ISSN Print 2070–7320
ISSN Online 2070–7339

ВЕСТНИК РГМУ

05 / 2017 СЕНТЯБРЬ-ОКТЯБРЬ
VESTNIKRGMU.RU

ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ПАМЯТЬ ОБЗОР

СТАТЬЯ **Противотуберкулезная вакцина** 29

Первые данные клинических исследований рекомбинантной вакцины «ГамТБВак» на здоровых добровольцах

СТАТЬЯ **Аутоиммунные васкулиты** 74

Влияние высоких доз циклофосфамида на репертуар Т-клеточных рецепторов Т-лимфоцитов периферической крови пациентов

ВЕСТНИК РОССИЙСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО МЕДИЦИНСКОГО УНИВЕРСИТЕТА

НАУЧНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ЖУРНАЛ РНИМУ ИМ. Н. И. ПИРОГОВА

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР Денис Ребриков, д. б. н.

ЗАМЕСТИТЕЛЬ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА Александр Эттингер, д. м. н.

РЕДАКТОРЫ Елена Куликова, Лилия Егорова

КОРРЕКТОР Ольга Комар

ПЕРЕВОДЧИКИ Екатерина Третьякова, Вячеслав Витюк

РУКОВОДИТЕЛЬ РЕДАКЦИИ Елена Куликова

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

М. Р. Богомильский, член-корр. РАН, д. м. н, профессор. (Москва, Россия)
В. В. Белоусов, д. б. н., профессор (Москва, Росия)
В. К. Боженко, д. м. н., к. б. н., профессор (Москва, Россия)
Н. А. Былова, к. м. н., доцент (Москва, Россия)
Р. Р. Гайнетдинов, к. м. н. (Санкт-Петербург, Россия)
Е. К. Гинтер, академик РАН, д. б. н. (Москва, Россия)
А. В. Гудков, PhD, DSc (Буффало, США)
Н. В. Гуляева, д. б. н., профессор (Москва, Россия)
Е. И. Гусев, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
В. Н. Даниленко, д. б. н., профессор (Москва, Россия)
И. И. Затевахин, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
А. А. Иванов, к. м. н. (Москва, Россия)
Ю. Г. Кжышковска, д. б. н., профессор (Гейдельберг, Германия)
Ю. В. Котелевцев, к. х. н. (Москва, Россия)
М. А. Лебедев, PhD (Дарем, США)
С. А. Мошковский, д. б. н., профессор (Москва, Россия)
Д. Б. Мунблит, MSc, PhD (Лондон, Великобритания)
В. В. Негребецкий, д. х. н, профессор (Москва, Россия)
А. А. Новиков, д. б. н. (Москва, Россия)
Н. В. Полунина, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Г. В. Порядин, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Г. М. Савельева, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
В. Ф. Семиглазов, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)
Т. А. Славянская, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
В. И. Стародубов, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
В. А. Степанов, член-корр. РАН, д. б. н., профессор (Томск, Россия)
С. В. Сучков, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Х. П. Тахчиди, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Г. Е. Труфанов, д. м. н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)
О. О. Фаворова, д. б. н., профессор (Москва, Россия)
М. Л. Филипенко, к. б. н., в. н. с. (Новосибирск, Россия)
Р. Н. Хазипов, д. м. н. (Марсель, Франция)
Н. Л. Шимановский, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Л. Н. Шишкина, д. б. н., с. н. с. (Новосибирск, Россия)
Р. И. Якубовская, д. б. н., профессор (Москва, Россия)

ДЛЯ ПОДАЧИ РУКОПИСЕЙ editor@vestnikrgmu.ru
ДЛЯ СОТРУДНИЧЕСТВА manager@vestnikrgmu.ru
АДРЕС РЕДАКЦИИ ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997

Журнал включён в РИНЦ. IF 2014: 0,139

Журнал включён в Перечень 27.01.2016 (№ 1760)

Индекс Хирша (h^5) журнала по оценке Google Scholar: 3

Здесь находится открытый архив журнала

Свидетельство о регистрации средства массовой информации № 012769 от 29 июля 1994 г.
Учредитель и издатель — Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова (Москва, Россия)

Журнал распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International www.creativecommons.org

Подписано в печать 31.10.2017
Тираж 100 экз. Отпечатано в типографии Print.Formula
www.print-formula.ru

