood factors against *Candida albicans*. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2022;99(2): 225–230. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-211>

Введение

У клинически здоровых лиц достаточно часто выявляется носительство *Candida* spp.: в орофарингеальной зоне — у 20–30% добровольцев, в тонком кишечнике — у 50–54%, в толстом кишечнике — у 55–70%, в фекалиях — у 65–70% [1]. Такая ситуация отчасти может быть обусловлена способностью грибов подавлять антагонистическую активность облигатной микробиоты слизистых оболочек человека. Показано, что *C. albicans* участвует в формировании сложноорганизованных микробных сообществ, в составе которых изменяются свойства этого микроорганизма. Известно, что частота встречаемости *C. albicans* в пристеночном муцине слепой кишки в 2 раза больше в присутствии *Staphylococcus aureus*, чем без него [1].

Среди факторов патогенности *C. albicans* следует выделить способность формировать биоплёнки [2]. Установлено, что применение антимикотических препаратов не приводит к полной гибели биоплёночных клеток *C. albicans*. Показано, что в случае использования нистатина в биоплёнке выживает около 30% клеток *C. albicans* [3].

Известно, что при разных клинических ситуациях *C. albicans* оказывает супрессивное влияние

на иммунокомпетентные клетки. Это может быть обусловлено способностью некоторых представителей рода *Candida* активировать протеолиз компонентов иммунитета [4]. Метаболиты *Candida* spp. замедляют созревание фаголизосом и продукцию оксида азота макрофагами [5]. Активация TLR2, опосредованная *Candida* spp., индуцирует сигналы, поддерживающие толеогенный профиль дендритных клеток [6]. Однако при определённых условиях наблюдается состояние комменсализма, когда иммунные факторы сдерживают развитие инфекции. Так, J.C. Oliver и соавт. [7] установлено, что ведущая роль в сдерживании популяции *Candida* spp. отводится фагоцитирующим клеткам. В исследованиях S.G. Nanjappa и соавт. [8] показано, что CD8⁺-Т-клетки памяти реализуют резистентность к *Candida* spp. даже при отсутствии влияния со стороны CD4⁺-Т-клеток.

Моноциты являются ключевыми клетками врождённого иммунитета, формирующими ответ на инфицирование *C. albicans* [9]. Однако в исследованиях J. Chandra и соавт. [10] приводятся сведения, что в присутствии фракции моноцитов у грибов увеличивается биоплёнокообразующая активность, что не описано для нейтрофильных гранулоцитов,

которые обладают более выраженным токсическим потенциалом в первую очередь за счёт более выраженной продукции активных форм кислорода [11]. С другой стороны, антителозависимая активация белков системы комплемента может оказать эффект по элиминации биоплёнок, сформированных грибами *Candida spp.* [12]. В то же время уровень специфических иммуноглобулинов класса М к маннану в крови инфицированных *C. albicans* пациентов не отличается от такового у здоровых лиц, а уровень специфических иммуноглобулинов класса G (IgG) к маннану существенно выше, чем у лиц группы сравнения [13]. Более того, при инфицировании *C. albicans* концентрация специфических IgG в моче и бронхоальвеолярной жидкости существенно повышается [13]. В доступной литературе отсутствуют комплексные сведения о противогрибковой активности факторов периферической крови здоровых лиц.

Цель исследования — изучение кандидацидной, антибиоплёночной, фагоцитарной и радикал-продуцирующей активности периферической крови здоровых доноров при использовании в качестве объекта клеток *C. albicans*.

Материалы и методы

Исследования проведены с использованием проб периферической крови 32 практически здоровых доноров, которые дали добровольное согласие на использование образцов крови. Для оценки микоцидной активности крови пробы делили на 3 порции. В первую порцию вносили тест-штамм *C. albicans* ATCC 10231 и сразу же осуществляли посев на среду Сабуро. Во вторую порцию инокулировали опсонизированные, а в третью — неопсонизированные грибы. Опсонизацию осуществляли согласно ранее апробированной методике [14] с использованием коммерческого препарата «Октогам», содержащего IgG с широким спектром специфических иммуноглобулинов против разных микроорганизмов. Рабочая концентрация препарата по IgG составила 20 мг/мл [15]. В отдельной серии исследований для опсонизации применяли свежеполученную и прогретую при 56°C пулированную сыворотку, что позволяет оценить вклад компонентов системы комплемента. Опсонизацию микроорганизмов осуществляли в течение 1 ч при 37°C. Пробы с опсонизированными и неопсонизированными *C. albicans* инкубировали 3 ч при 37°C. Посев образцов для подсчёта выросших колоний выполняли на среду Сабуро. В качестве дополнительного контроля использовали пробы, куда вместо крови вносили питательную среду и неопсонизированные или опсонизированные клетки *C. albicans*.

Биоплёнки *C. albicans* выращивали в плоскостонных полистироловых планшетах в течение 24 ч

при 37°C в бульоне Сабуро. После этого удаляли питательный бульон и промывали планшеты забуференным физиологическим раствором. На плёнки наносили цельную кровь или свежеполученную сыворотку на 1 ч, инкубацию осуществляли в термостате при 37°C. В контрольные пробы вносили равный объём питательного бульона. Толщину массы био-плёнок оценивали по методу O'Toole [16] после их окраски генцианвиолетом с последующей экстракцией красителя спиртом и учётом оптической плотности на планшетном фотометре «PowerWave X».

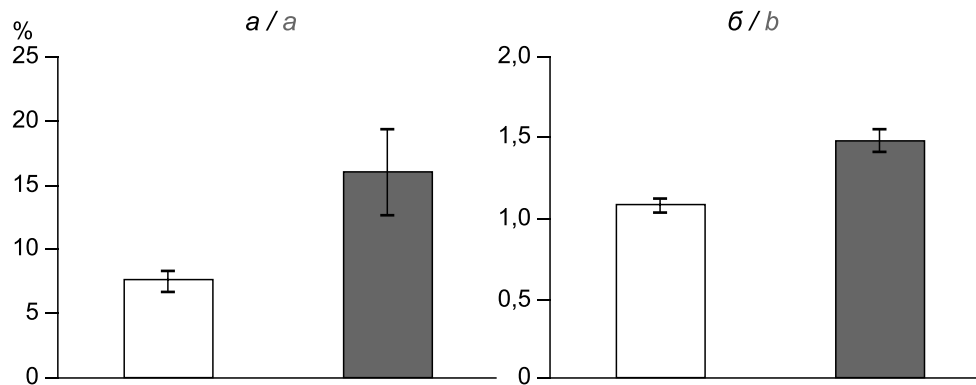
При изучении поглотительной активности лейкоцитов все пробы периферической крови делили на две порции. В 1-ю порцию вносили опсонизированные клетки *C. albicans*, во 2-ю — неопсонизированные микроорганизмы. Сущность метода аналогична таковому, как описано в работе [17], за исключением того, что в качестве объекта фагоцитоза выбраны клетки *C. albicans*. Оценку числа фагоцитирующих нейтрофилов и моноцитов проводили на микропрепаратах, окрашенных по методу Романовского–Гимзе. В каждом препарате учитывали не менее 200 фагоцитирующих клеток. Рассчитывали долю фагоцитирующих клеток каждого типа, фагоцитарное число (среднее число *C. albicans*, приходящееся на 1 фагоцитирующую клетку), а также абсолютные показатели фагоцитарной активности клеток.

Для определения радикалпродуцирующей активности лейкоцитов при постановке реакции люминолзависимой хемилюминесценции в стимулированном варианте в лунках планшета («Corning Inc. Costar») смешивали лейкоциты (25×10^6 /мл) и взвесь тест-штамма *C. albicans*. В контрольные пробы вместо тест-штамма вносили равный объём раствора Хенкса. Измерение проводили на люминометре («Thermo Labsystems»). Для статистического анализа использовали интегральный показатель хемилюминесценции за весь период измерения (integral, RLU) [18].

Статистический анализ осуществляли с помощью программного пакета «Statistica 6.0». Данные представлены в виде средней арифметической величины (M) и стандартной ошибки средней арифметической (m). Для проверки нормальности распределения применяли критерий Шапиро–Уилка. В случае распределения, приближенного к нормальному, использовали критерий Стьюдента, в остальных — критерий Манна–Уитни. Критический уровень значимости (p) при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05.

Результаты и обсуждение

Опсонизация *C. albicans* комплексным препаратом IgG статистически значимо не меняла число жизнеспособных клеток. Выявлена тенденция снижения числа жизнеспособных неопсонизированных



Относительное число фагоцитирующих *C. albicans* лейкоцитов (а) и фагоцитарное число лейкоцитов (б).

Светлые столбики — неопсонизированные *C. albicans*, тёмные — опсонизированные *C. albicans*.

Relative number of leukocytes phagocytosing *C. albicans* (a) and number of phagocytic leukocytes (b).

White bars — non-opsionized *C. albicans*; dark bars — opsonized *C. albicans*.

C. albicans после контакта с кровью с 237 ± 141 КОЕ в начальный момент контакта, до 65 ± 28 КОЕ через 180 минут ($p > 0,05$). Опсонизация *C. albicans* IgG увеличивала микоцидную активность крови (число живых клеток снижалось до 22 ± 12 КОЕ; $p < 0,05$).

C. albicans формировали достаточно выраженную биоплёнку — $0,411 \pm 0,064$ усл. ед. Обработка такой плёнки цельной кровью существенно уменьшала её толщину ($0,270 \pm 0,028$ усл. ед.; $p < 0,05$). При использовании свежеполученной сыворотки крови биоплёнка *C. albicans* разрушалась практически полностью ($0,117 \pm 0,006$ усл. ед.; $p < 0,05$).

При оценке поглотительной активности лейкоцитов установлено её существенное усиление при опсонизации объектов фагоцитоза с помощью IgG (рисунок). При этом количество активно поглощающих лейкоцитов было в 15 раз больше, чем в пробах с неопсонизированными *C. albicans*. Изменения поглотительной активности лейкоцитов затрагивают преимущественно таковую среди нейтрофилов. Опсонизация *C. albicans* IgG существенно не меняет число фагоцитирующих моноцитов.

При оценке радикалпродуцирующей активности лейкоцитов установлено, что клетки *C. albicans* стимулируют «респираторный взрыв» лейкоцитов ($1374,4 \pm 327,0$ RLU; в нестимулированных пробах — $213,6 \pm 19,3$ RLU; $p < 0,05$). В случае опсонизации *C. albicans* свежеполученной сывороткой крови этот эффект существенно усиливался ($2758,1 \pm 646,9$ RLU; $p < 0,05$ по сравнению с показателями проб с неопсонизированными клетками). Предварительное прогревание сыворотки при 56°C нивелировало стимулирующий эффект до уровня, аналогичного таковому в пробах с неопсонизированными *C. albicans* ($1716,7 \pm 444,8$ RLU; $p > 0,05$ по сравнению с показателями проб с неопсонизированными грибами).

Известно, что развитие кандидозной инфекции во многом определяется состоянием баланса меж-

ду факторами патогенности *C. albicans* и реактивностью макроорганизма. Как показано в настоящем исследовании, гуморальные факторы иммунитета играют существенную роль в подавлении жизнедеятельности *C. albicans*. Например, IgG, повышая специфичность распознавания дрожжеподобных грибов фагоцитирующими лейкоцитами, увеличивают их поглотительную активность. Компоненты системы комплемента оказывают деструктивное действие на биоплёнки *C. albicans* и участвуют в инициации генерации гидроксильных радикалов лейкоцитами. Кроме того, сыворотка крови содержит ряд пептидов, оказывающих негативное влияние на стенку дрожжевых клеток, трансляцию белка и т.д. [19]. В целом повсеместное распространение *Candida* spp., широкая представленность сходных внутриродовых антигенов придают иммунному ответу ряд отличительных черт, среди которых особенно следует выделить накопление естественных антител. Такая ситуация обеспечивает при очередном контакте с грибами более быстрые их распознавание и элиминацию [20]. С другой стороны, согласно данным литературы, активность системы комплемента и количество иммуноглобулинов зависят от многих факторов, среди которых не последнее место занимают адекватный белковый рацион [21], заболевания печени и некоторые другие [22].

Выявленное в настоящем исследовании изменение поглотительной активности преимущественно нейтрофильных лейкоцитов может быть обусловлено тем, что мононуклеарные клетки зависят от опсонизации в меньшей степени [23]. Мононуклеарные лейкоциты активно фагоцитируют нейтрофилы, вступившие в апоптоз [24], что позволяет предположить отсроченное развитие изменений их фагоцитарной активности.

Заключение

Таким образом, вероятно, что преимущественную роль в сдерживании *C. albicans*, снижении их

колониционной активности играют гуморальные факторы иммунной системы хозяина, способные диффундировать через слизистые оболочки. Кроме этого, фагоцитарная активность нейтрофильных гранулоцитов, усиленная иммуноглобулинами, вносит не менее существенный вклад в подавление патогенной активности *C. albicans*.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Несвицкий Ю.В., Волчкова Е.В., Филина Ю.С., Богданова Е.А., Умбетова К.Т., Пак С.Г. Разработка комплексного подхода к терапии инфекции, вызванной грибами рода *Candida*. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2015; 20(1): 27–31.
2. Gulati M., Nobile C.J. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes Infect.* 2016; 18(5): 310–21. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2016.01.002>
3. Чеботарь И.В., Паршиков В.В. Исследование действия антимикотических препаратов на биопленки, сформированные грибами рода *Candida*. *Акушерство и гинекология*. 2013; (5): 98–102.
4. Valand N., Girija U.V. *Candida* pathogenicity and interplay with the immune system. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2021; 1313: 241–72. https://doi.org/10.1007/978-3-030-67452-6_11
5. Slesiona S., Gressler M., Mihlan M., Zaehle C., Schaller M., Barz D., et al. Persistence versus escape: *Aspergillus terreus* and *Aspergillus fumigatus* employ different strategies during interactions with macrophages. *PLoS One*. 2012; 7(2): e31223. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031223>
6. Dillon S., Agrawal S., Banerjee K., Letterio J., Denning T.L., Oswald-Richter K., et al. Yeast zymosan, a stimulus for TLR2 and dectin-1, induces regulatory antigen-presenting cells and immunological tolerance. *J. Clin. Invest.* 2006; 116(4): 916–28. <https://doi.org/10.1172/JCI27203>
7. Oliver J.C., Ferreira C.B.R.J., Silva N.C., Dias A.L.T. *Candida* spp. and phagocytosis: multiple evasion mechanisms. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2019; 112(10): 1409–23. <https://doi.org/10.1007/s10482-019-01271-x>
8. Nanjappa S.G., McDermott A.J., Fites J.S., Galles K., Wüthrich M., Deepe G.S. Jr., et al. Antifungal Tc17 cells are durable and stable, persisting as long-lasting vaccine memory without plasticity towards IFN γ cells. *PLoS Pathog.* 2017; 13(5): e1006356. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006356>
9. Lionakis M.S. New insights into innate immune control of systemic candidiasis. *Med. Mycol.* 2014; 52(6): 555–64. <https://doi.org/10.1093/mmy/myu029>
10. Chandra J., McCormick T.S., Imamura Y., Mukherjee P.K., Ghannoum M.A. Interaction of *Candida albicans* with adherent human peripheral blood mononuclear cells increases *C. albicans* biofilm formation and results in differential expression of pro- and anti-inflammatory cytokines. *Infect. Immun.* 2007; 75(5): 2612–20. <https://doi.org/10.1128/IAI.01841-06>
11. Arce Miranda J.E., Baronetti J.L., Sotomayor C.E., Paraje M.G. Oxidative and nitrosative stress responses during macrophage-*Candida albicans* biofilm interaction. *Med. Mycol.* 2019; 57(1): 101–13. <https://doi.org/10.1093/mmy/myx143>
12. Chupáčová J., Borghi E., Morace G., Los A., Bujdáková H. Anti-biofilm activity of antibody directed against surface antigen complement receptor 3-related protein-comparison of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Pathog. Dis.* 2018; 76(1). <https://doi.org/10.1093/femspd/ftx127>
13. Wang K., Luo Y., Zhang W., Xie S., Yan P., Liu Y., et al. Diagnostic value of *Candida mannan* antigen and anti-mannan IgG and IgM antibodies for *Candida* infection. *Mycoses*. 2020; 63(2): 181–8. <https://doi.org/10.1111/myc.13035>
14. Шестакова А.В., Кадыралиев Б.К., Годовалов А.П., Быкова Л.П. Опсонизация *Candida albicans* иммуноглобулином для внутривенного введения. *Медицинская иммунология*. 2015; (5): 434.
15. Дерябин Д.Г., Каримов И.Ф. Особенности реагирования рекомбинантных люминесцирующих бактерий с различными Lux-оперонами в фагоцитарной системе. *Вестник Оренбургского государственного университета*. 2007; (12): 4–7.
16. O'Toole G.A. Microtiter dish biofilm formation assay. *J. Vis. Exp.* 2011; 47(4): 2437. <https://doi.org/10.3791/2437>
17. Shilov J.I., Orlova E.G. Role of adrenergic mechanisms in regulation of phagocytic cell functions in acute stress response. *Immunol. Lett.* 2003; 86(3): 229–33. [https://doi.org/10.1016/S0165-2478\(03\)00027-0](https://doi.org/10.1016/S0165-2478(03)00027-0)
18. Шилов С.Ю., Шилов Ю.И., Барков С.Ю. Влияние дегидроэпиандростерона на показатели люминолзависимой хемилюминисценции при зимозановом перитоните у старых крыс. *Российский иммунологический журнал*. 2017; 11(3): 570–2.
19. Арзуманян В.Г., Артемьева Т.А., Иксанова А.М. Противогрибковая активность сыворотки крови человека и некоторых млекопитающих. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2019; 96(1): 17–22. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-1-17-22>
20. Шаталова Е.В., Парахина О.В. Выраженность гуморального иммунного ответа у иммуносупрессированных животных в условиях кандид-бактериальной инфекции. *Аллергология и иммунология*. 2016; 17(1): 69.
21. Amaral J.F., Foschetti D.A., Assis F.A., Menezes J.S., Vaz N.M., Faria A.M. Immunoglobulin production is impaired in protein-deprived mice and can be restored by dietary protein supplementation. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2006; 39(12): 1581–6. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2006001200009>
22. Unsworth D.J. Complement deficiency and disease. *J. Clin. Pathol.* 2008; 61(9): 1013–7. <https://doi.org/10.1136/jcp.2008.056317>
23. Czop J.K., Fearon D.T., Austen K.F. Opsonin-independent phagocytosis of activators of the alternative complement pathway by human monocytes. *J. Immunol.* 1978; 120(4): 1132–8.
24. Liddiard K., Rosas M., Davies L.C., Jones S.A., Taylor P.R. Macrophage heterogeneity and acute inflammation. *Eur. J. Immunol.* 2011; 41(9): 2503–8. <https://doi.org/10.1002/eji.201141743>

REFERENCES

1. Nesvizhskiy Yu.V., Volchkova E.V., Filina Yu.S., Bogdanova E.A., Umbetova K.T., Pak S.G. The elaboration of the complex approach to the treatment of infections caused by fungi of the genus *Candida*. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni*. 2015; 20(1): 27–31. (in Russian)
2. Gulati M., Nobile C.J. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes Infect.* 2016; 18(5): 310–21. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2016.01.002>
3. Chebotar' I.V., Parshikov V.V. Investigation of the effect of antimycotics on the *Candida* biofilms. *Akusherstvo i ginekologiya*. 2013; (5): 98–102. (in Russian)
4. Valand N., Girija U.V. *Candida* pathogenicity and interplay with the immune system. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2021; 1313: 241–72. https://doi.org/10.1007/978-3-030-67452-6_11
5. Slesiona S., Gressler M., Mihlan M., Zaehle C., Schaller M., Barz D., et al. Persistence versus escape: *Aspergillus terreus* and *Aspergillus fumigatus* employ different strategies during interactions with macrophages. *PLoS One*. 2012; 7(2): e31223. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031223>
6. Dillon S., Agrawal S., Banerjee K., Letterio J., Denning T.L., Oswald-Richter K., et al. Yeast zymosan, a stimulus for TLR2 and dectin-1, induces regulatory antigen-presenting cells and

- immunological tolerance. *J. Clin. Invest.* 2006; 116(4): 916–28. <https://doi.org/10.1172/JCI27203>
7. Oliver J.C., Ferreira C.B.R.J., Silva N.C., Dias A.L.T. *Candida* spp. and phagocytosis: multiple evasion mechanisms. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2019; 112(10): 1409–23. <https://doi.org/10.1007/s10482-019-01271-x>
 8. Nanjappa S.G., McDermott A.J., Fites J.S., Galles K., Wüthrich M., Deepe G.S. Jr., et al. Antifungal Tc17 cells are durable and stable, persisting as long-lasting vaccine memory without plasticity towards IFN γ cells. *PLoS Pathog.* 2017; 13(5): e1006356. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006356>
 9. Lionakis M.S. New insights into innate immune control of systemic candidiasis. *Med. Mycol.* 2014; 52(6): 555–64. <https://doi.org/10.1093/mmy/myu029>
 10. Chandra J., McCormick T.S., Imamura Y., Mukherjee P.K., Ghannoum M.A. Interaction of *Candida albicans* with adherent human peripheral blood mononuclear cells increases *C. albicans* biofilm formation and results in differential expression of pro- and anti-inflammatory cytokines. *Infect. Immun.* 2007; 75(5): 2612–20. <https://doi.org/10.1128/IAI.01841-06>
 11. Arce Miranda J.E., Baronetti J.L., Sotomayor C.E., Paraje M.G. Oxidative and nitrosative stress responses during macrophage — *Candida albicans* biofilm interaction. *Med. Mycol.* 2019; 57(1): 101–13. <https://doi.org/10.1093/mmy/myx143>
 12. Chupáčová J., Borghi E., Morace G., Los A., Bujdák H. Antibiofilm activity of antibody directed against surface antigen complement receptor 3-related protein-comparison of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Pathog. Dis.* 2018; 76(1). <https://doi.org/10.1093/femspd/ftx127>
 13. Wang K., Luo Y., Zhang W., Xie S., Yan P., Liu Y., et al. Diagnostic value of *Candida mannan* antigen and anti-mannan IgG and IgM antibodies for *Candida* infection. *Mycoses.* 2020; 63(2): 181–8. <https://doi.org/10.1111/myc.13035>
 14. Shestakova A.V., Kadyraliev B.K., Godovalov A.P., Bykova L.P. Opsonization of *Candida albicans* with immunoglobulin for intravenous administration. *Meditsinskaya immunologiya.* 2015; (S): 434. (in Russian)
 15. Deryabin D.G., Karimov I.F. Peculiarities recombinant luminescent bacterium reaction with different lux-operons in phagocytal system. *Vestnik Orenburgskogo gosudarstvennogo universiteta.* 2007; (12): 4–7. (in Russian)
 16. O'Toole G.A. Microtiter dish biofilm formation assay. *J. Vis. Exp.* 2011; 47(4): 2437. <https://doi.org/10.3791/2437>
 17. Shilov J.I., Orlova E.G. Role of adrenergic mechanisms in regulation of phagocytic cell functions in acute stress response. *Immunol. Lett.* 2003; 86(3): 229–33. [https://doi.org/10.1016/S0165-2478\(03\)00027-0](https://doi.org/10.1016/S0165-2478(03)00027-0)
 18. Shilov S.Yu., Shilov Yu.I., Barkov S.Yu. Effect of dehydroepiandrosterone on the luminol-dependent chemiluminescence response under zymosan-induced peritonitis in old rats. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal.* 2017; 11(3): 570–2. (in Russian)
 19. Arzumanyan V.G., Artem'eva T.A., Iksanova A.M. Antifungal activity of human and some mammals sera. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2019; 96(1): 17–22. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-1-17-22> (in Russian)
 20. Shatalova E.V., Parakhina O.V. The severity of the humoral immune response in immunosuppressed animals under conditions of candida-bacterial infection. *Allergologiya i immunologiya.* 2016; 17(1): 69. (in Russian)
 21. Amaral J.F., Foschetti D.A., Assis F.A., Menezes J.S., Vaz N.M., Faria A.M. Immunoglobulin production is impaired in protein-deprived mice and can be restored by dietary protein supplementation. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2006; 39(12): 1581–6. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2006001200009>
 22. Unsworth D.J. Complement deficiency and disease. *J. Clin. Pathol.* 2008; 61(9): 1013–7. <https://doi.org/10.1136/jcp.2008.056317>
 23. Czop J.K., Fearon D.T., Austen K.F. Opsonin-independent phagocytosis of activators of the alternative complement pathway by human monocytes. *J. Immunol.* 1978; 120(4): 1132–8.
 24. Liddiard K., Rosas M., Davies L.C., Jones S.A., Taylor P.R. Macrophage heterogeneity and acute inflammation. *Eur. J. Immunol.* 2011; 41(9): 2503–8. <https://doi.org/10.1002/eji.201141743>