BULLETIN OF RUSSIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY

BIOMEDICAL JOURNAL OF PIROGOV RUSSIAN NATIONAL RESEARCH MEDICAL UNIVERSITY

EDITOR-IN-CHIEF Denis Rebrikov, DSc

DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF Alexander Oettinger, DSc

EDITORS Elena Kulikova, Liliya Egorova

PROOF-READER Olga Komar

TRANSLATORS Ekaterina Tretiyakova, Vyacheslav Vityuk

EDITORIAL MANAGER Elena Kulikova

EDITORIAL BOARD

Bogomilskiy MR, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Belousov VV, DSc, professor (Moscow, Russia)
Bozhenko VK, DSc, CSc, professor (Moscow, Russia)
Bylova NA, CSc, docent (Moscow, Russia)
Gainetdinov RR, CSc (Saint-Petersburg, Russia)
Ginter EK, member of RAS, DSc (Moscow, Russia)
Gudkov AV, PhD, DSc (Buffalo, USA)
Gulyaeva NV, DSc, professor (Moscow, Russia)
Gusev EI, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Danilenko VN, DSc, professor (Moscow, Russia)
Zatevakhin II, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Ivanov AA, CSc (Moscow, Russia)
Kzyshkowska YuG, DSc, professor (Heidelberg, Germany)
Kotelevtsev YuV, CSc (Moscow, Russia)
Lebedev MA, PhD (Darem, USA)
Moshkovskii SA, DSc, professor (Moscow, Russia)
Munblit DB, MSc, PhD (London, Great Britain)
Negrebetsky VV, DSc, professor (Moscow, Russia)
Novikov AA, DSc (Moscow, Russia)
Polunina NV, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Poryadin GV, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Savelieva GM, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Semiglazov VF, corr. member of RAS, DSc, professor (Saint-Petersburg, Russia)
Slavyanskaya TA, DSc, professor (Moscow, Russia)
Starodubov VI, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Stepanov VA, corr. member of RAS, DSc, professor (Tomsk, Russia)
Takhchidi KhP, corr.member of RAS, DSc (medicine), professor (Moscow, Russia)
Suchkov SV, DSc, professor (Moscow, Russia)
Trufanov GE, DSc, professor (Saint-Petersburg, Russia)
Favorova OO, DSc, professor (Moscow, Russia)
Filipenko ML, CSc, leading researcher (Novosibirsk, Russia)
Khazipov RN, DSc (Marsel, France)
Shimanovskii NL, corr. member of RAS, Dsc, professor (Moscow, Russia)
Shishkina LN, DSc, senior researcher (Novosibirsk, Russia)
Yakubovskaya RI, DSc, professor (Moscow, Russia)

FOR PAPERS SUBMISSION editor@vestnikrgmu.ru
FOR COLLABORATION manager@vestnikrgmu.ru
ADDRESS ul. Ostrovityanova, d. 1, Moscow, Russia, 117997

The journal is included in RSCI. IF 2014: 0,139

The journal is included in the list of HAC 27.01.2016 (no. 1760)

Five-year h-index is 3

Free access archive of the journal is here

The mass media registration certificate no. 012769 issued on July 29, 1994
Founder and publisher is Pirogov Russian National Research Medical University (Moscow, Russia)

The journal is distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License www.creativecommons.org

Approved for print 31.10.2017
Circulation: 100 copies. Printed by Print.Formula
www.print-formula.ru

ВЕСТНИК РГМУ 5, 2017
BULLETIN OF RSMU

Содержание
Contents

ОБЗОР 5

Иммунологическая память как основа рациональной вакцинопрофилактики населения. Обоснование создания системы сероэпидемиологического мониторинга в России
В. А. Гущин, В. А. Мануйлов, Е. П. Мазунина, Д. А. Клейменов, Т. А. Семененко, А. Л. Гинцбург, А. П. Ткачук

Immunological memory of the population as a basis for a wise vaccination strategy. A rationale for introducing a comprehensive seroepidemiological surveillance system in Russia
Gushchin VA, Manuilov VA, Mazunina EP, Kleymenov DA, Semenenko TA, Gintsburg AL, Tkachuk AP

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ 29

Иммунологическая память, формируемая в ответ на вакцинацию противотуберкулезной рекомбинантной вакциной «ГамТБвак»: клинические исследования вакцины на здоровых добровольцах
Д. А. Клейменов, Е. П. Мазунина, В. Г. Лунин, Е. Ю. Коптев, В. А. Мануйлов, В. А. Гущин, А. П. Ткачук

Immunological memory formed in response to administration of GamTBvac recombinant tuberculosis vaccine candidate: clinical trials in healthy volunteers
Kleymenov DA, Mazunina EP, Lunin VG, Koptev EYu, Manuilov VA, Gushchin VA, Tkachuk AP

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ 38

Адаптивный иммунитет и генетические аспекты прогрессирования туберкулезной инфекции у детей
М. А. Плеханова

Adaptive immunity and genetic aspects of tuberculosis in children
Plekhanova MA

МЕТОД 45

Протокол разработки скрининговой тест-системы для оценки иммунологической памяти к вакциноуправляемым инфекциям: одновременное определение титра антител к кори, паротиту, краснухе и гепатиту В
Е. П. Мазунина, Д. А. Клейменов, В. А. Мануйлов, В. А. Гущин, А. П. Ткачук

A protocol of development of a screening assay for evaluating immunological memory to vaccine-preventable infections: simultaneous detection of antibodies to measles, mumps, rubella and hepatitis B
Mazunina EP , Kleymenov DA, Manuilov VA, Gushchin VA, Tkachuk AP

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ 58

Оценка фактической восприимчивости отдельных групп декретированного населения к вирусам кори, краснухи и эпидемического паротита
А. В. Ноздрачева, А. А. Грицик, С. Н. Кузин, Т. А. Семененко

Estimating the actual susceptibility of decreed population to measles, rubella and mumps
Nozdracheva AV, Gritsik AA, Kuzin SN, Semenenko TA

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ 63

Роль иммунологической памяти в формировании противоопухолевого иммунитета у больных раком яичников на этапе неоадъювантного лечения
Е. Ю. Златник, Г. А. Неродо, А. Ю. Арджа, О. Н. Селютина, Е. С. Бондаренко

The role of immunological memory in establishing antitumor immunity in patients with ovarian cancer undergoing neoadjuvant therapy
Zlatnik EYu, Nerodo GA, Ardzha AYu, Seliutina ON, Bondarenko ES

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ 74

Исследование долгосрочного эффекта высоких доз циклофосфамида на репертуар Т-клеточных рецепторов Т-лимфоцитов периферической крови у пациентов с аутоиммунными васкулитами
Е. М. Мерзляк, С. А. Касацкая, А. В Сосновская, М. А. Израельсон, Д. Б. Староверов, Т. О. Наконечная, П. И. Новиков, Д. М. Чудаков, О. В. Британова

Long-term effect of high cyclophosphamide doses on the repertoire of T-cell receptors of peripheral blood T-lymphocytes in patients with autoimmune vasculitis
Merzlyak EM, Kasatskaya SA, Sosnovskaya AV, Israelson MA, Staroverov DB, Nakonechnaya TO, Novikov PI, Chudakov DM, Britanova OV

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ 81

Оценка числа ВИЧ-специфичных Т-лимфоцитов у здоровых доноров по данным высокопроизводительного секвенирования репертуаров Т-клеточных рецепторов
А. В. Елисеев, А. Д. Федорова, М. Ю. Лебедин, Д. М. Чудаков, М. А. Шугай

Estimating the number of HIV-specific T-cells in healthy donors using high-throughput sequencing profiles of T-cell receptor repertoires
Eliseev AV, Fedorova AD, Lebedin MY, Chudakov DM, Shugay M

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ 88

Клинические особенности болевых симптомов при предменструальном синдроме
Ю. Э. Доброхотова, В. Г. Фрипту, И. И. Гришин, Л. В.Сапрыкина, И. А. Мазур

Clinical characteristics of premenstrual pains
Dobrokhotova YuE, Friptu VG, Grishin II, Saprykina LV, Mazur IA

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ 94

Современные аспекты мультимодальной диагностики идиопатической эпиретинальной мембраны
Х. П. Тахчиди, Г. Ф. Качалина, Т. А. Касмынина, Е. П. Тебина

Modern aspects of multimodality approach to the diagnosis of idiopathic epiretinal membrane
Takhchidi KhP, Kachalina GF, Kasmynina TA, Tebina EP

ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ПАМЯТЬ КАК ОСНОВА РАЦИОНАЛЬНОЙ ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКИ НАСЕЛЕНИЯ. ОБОСНОВАНИЕ СОЗДАНИЯ СИСТЕМЫ СЕРОЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА В РОССИИ

В. А. Гущин[1,2] ✉, В. А. Мануйлов[1,3], Е. П. Мазунина[1], Д. А. Клейменов[1], Т. А. Семененко[4], А. Л. Гинцбург[5], А. П. Ткачук[1]

[1] Лаборатория трансляционной биомедицины,
Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи, Москва

[2] Кафедра вирусологии, биологический факультет,
Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва

[3] Институт молекулярной медицины,
Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова (Сеченовский университет), Москва

[4] Отдел эпидемиологии,
Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи, Москва

[5] Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи, Москва

Иммунологическая память — одна из ключевых функций адаптивного иммунитета, позволяющая организму противостоять инфекциям, предотвращать развитие онкологических и аутоиммунных заболеваний. Важнейшее свойство иммунологической памяти — это способность с помощью предсуществующих антиген-специфичных клонов B- и T-клеток быстро и эффективно реагировать на патоген, с которым у организма был контакт в прошлом. Наличие долгоживущих популяций клеток, надежно распознающих инфекционные агенты, позволяет использовать вакцинацию в качестве главного элемента превентивной медицины. На уровне сообщества людей иммунологическая память отдельных индивидуумов определяет феномен популяционного (коллективного) иммунитета, который чрезвычайно важен для обеспечения биобезопасности в масштабе государства. В обзоре описаны актуальные исследования популяционного иммунитета в контексте вакцинопрофилактики. Рассматриваются принципы организации серологических исследований, опыт серологического мониторинга в различных странах, существующие и перспективные аналитические подходы к изучению иммунологической памяти. Обсуждаются недостатки принятых в России способов оценки популяционного иммунитета и предлагается к реализации система сероэпидемиологического мониторинга.

Ключевые слова: иммунологическая память, популяционный иммунитет, гуморальный иммунитет, инфекционный агент, патоген, вакцина, вакцинопрофилактика, календарь прививок, отказ от вакцинации, мониторинг

Финансирование: статья подготовлена при поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках проекта RFMEFI60117X0018.