Информация об авторах

Годовалов Анатолий Петрович[✉] — к.м.н., в.н.с. Центральной научно-исследовательской лаборатории, доцент кафедры микробиологии с курсом вирусологии ПГМУ им. акад. Е.А. Вагнера, Пермь, Россия, agodovalov@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-5112-2003>

Боев Иосиф Александрович — стоматолог-хирург Клинической стоматологической больницы ПГМУ им. акад. Е.А. Вагнера, Пермь, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9682-7680>

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

Статья поступила в редакцию 30.11.2021;
принята к публикации 08.04.2022;
опубликована 29.04.2022

Information about the authors

Anatoly P. Godovalov[✉] — Cand. Sci. (Med.), leading researcher, Central Research Laboratory, Associate Professor, Department of microbiology with a course of virology, Academician E.A. Vagner Perm State Medical University, Perm, Russia, agodovalov@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-5112-2003>

Iosif A. Boev — dentist-surgeon, Clinical Dental Hospital, Academician E.A. Vagner Perm State Medical University, Perm, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9682-7680>

Author contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

The article was submitted 30.11.2021;
accepted for publication 08.04.2022;
published 29.04.2022

ОБЗОРЫ

Научный обзор

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-230>



Роль цианотоксинов в патологии человека и животных (обзор)

Поляк Ю.М.^{1✉}, Поляк М.С.²

¹Санкт-Петербургский научно-исследовательский центр экологической безопасности РАН — обособленное структурное подразделение Санкт-Петербургского федерального исследовательского центра РАН, Санкт-Петербург, Россия;

²Научно-исследовательский центр фармакотерапии, Санкт-Петербург, Россия

Аннотация

Цианобактерии (ЦБ) являются древнейшей и широко распространённой формой жизни на Земле. Некоторые представители этих микроорганизмов образуют токсины, опасные для человека и животных. В работе приводятся данные о распространении токсинообразующих ЦБ, патогенезе действия токсинов на клетки и ткани человека, сельскохозяйственных, домашних и диких животных. Уделено серьёзное внимание нейротоксическому действию цианотоксинов (ЦТ), наиболее часто являющихся причиной гибели животных. ЦТ способны вызывать тяжёлые поражения центральной и периферической нервной системы, печени, почек, репродуктивной системы и пищеварительного тракта. Приводятся данные о гепатотоксическом, нефротоксическом, кардиотоксическом, иммунотоксическом действии ЦТ. Рассматривается их роль в возникновении тяжёлых дегенеративных процессов в мозге человека. Оценивается возможность влияния ЦТ на канцерогенез, особенно в печени, толстом кишечнике и прямой кишке. Отмечена ограниченность существующих данных о болезнетворности ЦБ и той помощи, которая необходима при вызванных ими поражениях. Обсуждается необходимость дальнейших исследований клинических проявлений патологических процессов, вызванных ЦТ, разработки методов диагностики и специфической терапии отравлений.

Ключевые слова: цианобактерии, микроцистины, цилиндроспермопсины, анатоксины, сакситоксины, нейротоксичность цианотоксинов, гепатотоксичность цианотоксинов

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках государственного задания при поддержке Минобрнауки России по теме FFZF-2022-0011.

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

Для цитирования: Поляк Ю.М., Поляк М.С. Роль цианотоксинов в патологии человека и животных (обзор). *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022;99(2):231–243.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-230>

Review article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-230>

The role of cyanotoxins in human and animal pathology (a review)

Yulia M. Polyak^{1✉}, Mark S. Polyak²

¹Scientific Research Centre for Ecological Safety of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia;

²Scientific Research Centre of Pharmacotherapy, St. Petersburg, Russia

Abstract

Cyanobacteria are the oldest and most widespread form of life on Earth. Many of them produce toxins that are dangerous to humans and animals. The review presents data on the distribution of toxin-producing cyanobacteria, the pathogenesis of the action of toxins on human and animal cells and tissues. A significant consideration is given to the neurotoxic effect of cyanotoxins, which is most common cause of animal death. Cyanotoxins can

cause severe damage to the central and peripheral nervous systems, as well as the liver, kidneys, reproductive system and digestive tract. Data on hepatotoxic, nephrotoxic, cardiotoxic, immunotoxic effects of cyanotoxins are presented. Their role in the human brain degenerative diseases is considered. The possible influence of cyanotoxins on carcinogenesis, especially in the liver, large intestine and rectum, is evaluated. The limitations of the existing data on the pathogenicity of cyanobacteria and medical care necessary for cyanotoxin-induced diseases are noted. The necessity for further studies of clinical manifestations of pathological processes caused by cyanotoxins, the development of diagnostic methods and specific therapy of poisoning is discussed.

Keywords: cyanobacteria, microcystins, cylindrospermopsins, anatoxins, saxitoxins, cyanotoxin neurotoxicity, cyanotoxin hepatotoxicity

Funding source. This work was financially supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (research topic No FFZF-2022-0011).

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Polyak Yu.M., Polyak M.S. The role of cyanotoxins in human and animal pathology (a review). *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2022;99(2): 231–243. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-230>

Введение

Цианобактерии (ЦБ) относятся к древнейшим обитателям Земли. Не вызывает сомнения, что они существовали на нашей планете в протерозое, причём в самом начале этого периода. Однако существуют весомые доказательства того, что они обитали ранее, в архее, т.е. в самом древнем периоде существования нашей планеты [1, 2]. Свидетельством являются строматолиты — окаменелости сообществ ЦБ, природных матов (более известные медицинским микробиологам как биоплёнки, хотя специфичные по структуре, характерной именно для этих микроорганизмов). Таким образом, можно считать, что ЦБ существуют около 3,0–3,5 млрд лет. Условия, в которых в тот период они жили и размножались, были более чем жёсткими: резкие температурные перепады, отсутствие влаги, бескислородная среда, землетрясения и т.п. Это свидетельствует о высокой жизнестойкости ЦБ, их способности адаптироваться к неблагоприятным условиям существования. Это же подтверждается и в наши дни, поскольку ЦБ обнаруживают не только в водной среде (это их излюбленная среда обитания), но и в пустыне, на скалах, в арктических регионах [2–4]. Уместно вспомнить, что ЦБ существовали на Земле, когда в её атмосфере не было кислорода. Утверждают, что ЦБ сыграли значительную (если не решающую) роль в образовании нынешней атмосферы, прежде всего за счёт насыщения её кислородом. Прогнозируется, что потепление приведёт к дальнейшему распространению ЦБ [5].

В литературе прошлых лет ЦБ именуют сине-зелеными водорослями. Действительно, изначально их относили к эукариотам, микроводорослям. Впервые на основании изучения морфологии клеток на их принадлежность к прокариотам указал Ф. Кон в середине XIX в. В дальнейшем рядом исследований было подтверждено, что сине-зеленые водоросли являются микроорганизмами. Следует заметить, что ценный вклад в установление природы ЦБ внесли отечественные учёные [6]. До сегод-

няшнего дня, однако, не только в популярной, но и в научной литературе часто фигурирует термин «сине-зеленые водоросли», что является, строго говоря, ошибочным.

В настоящей работе не представляется возможным обсуждать сложные проблемы таксономии этой обширной группы микроорганизмов и их метаболизма. К тому же они решены далеко не в полной мере. Упомянем только, что ЦБ являются фототрофами, свет для них — основной источник энергии. Поэтому они не могут существовать в организмах человека и животных. Отсюда важное условие для понимания их болезнетворности — опасность для человека и животных представляют не сами ЦБ, а те токсичные продукты, которые они выделяют во внешнюю среду [7]. Именно токсины являются причиной острых и хронических патологий у человека и животных. Эти отравления зачастую становятся смертельно опасными, о чём свидетельствуют многочисленные сообщения о падеже домашних, сельскохозяйственных и диких животных [8]. В данном обзоре рассмотрены основные типы цианотоксинов (ЦТ), их распространение, пути поступления в организмы человека и животных, характер токсического действия.

Основная часть

Классификация цианотоксинов

Далеко не все ЦБ являются продуцентами токсинов. К числу образующих токсичные продукты принадлежат представители родов *Microcystis*, *Nodularia*, *Dolichospermum* (более известный под ныне устаревшим, но часто используемым названием *Anabaena*), *Nostoc*, *Cylindrospermopsis*, *Lyngbya* и ряд других [7]. В литературе прошлых лет среди наиболее частых представителей ЦБ, образующих токсины, фигурирует род *Anabaena*. Сегодня токсинообразующие представители этого рода отнесены к роду *Dolichospermum*. Среди ЦБ распространены продуценты не одного, а нескольких токсичных веществ. К ним принадлежат уже упомянутые

представители родов *Dolichospermum* (*Anabaena*), *Cylindrospermopsis*, *Lyngbya*, и несколько других.

ЦТ имеют различную химическую структуру. Наиболее часто они являются полипептидами и алкалоидами. Кроме того, некоторые штаммы оказывают токсическое воздействие за счёт липополисахаридов (ЛПС). Среди наиболее распространённых и изученных токсинов находятся циклические полипептиды — микроцистины и нодуларины, алкалоиды — цилиндропермопсины, анатоксины, сакситоксины [7–10].

Широкое распространение получила классификация ЦТ по их действию на определённые ткани в организме человека и животных [11]. Различают гепатотоксичные соединения (микроцистины, нодуларины), нейротоксичные (анатоксин-а, анатоксин-а(s), сакситоксины), клеточные яды (ЦТ поливалентного действия — цилиндропермопсины, ЛПС). Однако такое деление весьма условно, поскольку фактически прямо или опосредованно на несколько мишеней действует большинство токсинов. К таковым прежде всего могут быть отнесены микроцистины, нодуларины, ЛПС. Отсюда частое упоминание одних и тех же кардиотоксичных, нефротоксичных, дерматотоксичных, иммунотоксичных продуктов, образуемых ЦБ.

В последние годы внимание исследователей привлекает действие ЦТ на репродуктивную систему. Им обладают токсины, которые относят к разным группам по избирательности действия. Например, микроцистин-LR негативно влияет на структуру и функцию яичников, предстательной железы, плаценты и других органов животных, что приводит к снижению их фертильности [12].

Механизмы токсического действия

Структурное своеобразие токсинов, образуемых ЦБ, и, как следствие, избирательность действия на различные ткани в организме человека и животных связаны с многовариантностью патогенеза вызываемых ими расстройств. Действие токсинов имеет и общие черты, и специфику. Патфизиология вызываемых многими ЦБ процессов изучена недостаточно. Наибольшее внимание уделено действию микроцистинов [13, 14]. Обусловленные ими изменения в той или иной мере транслированы на патогенез процессов, вызываемых некоторыми токсинами (нодуларинами, цилиндропермопсинами).

Оксидативный стресс признан достаточно установленной причиной патологических изменений, к которым в определённых концентрациях приводят микроцистины и, с большей долей вероятности, другие цианотоксины. Считается, что оксидативный стресс развивается в силу образования под действием токсинов активных форм кислорода (активных радикалов), а также нарушения глута-

тионового гомеостаза [11, 15]. Полагают, что активные формы кислорода (супероксидный анион, синглетный кислород, перекись водорода, гидроксильный анион) образуются в силу вызываемых ЦТ деструктивных процессов в тканях с изменением рН и редокс-потенциала среды, подавления ими активности супероксиддисмутазы и каталазы. В свою очередь, активные радикалы разрушают структуру клеток, действуя в том числе на митохондрии, клеточный скелет, нуклеиновые кислоты. Утверждается, что изменения мембран митохондрий могут возникнуть в силу прямого действия микроцистинов.

Большое внимание в патогенезе повреждений, вызываемых микроцистинами, уделено их ингибирующему действию на клеточные фосфатазы (фосфатазу-1 и фосфатазу-2А). Обычно их упоминают как белковые фосфатазы PP1 и PP2A [11, 16]. Подавляющее действие токсинов изучено и *in vitro*, и в экспериментах на животных. Фосфатазы играют важную регулируемую роль в жизни клетки, включая её пролиферацию, деление, экспрессию соответствующих генов. PP2A, кроме того, подавляет процесс злокачественного перерождения клетки. Подавление микроцистинами активности фосфатазы ведёт к накоплению фосфорилированных продуктов, нарушению жизнеспособности клетки и её гибели [11].

Патогенез нейротоксического действия ЦТ многовариантен. Микроцистины способны преодолевать гематоэнцефалический барьер и вызывать нарушения функции мозга вследствие индукции оксидативного стресса и ингибирования активности клеточных фосфатаз. Однако более изучено и освещено в научной литературе нарушение нейротоксинами (сакситоксины, анатоксин-а, калкитоксин) межнейрональной и нервно-мышечной проводимости в силу ингибирования активности ацетилхолинэстеразы, нарушения функции ионных каналов — как инактивации каналов (сакситоксин), так и активации (анатоксин-а). Полагают, что особым механизмом действия на мозг обладает продуцируемый ЦБ бета-N-метиламино-L-аланин (БМАА), вызывающий дегенерацию нервной ткани, что приводит к тяжёлой патологии — боковому амиотрофическому склерозу, болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, деменции [17].

Особое место в патогенезе заболеваний, вызываемых ЦТ, занимает их сочетанное действие. Эти микроорганизмы, как правило, существуют в ассоциации. Токсичные продукты разных видов ЦБ обладают способностью к суммарному и даже потенцированному действию [18]. Это же касается сочетания ЦТ с токсинами иного происхождения [19].

Поражения цианотоксинами животных и человека

Отравления ЦТ животных, обычно со смертельным исходом, зафиксированы в Европе, Север-

ной и Южной Америке, Азии, на Австралийском континенте. Поражения, как правило, были связаны с употреблением воды для питья [20–22]. Гибель отмечали среди представителей дикой фауны (слоны, антилопы, фламинго и др.), сельскохозяйственных и домашних животных (крупный и мелкий рогатый скот, лошади, собаки и др.). Многие из этих инцидентов зафиксированы в научной литературе и медийных изданиях. Предположительно, первым таким сообщением была публикация в Польше в XIX в. [23], хотя утверждать, что причиной гибели животных были именно ЦБ, по понятной причине не приходится. Однако описание падежа скота соответствует современным представлениям об отравлении ЦТ.

Эпидемиология поражений человека представляется более сложной [24]. С ЦТ связывают острые и хронические заболевания, причем последние вызывают дискуссии с прямо противоположными утверждениями. Количество известных летальных исходов вследствие острого отравления человека ЦТ невелико. Чаще встречаются патологии желудочно-кишечного тракта, кожи, дыхательных путей, не приводящие к гибели людей. Такие отравления зафиксированы практически на всех материках, за исключением Антарктиды. Наибольшее количество наблюдений принадлежат тем странам, в которых существует микробиологический контроль и где удаётся подтвердить этиологию заболевания микробиологическими и токсикологическими исследованиями. Это многие европейские страны, Соединенные Штаты Америки, Канада, Китай, Бразилия и некоторые другие.

Причины острых отравлений человека разнообразны. Они включают употребление для питья воды и употребление в пищу продуктов, содержащих ЦТ [25, 26]. ЦТ попадают в организм человека не только с питьевой водой. Человек контактирует с ЦТ при занятии водными видами спорта, во время отдыха на берегу водоёмов, купании в воде, содержащей ЦТ. При этом наблюдаются различные поражения кожи, дыхательных путей и слизистых оболочек глаз [27, 28]. Редко источником отравлений могут быть мясные продукты, полученные от животных, употреблявших заражённую пищу. Акцент, однако, делается на употреблении для питья воды и контакт с водой при занятиях спортом и отдыхе [29, 30]. Особое место в описании острых отравлений занимают уникальные наблюдения за последствиями внутривенного введения большим раствором, содержащим ЦТ, которые подробнее будут рассмотрены далее.

Трудно судить об эпидемиологии хронических поражений человека, тем более что роль ЦТ в происхождении онкологических заболеваний, тяжёлых патологий мозга (болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера и др.) одними исследователями признаётся, другими оспаривается.

Нейротоксичность цианотоксинов

С образованием ЦБ нейротоксинов связывают возникновение частой и достаточно тяжёлой, в том числе смертельной, патологии человека и особенно животных. Многочисленные сообщения о массовой гибели сельскохозяйственного скота, домашних питомцев, обитателей дикой природы обычно рассматриваются как результаты употребления ими для питья воды, которая содержала ЦБ, продуцирующие нейропаралитические яды [16, 31, 32]. Без преувеличения, это доминирующая информация о ЦТ.

Поражения, вызванные нейротоксинами ЦБ, достаточно условно разделяют на две группы. Одни из них протекают остро и обычно являются результатом нарушений синаптической трансмиссии в межнейрональных и нервно-мышечных синапсах. Как правило, речь идет о блокаде синапсов, приводящей к мышечному параличу с нарушением дыхания [16]. Вторая группа патологий определяется проникновением ЦТ через гематоэнцефалический барьер в мозг, депонированием в его тканях и развитием дегенеративных процессов в органе. Такие процессы развиваются постепенно и способны привести к тяжёлым нервно-психическим заболеваниям [33]. Если острые поражения нервной системы первой группы, их этиопатогенез и симптомы не вызывают сомнений и многократно продемонстрированы *in vitro*, в эксперименте и в клинических условиях (меньше в медицинской, больше в ветеринарной практике), то хронически протекающие заболевания мозга пока остаются предметом дискуссии.

Нейротропным действием обладают многие токсины, образуемые ЦБ. Для некоторых из них нервная система является основной мишенью повреждающего действия, в том числе для сакситоксинов, анатоксина-а, гомоанатоксина-а, анатоксина-а(s), антиллатоксина, БМАА и некоторых других. Еще одна группа токсичных веществ (микроцистины, нодуларины, цилиндроспермопсины) поливалентны по токсическому действию. Их мишенями являются многие ткани, в том числе мозг и периферическая нервная система. Однако в существующих классификациях их чаще относят к иным группам (гепатотоксинам, цитотоксинам и др.) [31, 34].

К числу ЦТ, единодушно причисленных к нейротоксинам, принадлежат сакситоксины. Продуцентами сакситоксинов являются многие представители ЦБ, в том числе из родов *Dolichospermum* (*Anabaena*), *Cylindrospermopsis*, *Lyngbya* и др. Чем больше биомасса микроорганизма-продуцента в среде обитания, чем интенсивнее идёт лизис клеток, тем выше концентрация сакситоксинов, тем опаснее продукт, содержащий ЦБ. Чаще всего высокую концентрацию токсинов обнаруживают в воде, но они найдены и в продуктах питания, и в воздухе, содержащем капли влаги. Сакситоксины хорошо всасываются из кишечника, проникают в самые

различные ткани и, что особо важно, в нервную систему, включая мозг [35].

Отравления сакситоксинами людей носят спорадический характер. Тем не менее ограниченные данные говорят о возможности острых отравлений [29]. Приведённые в научной литературе описания симптомов отравления рассматриваются как результаты поражения периферической и центральной нервной системы. Течение заболевания может быть тяжёлым, если количество сакситоксина окажется велико.

В эксперименте, в бытовых условиях и в дикой природе гибель животных обусловлена нарушением дыхательной функции, вплоть до апноэ. Подавление функции энергозависимых натриевых каналов аксонов нейронов периферических нервных клеток приводит к нарушению нервно-мышечной проводимости с последующим параличом дыхательной мускулатуры и остановкой дыхания [32, 36].

Анатоксин-а также единодушно причислен к числу нейротоксичных продуктов, образуемых ЦБ [32]. Его продуцентами являются представители родов *Dolichospermum* (*Anabaena*), *Cylindrospermopsis* и др. Поражающее действие токсина на человека и животных определяется его связыванием с никотиновыми ацетилхолиновыми рецепторами нервных и мышечных клеток, что ведёт к нарушению эффективности синаптической трансмиссии как в межнейрональных, так и в нервно-мышечных синапсах.

Основной причиной отравления анатоксином-а является употребление воды, содержащей этот токсин. Кроме того, он может содержаться в рыбе, моллюсках, водных растениях, которые употребляют в пищу. Анатоксин-а быстро всасывается из кишечника, проникает в кровь и в ткани (печень, почки, мышцы и др.). Токсическое действие анатоксина-а преимущественно проявляется в прогрессирующей мышечной слабости, которая переходит в паралич, в том числе дыхательной мускулатуры. Примеров отравления человека анатоксином-а мало [35]. Приведён случай смертельного отравления мужчины, который имел дыхательный контакт с водой при «цветении» ЦБ. Смерть наступила от паралича дыхания. Более детально изучено действие анатоксина-а на животных, в том числе в эксперименте.

Еще один нейротоксин ЦБ, анатоксин-а(s), терминологически близок к анатоксину-а, хотя по многим параметрам это два разных химических соединения. Первый принадлежит к фосфорорганическим соединениям и структурно похож на ряд инсектицидов. Более того, он имеет определённое сходство с заринном (боевым отравляющим веществом). Однако, в отличие от других токсинов подобной структуры, анатоксин-а(s) получают биосинтетическим путем, а не посредством химического синтеза [35, 37]. Продуцентом анатоксина-а(s) являются ЦБ рода *Dolichospermum* (*Anabaena*).

Анатоксин-а(s) является необратимым ингибитором ацетилхолинэстеразы [38]. В экспериментах на различных видах животных блокада ацетилхолинэстеразы приводила к гиперсаливации, слезотечению, дизурии, остановке дыхания. Эффект зависел от дозы токсина — как разовой, так и курсовой. Установлено, что величина ЛД₅₀ при внутрибрюшинном введении мышам составляет 20–50 мкг/кг [37]. Введение таких доз анатоксина-а(s) приводит к параличу дыхательных мышц, что вызывает гибель животных. Имеется ограниченное количество сообщений о гибели домашнего скота и диких животных, употреблявших для питья воду, содержащую анатоксин-а(s), смерть наступала от паралича дыхания. Используемый в медицинской практике при отравлении фосфорорганическими соединениями в качестве антидота атропин в эксперименте эффективен и при действии анатоксина-а(s).