✉ **Для корреспонденции:** Гущин Владимир Алексеевич
ул. Гамалеи, д. 18, г. Москва, 123098; wowaniada@gmail.com

Статья получена: 24.09.2017 **Статья принята к печати:** 10.10.2017

IMMUNOLOGICAL MEMORY AS A BASIS FOR A WISE VACCINATION STRATEGY. A RATIONALE FOR INTRODUCING A COMPREHENSIVE SEROEPIDEMIOLOGICAL SURVEILLANCE SYSTEM IN RUSSIA

Gushchin VA[1,2] ✉, Manuilov VA[1,3], Mazunina EP[1], Kleymenov DA[1], Semenenko TA[4], Gintsburg AL[5], Tkachuk AP[1]

[1] Laboratory of Translational Biomedicine,
N. F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

[2] Department of Virology, Faculty of Biology,
Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

[3] Institute of Molecular Medicine,
I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

[4] Department of Epidemiology,
N. F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

[5] N. F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Immunological memory is one of the key features of the adaptive immunity. It confers the ability to resist infection and prevents development of cancer or autoimmune diseases. Most importantly, immunological memory mediated by preexisting antigen-specific clones of T- and B-cells ensures a rapid and effective response to an invasion by a previously encountered pathogen. Since vaccination induces a specific long-lived response to infectious agents, it becomes a basis for preventive medicine. In a human population, immunological memory of individuals shapes the so-called herd or community immunity crucial for national health. The present review touches upon significant population-wide research studies of immunological memory with regard to immunization. We discuss the principles of serological testing and the outcomes of serological monitoring conducted in different countries, and talk about standard and innovative analytical approaches to studying immunological memory. We also pinpoint the drawbacks of methods used for herd immunity assessment in Russia and propose a comprehensive system for seroepidemiological surveillance.

Keywords: immunological memory, herd immunity, humoral immunity, infectious agent, pathogen, vaccine, immunization, immunization schedule, vaccine hesistancy, surveillance

Funding: this paper was prepared with support of the Russian Ministry of Education and Science, project no. RFMEFI60117X0018.

✉ **Correspondence should be addressed:** Vladimir Gushchin
ul. Gamalei, d. 18, Moscow, Russia, 123098; wowaniada@gmail.com

Received: 24.09.2017 **Accepted:** 10.10.2017

Вакцинация является главным экономически оправданным средством борьбы с инфекционными заболеваниями, дающим прямую защиту от патогенов, обеспечивая долговременную иммунологическую память [1]. Несмотря на значительный прогресс в области вакцинопрофилактики, существует ряд препятствий для разработки новых или улучшенных вакцин, а также рационального использования ранее созданных препаратов: это, с одной стороны, нехватка новых фундаментальных знаний по иммунологии, а с другой — бюрократические, экономические и социально-политические барьеры. Так, в настоящий момент почти 20 млн детей не имеют доступа к уже разработанным вакцинам из типового календаря вакцинации (рисунок), в результате чего несколько миллионов людей умирают ежегодно [1]. Еще больше людей умирает от инфекций, против которых нет вакцин (ВИЧ, малярия) [2] или вакцинация дает лишь частичную защиту (туберкулез) [3].

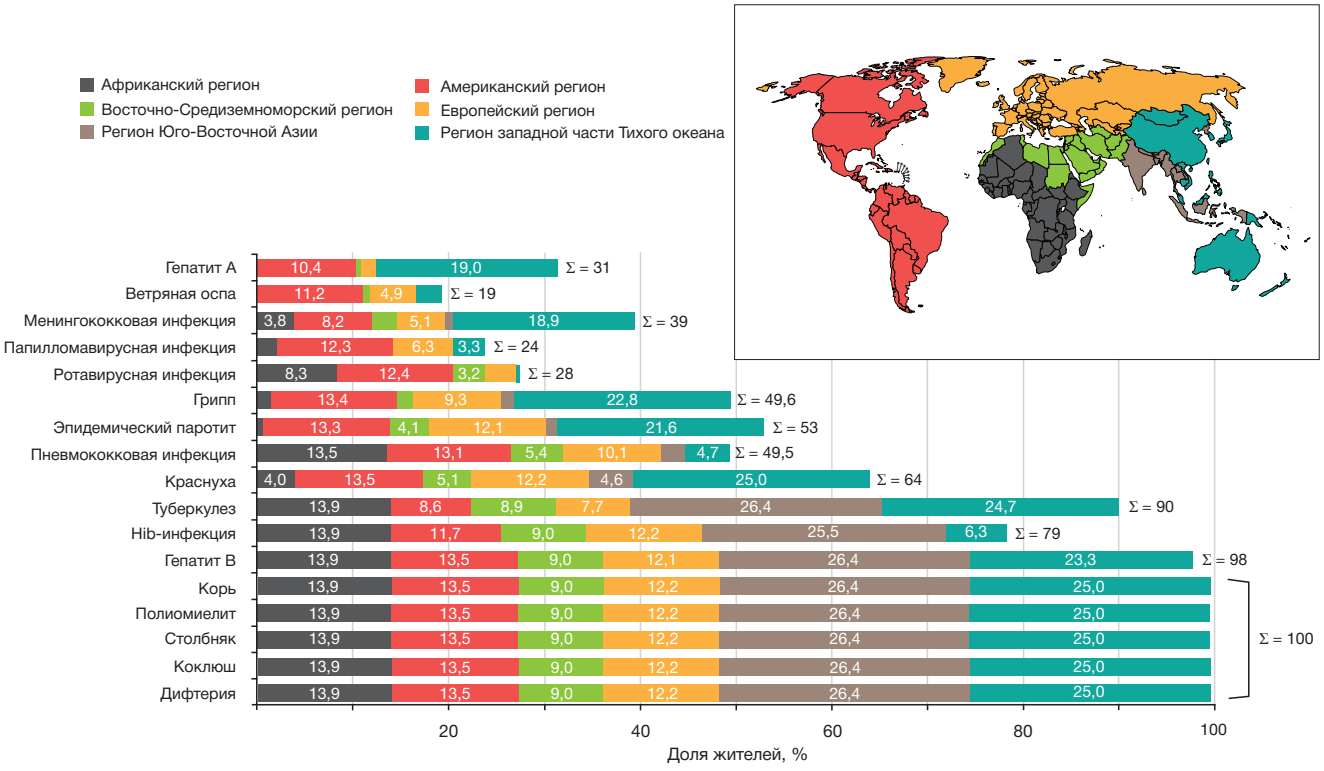
Задачей вакцинопрофилактики до 1970-х гг. было внедрение единичных вакцин против опасных заболеваний с обеспечением максимального охвата населения всех возрастных групп. Несомненными успехами прививочной работы того периода можно считать полную элиминацию оспы во всем мире, а также (частично) кори, полиомиелита, дифтерии, столбняка и туберкулеза (в отдельных регионах и развитых странах Европы и Северной Америки). Современная вакцинопрофилактика — это прежде всего сложная система календарей вакцинации детей, подростков и взрослых против множества возбудителей, некоторые из которых включают десятки серотипов.

Календарь прививок позволяет реализовать потенциал используемых вакцин и правильно рассчитать потребность в них для различных групп населения. Список используемых вакцин постоянно расширяется, что делает управление таким календарем очень сложным. Между тем, корректировка календаря прививок невозможна без мониторинга эффективности текущих программ вакцинации и глубокого понимания структуры популяционного (коллективного) иммунитета [5].

Популяционный иммунитет — это известный феномен, который проявляется в защите иммунологически восприимчивых индивидуумов, находящихся в обществе людей, обладающих иммунологической памятью против определенной инфекции (вакцинированных или перенесших заболевание). Пороговый уровень, необходимый для обеспечения коллективного иммунитета, зависит от количества индивидуальных контактов и вероятности передачи инфекции, определяемой природой патогена. Так, известно, что при равномерном распределении иммунизированных в обществе их доля в 82–87 % необходима для защиты от распространения дифтерии, полиомиелита и краснухи, 85–90 % — от эпидемического паротита и 92–95 % — от кори и коклюша [6].

Стоит отметить, что достижение абсолютного иммунитета против какой-либо инфекции невозможно в принципе, поскольку не у всех здоровых людей после введения вакцины формируется устойчивый иммунитет [7]. Феномен избирательности формирования иммунологической памяти в зависимости от генотипа пациента и других условий пока мало изучен [8]. Незащищенными от инфекций являются также люди с иммунодефицитами, ВИЧ-инфекцией, онкологическими заболеваниями [9]; младенцы, для которых применение вакцинации может быть неэффективно или небезопасно [10]; пожилые люди, иммунитет которых ослабевает [11]. Кроме того, даже проверенные вакцины от партии к партии или в зависимости от сезона различаются по эффективности [10, 12]. Таким образом, поддержание высокой доли истинно иммунизированных людей среди населения чрезвычайно важно для защиты как популяции в целом, так и ее незащищенных групп.

Важно, что феномен коллективного иммунитета наблюдается только при условии равномерного распределения иммунизированных лиц в популяции [5]. Известно, что



Доля жителей стран-членов Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), в которых предусмотрена иммунопрофилактика основных вакциноуправляемых инфекций в национальном календаре прививок, от числа всех жителей стран-членов ВОЗ (данные ВОЗ, [4])

группы людей, отказывающихся от вакцинации, например по религиозным соображениям, часто проживают компактно, что сильно снижает уровень коллективного иммунитета в этих регионах. Это было подтверждено, в частности, при обследовании населения районов проживания представителей менонитской церкви в США, коренных народов США и Канады, религиозных общин в Нидерландах [6, 13]. Отказы от прививок по таким причинам все чаще фиксируются и в мире, и в России, что вызвало широкую общественную [14, 15] и научную дискуссию [16–20]. Определение ландшафта защищенности в современном обществе, позволяющего выявлять контингент восприимчивых к инфекциям людей, требует проведения направленных серологических исследований.