В последние годы особое внимание привлекла нейротоксичность БМАА. Продуцентами токсина являются ЦБ родов *Nostoc*, *Dolichospermum* (*Anabaena*). Предполагают возможность образования БМАА и другими представителями этой группы микроорганизмов [32, 33]. Допускается, что БМАА могут образовывать некоторые водные растения и даже некоторые виды фитопланктона, обитающие в морской воде. Однако присутствие в них ЦТ может быть следствием вторичного его накопления, а первичным продуцентом являются ЦБ.

БМАА относится к небелковым аминокислотам. Мишенью для его действия является нервная система человека и животных. Полагают, что длительное повторное введение БМАА приводит к необратимым изменениям в центральной нервной системе, которые типичны для таких патологий человека, как болезни Альцгеймера, Паркинсона, боковой амиотрофической склероз. Подобное утверждение базируется на установлении механизма действия токсина, экспериментальных исследованиях и даже клинических наблюдениях [33, 39]. БМАА проникает в организм человека и животных с продуктами питания, в которых токсин накапливается (растения, морские животные). Токсин хорошо проникает через гематоэнцефалический барьер и депонируется в структурах мозга.

Допускается по меньшей мере несколько основных механизмов нейродегенеративного действия БМАА. Наиболее часто упоминают повышение уровня свободной глутаминовой кислоты как следствие активации глутаматных рецепторов нервных клеток. БМАА является агонистом глутаматных рецепторов [17, 40]. Избыток глутаминовой кислоты ведёт к патологии, которая считается смертельной для нейронов. Ещё один механизм — замещение в молекуле образуемого в нейронах белка естественной для неё аминокислоты серина на токсичную структуру БМАА. Образовавшаяся

белковая молекула не способна к фолдингу, спонтанному сворачиванию полипептида в присущую данной молекуле спираль. БМАА ингибирует ферменты окислительного стресса, что ведёт к образованию активных форм кислорода, деструкции клеточных структур, в том числе клеточной стенки с последующей её гибелью. Наконец, токсин является активатором провоспалительных цитокинов. В совокупности всё упомянутое рассматривают как фактор гибели нервных клеток, их апоптоза.

В экспериментах, в том числе на приматах, а также при аутопсии сельскохозяйственных животных, которые в той или иной форме повторно получали БМАА, были обнаружены дегенеративные изменения в мозге, периферической нервной системе, мышечной ткани, сетчатке глаза [40, 41]. В качестве доказательства возможности поражения нервной ткани мозга в первую очередь обычно приводят факт широкого распространения среди жителей острова Гуам бокового амиотрофического склероза и паркинсонизма. Аборигены интенсивно и длительно используют для приготовления пищи муку из растения *Cycas circinalis* из семейства Саговниковых, в корнях которого существуют в большом количестве ЦБ, продуцирующие БМАА. Токсин накапливается в семенах, из которых готовят пищу. Однако подобное утверждение признается не всеми, и считается целесообразным дальнейшее накопление экспериментальных и клинических данных о действии БМАА на нервные ткани мозга [40].

Гепатопатология

Гепатотоксичность метаболитов, образуемых ЦБ, исторически привлекала к себе серьёзное внимание. Уже отмечено, что острые смертельные поражения человека носят спорадический характер. Однако имеется трагическое наблюдение массового отравления людей, которое произошло в Бразилии в XX в., когда вследствие нарушений в системе водоснабжения гемодиализного центра более чем 100 больным был введён внутривенно раствор, содержащий микроцистины [42]. Половина больных погибла. Драма известна в литературе (в том числе научной) как синдром Каруару (по месту случившегося события). После гемодиализа у больных отмечали головную боль, мышечную слабость, нарушение зрения, спутанность сознания и ряд других симптомов. У погибших больных на аутопсии отмечались в основном изменения в печени, в том числе при микроскопии. Клетки печёночной ткани были деформированы, некротические изменения охватывали значительные участки органа. В желчевыводящих путях был найден выраженный холестаза. В самих гепатоцитах отмечены вакуолизация цитоплазмы, деформация ядер, их незавершённое деление. Электронная микроскопия подтвердила

глубокие структурные изменения в гепатоцитах — митохондриях, эндоплазматическом ретикулуме, ядрах.

Ряд исследований, выполненных в экспериментах на животных нескольких видов из разных местообитаний, погибших в результате употребления для питья воды, содержащей ЦТ, в целом дали аналогичные результаты, свидетельствующие о высокой чувствительности печени к повреждающему действию микроцистина, нодуларина, цилиндропермопсина [7, 43].

Приведённая гепатопатология касается острых поражений. Однако длительное повторное употребление в пищу небольших количеств ЦТ также ведёт к тяжёлым заболеваниям печени. Среди них упоминают цирроз и рак печени. Впрочем, достаточно убедительные статистически подтверждённые данные пока не приведены [44]. Патогенез поражения печени человека и животных при хроническом поступлении ЦТ в организм сходен с тем, что приведён выше. Это поражение гепатоцитов, вызванное нарушением фосфорилирования, деструкцией клеточных структур, включая аппарат наследственности [11, 45].

Патология сердечно-сосудистой системы

Не вызывает сомнений возможность повреждающего действия токсинов ЦБ на сердечно-сосудистую систему (ССС) и клетки крови. Тем не менее подчёркивается, что патология ССС, вызываемая ЦТ, пока изучена недостаточно [46]. Экспериментальные исследования, выполненные на различных видах животных, и данные, полученные *in vitro*, подтверждают возможность серьёзных изменений структуры и функции тканей сердца, сосудов и элементов крови при воздействии на них микроцистинов (микроцистина-LR в первую очередь) [11, 47, 48]. Различают два варианта поражений: те, которые являются следствием прямого действия токсинов на ткани, и те, что возникают как результат поражения иных органов (почек, печени, желудочно-кишечного тракта).

Как и в иных приведённых выше случаях, тяжесть патологии зависит от концентрации токсина, времени экспозиции, способа контакта клеток ССС и крови с повреждающим агентом. Мишенями токсического действия являются практически все основные структуры ССС (сердце, кровь и сосуды), выявлены серьёзные изменения в клетках эндотелия сосудов и кардиомиоцитах. Механизм повреждающего действия типичен для ЦТ — образование активных форм кислорода, оксидативный стресс, деструктивные процессы в митохондриях клеток, клеточном скелете. В клетках миокарда выявлены существенные изменения ферментативного пула, ведущие к радикальным нарушениям метаболизма клеток. Завершением патологического процесса является гибель

клеток [11, 46]. Некротические изменения стенок артерий способствуют тромбообразованию.

Чувствительны к повреждающему действию ЦТ (микроцистинов) клетки крови. Деструктивные изменения отмечены в элементах красной и белой крови — эритроцитах, лимфоцитах, моноцитах.

В экспериментах *in vitro* и на животных показано, что микроцистины даже в небольших количествах вызывают дисплазию эндотелия коронарных сосудов, ограничение кровотока с последующими изменениями в миокарде.

Как отмечено выше, действие ЦТ способно привести к серьёзной патологии печени, почек, лёгких, желудочно-кишечного тракта, вследствие чего возможны опосредованные морфологические и функциональные нарушения ССС. В клинических условиях этот вопрос практически не изучен, но известно возникновение вторичной миокардиопатии при заболеваниях иных органов и систем. Поэтому связь между действием ЦТ, поражением внутренних органов и, как следствие, сердца, сосудов и крови рассматривается как весьма вероятная [11].

Действие цианотоксинов на иммунитет

В ряде экспериментальных работ уверенно утверждается возможность негативного влияния ЦТ на иммунитет. По мнению авторов, иммунотоксическим действием обладают цилиндропермопсины, микроцистины, а также ЛПС ЦБ [48]. Однако этот перечень не является окончательным, о чём свидетельствует не очень убедительное включение в него в последние годы анатоксина-а и БМАА [49, 50].

Представления о влиянии ЦТ на иммунитет пока в основном базируются на экспериментальных данных. Очень ограниченно эта проблема изучена у человека [48]. Наиболее очевидным является повреждение клеточного иммунитета. Ряд экспериментальных работ свидетельствует о нарушении ЦТ морфологии и функции лимфоцитов, плазматических клеток и макрофагов.

Действие ЦТ на иммунокомпетентные клетки может быть прямым, т.е. результатом непосредственного контакта, и опосредованным, в силу разрушения тканей, где эти клетки депонируются. Наиболее очевидная последовательность развития иммунотоксического действия — разрушение ЦТ стенки кишечника, в которой депонируются лимфоциты, плазматические клетки и кишечные макрофаги. Деструкция слизистой оболочки (кишечного эпителия, собственной пластинки) ведёт к выбросу и разрушению этих клеток, что, в свою очередь, приводит к подавлению клеточного иммунитета как в кишечнике, так и в организме в целом [48].

Внимание к иммунотоксическому действию микроцистинов отражает особый интерес к повреждающему действию именно этой группы ЦТ [51, 52]. Наиболее частым объектом изучения является ми-

кроцистин-LR, но среди иммунотоксичных ЦТ называют также микроцистин-LA [51]. Микроцистины подавляют пролиферацию лимфоцитов, угнетают активность натуральных киллеров, вносят дисбаланс в образование и действие цитокинов. Особое место занимает разрушение микроцистинами слизистой оболочки кишечника, что приводит к гибели иммунокомпетентных клеток, подавляет защитную реакцию кишечной стенки на микробную инвазию и действие микробных токсинов [48, 53]. Экспериментальные данные, полученные в основном *in vitro* и у водных обитателей *in vivo*, говорят об иммунотоксическом потенциале цилиндропермопсина [48].

Осторожнее оценивается действие ЦТ на гуморальный иммунитет. Однако разрушение слизистой оболочки кишечника, подавление функции и разрушение плазматических клеток, прежде всего в *lamina propria*, способно ограничить или даже исключить образование антител. Нарушение кровотока, тромбоз сосудов ограничивает проникновение антител сыворотки крови (преимущественно IgG) в просвет кишечника и его стенку. Таким образом, подавление гуморального иммунитета как результат действия ЦТ представляется вполне возможным [48].

В недавних экспериментальных исследованиях установлено иммуносупрессивное действие анатоксина-а [50], который ранее рассматривали как нейротоксин. На примере *Carassius auratus* показано, что мишенью действия этого ЦТ являются лимфоциты рыб. Образующие активные формы кислорода разрушают митохондрии и ДНК клеток, подавляется активность клеточных ферментов, их антиоксидантная функция. Всё это приводит к гибели лимфоцитов и угнетению их роли в поддержании иммунного статуса животного. С учётом функции лимфоидных клеток снижается как гуморальный, так и клеточный иммунитет.

Еще один ЦТ, принадлежащий к группе нейротоксинов, который в эксперименте продемонстрировал иммунотоксическое действие, — БМАА. В определённых концентрациях он изменяет морфологию и метаболизм моноцитов, ограничивает их пролиферацию и тем самым снижает их фагоцитарную активность. Поскольку токсин попадает в организм человека повторно, длительно с продуктами питания, его вредоносное подавляющее действие на иммунитет представляется реальным [39].

Нефротоксичность цианотоксинов

Нефротоксичность ЦТ рассматривается как естественный результат их проникновения в орган, участвующий в выведении этих продуктов [54]. Утверждение базируется главным образом на исследованиях состояния почек у животных, которым в эксперименте вводили токсин, или они употребляли содержащую токсин воду [55, 56].

Объектом изучения поражающего действия в основном были микроцистины. В научной литературе имеются также данные о нефротоксичности цилиндроспермопсина [34].

Механизм нефротоксического действия микроцистинов аналогичен уже приведённому ранее — подавление активности протеинфосфатаз, разрушение цитоскелета, деструктивные процессы в митохондриях и ДНК. Обязательным компонентом процесса является образование активных радикалов кислорода. Несколько клинических наблюдений [54] подтверждают, что микроцистины проникают в ткань почек, преодолевают гломерулярный барьер и вызывают нарушение почечной функции (нарушение гемофильтрации, появление в моче форменных элементов). Впрочем, авторы сходятся на том, что ни экспериментальные, ни клинические данные не являются достаточными. Необходимы дальнейшие исследования, тем более если учесть, что риск патологии почек человека при отравлении микроцистинами авторы рассматривают как вполне реальный [54, 57].

Патологии желудочно-кишечного тракта

Поскольку острые отравления человека и животных наиболее часто возникают при употреблении в пищу воды и продуктов питания, содержащих ЦТ, естественно, что в этом случае объектом их повреждающего действия является кишечник. Обычно речь идет о слизистой оболочке и собственной мембране [48, 58]. Возможно и большее разрушительное действие, вплоть до тотального поражения стенки [48]. К числу энтеротоксичных относят микроцистины, цилиндроспермопсины, анабенолизины, лимнотриксин и некоторые другие. Во многих случаях утверждение об их поражающем действии базируется на экспериментальных данных. Но развитие патологии слизистой оболочки тонкого кишечника, вызванной микроцистинами, имеет клиническое подтверждение [48, 59].

Симптомокомплекс обычно проявляется в нарушении двух основных функций кишечника — всасывающей и секреторной — с соответствующими клиническими проявлениями. Поражения кишечника часто сопровождаются осложнениями: глосситом, стоматитом, эзофагитом. При затяжных процессах возникают вторичные изменения, связанные с дефицитом железа (анемия), авитаминозом, дисбиозом. Серьёзное внимание привлекает нарушение иммунитета в силу гибели иммунокомпетентных клеток, концентрирующихся в собственной мембране кишечника. Многообразие патологических изменений, связанных с поражением кишечника, и неизбежные процессы, которые возникают при острых отравлениях в иных органах брюшной полости (и не только), сделали рекомендации по терапии таких заболеваний достаточно неопределёнными [60].

Среди факторов, способствующих развитию патологии пищеварительного тракта, уверенно называют изменение микробного пейзажа кишечника как результат действия метаболитов, образуемых ЦБ [52, 59]. Миграция микроорганизмов происходит обычно из дистальных отделов кишечника в проксимальные его фрагменты и в желудок. При этом отдельные представители микробиоты погибают, для других, наоборот, создаются условия для интенсивного размножения. Предполагаются несколько причин, ведущих к изменению микробиоты: антимикробные свойства самих токсинов, образование ЦБ противомикробных соединений, подавление кишечного иммунитета, деструкция кишечной стенки с ограничением её барьерной функции [48, 58].

Образование ЦБ соединений, обладающих антимикробными свойствами, достаточно хорошо изучено [61]. Оно рассматривается не только как фактор, способный негативно воздействовать на микрофлору кишечника, но и как потенциальная возможность получения новых антимикробных лекарственных препаратов. Найдены десятки соединений, обладающих антимикробными свойствами, продуцентами которых являются ЦБ. К ним относятся представители токсинообразующих родов *Microcystis*, *Dolichospermum (Anabaena)*, *Lyngbya*, *Nostoc*, *Nodularia* [7]. Антимикробные соединения, образуемые ЦБ, относятся к различным химическим группам — пептидам, алкалоидам, нуклеозидам и др. Некоторые из них имеют структуру, близкую к структуре широко известных антимикробных препаратов (макролидов, кетолидов, бензойной кислоты, циклических пептидов и др.). Спектр их противомикробного действия многовариантен. Одни обладают противобактериальной и противогрибной активностью, другие — антипротозойным и противовирусным действием. Известны соединения, подавляющие иммунитет и угнетающие канцерогенез.

Канцерогенность цианотоксинов

К числу наиболее дискуссионных проблем, связанных с ЦБ, относится их канцерогенность. Одни авторы убеждены, что хроническая интоксикация ведет к злокачественному перерождению тканей человека [62, 63], другие такое предположение считают пока не доказанным [16, 64]. Противниками канцерогенеза, вызванного ЦТ, допускается, что они могут стимулировать злокачественный рост, если опухоль уже существует.

Среди ЦТ, способных вызывать злокачественное перерождение, наиболее часто упоминают микроцистины, нодуларины, цилиндроспермопсины [62, 65]. Очевидно, однако, что названы наиболее исследованные токсины ЦБ. Канцерогенность остальных токсичных метаболитов пока изучена

мало. Более того, клинические наблюдения, позволяющие утверждать, что имеется взаимосвязь между ЦТ и возникновением рака, касаются только микроцистинов. Канцерогенность других токсинов основана на экспериментальных данных.

Убеждение в способности ЦТ вызывать рак базируется на установленной их генотоксичности [64], продемонстрированной в эксперименте экспрессии онкогена при повторном длительном введении животным микроцистинов. Особо подчеркивается способность микроцистинов подавлять активность протеинфосфатаз, что ведёт к образованию аномальных клеток [62, 64].

Говоря о злокачественных новообразованиях у человека, вызванных ЦТ, обычно называют рак толстого кишечника, прямой кишки и печени. Полагают, что длительное употребление воды и продуктов, содержащих микроколичества ЦТ (обычно имеются в виду микроцистины), ведёт к возникновению опухолей именно такой локализации [16, 64]. В 2010 г. микроцистин был внесён международным агентством по исследованию рака в число онкогенов [51].

Помимо микроцистинов, сторонники канцерогенности ЦТ причисляют к числу возбудителей онкогена ещё несколько метаболитов ЦБ, в первую очередь нодуларины и, с оговорками, цилиндроспермопсин [16, 62]. Убедительных результатов клинических наблюдений пока не приводится. Однако экспериментальные данные говорят о такой возможности. Помимо подавления активности протеинфосфатаз, индукции образования агрессивных кислородных радикалов, ЦТ способны подавлять активность клеточного супрессора опухолевого перерождения и в то же время активировать гены, способствующие злокачественному перерождению клеток. Опыты на животных, пока ограниченные, в целом допускают возможность индукции ЦТ онкогена. Впрочем, все исследователи сходятся на том, что этот вопрос изучен недостаточно и заслуживает большего внимания.

Заключение

Образуемые рядом ЦБ токсичные метаболиты представляют собой реальную угрозу здоровью и жизни человека и животных. ЦТ способны вызывать тяжёлые поражения центральной и периферической нервной системы, печени, почек, репродуктивной системы, пищеварительного тракта и др. Есть основания говорить об иммуносупрессивном действии этих токсинов. Ряд исследований заставляет предполагать возможность влияния метаболитов ЦБ на канцерогенез, особенно в печени, толстом кишечнике и прямой кишке. Ведётся дискуссия о роли ЦТ в возникновении тяжёлых дегенеративных процессов в мозге человека. Хорошо известны множественные случаи массовой гибели

домашних, сельскохозяйственных и диких животных, употреблявших продукты (обычно воду), содержащие ЦТ.

Люди и животные могут иметь различные контакты с токсичными метаболитами ЦБ. По вполне обоснованным причинам их число будет расти, в том числе и таких контактов, которые для человека не будут очевидными. В наше время нельзя исключить возможность преступного использования ЦТ.

Всё это говорит о необходимости изучения ЦБ, их роли в этиологии заболеваний человека и животных, патогенеза поражений ЦТ. Необходимо уделить серьёзное внимание клиническим проявлениям вызванных ими патологических процессов, разработке методов диагностики и специфической терапии отравлений.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Панкратова Е.М. Становление функциональных особенностей цианобактерий на путях их сопряжённой эволюции с биосферой. *Теоретическая и прикладная экология*. 2010; (3): 4–11.
2. Vachard D. Cyanobacteria. In: *Encyclopedia of Geology*. Academic Press; 2021: 446–60. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.11843-3>
3. Gaysina L.A., Saraf A., Singh P. Cyanobacteria in diverse habitats. In: Mishra A.K., Tiwari D.N., Rai A.N., eds. *Cyanobacteria: From Basic Science to Applications*. Academic Press; 2019: 1–28. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814667-5.00001-5>
4. Андреева Н.А., Мельников В.В., Снарская Д.Д. Роль цианобактерий в морских экосистемах. *Биология моря*. 2020; 46(3): 161–73. <https://doi.org/10.31857/S013434752003002X>
5. Капков В.И., Васильева С.Г., Лобакова Е.С. Сукцессии цианобактерий в водоемах бореальной зоны. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2018; (4): 100–7. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-4-100-107>
6. Шлегель Г.Г. *История микробиологии*. М.: Едиториал УРСС; 2002.
7. Поляк Ю.М., Сухаревич В.И. Токсичные цианобактерии: распространение, регуляция синтеза токсинов, способы их деструкции. *Вода: химия и экология*. 2017; (11-12): 125–39.
8. Mancini M., Rodriguez C., Bagnis G., Liendo A., Prosperi C., Bonansea M., et al. Cyanobacterial bloom and animal mass mortality in a reservoir from Central Argentina. *Braz. J. Biol.* 2010; 70(3 Suppl.): 841–5. <https://doi.org/10.1590/s1519-69842010000400015>
9. Chernoff N., Hill D., Lang J., Schmid J., Le T., Farthing A., et al. The comparative toxicity of 10 microcystin congeners administered orally to mice: clinical effects and organ toxicity. *Toxins (Basel)*. 2020; 12(6): 403. <https://doi.org/10.3390/toxins12060403>
10. Chichova M., Tasinov O., Shkodrova M., Mishonova M., Sazdova I., Ilieva B., et al. New data on cylindrospermopsin toxicity. *Toxins (Basel)*. 2021; 13(1): 41. <https://doi.org/10.3390/toxins13010041>
11. McLellan N.L., Manderville R.A. Toxic mechanisms of microcystins in mammals. *Toxicol. Res. (Camb)*. 2017; 6(4): 391–405. <https://doi.org/10.1039/c7tx00043j>
12. Zhang S., Du X., Liu H., Losiewicz M.D., Chen X., Ma Y., et al. The latest advances in the reproductive toxicity of microcystin-LR. *Environ. Res.* 2021; 192: 110254. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110254>