Серологические исследования являются важным инструментом для мониторинга инфекционных процессов, выявления групп риска и прогнозирования новых угроз и предоставляют информацию, которая часто отсутствует в данных эпидемиологического надзора и данных по охвату иммунизацией [20]. Современный серомониторинг основывается на оценке качества и количества специфических антител в сыворотке крови, являющихся, с одной стороны, маркером вакцинации или перенесенного заболевания, а с другой — определяющих защиту от инфекции [21]. Наличие в крови антител в результате перенесенного заболевания позволяет использовать серомониторинг для выявления не только клинических, но и субклинических случаев инфекции, которые в ином случае остались бы незамеченными. Так, было показано наличие антител к коклюшному токсину у 20 % детей раннего возраста, не вакцинированных и не имевших в истории болезни упоминания о коклюше [22]. Централизованная система серомониторинга популяционного иммунитета должна быть частью любой широкомасштабной кампании по вакцинации.

Общие принципы организации системы серологического мониторинга

Целью существования общегосударственной системы мониторинга [23, 24] является получение достоверной информации, достаточной для определения уровня популяционного иммунитета, эффективности существующих программ вакцинации, необходимости корректировки календаря прививок, а также объемов закупаемых вакцин. Поэтому к первоочередным задачам системы относятся:

1. определение реальной доли населения, имеющей протективный уровень антител к возбудителям, циркулирующим на эндемичных территориях, в том числе относящимся к инфекциям, управляемым средствами специфической профилактики, с возможностью стратификации;

2. определение эффективности проводимых программ вакцинации в региональном, социально-экономическом и возрастном разрезе на основе сопоставления данных по охвату прививками с реальной иммунной прослойкой в группе;

3. уточнение истинных значений популяционного иммунитета для данной группы или территории (доля иммунизированных людей в группе, достаточная для защиты группы от эпидемического распространения инфекции).

Основными критериями эффективности полноценной системы мониторинга является количество и качество получаемой информации, что обеспечивается приверженностью следующим принципам [25, 26]:

— *принцип глобальности*: мониторинг той части населения или объектов окружающей среды, которая безусловно необходима для валидного определения распространенности маркеров инфекции статистическими методами (зависит от вида возбудителя, его региональной эндемичности, путей и факторов риска передачи);

— *принцип релевантности*: репрезентативность исследуемых групп и объектов, обеспечение проведения исследований в соответствии с принципами современной эпидемиологии;

— *принцип непрерывности*: непрерывность исследований, т. е. возможность воспроизвести их в течение ряда лет;

— *принцип однородности* данных: однородность предоставляемых результатов по различным инфекциям и исследуемым группам, т. е. возможность их совокупного анализа в рамках единой эпидемиологической картины и временной динамики.

Для запуска такой системы мониторинга специалисты должны обладать полномочиями и возможностями для сбора, паспортизации и архивации образцов, необходимой лабораторной базой и собственным центром обработки данных. Необходимость ее формирования в рамках существующей организационной структуры учреждений здравоохранения или наряду с ней прямо обозначена в планах Правительства РФ [23] и следует из оценки актуального состояния дел в области вакцинации.

Существующие способы оценки популяционного иммунитета в России

В настоящее время в России не проводятся широкомасштабные исследования встречаемости маркеров иммунитета к вакциноуправляемым инфекциям, результаты которых можно было бы распространить на все население страны с необходимой степенью достоверности. Эффективность проводимых программ вакцинации косвенно оценивается тремя способами:

— анализ показателей охвата прививками (документальной прививаемости),

— анализ заболеваемости,

— локальные сероэпидемиологические исследования.

Рассмотрим их особенности по отдельности.

Охват прививками

Каждая организация, прививающая пациентов, заполняет две формы государственной статистической отчетности [27, 28]: форма № 5 включает данные о количестве поставленных прививок (абсолютном количестве израсходованных доз вакцины); форма № 6 — данные не только о количестве прививок, но и о списочной численности контингентов населения, подлежащего иммунизации до достижения того или иного (т. н. «декретированного») возраста в соответствии с Национальным календарем прививок [29, 30] в отчетном периоде. На основе этих данных рассчитываются следующие показатели: *охват прививками* — доля детей, попадающих по критерию возраста в декретированную группу населения, и получивших хотя бы одну прививку из курса вакцинации; *привитость* — доля пациентов во всех возрастных контингентах, получивших полный предусмотренный курс прививок; *своевременность* — доля детей, получивших необходимые прививки вовремя, т. е. до достижения определенного возраста (подробнее см. [31]). Эта отчетность собирается Роспотребнадзором [32, 33], а данные по охвату прививками включаются в ежегодный публичный Государственный доклад [34].