13. He J., Li G., Chen J., Lin J., Zeng C., Chen J., et al. Prolonged exposure to low-dose microcystin induces nonalcoholic steatohepatitis in mice: a systems toxicology study. *Arch. Toxicol.* 2017; 91(1): 465–80. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1681-3>
14. Welten R.D., Meneely J.P., Elliott C.T. A comparative review of the effect of microcystin-LR on the proteome. *Exposure and Health.* 2020; 12(2): 111–29. <https://doi.org/10.1007/s12403-019-00303-1>
15. Chen L., Giesy J.P., Xie P. The dose makes the poison. *Sci. Total Environ.* 2018; 621: 649–53. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.218>
16. Buratti F.M., Manganelli M., Vichi S., Stefanelli M., Scardala S., Testai E., et al. Cyanotoxins: Producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human health toxicological risk evaluation. *Arch. Toxicol.* 2017; 91(3): 1049–130. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1913-6>
17. Ra D., Sa B., Si B., Js M., Sj M., Da D., et al. Is exposure to BMAA a risk factor for neurodegenerative diseases? A response to a critical review of the BMAA hypothesis. *Neurotox. Res.* 2021; 39(1): 81–106. <https://doi.org/10.1007/s12640-020-00302-0>
18. Martin R.M., Stallrich J., Bereman M.S. Mixture designs to investigate adverse effects upon co-exposure to environmental cyanotoxins. *Toxicology.* 2019; 421: 74–83. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2019.04.013>
19. Metcalf J.S., Codd G.A. Co-occurrence of cyanobacteria and cyanotoxins with other environmental health hazards: impacts and implications. *Toxins.* 2020; 12(10): 629–36. <https://doi.org/10.3390/toxins12100629>
20. Massey I.Y., Yang F., Ding Z., Yang S., Guo J., Tezi C., et al. Exposure routes and health effects of microcystins on animals and humans: A mini-review. *Toxicon.* 2018; 151: 156–62. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.07.010>
21. Foss A.J., Aubel M.T., Gallagher B., Mettee N., Miller A., Fogelson S.B. Diagnosing microcystin intoxication of canines: Clinicopathological indications, pathological characteristics, and analytical detection in postmortem and antemortem samples. *Toxins.* 2019; 11(8): 456. <https://doi.org/10.3390/toxins11080456>
22. Svirčev Z., Lalić D., Bojadžija Savić G., Tokodi N., Drobac Backović D., Chen L., et al. Global geographical and historical overview of cyanotoxin distribution and cyanobacterial poisonings. *Arch. Toxicol.* 2019; 93(9): 2429–81. <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02524-4>
23. Codd G.A., Pliński M., Surosz W., Hutson J., Fallowfield H.J. Publication in 1672 of animal deaths at the Tuchomskie Lake, northern Poland and a likely role of cyanobacterial blooms. *Toxicon.* 2015; 108: 285–6. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.10.005>
24. Белов А.Б., Панин А.Л. Теория сапронозных инфекций: история развития и пути совершенствования в системе медико-биологических наук. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.* 2020; 97(1): 91–101. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-1-91-101>
25. Otten T.G., Paerl H.W. Health effects of toxic cyanobacteria in U.S. drinking and recreational waters: our current understanding and proposed direction. *Curr. Environ. Health Rep.* 2015; 2(1): 75–84. <https://doi.org/10.1007/s40572-014-0041-9>
26. Svirčev Z., Drobac D., Tokodi N., Mijović B., Codd G.A., Meriluoto J. Toxicology of microcystins with reference to cases of human intoxications and epidemiological investigations of exposures to cyanobacteria and cyanotoxins. *Arch. Toxicol.* 2017; 91(2): 621–50. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1921-6>
27. Trevino-Garrison I., DeMent J., Ahmed F.S., Haines-Lieber P., Langer T., Ménager H., et al. Human illnesses and animal deaths associated with freshwater harmful algal blooms—Kansas. *Toxins.* 2015; 7(2): 353–66. <https://doi.org/10.3390/toxins7020353>
28. Vidal F., Sedan D., D'Agostino D., Cavalieri M.L., Mullen E., Parot Varela M.M., et al. Recreational exposure during algal bloom in Carrasco Beach, Uruguay: A liver failure case report. *Toxins.* 2017; 9(9): 267. <https://doi.org/10.3390/toxins9090267>
29. Vilariño N., Louzao M.C., Abal P., Cagide E., Carrera C., Vieytes M.R., et al. Human poisoning from marine toxins: Unknowns for optimal consumer protection. *Toxins.* 2018; 10(8): 324. <https://doi.org/10.3390/toxins10080324>
30. Plaas H.E., Paerl H.W. Toxic cyanobacteria: a growing threat to water and air quality. *Environ. Sci. Technol.* 2021; 55(1): 44–64. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c06653>
31. Hu Y., Chen J., Fan H., Xie P., He J. A review of neurotoxicity of microcystins. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2016; 23(8): 7211–9. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6073-y>
32. Metcalf J.S., Souza N.R. Cyanobacteria and their toxins. In: Ahuja S., ed. *Separation Science and Technology.* Academic Press; 2019; 11: 125–48. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815730-5.00006-5>
33. Попова А.А., Кокшарова О.А. Нейротоксичная небелковая аминокислота — βN-метиламин-L-аланин и ее роль в биологических системах (обзор). *Биохимия.* 2016; 81(8): 1021–33.
34. Hinojosa M.G., Gutiérrez-Praena D., Prieto A.I., Guzmán-Guillén R., Jos A., Cameán A.M. Neurotoxicity induced by microcystins and cylindrospermopsin: A review. *Sci. Total Environ.* 2019; 668: 547–65. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.426>
35. Testai E., Scardala S., Vichi S., Buratti F.M., Funari E. Risk to human health associated with the environmental occurrence of cyanobacterial neurotoxic alkaloids anatoxins and saxitoxins. *Crit. Rev. Toxicol.* 2016. 46(5): 385–419. <https://doi.org/10.3109/10408444.2015.1137865>
36. Sini P., Dang T.B.C., Fais M., Galio M., Padedda B.M., Lugliè A., et al. Cyanobacteria, cyanotoxins, and neurodegenerative diseases: Dangerous Liaisons. *Int. J. Mol. Sci.* 2021; 22(16): 8726. <https://doi.org/10.3390/ijms22168726>
37. Patocka J., Gupta R.C., Kuca K. Anatoxin-a(s): natural organophosphorus anticholinesterase agent. *Mil. Med. Sci. Lett.* 2011; 80: 129–39.
38. Florczyk M., Łakomiak A., Woëny M., Brzuzanet P. Neurotoxicity of cyanobacterial toxins. *Environ. Biotechnol.* 2014; 10(1): 26–43. <https://doi.org/10.14799/ebms246>
39. Silva D.F., Candeias E., Esteves A.R., Magalhães J.D., Ferreira I.L., Nunes-Costa D., et al. Microbial BMAA elicits mitochondrial dysfunction, innate immunity activation, and Alzheimer's disease features in cortical neurons. *J. Neuroinflammation.* 2020; 17(1): 332. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-02004-y>
40. Delcourt N., Claudepierre T., Maignien T., Arnich N., Mattei C. Cellular and molecular aspects of the β-N-Methylamino-L-alanine (BMAA) mode of action within the neurodegenerative pathway: Facts and controversy. *Toxins (Basel).* 2017; 10(1): 6. <https://doi.org/10.3390/toxins10010006>
41. Soto T., Buzzi E.D., Rotstein N.P., German O.L., Politi L.E. Damaging effects of BMAA on retina neurons and Müller glial cells. *Exp. Eye Res.* 2021; 202: 108342. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2020.108342>
42. Azevedo S.M., Carmichael W.W., Jochimsen E.M., Rinehart K.L., Lau S., Shaw G.R., et al. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru — Brazil. *Toxicol.* 2002; 181-182: 441–6. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00491-2](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00491-2)
43. Badar M., Batool F., Khan S.S., Khokhar I., Qamar M., Yasir Ch. Effects of microcystins toxins contaminated drinking water on hepatic problems in animals (cows and buffalos) and toxins removal chemical method. *Buffalo Bulletin.* 2017; 36(1): 43–56.
44. Li Y., Chen J.A., Zhao Q., Pu C., Qiu Z., Zhang R., et al. A cross-sectional investigation of chronic exposure to micro-

- cystin in relationship to childhood liver damage in the Three Gorges Reservoir Region, China. *Environ. Health Perspect.* 2011; 119(10): 1483–8. <https://doi.org/10.1289/ehp.100241>
45. Zhang Y., Zhu P., Wu X., Yuan T., Su Z., Chen S., et al. Microcystin-LR induces NLRP3 inflammasome activation via FOXO1 phosphorylation, resulting in interleukin-1 β secretion and pyroptosis in hepatocytes. *Toxicol. Sci.* 2021; 179(1): 53–69. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfaa159>
46. Cao L., Massey I.Y., Feng H., Yang F. A review of cardiovascular toxicity of microcystins. *Toxins.* 2019; 11(9): 507. <https://doi.org/10.3390/toxins11090507>
47. Milutinović A., Zorc-Pleskovic R., Petrovic D., Zorc M., Suput D. Microcystin-LR induces alterations in heart muscle. *Folia Biol. (Praha).* 2006; 52(4): 116–8.
48. Kubickova B., Babica P., Hilscherová K. Effects of cyanobacterial toxins on the human gastrointestinal tract and the mucosal innate immune system. *Environ. Sci. Europe.* 2019; 31(1): 1–27. <https://doi.org/10.1186/s12302-019-0212-2>
49. Sieroslawska A., Rymuszka A. Assessment of the cytotoxic impact of cyanotoxin beta-N-methylamino-L-alanine on a fish immune cell line. *Aquatic. Toxicol.* 2019; 212: 214–21. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.05.012>
50. Zhong Y., Shen L., Ye X., Zhou D., He Y., Li Y., et al. Neurotoxic anatoxin-a can also exert immunotoxicity by the induction of apoptosis on *Carassius auratus* lymphocytes in vitro when exposed to environmentally relevant concentrations. *Front. Physiol.* 2020; 11: 316. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00316>
51. Lone Y., Bhide M., Koiri R.K. Microcystin-LR induced immunotoxicity in mammals. *J. Toxicol.* 2016; 2016: 8048125. <https://doi.org/10.1155/2016/8048125>
52. Duan Y., Xiong D., Wang Y., Dong H., Huang J., Zhang J. Effects of *Microcystis aeruginosa* and microcystin-LR on intestinal histology, immune response, and microbial community in *Litopenaeus vannamei*. *Environ. Pollut.* 2020; 265(Pt. A): 114774. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114774>
53. Rymuszka A., Sieroslawska A., Bownik A., Skowronski T. Immunotoxic potential of cyanotoxins on the immune system of fish. *Central Eur. J. Immunol.* 2008; 33(3): 150–2.
54. Xu S., Yi X., Liu W., Zhang C., Massey I.Y., Yang F., et al. A review of nephrotoxicity of microcystins. *Toxins.* 2020; 12(11): 693. <https://doi.org/10.3390/toxins12110693>
55. Sitprija V., Sitprija S. Marine toxins and nephrotoxicity: Mechanism of injury. *Toxicon.* 2019; 161: 44–9. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.02.012>
56. Wang Z., Li G., Wu Q., Liu C., Shen J., Yan W. Microcystin-LR exposure induced nephrotoxicity by triggering apoptosis in female zebrafish. *Chemosphere.* 2019; 214: 598–605. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.09.103>
57. Lin H., Liu W., Zeng H., Pu C., Zhang R., Qiu Z., et al. Determination of environmental exposure to microcystin and aflatoxin as a risk for renal function based on 5493 rural people in southwest China. *Environ. Sci. Technol.* 2016; 50(10): 5346–56. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b01062>
58. Zhou Y., Xu X., Yu B., Yu G. Characterization of in vitro effects of microcystin-LR on intestinal epithelial cells. *Environ. Toxicol.* 2017; 32(5): 1539–47. <https://doi.org/10.1002/tox.22375>
59. Wu J.X., Huang H., Yang L., Zhang X.F., Zhang S.S., Liu H.H., et al. Gastrointestinal toxicity induced by microcystins. *World J. Clin. Cases.* 2018; 6(10): 344–54. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v6.i10.344>
60. Harris N., Harvey K.V., Gordon S.C., Alderman P., Esposito D., Reif J.S., et al. Algal bloom-related illness: Improving health outcomes in primary care. *J. Nurse Practitioners.* 2020; 16(9): 679–82. <https://doi.org/10.1016/j.nurpra.2020.06.019>
61. Thuan N.H., An T.T., Shrestha A., Canh N.X., Sohng J.K., Dhakal D. Recent advances in exploration and biotechnological production of bioactive compounds in three cyanobacterial genera: *Nostoc*, *Lyngbya*, and *Microcystis*. *Front. Chem.* 2019; 7: 604. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00604>
62. Vankova D., Pasheva M., Kiselova-Kaneva Y., Ivanov D., Ivanova D. Mechanisms of cyanotoxin toxicity—carcinogenicity, anticancer potential, and clinical toxicology. In: Pinar E., Tomohisa O., eds. *Medical Toxicology*. Rijeka, Croatia: IntechOpen; 2021. <https://doi.org/10.5772/intechopen.88016>
63. Hernandez B.Y., Zhu X., Sotto P., Paulino Y. Oral exposure to environmental cyanobacteria toxins: Implications for cancer risk. *Environ. Int.* 2021; 148: 106381. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106381>
64. Zegura B., Straser A., Filipič M. Genotoxicity and potential carcinogenicity of cyanobacterial toxins — a review. *Mutat. Res.* 2011; 727(1-2): 16–41. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2011.01.002>
65. Ren Y., Yang M., Chen M., Zhu Q., Zhou L., Qin W., et al. Microcystin-LR promotes epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer cells through PI3-K/AKT and SMAD2. *Toxicol. Lett.* 2017; 265: 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.11.004>

REFERENCES

1. Pankratova E.M. Establishment of functional peculiarities of cyanobacteria all the way of their evolution with biosphere. *Teoreticheskaya i prikladnaya ekologiya.* 2010; (3): 4–11. (in Russian)
2. Vachard D. Cyanobacteria. In: *Encyclopedia of Geology*. Academic Press; 2021: 446–60. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.11843-3>
3. Gaysina L.A., Saraf A., Singh P. Cyanobacteria in diverse habitats. In: Mishra A.K., Tiwari D.N., Rai A.N., eds. *Cyanobacteria: From Basic Science to Applications*. Academic Press; 2019: 1–28. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814667-5.00001-5>
4. Andreeva N.A., Mel'nikov V.V., Snarskaya D.D. The role of cyanobacteria in marine ecosystems. *Biologiya morya.* 2020; 46(3): 161–73. <https://doi.org/10.31857/S013434752003002X> (in Russian)
5. Kapkov V.I., Vasil'eva S.G., Lobakova E.S. Succession of cyanobacteria in boreal waters. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2018; (4): 100–7. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-4-100-107> (in Russian)
6. Shlegel G.G. *History of Microbiology [Istoriya mikrobiologii]*. Moscow: Editorial URSS; 2002. (in Russian)
7. Polyak Yu.M., Sukharevich V.I. Toxic cyanobacteria: their occurrence, regulation of toxin production and control. *Voda: khimiya i ekologiya.* 2017; (11-12): 125–39. (in Russian)
8. Mancini M., Rodriguez C., Bagnis G., Liendo A., Prosperi C., Bonansea M., et al. Cyanobacterial bloom and animal mass mortality in a reservoir from Central Argentina. *Braz. J. Biol.* 2010; 70(3 Suppl.): 841–5. <https://doi.org/10.1590/s1519-69842010000400015>
9. Chernoff N., Hill D., Lang J., Schmid J., Le T., Farthing A., et al. The comparative toxicity of 10 microcystin congeners administered orally to mice: clinical effects and organ toxicity. *Toxins (Basel).* 2020; 12(6): 403. <https://doi.org/10.3390/toxins12060403>
10. Chichova M., Tasinov O., Shkodrova M., Mishonova M., Sazdova I., Ilijeva B., et al. New data on cylindrospermopsin toxicity. *Toxins (Basel).* 2021; 13(1): 41. <https://doi.org/10.3390/toxins13010041>
11. McLellan N.L., Manderville R.A. Toxic mechanisms of microcystins in mammals. *Toxicol. Res. (Camb).* 2017; 6(4): 391–405. <https://doi.org/10.1039/c7tx00043j>
12. Zhang S., Du X., Liu H., Losiewicz M.D., Chen X., Ma Y., et al. The latest advances in the reproductive toxicity of microcystin-LR. *Environ. Res.* 2021; 192: 110254. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110254>
13. He J., Li G., Chen J., Lin J., Zeng C., Chen J., et al. Prolonged exposure to low-dose microcystin induces nonalcoholic steatohepa-

- titis in mice: a systems toxicology study. *Arch. Toxicol.* 2017; 91(1): 465–80. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1681-3>
14. Welten R.D., Meneely J.P., Elliott C.T. A comparative review of the effect of microcystin-LR on the proteome. *Exposure and Health.* 2020; 12(2): 111–29. <https://doi.org/10.1007/s12403-019-00303-1>
 15. Chen L., Giesy J.P., Xie P. The dose makes the poison. *Sci. Total Environ.* 2018; 621: 649–53. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.218>
 16. Buratti F.M., Manganelli M., Vichi S., Stefanelli M., Scardala S., Testai E., et al. Cyanotoxins: Producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human health toxicological risk evaluation. *Arch. Toxicol.* 2017; 91(3): 1049–130. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1913-6>
 17. Ra D., Sa B., Sl B., Js M., Sj M., Da D., et al. Is exposure to BMAA a risk factor for neurodegenerative diseases? A response to a critical review of the BMAA hypothesis. *Neurotox. Res.* 2021; 39(1): 81–106. <https://doi.org/10.1007/s12640-020-00302-0>
 18. Martin R.M., Stallrich J., Bereman M.S. Mixture designs to investigate adverse effects upon co-exposure to environmental cyanotoxins. *Toxicology.* 2019; 421: 74–83. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2019.04.013>
 19. Metcalf J.S., Codd G.A. Co-occurrence of cyanobacteria and cyanotoxins with other environmental health hazards: impacts and implications. *Toxins.* 2020; 12(10): 629–36. <https://doi.org/10.3390/toxins12100629>
 20. Massey I.Y., Yang F., Ding Z., Yang S., Guo J., Tezi C., et al. Exposure routes and health effects of microcystins on animals and humans: A mini-review. *Toxicon.* 2018; 151: 156–62. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.07.010>
 21. Foss A.J., Aubel M.T., Gallagher B., Mettee N., Miller A., Fogelson S.B. Diagnosing microcystin intoxication of canines: Clinicopathological indications, pathological characteristics, and analytical detection in postmortem and antemortem samples. *Toxins.* 2019; 11(8): 456. <https://doi.org/10.3390/toxins11080456>
 22. Svirčev Z., Lalić D., Bojadžija Savić G., Tokodi N., Drobac Backović D., Chen L., et al. Global geographical and historical overview of cyanotoxin distribution and cyanobacterial poisonings. *Arch. Toxicol.* 2019; 93(9): 2429–81. <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02524-4>
 23. Codd G.A., Pliński M., Surosz W., Hutson J., Fallowfield H.J. Publication in 1672 of animal deaths at the Tuchomskie Lake, northern Poland and a likely role of cyanobacterial blooms. *Toxicon.* 2015; 108: 285–6. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.10.005>
 24. Belov A.B., Panin A.L. Theory of sapronous infections: the history of development and ways of improvement in the system of medical and biological sciences. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2020; (1): 91–101. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-1-91-101> (in Russian)
 25. Otten T.G., Paerl H.W. Health effects of toxic cyanobacteria in U.S. drinking and recreational waters: our current understanding and proposed direction. *Curr. Environ. Health Rep.* 2015; 2(1): 75–84. <https://doi.org/10.1007/s40572-014-0041-9>
 26. Svirčev Z., Drobac D., Tokodi N., Mijović B., Codd G.A., Meriluoto J. Toxicology of microcystins with reference to cases of human intoxications and epidemiological investigations of exposures to cyanobacteria and cyanotoxins. *Arch. Toxicol.* 2017; 91(2): 621–50. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1921-6>
 27. Trevino-Garrison I., DeMent J., Ahmed F.S., Haines-Lieber P., Langer T., Ménager H., et al. Human illnesses and animal deaths associated with freshwater harmful algal blooms—Kansas. *Toxins.* 2015; 7(2): 353–66. <https://doi.org/10.3390/toxins7020353>
 28. Vidal F., Sedan D., D'Agostino D., Cavalieri M.L., Mullen E., Parot Varela M.M., et al. Recreational exposure during algal bloom in Carrasco Beach, Uruguay: A liver failure case report. *Toxins.* 2017; 9(9): 267. <https://doi.org/10.3390/toxins9090267>
 29. Vilariño N., Louzao M.C., Abal P., Cagide E., Carrera C., Vieytes M.R., et al. Human poisoning from marine toxins: Unknowns for optimal consumer protection. *Toxins.* 2018; 10(8): 324. <https://doi.org/10.3390/toxins10080324>
 30. Plaas H.E., Paerl H.W. Toxic cyanobacteria: a growing threat to water and air quality. *Environ. Sci. Technol.* 2021; 55(1): 44–64. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c06653>
 31. Hu Y., Chen J., Fan H., Xie P., He J. A review of neurotoxicity of microcystins. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2016; 23(8): 7211–9. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6073-y>
 32. Metcalf J.S., Souza N.R. Cyanobacteria and their toxins. In: Ahuja S., ed. *Separation Science and Technology.* Academic Press; 2019; 11: 125–48. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815730-5.00006-5>
 33. Popova A.A., Koksharova O.A. Neurotoxic non-proteinogenic amino acid β -n-methylamino-l-alanine and its role in biological systems. *Biokhimiya.* 2016; 81(8): 1021–33. (in Russian)
 34. Hinojosa M.G., Gutiérrez-Praena D., Prieto A.I., Guzmán-Guillén R., Jos A., Cameán A.M. Neurotoxicity induced by microcystins and cylindrospermopsin: A review. *Sci. Total Environ.* 2019; 668: 547–65. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.426>
 35. Testai E., Scardala S., Vichi S., Buratti F.M., Funari E. Risk to human health associated with the environmental occurrence of cyanobacterial neurotoxic alkaloids anatoxins and saxitoxins. *Crit. Rev. Toxicol.* 2016. 46(5): 385–419. <https://doi.org/10.3109/10408444.2015.1137865>
 36. Sini P., Dang T.B.C., Fais M., Galioto M., Padedda B.M., Lugliè A., et al. Cyanobacteria, cyanotoxins, and neurodegenerative diseases: Dangerous Liaisons. *Int. J. Mol. Sci.* 2021; 22(16): 8726. <https://doi.org/10.3390/ijms22168726>
 37. Patocka J., Gupta R.C., Kuca K. Anatoxin-a(s): natural organophosphorus anticholinesterase agent. *Mil. Med. Sci. Lett.* 2011; 80: 129–39.
 38. Florczyk M., Łakomiak A., Wońny M., Brzuzanet P. Neurotoxicity of cyanobacterial toxins. *Environ. Biotechnol.* 2014; 10(1): 26–43. <https://doi.org/10.14799/ebms246>
 39. Silva D.F., Candeias E., Esteves A.R., Magalhães J.D., Ferreira I.L., Nunes-Costa D., et al. Microbial BMAA elicits mitochondrial dysfunction, innate immunity activation, and Alzheimer's disease features in cortical neurons. *J. Neuroinflammation.* 2020; 17(1): 332. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-02004-y>
 40. Delcourt N., Claudepierre T., Maignien T., Arnich N., Mattei C. Cellular and molecular aspects of the β -N-Methylamino-l-alanine (BMAA) mode of action within the neurodegenerative pathway: Facts and controversy. *Toxins (Basel).* 2017; 10(1): 6. <https://doi.org/10.3390/toxins10010006>
 41. Soto T., Buzzi E.D., Rotstein N.P., German O.L., Politi L.E. Damaging effects of BMAA on retina neurons and Müller glial cells. *Exp. Eye Res.* 2021; 202: 108342. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2020.108342>
 42. Azevedo S.M., Carmichael W.W., Jochimsen E.M., Rinehart K.L., Lau S., Shaw G.R., et al. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru — Brazil. *Toxicol.* 2002; 181-182: 441–6. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00491-2](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00491-2)
 43. Badar M., Batool F., Khan S.S., Khokhar I., Qamar M., Yasir Ch. Effects of microcystins toxins contaminated drinking water on hepatic problems in animals (cows and buffalos) and toxins removal chemical method. *Buffalo Bulletin.* 2017; 36(1): 43–56.
 44. Li Y., Chen J.A., Zhao Q., Pu C., Qiu Z., Zhang R., et al. A cross-sectional investigation of chronic exposure to microcystin in relationship to childhood liver damage in the Three