Несомненно, при таком подходе учитывается каждый человек в стране, получивший прививку. Однако не учитываются люди, вакцину не получившие. Во-первых, для того чтобы рассчитать долю привитых людей, нужно знать точную численность населения в той или иной группе, но лечебно-профилактические учреждения (ЛПУ) вынуждены пользоваться так называемой переписной численностью населения [33] — данными о том, сколько людей состоит на учете в поликлиниках. Вследствие миграционных процессов и того, что не все жители встают на учет, эти данные не отражают реальной численности различных групп населения. Кроме того, в отсутствие единой электронной системы медицинских карт большая часть информации о прививках конкретного человека теряется при его переезде на участок другого ЛПУ. Во-вторых, даже самый аккуратный ежегодный учет доли вакцинированных пациентов не позволяет определить текущее количество людей в стране, когда-либо получивших вакцину вообще. Например, в работе О. В. Цвиркун [35] приводятся данные об охвате детей прививками против кори, начиная с 1968 г. Так, если в конце 1960-х гг. этот показатель составлял 30–50 %, то уже к концу 1980-х гг. он достиг 75 %, а к 2013 г. — 97–98 %. Несмотря на высокие значения показателя охвата прививками, согласно выводу этой же работы [35], основанному на математическом моделировании, к 2014 г. доля восприимчивых к кори людей в России составляла 25,6 %. Среди 74,4 % невосприимчивых людей 50 % приобрели иммунитет после вакцинации, а остальные 24,4 % — вследствие перенесенного заболевания. Эти показатели далеки от формальных критериев элиминации кори [36–39].

Приведем еще один пример в отношении другого вакциноуправляемого заболевания — гепатита В. Федеральная программа вакцинации новорожденных против этой инфекции началась в России в 2001 г. [40, 41]. К сожалению, данные по охвату прививками новорожденных до 2010 г. не опубликованы, но в 2010–2016 гг. значение показателя составляло около 97 % [42]. Сопоставив эту информацию с данными о рождаемости в эти годы (около 2 млн детей в год, [43]), можно предположить, что как минимум 14 млн детей к настоящему времени прошли курс вакцинации против гепатита В (10 % населения страны). Но само по себе высокое значение показателя охвата прививками (97 %) ничего не говорит о том, сколько вообще человек в России на сегодняшний день получили вакцину. Во-первых, неизвестно, сколько людей уже были иммунизированы к 2001 г. (в том числе в результате перенесенного заболевания) и сколько точно новорожденных было вакцинировано в 2001–2009 гг. Во-вторых, согласно крайне фрагментарным данным [44, 45], только в 2006–2008 гг. от 18,5 до 25 млн человек (взрослых, подростков и детей) были дополнительно иммунизированы вне календаря. Как мы видим, этих данных недостаточно, чтобы сказать, сколько в данный момент людей в России получили прививку от гепатита В и/или являются иммунизированными.

Наконец, как уже отмечалось, проведение вакцинации не обязательно означает успешную иммунизацию [7, 10, 12]. Все это говорит о том, что публикуемые показатели документальной привитости не могут рассматриваться в качестве критерия оценки популяционного иммунитета.

Анализ заболеваемости

Заболеваемость — это доля пациентов с впервые зарегистрированным заболеванием за отчетный период, выраженная по отношению к численности населения [46]. Каждый диагноз инфекционного заболевания фиксируется в форме экстренного извещения № 058/У [47, 48] и в форме № 2 государственной статистической отчетности [27]. Эти документы также представляются в Роспотребнадзор [32, 33] для обобщения и публикации данных [34]. Динамика истинной заболеваемости в отношении какой-либо инфекции служит объективным показателем здоровья населения, определяемого помимо иных факторов охватом и эффективностью вакцинации. Однако заболеваемость не позволяет количественно определить параметры популяционного иммунитета по следующим причинам.

Во-первых, статистика регистрирует только первичные манифестные случаи заболевания, выявленные у пациентов, обратившихся к врачу. Из-за этого истинный уровень заболеваемости остается неизвестным. Более того, с точки зрения эпидемиологии когорта людей, регулярно наблюдающихся у врача, может быть совершенно нерелевантной по отношению к остальному населению страны [25].

Во-вторых, случаи заболевания для ряда инфекций должны учитываться на основе лабораторного или иного достоверного подтверждения диагноза, чего не происходит вследствие недостаточной оснащенности региональных ЛПУ поликлинического звена [49]. Характерным примером для России является установление диагноза по гриппу и ОРВИ и, соответственно, показателей заболеваемости для этих инфекций. Например, в 2016 г., согласно официальной статистике, в России заболели гриппом всего 88,5 тыс. человек (0,06 % населения), в то время как ОРВИ невыясненной этиологии — 31,7 млн человек (около 20 % населения) [34]. Похожие уровни заболеваемости фиксировались и ранее [42, 50]. Для сравнения: в США в неэпидемический сезон 2015–2016 гг. гриппом заболели 22–29 млн человек (7–9 % населения) [51], а в Японии ежегодная заболеваемость сезонным гриппом в 2010–2014 гг. составляла 10–16 % от всего населения [52–54]. Явная диспропорция между заболеваемостью гриппом и ОРВИ, характерная для России, объясняется, очевидно, тем, что диагноз «ОРВИ» ставится врачом по симптоматике, а диагноз «грипп» — после подтверждения лабораторными методами [55]. Грипп — вакциноуправляемая инфекция, а вся совокупность ОРВИ — нет, поэтому заниженные данные о заболеваемости гриппом не позволяют определить эффективность проводимых программ иммунизации населения против этого опасного заболевания.