ОБЗОРЫ

- Gorges Reservoir Region, China. *Environ. Health Perspect.* 2011; 119(10): 1483–8. <https://doi.org/10.1289/ehp.100241>
45. Zhang Y., Zhu P., Wu X., Yuan T., Su Z., Chen S., et al. Microcystin-LR induces NLRP3 inflammasome activation via FOXO1 phosphorylation, resulting in interleukin-1 β secretion and pyroptosis in hepatocytes. *Toxicol. Sci.* 2021; 179(1): 53–69. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfaa159>
46. Cao L., Massey I.Y., Feng H., Yang F. A review of cardiovascular toxicity of microcystins. *Toxins.* 2019; 11(9): 507. <https://doi.org/10.3390/toxins11090507>
47. Milutinović A., Zorc-Pleskovic R., Petrovic D., Zorc M., Suptut D. Microcystin-LR induces alterations in heart muscle. *Folia Biol. (Praha)*. 2006; 52(4): 116–8.
48. Kubickova B., Babica P., Hilscherová K. Effects of cyanobacterial toxins on the human gastrointestinal tract and the mucosal innate immune system. *Environ. Sci. Europe.* 2019; 31(1): 1–27. <https://doi.org/10.1186/s12302-019-0212-2>
49. Sieroslawska A., Rymuszka A. Assessment of the cytotoxic impact of cyanotoxin beta-N-methylamino-L-alanine on a fish immune cell line. *Aquatic. Toxicol.* 2019; 212: 214–21. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.05.012>
50. Zhong Y., Shen L., Ye X., Zhou D., He Y., Li Y., et al. Neurotoxic anatoxin-a can also exert immunotoxicity by the induction of apoptosis on *Carassius auratus* lymphocytes in vitro when exposed to environmentally relevant concentrations. *Front. Physiol.* 2020; 11: 316. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00316>
51. Lone Y., Bhide M., Koiri R.K. Microcystin-LR induced immunotoxicity in mammals. *J. Toxicol.* 2016; 2016: 8048125. <https://doi.org/10.1155/2016/8048125>
52. Duan Y., Xiong D., Wang Y., Dong H., Huang J., Zhang J. Effects of *Microcystis aeruginosa* and microcystin-LR on intestinal histology, immune response, and microbial community in *Litopenaeus vannamei*. *Environ. Pollut.* 2020; 265(Pt. A): 114774. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114774>
53. Rymuszka A., Sieroslawska A., Bownik A., Skowronski T. Immunotoxic potential of cyanotoxins on the immune system of fish. *Central Eur. J. Immunol.* 2008; 33(3): 150–2.
54. Xu S., Yi X., Liu W., Zhang C., Massey I.Y., Yang F., et al. A review of nephrotoxicity of microcystins. *Toxins.* 2020; 12(11): 693. <https://doi.org/10.3390/toxins12110693>
55. Sitprija V., Sitprija S. Marine toxins and nephrotoxicity: Mechanism of injury. *Toxicon.* 2019; 161: 44–9. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.02.012>
56. Wang Z., Li G., Wu Q., Liu C., Shen J., Yan W. Microcystin-LR exposure induced nephrotoxicity by triggering apoptosis in female zebrafish. *Chemosphere.* 2019; 214: 598–605. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.09.103>
57. Lin H., Liu W., Zeng H., Pu C., Zhang R., Qiu Z., et al. Determination of environmental exposure to microcystin and aflatoxin as a risk for renal function based on 5493 rural people in southwest China. *Environ. Sci. Technol.* 2016; 50(10): 5346–56. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b01062>
58. Zhou Y., Xu X., Yu B., Yu G. Characterization of in vitro effects of microcystin-LR on intestinal epithelial cells. *Environ. Toxicol.* 2017; 32(5): 1539–47. <https://doi.org/10.1002/tox.22375>
59. Wu J.X., Huang H., Yang L., Zhang X.F., Zhang S.S., Liu H.H., et al. Gastrointestinal toxicity induced by microcystins. *World J. Clin. Cases.* 2018; 6(10): 344–54. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v6.i10.344>
60. Harris N., Harvey K.V., Gordon S.C., Alderman P., Esposito D., Reif J.S., et al. Algal bloom-related illness: Improving health outcomes in primary care. *J. Nurse Practitioners.* 2020; 16(9): 679–82. <https://doi.org/10.1016/j.nurpra.2020.06.019>
61. Thuan N.H., An T.T., Shrestha A., Canh N.X., Sohng J.K., Dhakal D. Recent advances in exploration and biotechnological production of bioactive compounds in three cyanobacterial genera: *Nostoc*, *Lyngbya*, and *Microcystis*. *Front. Chem.* 2019; 7: 604. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00604>
62. Vankova D., Pasheva M., Kiselova-Kaneva Y., Ivanov D., Ivanova D. Mechanisms of cyanotoxin toxicity—carcinogenicity, anticancer potential, and clinical toxicology. In: Pinar E., Tomohisa O., eds. *Medical Toxicology*. Rijeka, Croatia: IntechOpen; 2021. <https://doi.org/10.5772/intechopen.88016>
63. Hernandez B.Y., Zhu X., Sotto P., Paulino Y. Oral exposure to environmental cyanobacteria toxins: Implications for cancer risk. *Environ. Int.* 2021; 148: 106381. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106381>
64. Zegura B., Straser A., Filipič M. Genotoxicity and potential carcinogenicity of cyanobacterial toxins — a review. *Mutat. Res.* 2011; 727(1-2): 16–41. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2011.01.002>
65. Ren Y., Yang M., Chen M., Zhu Q., Zhou L., Qin W., et al. Microcystin-LR promotes epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer cells through PI3-K/AKT and SMAD2. *Toxicol. Lett.* 2017; 265: 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.11.004>

Информация об авторах

Поляк Юлия Марковна[✉] — к.т.н., с.н.с. Санкт-Петербургского научно-исследовательского центра экологической безопасности РАН — обособленного структурного подразделения Санкт-Петербургского федерального исследовательского центра РАН, Санкт-Петербург, Россия, yuliapolyak@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9490-2392>

Поляк Марк Соломонович — д.м.н., профессор, научный директор Научно-исследовательского центра фармакотерапии, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2490-1503>

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

Статья поступила в редакцию 13.01.2022;
принята к публикации 14.03.2022;
опубликована 29.04.2022

Information about the authors

Yulia M. Polyak[✉] — Cand. Sci. (Tech.), senior researcher, Scientific Research Centre for Ecological Safety of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia, yuliapolyak@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9490-2392>

Mark S. Polyak — D. Sci. (Med.), Professor, Research director, Scientific Research Centre of Pharmacotherapy, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2490-1503>

Author contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

The article was submitted 13.01.2022;
accepted for publication 14.03.2022;
published 29.04.2022

Научный обзор

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-227>

Гнойно-септические инфекции у родильниц. Часть 2. Клинико-патогенетическая характеристика нозологических форм, этиология и антибиотикорезистентность (обзор литературы)*

Смирнова С.С.^{1,2}, Егоров И.А.^{1✉}, Голубкова А.А.^{3,4}

¹Екатеринбургский научно-исследовательский институт вирусных инфекций Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Екатеринбург, Россия;

²Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург, Россия;

³Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия;

⁴Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, Москва, Россия

Аннотация

Несмотря на совершенствование системы оказания акушерской помощи, гнойно-септические инфекции (ГСИ) родильниц и связанная с ними материнская смертность не теряют актуальности. В данном исследовании проведён анализ публикаций на следующих информационных ресурсах: eLibrary, Google Scholar, PubMed, NCBI по клинико-патогенетической характеристике ГСИ послеродового периода (сепсис, перитонит, эндометрит, мастит и инфекции области хирургического вмешательства) и их ведущих возбудителей. Клиническая картина ГСИ послеродового периода не всегда соответствует степени активности инфекционного процесса, что приводит к поздней диагностике локального очага инфекции и в дальнейшем к генерализации инфекционного процесса. Современной чертой ГСИ родильниц является их полиэтиологичность с преобладанием условно-патогенных микроорганизмов, роль отдельных представителей которых неоднозначна. В последние годы увеличивается этиологическая и эпидемиологическая значимость грамотрицательных микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae*, в том числе с множественной лекарственной устойчивостью.

Таким образом, несмотря на достаточное количество информации об этиологии и клинико-патогенетических особенностях ГСИ послеродового периода, необходим междисциплинарный подход к изучению этой проблемы с участием акушеров-гинекологов, микробиологов, клинических фармакологов и эпидемиологов.

Ключевые слова: обзор литературы, гнойно-септические инфекции родильниц, инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи, структура нозологических форм, клинические проявления, этиология, антибиотикорезистентность, патогенез, исходы

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

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

Для цитирования: Смирнова С.С., Егоров И.А., Голубкова А.А. Гнойно-септические инфекции у родильниц. Часть 2. Клинико-патогенетическая характеристика нозологических форм, этиология и антибиотикорезистентность (обзор литературы). *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022;99(2):244–259. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-227>

Purulent-septic infections in puerperas. Part 2. Clinical and pathogenetic characteristics of nosological forms, etiology and antibiotic resistance (literature review)

Svetlana S. Smirnova^{1,2}, Ivan A. Egorov^{1✉}, Alla A. Golubkova^{3,4}

¹Ekaterinburg Research Institute of Viral Infections, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Yekaterinburg, Russia;

²Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russia;

³Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia;

⁴Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Moscow, Russia

Abstract

Despite the improvement of the obstetric care system, purulent-septic infections (PSI) of puerperas and the associated maternal mortality do not lose relevance at the present time. This study analyzed publications on the following information resources: eLibrary, Google Scholar, PubMed, NCBI on the clinical and pathogenetic characteristics of postpartum GSI (sepsis, peritonitis, endometritis, mastitis, and surgical site infections (SSI)) and their leading pathogens.

It should be said that the clinical picture of PSI in the postpartum period does not always correspond to the degree of activity of the infectious process, which leads to late diagnosis of the local focus of infection and, in the future, to its generalization.

A modern feature of the PSI of puerperas is their polyetiology, with a predominance of opportunistic microorganisms, the role of individual representatives of which is far from unambiguous and requires discussion.

In recent years, the etiological and epidemiological significance of gram-negative microorganisms of the Enterobacteriaceae family, including those with multidrug resistance, has been increasing.

Thus, despite a sufficient amount of information on the etiology and clinical and pathogenetic features of PSI in the postpartum period, an interdisciplinary approach is needed to study this problem with the participation of different specialists: obstetricians-gynecologists, microbiologists, clinical pharmacologists and epidemiologists.

Keywords: literature review, purulent-septic infections of puerperas, infections associated with the provision of medical care, the structure of nosological forms, clinical manifestations, etiology, antibiotic resistance, pathogenesis, outcomes

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Smirnova S.S., Egorov I.A., Golubkova A.A. Purulent-septic infections in puerperas. Part 2. Clinical and pathogenetic characteristics of nosological forms, etiology and antibiotic resistance (literature review). *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2022;99(2): 244–259. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-227>

Введение

Несмотря на совершенствование системы оказания акушерской помощи, гнойно-септические инфекции (ГСИ) родильниц и связанная с ними материнская смертность сохраняют актуальность. Подходы к выявлению и регистрации случаев инфекций различаются в разных странах и зависят в том числе от уровня доходов населения, что существенно влияет на показатели распространённости ГСИ в послеродовом периоде [1, 2].

Клинические проявления ГСИ послеродового периода варьируют от лёгких (стёртых) до тяжёлых форм и в момент дебюта не всегда соответствуют степени активности инфекционного процесса, что приводит к их поздней диагностике и генерализации инфекционного процесса [3–5].

Изучение этиологии ГСИ в послеродовом периоде свидетельствует о постоянной смене ведущих возбудителей. В 1960–1970-е годы на смену стрептококкам пришли стафилококки, в тот период также в этиологии ГСИ возросла значимость кишечной палочки. В 1990-е годы акцент сместился на представителей анаэробной флоры (бактероиды, пептококки и пептострептококки), которые достаточно часто выделяли в ассоциациях с представителями грамположительной и грамотрицательной аэробной флоры — энтерококками и кишечной палочкой [6, 7].

Изменение структуры возбудителей было связано с селекцией микроорганизмов под действием антибиотиков. Замена широко распространённого в «доантибиотическую» эру стрептококка на золоти-

стый стафилококк произошла по причине активного применения бензилпенициллина. В дальнейшем применение бета-лактамовых антибиотиков обусловило повышение этиологической значимости грамотрицательных микроорганизмов. Нерациональное применение антибактериальных препаратов в акушерской практике создало условия для селекции штаммов микроорганизмов с приобретённой устойчивостью [7–9].

Таким образом, несмотря на значительный объём информации об этиологии и клинко-патогенетических особенностях ГСИ послеродового периода, она требует постоянного изучения и переосмысления всеми специалистами, участвующими в системе профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, в акушерских стационарах: акушерами-гинекологами, микробиологами, клиническими фармакологами и эпидемиологами.

Целью обзора стали обобщение и систематизация данных об этиологии, антибиотикорезистентности возбудителей и клинических проявлениях ГСИ у родильниц.

Основная часть

Поиск публикаций проведён по поисковым запросам: послеродовой сепсис, послеродовой эндометрит, послеродовой мастит, лактационный мастит, инфекции области хирургического вмешательства (ИОХВ) после кесарева сечения, ИОХВ после эпизиотомии, этиология послеродовых инфекций, антибиотикорезистентность возбудителей ГСИ родильниц, maternal death, maternal sepsis, sepsis in pregnancy, cesarean sections, postcesarean section, wound infection, perineal trauma, mastitis, endometritis, etiology postpartum infections, antibacterial resistance purulent septic infections на русском и английском языках в научной электронной библиотеке eLibrary, поисковой системе по полным текстам научных публикаций Академия Google (Google Scholar), на английском языке в Национальной медицинской библиотеке США PubMed (MEDLINE), базе Национального центра биотехнологической информации США (NCBI).

Глубина поиска составила 20 лет (2000–2020 гг.). В процессе поиска было найдено 7687 публикаций. В обзор включали публикации при условии наличия в них данных об этиологии ГСИ послеродового периода и их клинических проявлениях, устойчивости возбудителей ГСИ к антибактериальным препаратам, эпидемиологической характеристике. Критериям поиска соответствовала 61 публикация.

Клинко-патогенетическая характеристика ГСИ послеродового периода

Интенсивность патологического процесса и выраженность патоморфологических изменений

в организме родильницы не всегда соответствуют клинической манифестации ГСИ. Часть симптомов послеродовых инфекций расцениваются как особенности течения беременности или как экстрагенитальная патология. Это приводит к отсроченной постановке диагноза ГСИ, зачастую уже на стадии генерализации инфекционного процесса.

Послеродовой сепсис. Клинически сепсис может быть следствием первичного очага инфекции, локализованного в матке, при наличии морфологических изменений, соответствующих классической картине эндометрита с торпидным течением [10, 11]. В 30% случаев первичный очаг сепсиса идентифицировать не удаётся, а в 16% даже не получается определить его этиологию [12, 13]. Сепсис также может развиваться на фоне перитонита в результате перехода воспалительного процесса с неполноценного шва на матке на брюшину [14–16].

Большинство авторов отмечают трудности в диагностике сепсиса, что в раннем послеродовом периоде обусловлено увеличением восприимчивости беременных к инфекции. Зачастую такие клинические проявления, как гипердинамическое кровообращение, тахикардия, снижение кислородного резерва, гиперкоагуляция, при наличии во время родов акушерских манипуляций и кровопотери маскируют начальные клинические проявления инфекции, в том числе генерализованной [3–5].

Результаты некоторых исследований показывают противоречивость при выборе диагностических критериев генерализации инфекции и её исхода. Так, уровень прокальцитонина сыворотки крови родильниц не всегда даёт представление об исходе процесса. Некоторые авторы вместо прокальцитонина предлагают в качестве маркера использовать моноцитарный хемоаттрактантный протеин-1 [17]. Корректировка и доработка оценочных систем продолжают. Например, оценочная система SOS (Sepsis in Obstetrics Score) с учётом физиологии беременности была модифицирована относительно недавно — в 2014 г. [18].

Локализованные формы ГСИ послеродового периода регистрируются наиболее часто, одной из распространённых форм является послеродовой эндометрит, на который приходится 3–20%, а среди пациенток с послеродовыми воспалительными осложнениями — до 40,0–54,3%.

Послеродовой эндометрит морфологически характеризуется воспалением слизистой оболочки матки — эндометрия с возможным вовлечением в процесс миометрия.

Существуют несколько классификаций послеродового эндометрита. Наиболее значимой, с клинической и с эпидемиологической точек зрения, является классификация, отражающая клинко-патогенетические особенности данной инфекции по способу родоразрешения, а именно: после само-

произвольных родов или после операции кесарево сечение [19].

Эндометрит после самопроизвольных родов обусловлен перемещением микрофлоры восходящим путём после разрыва плодных оболочек из влагалища и шейки матки в её полость во время родовой деятельности. К этому предрасполагают колонизация нижних отделов генитального тракта условно-патогенной флорой (УПФ), бактериальный вагиноз, перенесённые инфекции, передаваемые половым путём, а также стрептококковая группы В инфекция [20, 21].

Колонизация родовых путей не всегда приводит к восходящей инфекции полости матки. Её возникновение зависит от иммунных механизмов защиты, массивности бактериального инокулята и степени вирулентности микроорганизмов [22]. Доказано, что у женщин во время беременности и в раннем послеродовом периоде имеют место транзитный иммунодефицит, снижение активности местного тканевого иммунитета, что повышает их чувствительность к бактериальной инфекции [19].

Немаловажное значение имеет степень заселения микроорганизмами влагалища, которое какой-то промежуток времени (от нескольких часов до 3 дней) после родов через естественные родовые пути практически не содержит микрофлоры, либо её количество ниже клинически значимого уровня [22–24]. В дальнейшем происходит заселение полости матки микроорганизмами, которое количественно выражается в 3 степенях: низкой — менее 5×10^2 КОЕ/мл, умеренной — 5×10^2 – 10^3 КОЕ/мл и высокой — более 10^3 КОЕ/мл. Степень контаминации полости матки микрофлорой зависит от состояния здоровья родильницы, характеристики микроорганизмов и их вирулентности. При лёгкой форме заболевания преобладает умеренный рост микроорганизмов, при среднетяжёлой и тяжёлой формах обсеменённость достигает 10^3 – 10^5 КОЕ/мл и более. При эндометрите после кесарева сечения обсеменённость может достигать 10^5 – 10^8 КОЕ/мл. Микробиологический мониторинг уровня колонизации полости матки условно-патогенными микроорганизмами позволяет дифференцировать возбудителей эндометрита от микроорганизмов-контаминантов [19].

После абдоминального родоразрешения риски развития эндометрита увеличиваются, что обусловлено отрицательным влиянием операции на иммунологическую реактивность родильницы, перестройкой деятельности гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, снижением объёма циркулирующей крови и развитием олигоцитемической гиповолемии на фоне снижения количества форменных элементов крови. В ряде исследований установлено угнетающее влияние на функцию иммунокомпетентных клеток средств для наркоза, что в раннем послеродовом периоде приводит к

лимфопении, хотя и без изменения соотношения Т- и В-клеток и нарушению продукции интерлейкина-2 — ключевого цитокина иммунологических реакций [25]. При оперативном родоразрешении имеет значение наличие инородных тел (таких, как шовный материал), некроз миометрия по линии шва и возникновение гематом. Это может привести к формированию неполноценного рубца на матке, который может стать первичным очагом инфекции с последующей генерализацией процесса [22, 26].

Резюмируя вышеизложенное, следует выделить 4 пути проникновения инфекции в полость матки:

- восходящий, характерный для родов через естественные родовые пути;
- лимфогенный, реализующийся преимущественно через разрез на матке и разрывы её шейки;
- гематогенный — при распространении инфекции из хронических очагов;
- интраамниональный, связанный с использованием в акушерской практике инвазивных методов исследования (кордоцентез, редукция эмбрионов при многоплодной беременности и др.) [19, 25].

В современных условиях клинической особенностью послеродового эндометрита считают позднюю манифестацию, преобладание атипичных и стёртых форм, несоответствие реакции организма тяжести местного воспалительного процесса [6, 27]. Традиционно считается, что дебют эндометрита соответствует 2–5 сут, реже 7 сут после родов [19, 21]. Однако для эндометрита, вызванного *Chlamydia trachomatis*, более характерна манифестация на 7-е и более сутки [20]. После оперативного родоразрешения клиническая манифестация эндометрита приходится на 12–15-е сутки после родов [28]. Ряд исследователей считают, что клинические проявления инфекции могут возникать и через 4–6 нед после родов, при этом время дебюта будет зависеть от времени инфицирования (во время беременности, во время родов или в послеродовом периоде) и вида микроорганизмов, вызвавших воспалительный процесс [20, 22]. В то же время законодательные акты России обязывают наблюдать родильниц в течение 30 дней после родов для выявления и учёта ГСИ послеродового периода¹.

С учётом патогенеза заболевания И.А. Верес и соавт. предложили разделять послеродовый эндометрит на инфекционный, который является следствием воспалительных заболеваний, преимущественно урогенитального тракта, и гипотониче-

¹ Раздел XLIV. Профилактика инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

ский — вследствие гипотонии миометрия в родах и субинволюции матки в послеродовом периоде [29]. Для каждого из них авторы выделили специфические факторы риска. Для инфекционного эндометрита — это хронические или перенесённые ранее урогенитальные заболевания, хориоамнионит, рост патогенной флоры в мазке из цервикального канала во время беременности (более 1×10^4 КОЕ/мл), кесарево сечение по экстренным показаниям, длительный безводный период, ручное отделение последа в сочетании с гнойным кольпитом. Факторы риска гипотонического эндометрита — это половой инфантилизм, роды после вспомогательных репродуктивных технологий, субинволюция матки в предыдущих родах, анемия и/или гестоз тяжёлой степени, затяжные роды, слабость родовой деятельности, не корригируемая медикаментозной стимуляцией, нарушение отделения последа, гипотония матки в послеродовом периоде, гипотонические кровотечения [29].

Второй по распространённости локализованной нозологической формой ГСИ послеродового периода, способной к генерализации процесса, является послеродовой мастит.

Послеродовой мастит — это воспалительное заболевание молочной железы, вызываемое бактериями, которое развивается после родов и связано с процессом лактации [30]. Проникновение микроорганизмов в молочную железу может происходить через молочные протоки, при гематогенном распространении, а также через трещины соска в лимфатические протоки [31].

В зависимости от клинической формы заболевания различают серозный, инфильтративный, гнойный, инфильтративно-гнойный (диффузный и узловой), абсцедирующий (фурункул ареолы, абсцесс в толще железы или ретромаммарный абсцесс), флегмонозный (гноино-некротический) и гангренозный маститы [30].

Сроки развития мастита имеют широкий временной диапазон. Наиболее часто дебют инфекции приходится на 2-ю и 3-ю недели послеродового периода, а в ряде случаев — через 2–3 мес и даже через годы после родов [31, 32]. Патологический процесс, как правило, носит односторонний характер, причём правая молочная железа поражается чаще (55%), чем левая (34%), а двусторонний мастит встречается в 10% случаев. В 10–30% случаев возможны рецидивы заболевания [32–34].

Послеродовые инфекции области хирургического вмешательства. Одной из нозологических форм ГСИ родильниц, способных к генерализации процесса и развитию сепсиса и септического шока, являются ИОХВ после абдоминального родоразрешения и эпизиотомии [35, 36].

Кесарево сечение, как и любое хирургическое вмешательство, сопровождается развитием различ-

ного рода осложнений, в том числе инфекционных [30, 37].

При эпизиотомии хирургическим путём расширяют влагалищное отверстие, осуществляя разрез промежности во втором периоде родов. Несмотря на существование семи различных типов данного оперативного вмешательства, в настоящее время не существует стандартной процедуры эпизиотомии в отношении точек, углов и длины разреза. С одной стороны, эпизиотомия применяется с целью предупреждения разрыва промежности и повреждения мышц таза, с другой — её необоснованное применение, в том числе в плановом порядке, создаёт риски развития инфекционных осложнений пуэрперия [36, 38, 39].

Этиология ГСИ послеродового периода

По данным различных исследователей, этиологическая структура ГСИ послеродового периода представлена широким спектром представителей УПФ. Этиология нозологических форм ГСИ родильниц и информация о ведущих возбудителях представлена в **таблице**.

Разнообразие возбудителей не позволяет однозначно оценить их роль в этиологии ГСИ послеродового периода, по этой причине целесообразно рассмотреть их значимость в контексте отдельных нозологических форм.

Послеродовой сепсис. Как правило, для сепсиса характерна моноэтиологичность, однако каждый 7-й случай имеет полимикробную этиологию [12]. По данным А. Ali и соавт., в Великобритании основными этиологическими агентами, приводящими к развитию материнского сепсиса, считают *Streptococcus pyogenes* (гемолитический стрептококк группы А), *Escherichia coli*, вирус гриппа [14]. По данным исследования, проведённого R. Duan и соавт. в западном Китае в 2011–2015 гг., наиболее распространёнными в группе грамположительных микроорганизмов были *Listeria monocytogenes* (43,8%), а среди грамотрицательных — *E. coli* (54,3%), реже *Acinetobacter baumannii* [40]. По данным R. Majangara и соавт., наиболее распространённой бактерией, приводившей к развитию материнского сепсиса в Зимбабве, была *E. coli* (30,6%) [57]. В Великобритании этиологическая связь с *E. coli* была установлена в 37% случаев [14]. Обобщая данные литературы, необходимо отметить, что наибольшее значение в этиологии послеродового сепсиса имеют *E. coli* и *Streptococcus* групп А и В [12].

Отдельно необходимо рассмотреть значение *Streptococcus* группы В (*Streptococcus agalactiae*) и группы А (*Streptococcus pyogenes*) в этиологии сепсиса родильниц. По данным J. Hall и соавт., в мире примерно для 1 из 5 беременных женщин характерна ректовагинальная колонизация *Streptococcus*

ОБЗОРЫ

Ведущие возбудители ГСИ послеродового периода

Leading causative agents of PSI in the postpartum period

Нозологическая форма ГСИ родильниц Nosological form of PSI in puerperas	Год (годы) исследования/год (годы) публикации Year (years) of research/year (years) of publication	Основные группы микроорганизмов The main groups of microorganisms	Ведущие возбудители Leading pathogens	Примечание Footnote
Инфекционные агенты ГСИ в акушерстве Infectious agents of PSI in obstetrics	2017	Грамотрицательные бактерии [35] Gram-negative bacteria [35]	<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp., <i>Enterobacter</i> spp., <i>Proteus</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Hemophilus influenzae</i> , <i>Serratia</i> spp.	
		Грамположительные бактерии [35] Gram-positive bacteria [35]	<i>Pneumococcus</i> spp., <i>Streptococcus</i> групп A, B и D / <i>Streptococcus</i> groups A, B and D, <i>Enterococcus</i> spp., <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i>	
		Анаэробы [35] Anaerobes [35]	<i>Bacteroides</i> spp., <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Fusobacterium</i> spp., <i>Peptococcus</i> spp., <i>Peptostreptococcus</i> spp.	
Послеродовой сепсис Postpartum sepsis	2011–2015, 2019	Грамотрицательные бактерии Gram-negative bacteria	<i>E. coli</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> [14, 40]	
	2011–2015, 2018, 2019	Грамположительные бактерии Gram-positive bacteria	<i>Streptococcus pyogenes</i> [12, 14, 40, 41]	
	2017, 2019		<i>Streptococcus agalactiae</i> [12, 42]	
	2011–2015, 2019		<i>Listeria monocytogenes</i> [14, 40]	
	2011–2015, 2019	Вирусы Viruses	Вирусы гриппа Influenza viruses [14, 40]	
	2015	Дрожжеподобные грибы Yeast-like fungi	<i>Candida glabrata</i> [17, 43]	
Послеродовой перитонит Postpartum peritonitis	2006, 2011	Грамположительные бактерии Gram-positive bacteria	<i>Enterococcus</i> spp. (64%), в частности <i>Enterococcus faecalis</i> (29,4%) [44] <i>Enterococcus</i> spp. (64%), in particular <i>Enterococcus faecalis</i> (29.4%) [44]	Имеются данные о выделении ассоциаций грамположительной и грамотрицательной микрофлоры совместно с неспорообразующими анаэробами и представителями родов <i>Bacteroides</i> , <i>Peptococcus</i> , <i>Peptostreptococcus</i> у значительной части заболевших женщин There is evidence of the isolation of associations of gram-positive and gram-negative microflora together with non-spore-forming anaerobes and representatives of the genera <i>Bacteroides</i> , <i>Peptococcus</i> , <i>Peptostreptococcus</i> in a significant part of sick women

Продолжение таблицы / Continuation of the Table

Нозологическая форма ГСИ родильниц Nosological form of PSI in puerperas	Год (годы) исследования/год (годы) публикации Year (years) of research/year (years) of publication	Основные группы микроорганизмов The main groups of microorganisms	Ведущие возбудители Leading pathogens	Примечание Footnote
	2006, 2011		<i>Staphylococcus haemolyticus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> [44]	
	2006, 2011	Грамотрицательные бактерии Gram-negative bacteria	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> [44]	
	2006, 2011	Дрожжеподобные грибы Yeast-like fungi	<i>Candida</i> sp. [44]	
Послеродовой эндометрит Postpartum endometritis	2006, 2011, 2016	Грамположительные бактерии Gram-positive bacteria	<i>Streptococcus agalactiae</i> [19, 24, 45]	
	2006, 2011, 2016		<i>Staphylococcus aureus</i> [19, 20, 24, 45, 46]	
	2006, 2011, 2016		<i>Enterococcus</i> spp. [19, 24, 45]	
	2006, 2011, 2016, 2017, 2020		<i>Streptococcus pyogenes</i> [19, 20, 24, 45, 46]	
	2016, 2017		<i>Listeria monocytogenes</i> [9, 47]	
	2006, 2011, 2016	Грамотрицательные бактерии Gram-negative bacteria	<i>E. coli</i> [19, 24, 45]	
	2006, 2011, 2016		<i>Proteus</i> spp. [19, 24, 45]	
	2006, 2011, 2016		<i>Klebsiella</i> spp. [19, 24, 45]	
	2006, 2011, 2016		<i>Enterobacter</i> spp. [19, 24, 45]	
	2016, 2017		<i>Haemophilus influenzae</i> [9, 47]	
	2017, 2020	Грамположительные анаэробы Gram-positive anaerobes	<i>Peptostreptococcus</i> spp. [20, 46]	
	2017, 2020		<i>Peptococcus</i> spp. [20, 46]	
	2017, 2020	Грамотрицательные анаэробы Gram-negative bacteria	<i>Prevotella bivia</i> [20, 46]	
	2017, 2020		<i>Bacteroides fragilis</i> [20, 46]	
	2017, 2020		<i>Clostridium</i> spp. [20, 46]	
	2011		<i>Chlamydia trachomatis</i> , <i>Mycoplasma</i> spp. [6]	

Продолжение таблицы / Continuation of the Table

Нозологическая форма ГСИ родильниц Nosological form of PSI in puerperas	Год (годы) исследования/год (годы) публикации Year (years) of research/year (years) of publication	Основные группы микроорганизмов The main groups of microorganisms	Ведущие возбудители Leading pathogens	Примечание Footnote
Послеродовой мастит Postpartum mastitis	2013–2017, 2018, 2019	Грамположительные бактерии Gram-positive bacteria	<i>Staphylococcus epidermidis</i> [30, 34, 48]	
	2015, 2019		<i>Staphylococcus aureus</i> [34, 49]	
	2018, 2019		<i>Streptococcus</i> групп А и В [30, 34] <i>Streptococcus</i> groups A and B [30, 34]	
	2018, 2019	Грамотрицательные бактерии Gram-negative bacteria	<i>E. coli</i> [30, 34]	
	2018, 2019		<i>Enterobacter</i> spp. [30, 34]	
	2018, 2019		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> [30, 34]	
	2018, 2019		<i>Klebsiella</i> spp. [30, 34]	
	2016		<i>Salmonella typhi</i> и другие представители рода <i>Salmonella</i> [50] <i>Salmonella typhi</i> and other members of the genus <i>Salmonella</i> [50]	
	2016		<i>Mycobacterium tuberculosis</i> [50]	
	2016		Анаэробная микрофлора [50] Anaerobic microflora [50]	
	2009–2011	Дрожжеподобные грибы Yeast-like fungi	<i>Candida albicans</i> [51]	Роль <i>Candida albicans</i> в этиологии послеродового мастита неоднозначна и требует сопоставления результатов бактериологического исследования и клинической картины [51] The role of <i>Candida albicans</i> in the etiology of postpartum mastitis is ambiguous and requires a comparison of the results of bacteriological research and the clinical picture [51]
Послеродовые инфекции ИОХВ Postpartum SSI	2013, январь–май 2016 2013, January–May, 2016	Грамположительные бактерии Gram-positive bacteria	<i>Enterococcus faecalis</i> [52–54], <i>Corynebacterium</i> spp. [52–54], <i>Staphylococcus aureus</i> и коагулаза-негативные стафилококки / <i>Staphylococcus aureus</i> and coagulase-negative <i>Staphylococci</i> [52–54], <i>Staphylococcus pyogenes</i> [52–54]	
	2013, январь–май 2016 2013, January–May, 2016		Грамотрицательные бактерии Gram-negative bacteria	<i>E. coli</i> [52–54]

Окончание таблицы / End of the Table

Нозологическая форма ГСИ родильниц Nosological form of PSI in puerperas	Год (годы) исследования/год (годы) публикации Year (years) of research/year (years) of publication	Основные группы микроорганизмов The main groups of microorganisms	Ведущие возбудители Leading pathogens	Примечание Footnote
				Cases of isolation <i>E. coli</i> , together with <i>Serratia marcescens</i> and <i>Proteus mirabilis</i> from biological material obtained from the wound surface of puerperas with PSI after cesarean section, are described [55]
	2013, январь–май 2016 2013, January–May, 2016		<i>Klebsiella pneumoniae</i> [52–54], <i>Citrobacter</i> spp. [52–54], <i>Enterobacter</i> spp. [52–54]	
		Дрожжеподобные грибы Yeast-like fungi	<i>Candida albicans</i> [52–54]	
	2009–2012		<i>Mycobacterium massiliense</i> [56]	Преимущественно при ИОХВ после кесарева сечения Mainly for SSI after cesarean section

группы В (*Streptococcus agalactiae*), что во время беременности повышает риск развития инфекционного процесса, ассоциированного с данным возбудителем [42]. По данным другого исследования, проведённого в Нидерландах и США, клинически значимая бактериемия, обусловленная *Streptococcus* группы В, развивается в 20–25% случаев [42]. М. Nguyen и соавт. отмечали, что риск стрептококковой инфекции у родильниц в 20 раз превышал таковой у небеременных женщин [41].

В настоящее время произошло переосмысление источников инфекции *Streptococcus* группы А. Ранее основным источником считался медицинский персонал, среди которого были бессимптомные носители, однако в настоящее время только 15–25% случаев инфицирования *Streptococcus* группы А являются внутрибольничными. По данным М. Nguyen и соавт., в 84,4–85,0% случаев *Streptococcus* группы А инфекция развивалась после вагинального родоразрешения [41]. Недостатком цитируемого исследования было отсутствие информации о применении эпизиотомии, у 46% пациенток имела место клинически значимая бактериемия, у 28% случаях — эндометрит, у 8% — перитонит.

В литературе описаны случаи сепсиса, при которых в качестве этиологического агента выступала *Candida glabrata*. Считается, что кандидозный сепсис может возникать после экстракорпорального оплодотворения, в том числе в результате инфицирования спермы, при наложении швов на шейку матки, разрыве плодных оболочек, амниоцентезе

и биопсии ворсин хориона. Для генерализованной кандидозной инфекции необходима инокуляция *C. glabrata* в матку, тогда как проникновение её через неповреждённые оболочки затруднительно [17, 43].

В литературе представлены данные о выделении из гемокультуры у женщин с сепсисом *E. coli*, продуцирующей бета-лактамазы расширенного спектра и, соответственно, устойчивой к антибиотикам из нескольких фармакологических групп: амоксициллину (58% случаев), амоксициллин/клавулановой кислоте (15%), пиперацillin-тазобактаму (2,1%), гентамицину (1%). Среди грам-положительных бактерий отмечается устойчивость к клиндамицину у *Streptococcus* группы А в 16,7% случаев, *Streptococcus* группы В — в 11% и *Staphylococcus aureus* — в 14% [58]. В последние годы получены данные об увеличении этиологической значимости представителей рода энтерококков за счёт формирования устойчивости к цефалоспорином. Нерациональное использование антибиотиков в лечебной практике является одним из условий формирования бактерий с множественной лекарственной устойчивостью или даже абсолютной резистентностью к любым препаратам, так называемых супербактерий ESCAPE [9, 11].

Послеродовой перитонит. В отличие от акушерского сепсиса, в этиологии акушерского перитонита преобладают *Enterococcus* spp. (64%), в частности *Enterococcus faecalis* (29,4%), бактерии семейства *Enterobacteriaceae* (20–30%) и *Pseudomonas aeruginosa* (29,4%). Доля других

микроорганизмов менее значима: *Staphylococcus* spp. — 13,3%, в том числе *Staphylococcus haemolyticus* (11,8%), *Staphylococcus aureus* (5,9%), и *Candida* spp. — 6,6–23,5%. Имеют место также ассоциации грамотрицательной и грамположительной микрофлоры с неспорообразующими анаэробами и представителями родов *Bacteroides*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus* [44].

Этиология послеродового перитонита определяется способом инфицирования брюшины, который происходит несколькими путями. У 30% женщин инфицированное содержимое полости матки попадает в брюшную полость во время операции, у 15% — кишечная микрофлора проникает в брюшную полость во время послеоперационного разреза кишечника. Наиболее часто (55%) инфицирование брюшной полости происходит при несостоятельности шва на матке на фоне эндометрита, который в большинстве случаев (70%) сопряжён с нарушением техники наложения шва, а в 30% — с репаративными возможностями организма роженицы [11]. Следует отметить, что в зарубежных и российских источниках практически нет информации о развитии перитонита после оперативного родоразрешения [37].

Послеродовой эндометрит. Ведущая нозологическая форма ГСИ рожениц характеризуется полиэтиологичностью, с преобладанием УПФ и формированием ассоциаций аэробов и облигатных неклостридиальных анаэробов [19, 27]. Присутствие ассоциаций микроорганизмов приводит к взаимному усилению роста и изменению вирулентности отдельных представителей, что может сопровождаться усилением выраженности изменений в матке и более тяжёлыми клиническими формами заболевания.

Среди аэробных грамположительных возбудителей чаще встречаются *Streptococcus* группы В, в том числе *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp. и грамотрицательные бактерии — *E. coli*, *Proteus* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. [19, 24, 45]. Среди анаэробных грамположительных микроорганизмов преобладают *Peptostreptococcus* spp., *Peptococcus* spp., среди грамотрицательных — *Prevotella bivia*, *Bacteroides fragile*, реже — *Clostridium* spp. Считается, что матка, повреждённая кесаревым сечением, особенно чувствительна к *Streptococcus pyogenes* и *Staphylococcus aureus* [20, 46].

Ряд авторов высказывают сомнения по поводу этиологической роли *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma* spp. и некоторых вирусов, однако указывают на необходимость настороженности при выделении этих микроорганизмов в ассоциации с УПФ [6]. Описаны случаи выделения из влагалища и особенно отделяемого цервикального канала таких микроорганизмов, как *Haemophilus influenzae*,

Listeria monocytogenes, которые во время беременности создают риск её преждевременного прерывания, внутриутробное инфицирование плода, а при родоразрешении приводят к возникновению хориоамнионита и эндометрита, и сепсиса у новорождённого [9, 47]. Присутствие дрожжеподобных грибов рода *Candida*, как правило, не указывает на их этиологическую роль, но за счёт продукции грибами питательных веществ способствует увеличению количества бактерий в биоматериале [59].

Результаты отдельных исследований, посвящённых изучению резистентности возбудителей послеродового эндометрита, указывают на устойчивость *E. faecalis* к антимикробным препаратам из группы макролидов (азитромицину), пенициллинов (бензилпенициллину), сульфаниламидов (ко-тримоксазолу) и тетрациклинов (доксциклину).

Для *Staphylococcus haemolyticus* характерна устойчивость к бензилпенициллину, эритромицину, офлоксацину, цефотаксиму [60].

Послеродовой мастит. В качестве преобладающего этиологического агента при лактационном мастите выступает *Staphylococcus aureus*, который выделяется из патологического очага в 80–95% случаев, как в виде монокультуры, так в ассоциации с другими патогенами [34, 49].

Особую значимость в этиологии мастита имеют метициллинрезистентные *Staphylococcus aureus*, которые в 50,8% случаев были выделены в мазках с сосковой области грудных желез. Сложность идентификации *Staphylococcus aureus*, устойчивых к метициллину, — в способности данного микроорганизма образовывать биоплёнки [33, 34, 63].

P. Mediano и соавт. в своих исследованиях поднимают проблемы рационального использования антибиотиков в лечении мастита и инфекций, локализующихся в носо-, ротоглотке и мочеполовой системе [51]. Авторы считают, что применение антибиотиков для лечения инфекций горла оказывает влияние на микрофлору молочной железы, а антибиотики широкого спектра, применяемые при лечении мастита, могут приводить к развитию инфекций мочевыводящих путей и кандидозу влагалища, подавляя активность *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* в грудном молоке. Доказано, что микроорганизмы, приводящие к развитию инфекций горла и мочеполовой системы, могут распространяться на молочную железу, а микроорганизмы, вызывающие мастит, могут вызывать инфекции горла и мочеполовой системы, что у женщин с послеродовым маститом создаёт дополнительные риски развития инфекций других локализаций [51, 64].

В последние годы большое внимание уделяется исследованию микрофлоры человека, и мастит рядом авторов рассматривается как результат дисбиоза молочной железы [48]. Авторы отмечают, что присутствие *Staphylococcus aureus* в протоках мо-

лочной железы и грудном молоке в количествах, не превышающих 10^3 КОЕ/мл, не приводит к развитию мастита, т.к. содержащиеся в грудном молоке родильницы молочнокислые бактерии (*Lactobacillus fermentum* СЕСТ5716) подавляют размножение широкого спектра микроорганизмов путём конкурентной адгезии и продукции антибактериальных веществ. В этом случае выделение *Staphylococcus aureus* будет свидетельствовать лишь о колонизации данным микроорганизмом [49, 51, 65, 66].

Гораздо реже этиологическими агентами мастита выступают грамотрицательные бактерии: *Enterobacter* spp., *Escherichia* spp., *P. aeruginosa*, *Klebsiella* spp., а также *Streptococcus* групп А и В [30, 34]. *Staphylococcus epidermidis*, по мнению ряда авторов, может провоцировать развитие абсцесса молочной железы с последующим переходом в сепсис [32, 48, 61, 62].

Описаны случаи послеродового мастита как осложнения брюшного тифа и других сальмонеллезных инфекций. Одна из редких бактерий в этиологии этого заболевания — *Mycobacterium tuberculosis* (до 1% случаев). При гнойных формах мастита может выделяться и анаэробная микрофлора [50].

При выделении из грудного молока дрожжеподобного грибка *C. albicans* решать вопрос о кандидозной этиологии мастита необходимо с учётом клинической картины заболевания. Патогномичным симптомом такого мастита является ощущение «покалывания иголками» от соска в сторону позвоночника, сохраняющееся и после кормления ребёнка. Из общих симптомов мастита для кандидозной этиологии характерны зуд, болезненность и жжение в области сосков как во время, так и после кормления грудью. Основным фактором риска в этом случае являются длительно незаживающие трещины сосков (более 5–7 дней) и сахарный диабет [31, 49]. В ряде случаев источником *C. albicans* для родильниц являются их новорождённые, в ротовой полости которых может происходить чрезмерный рост дрожжеподобного грибка в присутствии *Staphylococcus* и *Streptococcus* [51].

Инфекции области хирургического вмешательства. Нередко этиологическими агентами инфекции в области эпизиотомной раны и кесарева сечения являются представители собственной микрофлоры кожи, влагалища или кишечника родильницы [39, 67]. Среди возбудителей ИОХВ выделяют и грамположительные (*E. faecalis*, *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus aureus*, коагулаза-негативные *Staphylococcus*, *Streptococcus pyogenes*), и грамотрицательные микроорганизмы (*E. coli*, *Kl. pneumoniae*, *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp.). Среди грибковой флоры чаще других идентифицируют *C. albicans* [52–54]. Описаны случаи выделения с раневой поверхности у родильниц с ИОХВ *E. coli*, *Serratia*

marcescens и *Proteus mirabilis* [55]. В зарубежной литературе описан случай ИОХВ после кесарева сечения, вызванный *Mycobacterium massiliense* [56].

Выводы

Для ГСИ послеродового периода на современном этапе акушерской помощи характерна стёртая клиническая картина заболевания с торпидным течением инфекционного процесса.

Интенсивность патологического процесса и выраженность патоморфологических изменений в организме родильницы не всегда соответствуют тяжести клинических проявлений ГСИ. Зачастую клинические проявления послеродовых инфекций расцениваются как проявления беременности или как экстрагенитальная патология. Это приводит к отсроченной постановке диагноза ГСИ родильниц на стадии генерализации инфекционного процесса.

Несмотря на этиологическое разнообразие возбудителей ГСИ, в настоящее время прослеживается ведущая роль конкретных возбудителей в этиологии конкретных нозологических форм ГСИ послеродового периода. Так, при послеродовом сепсисе чаще других выступают *E. coli* и *Streptococcus* групп А и В. При акушерском перитоните — это представители грамположительной флоры, особенно *Enterococcus* spp., вторыми по значимости являются грамотрицательные бактерии семейства *Enterobacteriaceae*. Послеродовой эндометрит сохраняет полиэтиологичность с преобладанием УПФ и многокомпонентных ассоциаций аэробов и облигатных неклостридиальных анаэробов. В качестве доминирующего этиологического агента при лактационном мастите выступает *Staphylococcus aureus*. Этиопатогены при послеродовых ИОХВ — представители микрофлоры кожи, влагалища или кишечника, что обусловлено местом оперативного вмешательства.

Сохраняющаяся тенденция нерационального использования антибиотиков в клинической практике создаёт благоприятные условия для формирования множественной лекарственной устойчивости бактерий или даже абсолютной резистентности к любым препаратам.

Заключение

Охрана здоровья женщин является приоритетным направлением развития системы здравоохранения России. Применяемые технологии современной акушерской практики, с одной стороны, базируются на способах оказания медицинской помощи, ориентированных на сохранение беременности и создание условий для выхаживания новорождённых, с другой — отдельно применяемые методики увеличивают риски возникновения ГСИ послеродового периода, особенно у родильниц из группы высокого инфекционного риска. Последствия ГСИ

послеродового периода негативно сказываются на репродуктивной функции женщины, в последующем приводя к невынашиванию беременности и бесплодию, нанося значительный ущерб демографической ситуации в стране.

Широкое разнообразие этиологических агентов, для которых характерно формирование такого эпидемиологически значимого свойства, как антибиотикоустойчивость, создаёт условия для формирования госпитальных штаммов.

Эпидемиологическое наблюдение в учреждениях родовспоможения должно осуществляться постоянно с применением пассивного и активного метода выявления как клинически манифестных случаев ГСИ послеродового периода, так и донозологических форм послеродовых состояний (гематометра, лохиометра, субинволюция матки, лактостаза и др.), с целью своевременного выявления источников инфекции и организации противоэпидемических мероприятий.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Смирнова С.С., Голубкова А.А., Алимов А.В., Акимкин В.Г. Внутритробные инфекции новорожденных как маркер эпидемического неблагополучия в учреждениях родовспоможения. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2019; 18(5): 42–9. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2019-18-5-42-49>
2. Найговзина Н.Б., Попова А.Ю., Бирюкова Е.Е., Ежлова Е.Б., Игонина Е.П., Покровский В.И. и др. Оптимизация системы мер борьбы и профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи в Российской Федерации. *ОРГЗДРАВ: новости, мнения, обучения. Вестник ВШОУЗ*. 2018; (1): 17–26.
3. Bonet M., Nogueira Pileggi V., Rijken M.J., Coomarasamy A., Lissauer D., Souza J.P., et al. Towards a consensus definition of maternal sepsis: results of a systematic review and expert consultation. *Reprod. Health*. 2017; 14(1): 67. <https://doi.org/10.1186/s12978-017-0321-6>
4. Артымук Н.В. Сепсис в акушерстве – 2017. Обзор. *Акушерство и гинекология. Новости. Мнения. Обучение*. 2017; (3): 61–5.
5. Pundir J., Coomarasamy A. Bacterial sepsis in pregnancy. In: *Obstetrics: Evidence-based Algorithms*. Cambridge: Cambridge University Press; 2016: 87–9. <https://doi.org/10.1017/SBO9781107338876.025>
6. Горин В.С., Матвеева И.В., Попова Ж.Ю. Клинико-микробиологические особенности пуэрперального эндометрита, диагностика и лечение. *Сибирский медицинский журнал (Иркутск)*. 2011; 101(2): 9–16.
7. Сергеев В.И., Горовиц Э.С., Маркович Н.И. *Внутрибольничные гнойно-септические инфекции новорожденных и родильниц. Микробиологические и эпидемиологические аспекты*. Пермь; 2010.
8. Жилинкова Н.Г. Современные представления о пуэрперальных инфекциях в связи с антибактериальной резистентностью и завершением эры антибиотиков. *Акушерство и гинекология. Новости. Мнения. Обучение*. 2019; 7(3): 70–5. <https://doi.org/10.24411/2303-9698-2019-13010>
9. Адамян Л.В., Кузьмин В.Н., Арсланян К.Н., Харченко Э.И. Современные способы борьбы с инфекцией в акушерстве и перинатологии (антибиотики, бактериофаги, иммуномодуляторы). *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2017; (3): 37–45.
10. Морова О.В., Голубкова А.А., Богаевская Е.К. Эпидемиологические аспекты инфекционно-воспалительных заболеваний послеродового периода и критерии при оценке рисков. *Вестник Уральского государственного медицинского университета*. 2018; (2): 44–7.
11. Иванников Н.Ю., Митичкин А.Е., Димитрова В.И., Слюсарева О.А., Хлынова С.А., Доброхотова Ю.Э. Современные подходы в лечении послеродовых гнойно-септических заболеваний. *Медицинский совет*. 2019; (7): 58–69. <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2019-7-58-69>
12. Plante L.A., Pacheco L.D., Louis J.M. SMFM Consult Series #47: Sepsis during pregnancy and the puerperium. *Am. J. Obstet. Gynecol*. 2019; 220(4): B2–B10. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2019.01.216>
13. Шорников А.Б., Зайратьянц О.В. Послеродовый сепсис. *Вестник Национального медико-хирургического центра им. Н.И. Пирогова*. 2013; 8(3): 77–9.
14. Ali A., Lamont R.F. Recent advances in the diagnosis and management of sepsis in pregnancy. *F1000Res*. 2019; 8: F1000 Faculty Rev-1546. <https://doi.org/10.12688/f1000research.18736.1>
15. Анаьева В.В., Французов В.Н., Подтетнев А.Д., Ордианц И.М. Синдром системной воспалительной реакции у родильниц с осложненным течением пуэрперия. *Вестник Российской военно-медицинской академии*. 2011; (3): 49–52.
16. Милованов А.П., Миханюшина Н.А., Лебеденко Е.Ю. Клинико-морфологическая дифференциация сепсиса во время родов и в послеродовом периоде. *Доктор.Ру*. 2018; (6): 11–6. <https://doi.org/10.31550/1727-2378-2018-150-6-11-16>
17. Девятова Е.А. Акушерский сепсис. *Акушерство и гинекология. Новости. Мнения. Обучение*. 2015; (3): 33–44.
18. Albright C.M., Ali T.N., Lopes V., Rouse D.J., Anderson B.L. The sepsis in obstetrics score: a model to identify risk of morbidity from sepsis in pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol*. 2014; 211(1): 39.e1–8.
19. Адамян Л.В., ред. *Клинические рекомендации: Послеродовый эндометрит*. М.; 2016.
20. Taylor M., Pillarisetty L.S. *Endometritis*. Treasure Island, FL: StatPearls Publishing; 2021.
21. Самойлова Т.Е., Кохно Н.И., Докудаева Ш.А. Микробные ассоциации при послеродовом эндометрите. *Русский медицинский журнал. Медицинское обозрение*. 2018; 2(10): 6–13.
22. Докудаева Ш.А. Современные представления об этиологии, патогенезе, клинике и диагностике послеродового эндометрита. *Вестник Национального медико-хирургического центра им. Н.И. Пирогова*. 2016; 11(4): 109–15.
23. Захарова Ю.А., Фельдблюм И.В., Падрюль Н.Н., Николаева А.М. Характеристика микрофлоры плацентарной ткани и вагинальных секретов беременных, рожениц и родильниц. *Пермский медицинский журнал*. 2006; 23(3): 61–8.
24. Колесаева Ж.Ю. Роль условно-патогенной микрофлоры влагалища в этиологии послеродовых гнойно-воспалительных заболеваний. *Журнал акушерства и женских болезней*. 2011; 60(6): 96–100.
25. Анохова Л.И., Белокрыницкая Т.Е., Патеев А.В., Кохан С.Т. Послеродовый эндометрит и его профилактика (обзор литературы). *Научное обозрение. Медицинские науки*. 2016; (4): 6–13.
26. Буянова С.Н., Пучкова Н.В. Несостоятельный рубец на матке после кесарева сечения: диагностика, тактика ведения, репродуктивный прогноз. *Российский вестник акушера-гинеколога*. 2011; 11(4): 36–8.
27. Касабулатов Н.М. *Послеродовой эндометрит: патогенез, особенности клеточного и гуморального иммунитета, диагностика и лечение*: Автореф. дисс. ... д-ра мед. наук. М.; 2006.

28. Черемискин В.П., Устюжанина Н.В. Особенности эндометрита в позднем послеродовом периоде. *Пермский медицинский журнал*. 2008; 25(1): 36–9.
29. Верес И.А., Белько В.И. Исследование факторов риска и разработка прогнозирования возникновения послеродового гипотонического и инфекционного эндометрита. *Военная медицина*. 2018; (4): 77–86.
30. Савельевой Г.М., Сухих Г.Т., Серова В.Н., Радзинского В.Е., ред. *Акушерство: национальное руководство*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2018.
31. ВОЗ. Мастит. Причины и ведение. Женева; 2000.
32. Cullinane M., Amir L.H., Donath S.M., Garland S.M., Tabrizi S.N., Payne M.S., et al. Determinants of mastitis in women in the CASTLE study: a cohort study. *BMC Fam. Pract.* 2015; 16: 181. <https://doi.org/10.1186/s12875-015-0396-5>
33. Blackmon M.M., Nguyen H., Mukherji P. *Acute Mastitis*. Treasure Island, FL: StatPearls Publishing; 2020.
34. Балушкина А.А., Тютюнник В.Л., Кан Н.Е., Пустотина О.А., Москалева Г.В. Новые тенденции в профилактике и лечении послеродового мастита и лактостаза. *Медицинский совет*. 2019; (12): 136–41. <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2019-12-136-141>
35. Адамян Л.В., Артымук Н.В., Белокрыницкая Т.Е., Гельфанд Б.Р., Куликов А.В., Кан Н.Е. и др. *Септические осложнения в акушерстве. Клинические рекомендации. Протоколы лечения. Анестезия, интенсивная терапия и реанимация в акушерстве и гинекологии: Клинические рекомендации*. М.: Медицина; 2018: 582–635.
36. Мальцева А.Н. Лечение и профилактика раневой инфекции после эпизиотомии. *Austrian Journal of Technical and Natural Sciences*. 2014; (1-2): 58–64.
37. Стрижаков А.Н., Бадма-Гаряев М.С., Давыдов А.И., Подтетенев А.Д., Проценко Д.Н., Буданов П.В. Акушерский перитонит после кесарева сечения: дифференцированный подход к выбору хирургической тактики. *Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии*. 2013; 12(6): 53–62.
38. Carroli G., Mignini L. Episiotomy for vaginal birth. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2009; (1): CD000081. <https://doi.org/10.1002/14651858.cd000081.pub2>
39. Bonet M., Ota E., Chibueze C.E., Oladapo O.T. Antibiotic prophylaxis for episiotomy repair following vaginal birth. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2017; 11(11): CD012136. <https://doi.org/10.1002/14651858.cd012136.pub2>
40. Duan R., Xu X., Wang X., Yu H. Perinatal outcome in women with bacterial sepsis: a cross-sectional study from West China. *Medicine (Baltimore)*. 2019; 98(44): e17751. <https://doi.org/10.1097/md.00000000000017751>
41. Nguyen M., Bendi V.S., Guduru M., Olson E., Vivekanandan R., Foral P.A., et al. Postpartum invasive group A Streptococcus infection: case report and mini-review. *Cureus*. 2018; 10(8): e3184. <https://doi.org/10.7759/cureus.3184>
42. Hall J., Adams N.H., Bartlett L., Seale A.C., Lamagni T., Bianchi-Jassir F., et al. Maternal disease with group B *Streptococcus* and serotype distribution worldwide: systematic review and meta-analyses. *Clin. Infect. Dis.* 2017; 65(Suppl. 2): S112–24. <https://doi.org/10.1093/cid/cix660>
43. Tan S.Q., Ng O.T., Khong C.C. Candida glabrata sepsis associated with chorioamnionitis in an IVF twin pregnancy: should we deliver? *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 2015; 41(6): 962–6. <https://doi.org/10.1111/jog.12656>
44. Котомина Т.С. *Современная хирургическая тактика лечения родильниц с акушерским перитонитом на фоне несостоятельности швов на матке после операции кесарева сечения*: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. М.; 2013.
45. Вербицкая М.С. Послеродовый эндометрит: профилактика и комплексная терапия. *Медицинский журнал*. 2006; (3): 14–8.
46. Каримова Г.Н. *Совершенствование клинико-лабораторных подходов к прогнозированию, диагностике и тактике лечения послеродового эндометрита*: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. М.; 2017.
47. Боронина Л.Г., Блинова С.М., Саматова Е.В., Жилин А.В. Этиологическая структура и антибиотикорезистентность основных возбудителей гнойно-септических заболеваний родильниц и новорожденных. *РМЖ. Мать и дитя*. 2016; 24(5): 336–9.
48. Yu Z., Sun S., Zhang Y. High-risk factors for suppurative mastitis in lactating women. *Med. Sci. Monit.* 2018; 24: 4192–7. <https://doi.org/10.12659/msm.909394>
49. Яковлев Я.Я., Манеров Ф.К. Лактостаз и лактационный мастит в практике педиатра. *Сибирское медицинское обозрение*. 2015; (2): 32–41.
50. Радзинский В.Е., ред. *Акушерство: учебник*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2016.
51. Mediano P., Fernández L., Rodríguez J.M., Marín M. Case-control study of risk factors for infectious mastitis in Spanish breastfeeding women. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2014; 14: 195. <https://doi.org/10.1186/1471-2393-14-195>
52. Деменко С.Г. *Оптимизация эпидемиологического и микробиологического мониторинга за гнойно-септическими инфекциями родильниц на основе отечественных стандартных определений случая и бактериологического исследования последа*: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. Пермь; 2013.
53. Bitew Kifilie A., Dagnew M., Tegenie B., Yeshitela B., Howe R., Abate E. Bacterial profile, antibacterial resistance pattern, and associated factors from women attending postnatal health service at University of Gondar Teaching Hospital, Northwest Ethiopia. *Int. J. Microbiol.* 2018; 2018: 3165391. <https://doi.org/10.1155/2018/3165391>
54. Багрий Д.О. Оптимизация тактики ведения пациенток с акушерской раневой инфекцией. *Здоровье женщины*. 2013; (2): 112–3.
55. Zejnullahu V.A., Isjanovska R., Sejfiija Z., Zejnullahu V.A. Surgical site infections after cesarean sections at the University Clinical Center of Kosovo: rates, microbiological profile and risk factors. *BMC Infect. Dis.* 2019; 19(1): 752. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4383-7>
56. Wu T.S., Yang C.H., Brown-Elliott B.A., Chao A.S., Leu H.S., Wu T.L., et al. Postcesarean section wound infection caused by *Mycobacterium massiliense*. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2016; 49(6): 955–61. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2015.06.010>
57. Majangara R., Gidiri M.F., Chirenje Z.M. Microbiology and clinical outcomes of puerperal sepsis: a prospective cohort study. *J. Obstet. Gynaecol.* 2018; 38(5): 635–41. <https://doi.org/10.1080/01443615.2017.1399112>
58. Knowles S.J., O'Sullivan N.P., Meenan A.M., Hanniffy R., Robson M. Maternal sepsis incidence, aetiology and outcome for mother and fetus: a prospective study. *BJOG*. 2015; 122(5): 663–71. <https://doi.org/10.1111/1471-0528.12892>
59. Козаренко О.Н. *Антимикробные пептиды в патогенезе послеродового эндометрита*: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. Симферополь; 2017.
60. Тирская Ю.И., Баринев С.В., Долгих Т.И. Прогнозирование инфекционного риска и способ профилактики послеродового эндометрита у родильниц инфекционного риска. *Акушерство и гинекология*. 2014; (5): 37–42.
61. Khanal V., Scott J.A., Lee A.H., Binns C.W. Incidence of mastitis in the neonatal period in a traditional breastfeeding society: results of a cohort study. *Breastfeed. Med.* 2015; 10(10): 481–7. <https://doi.org/10.1089/bfm.2015.0080>
62. Michie C., Lockie F., Lynn W. The challenge of mastitis. *Arch. Dis. Child.* 2003; 88(9): 818–21. <https://doi.org/10.1136/ad.88.9.818>
63. Кузьмин В.Н., Адамян Л.В., Коньшева О.В., Харченко Э.И. Эпидемиологический надзор в акушерском специализированном стационаре при многопрофильной больнице. *Ин-*

ОБЗОРЫ

- фекационные болезни: новости, мнения, обучение. 2017; (3): 65–9.
64. Захарова И.Н., Кучина А.Е., Бережная И.В., Санникова Т.Н. Мастит и/или лактостаз? Как отличить? Чем помочь? Как лечить? *Медицинский совет*. 2019; (11): 10–5. <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2019-11-10-15>
65. Пустотина О.А. Лактационный мастит и лактостаз: тактические контрарверсии. *Гинекология Эндокринология*. 2014; 8-1(96): 64–7.
66. Карапетян А.О. *Lactobacillus fermentum* СЕСТ5716 — пробиотик и лечение лактационного мастита. *Медицинский совет*. 2019; (13): 70–2. <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2019-13-70-72>
67. Tkatchenko R.A., Kaminski V.V. Postoperative infections in obstetrics and gynecology: prevention, diagnosis and treatment. *Акушерство. Гинекология. Генетика*. 2017; 3(1): 54–65.
- REFERENCES
- Smirnova S.S., Golubkova A.A., Alimov A.V., Akimkin V.G. Prenatal infection of the newborns as an epidemic marker in maternity hospitals. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika*. 2019; 18(5): 42–9. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2019-18-5-42-49> (in Russian)
 - Naygovzina N.B., Popova A.Yu., Biryukova E.E., Ezhlova E.B., Igonina E.P., Pokrovskiy V.I., et al. Optimization of the system of measures to control and prevent infections associated with the provision of medical care in the Russian Federation. *ORGZDRAV: novosti, mneniya, obucheniya. Vestnik VShOUZ*. 2018; (1): 17–26. (in Russian)
 - Bonet M., Nogueira Pileggi V., Rijken M.J., Coomarasamy A., Lissauer D., Souza J.P., et al. Towards a consensus definition of maternal sepsis: results of a systematic review and expert consultation. *Reprod. Health*. 2017; 14(1): 67. <https://doi.org/10.1186/s12978-017-0321-6>
 - Artyukov N.V. Sepsis in obstetrics – 2017. Review. *Akusherstvo i ginekologiya. Novosti. Mneniya. Obuchenie*. 2017; (3): 61–5. (in Russian)
 - Pundir J., Coomarasamy A. Bacterial sepsis in pregnancy. In: *Obstetrics: Evidence-based Algorithms*. Cambridge: Cambridge University Press; 2016: 87–9. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107338876.025>
 - Gorin V.S., Matveeva I.V., Popova Zh.Yu. Clinical and microbiological characteristics of puerperal endometritis, diagnosis and treatment. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal (Irkutsk)*. 2011; 101(2): 9–16. (in Russian)
 - Sergevniin V.I., Gorovits E.S., Markovich N.I. *Nosocomial Purulent-Septic Infections of Newborns and Maternity Hospitals. Microbiological and Epidemiological Aspects [Vnutribol'nichnye gnoyno-septicheskie infektsii novorozhdennykh i rodil'nits. Mikrobiologicheskie i epidemiologicheskie aspekty]*. Perm'; 2010. (in Russian)
 - Zhilinkova N.G. Modern ideas about puerperal infections due to antibacterial resistance and the end of the antibiotic era. *Akusherstvo i ginekologiya. Novosti. Mneniya. Obuchenie*. 2019; 7(3): 70–5. <https://doi.org/10.24411/2303-9698-2019-13010> (in Russian)
 - Adamyan L.V., Kuz'min V.N., Arslanyan K.N., Kharchenko E.I. Modern methods to combat infection in obstetrics and perinatology (antibiotics, bacteriophages, immunomodulators). *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie*. 2017; (3): 37–45. (in Russian)
 - Morova O.V., Golubkova A.A., Bogaevskaya E.K. Epidemiological aspects infectious-inflammatory diseases of the postpartum period and criteria in risk assessment. *Vestnik Ural'skogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*. 2018; (2): 44–7. (in Russian)
 - Ivannikov N.Yu., Mitichkin A.E., Dimitrova V.I., Slyusareva O.A., Khlynova S.A., Dobrokhotova Yu.E. Modern approaches to the treatment of postpartum purulent-septic diseases. *Meditsinskiy совет*. 2019; (7): 58–69. <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2019-7-58-69> (in Russian)
 - Plante L.A., Pacheco L.D., Louis J.M. SMFM Consult Series #47: Sepsis during pregnancy and the puerperium. *Am. J. Obstet. Gynecol*. 2019; 220(4): B2–B10. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2019.01.216>
 - Shornikov A.B., Zayrat'yants O.V. Lechopyra. *Vestnik Natsional'nogo mediko-khirurgicheskogo tsentra im. N.I. Pirogova*. 2013; 8(3): 77–9. (in Russian)
 - Ali A., Lamont R.F. Recent advances in the diagnosis and management of sepsis in pregnancy. *F1000Res*. 2019; 8: F1000 Faculty Rev-1546. <https://doi.org/10.12688/f1000research.18736.1>
 - Anan'eva V.V., Frantsuzov V.N., Podtetenev A.D., Ordinyants I.M. Systemic inflammation response syndrome in obstetric patients with complications in puerperal period. *Vestnik Rossiyskoy voenno-meditsinskoy akademii*. 2011; (3): 49–52. (in Russian)
 - Milovanov A.P., Mikhanchina N.A., Lebedenko E.Yu. Clinical and morphological differential diagnosis of sepsis in labor and postpartum. *Doktor.Ru*. 2018; (6): 11–6. <https://doi.org/10.31550/1727-2378-2018-150-6-11-16> (in Russian)
 - Devyatova E.A. Obstetric sepsis. *Akusherstvo i ginekologiya. Novosti. Mneniya. Obuchenie*. 2015; (3): 33–44. (in Russian)
 - Albright C.M., Ali T.N., Lopes V., Rouse D.J., Anderson B.L. The Sepsis in Obstetrics Score: a model to identify risk of morbidity from sepsis in pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol*. 2014; 211(1): 39.e1–8.
 - Adamyan L.V., ed. *Clinical Recommendations: Postpartum Endometritis [Klinicheskie rekomendatsii: Poslerodovyy endometrit]*. Moscow; 2016. (in Russian)
 - Taylor M., Pillarisetty L.S. *Endometritis*. Treasure Island, FL: StatPearls Publishing; 2021.
 - Samoylova T.E., Kokhno N.I., Dokudaeva Sh.A. Microbial associations in postpartum endometritis. *Russkiy meditsinskiy zhurnal. Meditsinskoe obozrenie*. 2018; 2(10): 6–13. (in Russian)
 - Dokudaeva Sh.A. Current concepts of etiology, pathogenesis, clinical presentation and diagnosis of postpartum endometritis. *Vestnik Natsional'nogo mediko-khirurgicheskogo tsentra im. N.I. Pirogova*. 2016; 11(4): 109–15. (in Russian)
 - Zakharova Yu.A., Fel'dblyum I.V., Padrul' N.N., Nikolaeva A.M. Characterization of placental tissue and vaginal secret microflora in pregnant women, women in childbirth and puerperas. *Permskiy meditsinskiy zhurnal*. 2006; 23(3): 61–8. (in Russian)
 - Kolesaeva Zh.Yu. Role of oportunistic vaginal microflora in etiology of postpartum infection complications. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney*. 2011; 60(6): 96–100. (in Russian)
 - Anokhova L.I., Belokrinitskaya T.E., Pateyuk A.V., Kokhan S.T. Postnatal endometritis and its prevention (review of literature). *Nauchnoe obozrenie. Meditsinskie nauki*. 2016; (4): 6–13. (in Russian)
 - Buyanova S.N., Puchkova N.V. An inconsistent uterine scar after cesarean section: diagnosis, management tactics, reproductive prognosis. *Rossiyskiy vestnik akushera-ginekologa*. 2011; 11(4): 36–8. (in Russian)
 - Kasabulatov N.M. *Postpartum endometritis: pathogenesis, features of cellular and humoral immunity, diagnosis and treatment*: Diss. Moscow; 2006. (in Russian)
 - Cheremiskin V.P., Ustyuzhanina N.V. Peculiar features of endometritis at late postnatal period. *Permskiy meditsinskiy zhurnal*. 2008; 25(1): 36–9. (in Russian)

29. Veres I.A., Bel'ko V.I. Study of risk factors and the development of predict the occurrence of postpartum uterine infections and endometritis. *Voennaya meditsina*. 2018; (4): 77–86. (in Russian)
30. Savel'evoy G.M., Sukhikh G.T., Serova V.N., Radzinskogo V.E., eds. *Obstetrics: a National Guide [Akusherstvo: natsional'noe rukovodstvo]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2018. (in Russian)
31. WHO. Mastitis. Causes and management. Geneva; 2000. (in Russian)
32. Cullinane M., Amir L.H., Donath S.M., Garland S.M., Tabrizi S.N., Payne M.S., et al. Determinants of mastitis in women in the CASTLE study: a cohort study. *BMC Fam. Pract.* 2015; 16: 181. <https://doi.org/10.1186/s12875-015-0396-5>
33. Blackmon M.M., Nguyen H., Mukherji P. *Acute Mastitis*. Treasure Island, FL: StatPearls Publishing; 2020.
34. Balushkina A.A., Tyutyunnik V.L., Kan N.E., Pustotina O.A., Moskaleva G.V. New trends in prevention and treatment of postpartum mastitis and lactostasis. *Meditsinskiy sovet*. 2019; (12): 136–41. <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2019-12-136-141> (in Russian)
35. Adamyan L.V., Artymuk N.V., Belokrinitzskaya T.E., Gelfand B.R., Kulikov A.V., Kan N.E., et al. *Septic Complications in Obstetrics. Clinical Recommendations. Treatment Protocols. Anesthesia, Intensive Care and Resuscitation in Obstetrics and Gynecology: Clinical Recommendations [Septicheskie oslozheniya v akusherstve. Klinicheskie rekomendatsii. Protokoly lecheniya. Anesteziya, intensivnaya terapiya i reanimatsiya v akusherstve i ginekologii: Klinicheskie rekomendatsii.]*. Moscow: Meditsina; 2018: 582–635. (in Russian)
36. Mal'tseva A.N. Treatment and prevention of wound infection after episiotomy. *Austrian Journal of Technical and Natural Sciences*. 2014; (1-2): 58–64. (in Russian)
37. Strizhakov A.N., Badma-Garyaev M.S., Davydov A.I., Podtetenov A.D., Protsenko D.N., Budanov P.V. Obstetric peritonitis after caesarean section: a differential approach to choosing surgical tactics. *Voprosy ginekologii, akusherstva i perinatologii*. 2013; 12(6): 53–62. (in Russian)
38. Carroli G., Mignini L. Episiotomy for vaginal birth. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2009; (1): CD000081. <https://doi.org/10.1002/14651858.cd000081.pub2>
39. Bonet M., Ota E., Chibueze C.E., Oladapo O.T. Antibiotic prophylaxis for episiotomy repair following vaginal birth. *Cochrane. Database. Syst. Rev.* 2017; 11(11): CD012136. <https://doi.org/10.1002/14651858.cd012136.pub2>
40. Duan R., Xu X., Wang X., Yu H. Perinatal outcome in women with bacterial sepsis: A cross-sectional study from West China. *Medicine (Baltimore)*. 2019; 98(44): e17751. <https://doi.org/10.1097/md.00000000000017751>
41. Nguyen M., Bendi V.S., Guduru M., Olson E., Vivekanandan R., Foral P.A., et al. Postpartum invasive group a streptococcus infection: case report and mini-review. *Cureus*. 2018; 10(8): e3184. <https://doi.org/10.7759/cureus.3184>
42. Hall J., Adams N.H., Bartlett L., Seale A.C., Lamagni T., Bianchi-Jassir F., et al. Maternal disease with group b streptococcus and serotype distribution worldwide: systematic review and meta-analyses. *Clin. Infect. Dis.* 2017; 65(Suppl. 2): S112–24. <https://doi.org/10.1093/cid/cix660>
43. Tan S.Q., Ng O.T., Khong C.C. Candida glabrata sepsis associated with chorioamnionitis in an IVF twin pregnancy: Should we deliver? *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 2015; 41(6): 962–6. <https://doi.org/10.1111/jog.12656>
44. Kotomina T.S. *Modern surgical tactics of treatment of maternity women with obstetric peritonitis against the background of failure of sutures on the uterus after cesarean section*: Diss. Moscow; 2013. (in Russian)
45. Verbitskaya M.S. The prevention of postnatal endometriosis in puerperae with different degree of infection risk with implementation of application form of sorbent agent. *Meditsinskiy zhurnal*. 2006; (3): 14–8. (in Russian)
46. Karimova G.N. *Improvement of clinical and laboratory approaches to prognosis, diagnosis and tactics of treatment of postpartum endometritis*: Diss. Moscow; 2017. (in Russian)
47. Boronina L.G., Blinova S.M., Samatova E.V., Zhilin A.V. Etiological structure and antibiotic resistance of the main pathogens of purulent-septic diseases of maternity hospitals and newborns. *RMZh. Mat' i ditya*. 2016; 24(5): 336–9. (in Russian)
48. Yu Z., Sun S., Zhang Y. High-risk factors for suppurative mastitis in lactating women. *Med. Sci. Monit.* 2018; 24: 4192–7. <https://doi.org/10.12659/msm.909394>
49. Yakovlev Ya.Ya., Manerov F.K. Lactostasis and lactation mastitis in pediatric practice. *Sibirskoe meditsinskoe obozrenie*. 2015; (2): 32–41. (in Russian)
50. Radzinskiy V.E., ed. *Obstetrics: Textbook [Akusherstvo: uchebnik]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2016.
51. Mediano P., Fernández L., Rodríguez J.M., Marín M. Case-control study of risk factors for infectious mastitis in Spanish breastfeeding women. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2014; 14: 195. <https://doi.org/10.1186/1471-2393-14-195>
52. Demenko S.G. *Optimization of epidemiological and microbiological monitoring of purulent-septic infections of maternity hospitals on the basis of domestic standard definitions of the case and bacteriological examination of the afterbirth*: Diss. Perm'; 2013. (in Russian)
53. Bitew Kifilie A., Dagne M., Tegenie B., Yeshitela B., Howe R., Abate E. Bacterial profile, antibacterial resistance pattern, and associated factors from women attending postnatal health service at University of Gondar Teaching Hospital, Northwest Ethiopia. *Int. J. Microbiol.* 2018; 2018: 3165391. <https://doi.org/10.1155/2018/3165391>
54. Bagriy D.O. Optimization of management tactics of patients with obstetric wound infection. *Zdorov'e zhenshchiny*. 2013; (2): 112–3. (in Russian)
55. Zejnullahu V.A., Isjanovska R., Sejfiya Z., Zejnullahu V.A. Surgical site infections after cesarean sections at the University Clinical Center of Kosovo: rates, microbiological profile and risk factors. *BMC Infect. Dis.* 2019; 19(1): 752. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4383-7>
56. Wu T.S., Yang C.H., Brown-Elliott B.A., Chao A.S., Leu H.S., Wu T.L., et al. Postcesarean section wound infection caused by *Mycobacterium massiliense*. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2016; 49(6): 955–61. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2015.06.010>
57. Majangara R., Gidiri M.F., Chirenje Z.M. Microbiology and clinical outcomes of puerperal sepsis: a prospective cohort study. *J. Obstet. Gynaecol.* 2018; 38(5): 635–41. <https://doi.org/10.1080/01443615.2017.1399112>
58. Knowles S.J., O'Sullivan N.P., Meenan A.M., Hanniffy R., Robson M. Maternal sepsis incidence, aetiology and outcome for mother and fetus: a prospective study. *BJOG*. 2015; 122(5): 663–71. <https://doi.org/10.1111/1471-0528.12892>
59. Kozarenko O.N. *Antimicrobial peptides in the pathogenesis of postpartum endometritis*: Diss. Simferopol; 2017. (in Russian)
60. Tirskaia Yu.I., Barinov S.V., Dolgikh T.I. The prediction of an infection risk and the way to prevent postpartum endometritis in puerperas at risk for infections. *Akusherstvo i ginekologiya*. 2014; (5): 37–42. (in Russian)
61. Khanal V., Scott J.A., Lee A.H., Binns C.W. Incidence of mastitis in the neonatal period in a traditional breastfeeding society: results of a cohort study. *Breastfeed. Med.* 2015; 10(10): 481–7. <https://doi.org/10.1089/bfm.2015.0080>
62. Michie C., Lockie F., Lynn W. The challenge of mastitis. *Arch. Dis. Child.* 2003; 88(9): 818–21. <https://doi.org/10.1136/adc.88.9.818>
63. Kuz'min V.N., Adamyan L.V., Konyshcheva O.V., Kharchenko E.I. Epidemiological supervision in the obstetric specialized stationary at the multidisciplinary hospital. *Infektsionnye*

ОБЗОРЫ

- bolezni: novosti, mneniya, obuchenie*. 2017; (3): 65–9. (in Russian)
64. Zakharova I.N., Kuchina A.E., Berezhnaya I.V., Sannikova T.N. Mastitis and/or plugged ducts? How to differentiate, help and treat? *Meditsinskiy sovet*. 2019; (11): 10–5. <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2019-11-10-15>
65. Pustotina O.A. Lactation mastitis and milk stasis: controversy over tactics. *Ginekologiya Endokrinologiya*. 2014; 8-1(96): 64–7. (in Russian)

Информация об авторах

Смирнова Светлана Сергеевна — к.м.н., в.н.с., рук. Урало-Сибирского научно-методического центра по профилактике инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи ЕНИИВИ ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор», Екатеринбург, Россия; доцент каф. эпидемиологии, социальной гигиены и организации госсанэпидслужбы УГМУ, Екатеринбург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9749-4611>

Егоров Иван Андреевич[✉] — м.н.с. Урало-Сибирского научно-методического центра по профилактике инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи ЕНИИВИ ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор», Екатеринбург, Россия, ivan.egriv@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7153-2827>

Алла Александровна Голубкова — д.м.н., проф., в.н.с. лаб. инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия; профессор каф. эпидемиологии РМАНПО, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-4812-2165>

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

Статья поступила в редакцию 30.12.2021;
принята к публикации 02.02.2022;
опубликована 28.02.2022

66. Karapetyan A.O. Lactobacillus fermentum CECT5716 — prevention and treatment of lactational mastitis. *Meditsinskiy sovet*. 2019; (13): 70–2. <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2019-13-70-72> (in Russian)
67. Tkatchenko R.A., Kaminski V.V. Postoperative infections in obstetrics and gynecology: prevention, diagnosis and treatment. *Akusherstvo. Ginekologiya. Genetika*. 2017; 3(1): 54–65. (in Ukrainian)

Information about the authors

Svetlana S. Smirnova — Cand. Sci. (Med.), leading researcher, Head, Ural-Siberian scientific-methodological center for the prevention of health-care-related infections, Ekaterinburg Research Institute of Viral Infections, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Yekaterinburg, Russia; Associate Professor, Department of epidemiology, social hygiene and organization of sanitary-epidemiological service, Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9749-4611>

Ivan A. Egorov[✉] — junior researcher, Ural-Siberian scientific-methodological center for the prevention of health-care-related infections, Ekaterinburg Research Institute of Viral Infections, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Yekaterinburg, Russia, ivan.egriv@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7153-2827>

Alla A. Golubkova — D. Sci. (Med.), Professor, leading researcher, Laboratory of infections associated with the provision of medical care, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia; Professor, Department of epidemiology, Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-4812-2165>

Author contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

The article was submitted 30.12.2021;
accepted for publication 02.02.2022;
published 28.02.2022

НЕКРОЛОГИ

Памяти Рахима Мусаевича Хаитова (6 января 1944 года – 11 марта 2022 года)



Отечественная наука понесла тяжелую потерю. 11 марта 2022 г. скончался Рахим Мусаевич Хаитов — академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки Российской Федерации, научный руководитель ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, главный аллерголог-иммунолог Минздрава России, член бюро Отделения физиологии и фундаментальной медицины РАН, заведующий кафедрой клинической аллергологии и иммунологии МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России.

Р.М. Хаитов родился в 1944 г. в Самарканде. В 1967 г. он с отличием окончил Самаркандский медицинский институт, в стенах которого начал научную деятельность, ещё будучи студентом III курса. В 1968 г. он защитил кандидатскую диссертацию, в 1972 г. — докторскую, которую подготовил в Москве, в Институте биофизики Минздрава СССР. В 1974 г. в отделе иммунологии Института биофизики Р.М. Хаитов организовал и возглавил лабораторию генетического контроля иммунного ответа.

Р.М. Хаитов стоял у истоков создания первого в нашей стране Института иммунологии Минздрава СССР. Он перешел в этот институт вместе с коллективом руководимой им лаборатории. В 1983 г. Р.М. Хаитов был назначен заместителем директора Института иммунологии по научной работе, в 1988 г. стал директором Института иммунологии, который возглавлял до 2014 г. С 2014 г. Р.М. Хаитов был научным руководителем Института иммунологии.

В 1980 г. Р.М. Хаитову было присвоено звание профессора. В 1991 г. он был избран членом-корреспондентом РАМН, в 1997 г. — действительным членом РАМН, в 2006 г. — действительным членом РАН.

Р.М. Хаитов — ведущий специалист в области фундаментальной и клинической иммунологии и аллергологии. Работы академика Р.М. Хаитова оказали значительное влияние на развитие отечественной и мировой науки, он во многом способствовал становлению современной иммунологии в наиболее важных её областях — фундаментальной, прикладной и общеобразовательной. Он внёс значительный вклад в развитие фундаментальных и прикладных аспектов иммунологии, аллергологии, вакцинологии, иммуногенетики, биотехнологии. Р.М. Хаитов является автором и соавтором более 1000 научных работ, в том числе более 70 монографий, руководств и учебников по иммунологии, более 50 авторских свидетельств, российских и международных патентов. Им разработаны новые методы диагностики, профилактики и лечения аллергий, опухолевых и инфекционных заболеваний, включая ВИЧ-инфекцию/СПИД, гепатиты, грипп, COVID-19 и др.

Труды Р.М. Хаитова внесли огромный вклад в развитие фундаментальных представлений об иммунной системе, в том числе о механизмах миграции и регуляции дифференцировки кровяных стволовых клеток, в них описаны механизмы регуляции со стороны тимуса и гипофиз-адренальной системы (1990–2000 гг.). Открыты неизвестные ранее медиаторы костного мозга. Р.М. Хаитовым были обнаружены и изучены субпопуляции клеток иммунной системы (2000–2010 гг.). На протеомном и молекулярно-генетическом уровнях исследована часть генома человека, осуществляющая регуляцию иммунного ответа (2010–2019 гг.). С разработкой этой проблемы связаны перспективы генодиагностики и персонализированной медицины, лечения онкологических, аутоиммунных, инфекционных и аллергических заболеваний.

Логичным продолжением фундаментальных исследований академика Р.М. Хаитова стало создание новых принципов конструирования вакцинирующих препаратов с повышенными защитными свойствами — вакцин нового поколения. Эти препараты (вакцины против гриппа, брюшного тифа, дизентерии) созданы, производятся и широко ис-

пользуются в клинической практике в России и за рубежом. Подготовлены к производству принципиально новые препараты для лечения аллергий — вакцины против аллергических заболеваний (2010–2019 гг.). Для терапии нарушений иммунитета Р.М. Хаитовым и его сотрудниками созданы новые эффективные лекарства (полиоксидоний, тактивин, миелопид, иммуномакс и др.), широко используемые в практической медицине. В последние годы Р.М. Хаитов активно разрабатывал средства профилактики и лечения COVID-19.

Р.М. Хаитов вместе со своими учениками создал широкий спектр средств и изделий для диагностики инфекций, аллергий, иммунозависимых патологий, оценки и мониторинга иммунологического, аллергологического и иммуногенетического статуса людей, в том числе занятых на производстве с опасными условиями труда. Были разработаны методы типирования генов иммунного ответа и оценки их функций. Созданы высокотехнологичные отечественные наборы реагентов и оборудование, позволяющее широко внедрять эти достижения в здравоохранение. В настоящее время эти реагенты и приборы применяются практически во всех субъектах Российской Федерации и за рубежом.

Под руководством Р.М. Хаитова проведены работы по оценке иммунного и аллергологического статуса больших контингентов взрослого и детского населения России и влияния на него неблагоприятных факторов физической, химической и биологической природы, создана иммунологическая карта страны. Были решены проблемы обеспечения иммунобезопасности работников вредных производств, предприятий по уничтожению ядерного и химического оружия, ракетного топлива, населения, проживающего вблизи таких объектов, зон экологического бедствия, ликвидаторов аварии на Чернобыльской АЭС и др.

Научная и научно-организаторская деятельность Р.М. Хаитова внесла важный вклад в становление и развитие иммунологической службы страны.

Р.М. Хаитов активно участвовал в создании первого в России Института иммунологии, который он возглавлял в течение 30 лет, он до последнего времени был его научным руководителем. Р.М. Хаитов долгие годы был главным аллергологом-иммунологом Минздрава России. По инициативе Р.М. Хаитова на территории России была создана сеть лабораторий и центров клинической иммунологии, в Номенклатуру врачебных и провизорских специальностей введена специальность «аллергология и иммунология».

С целью объединения в единое сообщество ученых и врачей — аллергологов и иммунологов в 1994 г. Р.М. Хаитов создал Российскую ассоциацию аллергологов и клинических иммунологов, президентом которой он был до настоящего време-

ни. Р.М. Хаитов представлял нашу страну в Совете национальных обществ Европейской академии аллергологии и клинической иммунологии (ЕААСИ) и Всемирной аллергологической организации (WAO).

Р.М. Хаитов вел большую научно-организационную работу. Он был членом рабочей группы по развитию спортивной медицины Совета при Президенте Российской Федерации по развитию физической культуры и спорта, членом Секции № 7 «Медицина и здравоохранение» Межведомственного совета по присуждению премий Правительства Российской Федерации в области науки и техники и членом этого Межведомственного совета. Р.М. Хаитов был председателем Экспертного совета РАН по иммунологии Отделения физиологических наук РАН и членом Экспертного совета РАН, членом секции № 1 КНТС Роскосмоса «Космическая биология и физиология», членом Центральной аттестационной комиссии Минздрава России, членом Научного совета Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные науки — медицине», входил в состав рабочей группы экспертов по вопросам иммунопрофилактики инфекционных болезней Минздрава России, был членом Научного совета Минздрава России, экспертом РАН и Российского научного фонда. Р.М. Хаитов возглавлял диссертационный совет по специальностям «иммунология» и «клиническая иммунология, аллергология». С 1988 по 2021 г. он был главным редактором журнала «Иммунология», с 1997 по 2019 г. — журнала «Физиология и патология иммунной системы. Иммунофармакогеномика». Р.М. Хаитов был председателем редакционного совета «Российского аллергологического журнала», членом редколлегий ряда отечественных и международных журналов: «Вестник Академии медицинских наук», «Медицина экстремальных ситуаций», «Аллергология и иммунология», «Иммунопатология, аллергология, инфектология», «Цитокины и воспаление», «Медицинская иммунология», «Инфекция и иммунитет», «Сахарный диабет», «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» и др., членом редколлегий информационных изданий по наукам о жизни Всероссийского института научной и технической информации РАН. Р.М. Хаитов входил в состав редакционных коллегий журналов «AIDS», «Cellular & Molecular Immunology», «Self/Nonself».

Р.М. Хаитов уделял большое внимание вопросам образования и подготовки научных и медицинских кадров. Им создана большая научная школа, под его руководством выполнены и защищены 69 кандидатских диссертаций, 40 его учеников стали докторами наук. С 2005 г. Р.М. Хаитов возглавлял кафедру клинической аллергологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России.

Выполняя обязанности главного аллерголога-иммунолога Минздрава России, Р.М. Хаитов значительное внимание уделял совершенствованию аллергологической и иммунологической службы. По его инициативе специальность «аллергология и иммунология» была введена в номенклатуру врачебных и провизорских специальностей РФ, в различных регионах страны были созданы лаборатории и центры клинической иммунологии по оценке иммунного статуса населения, профилактике и борьбе со СПИДом. Важной частью организационной работы Р.М. Хаитова была постоянная забота об улучшении условий труда врачей — аллергологов-иммунологов, а также о повышении качества специализированной медицинской помощи населению.

Научные достижения и активная научно-организационная деятельность Р.М. Хаитова были отмечены премиями и правительственными наградами. В 1973 г. ему была присуждена премия Ленинского комсомола в области науки и техники, в 1979 г. — премия им. А.А. Богомольца, в 1995 г. — премия РАН им. И.И. Мечникова. В 2001 г. Р.М. Хаитову была присуждена Государственная премия РФ в области науки и техники за работу «Конъюги-

рованные полимер-субъединичные иммуногены и вакцины», в 1996 г. — премия Правительства РФ в области науки и техники «За разработку, внедрение в промышленное производство и клиническую практику нового типа иммунокорректирующих лекарственных препаратов пептидной природы: тактивина и миелопида», в 2004 г. — премия Правительства РФ в области науки и техники за учебник «Иммунология», в 2012 г. — Государственная премия в области науки и технологий «За выдающиеся достижения в научном и практическом развитии отечественной иммунологии». Р.М. Хаитов награжден почетной грамотой Президента Российской Федерации (2015 г.).

Академик РАН Р.М. Хаитов награжден орденом Трудового Красного Знамени, орденами Почета, «За заслуги перед Отечеством» III и IV степени, а также рядом отраслевых и зарубежных наград.

Глубокую скорбь по поводу кончины Р.М. Хаитова выразили российские и зарубежные научные коллективы и представители образовательных учреждений и профессиональных ассоциаций. Светлая память о Рахиме Мусаевиче Хаитове сохранится в сердцах его коллег, учеников, близких людей.

*Коллеги, редакционная коллегия и редакция
«Журнала микробиологии,
эпидемиологии и иммунобиологии*