В-третьих, для некоторых инфекций количество вновь регистрируемых случаев заболевания очень слабо коррелирует с распространенностью инфекции вообще. Здесь можно привести в пример гепатит В, который, как известно, клинически проявляется в острой либо хронической форме [56]. Официальная заболеваемость острым гепатитом В в России снизилась со 141 случая на 100 тыс. человек в 1999 г. до 22,7 случая — в 2016 г. Успех обусловлен как программой всеобщей вакцинации новорожденных, так и борьбой с распространением наркотиков [57, 58]. При этом общее количество инфицированных людей в России, определенное прямым скринингом различных групп населения на наличие в сыворотке крови HBsAg, оценивается в 2–4 % населения (3–6 млн носителей вируса), причем значение этого показателя, по-видимому, меняется незначительно [59–62] вследствие эпидемиологических особенностей распространения возбудителя [63]. Для гепатита В динамика регистрации новых случаев заболевания не коррелирует с истинной заболеваемостью в популяции

и служит слабым индикатором коллективного иммунитета к этой инфекции.

С заболеваемостью связан показатель смертности от инфекций, однако в России способ расчета этого параметра, вероятно, приводит к искажению данных. Так, ВОЗ оценивает долю смертей от инфекций в среднем по миру примерно в 25 % (по отношению ко всем причинам смерти), и даже в развитых странах значение показателя составляет около 10 % [2]. В России же, по официальным данным [43], доля таких смертей в 2010–2014 гг. составила всего 1,7–3,1 % [64]. Причина та же, что и в случае регистрации заболеваемости: невозможность достоверно установить этиологию инфекционного заболевания, приведшего к смерти в результате осложнений или сочетанного поражения органов, в то время как многие новообразования (особенно гинекологические), болезни пищеварительной системы и даже сердечно-сосудистые заболевания, приводящие к смерти, имеют инфекционную природу [65]. Это означает, что данные о смертности вследствие инфекций, также не подходят в полной мере для оценки популяционного иммунитета.

Сероэпидемиологические исследования

Формально в России действует государственная система серологического мониторинга к вакциноуправляемым инфекциям в индикаторных группах населения [31, 33, 36] через региональные Центры гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора и профильные научно-исследовательские центры [35, 55]. Однако задачами такого мониторинга являются не изучение коллективного иммунитета к инфекциям, а определение «напряженности иммунитета» [67] у представителей индикаторных групп различных возрастов с документированным вакцинальным статусом [68]. Это важная задача для оценки эффективности вакцинации, но такой мониторинг не позволяет изучать иммунитет всего населения.

Значительную ценность представляют прямые исследования распространенности серологических маркеров разных инфекций (в том числе антител к возбудителям) в различных группах населения, проводимые в рамках собственных исследовательских программ научными учреждениями. Но эти исследования нерегулярны, включают ограниченные группы населения и публикуются в разных источниках, что не позволяет формировать общую картину популяционного иммунитета в России.

Приведем несколько примеров таких исследований в отношении вакциноуправляемых инфекций. В работе [69], выполненной на материале от 300 жителей Ленинградской области, показано, что антитела к вирусу краснухи были обнаружены у 60–78 % из них в зависимости от возрастной группы. Отметим, что в работе исследовали образцы, собранные еще в 1995 г. — до начала федеральной программы вакцинации против краснухи (2000 г.) и до введения обязательной ревакцинации (2002 г.) [41]. В следующей работе, выполненной на материале от 779 человек из Санкт-Петербурга в 2013 г. [70], показано, что доля иммунизированных людей составила 82,1 %, т. е. отмечено слабое влияние вакцинации на жителей региона.

Данные о реальной распространенности антител на протективном уровне к паротиту демонстрируют прямую корреляцию с показателем охвата прививками. Так, по данным сотрудников ГНЦ ВБ «Вектор» (Новосибирск, [71]), всего к 2006 г. было вакцинировано от паротита 90–95 % населения страны. В работе [72] показано, что среди 60 детей, обследованных в это же время в Новосибирске, 97 % имели антитела к вирусу паротита. А в работе [73], выполненной в Москве с включением в исследование 904 человек разного возраста, протективные антитела против паротита были обнаружены в 93 % случаев.

В исследовании, посвященном иммунитету против вируса гепатита В в поствакцинальную эру и выполненном в 2013 г. на материале от 970 жителей Санкт-Петербурга, было показано, что антителами к HBsAg обладает около 55 % населения [74]. При этом результаты аналогичных исследований, проведенных на материале, полученном до начала всеобщих программ вакцинации против гепатита В в России (2001 г., [41]), показывают более низкие значения коллективного иммунитета. Например, в работах [75, 76] было показано, что встречаемость антител к HBsAg у представителей коренных народностей Сибири (выборки составили 194–657 человек, материал был собран в 1993–2002 гг.) составила 19–52 %. Похожие данные, хотя и для другой группы населения, были получены в работе [77]: среди 302 пациентов из Москвы (2011–2013 гг.) частота встречаемости антител к HBsAg составила 20,9 %. С учетом того, что средний возраст пациентов составил 45,5 ± 8,6 года, можно предположить, что среди них преобладали лица, не получавшие вакцину. Сравнение данных трех работ позволило бы утверждать, что программа всеобщей вакцинации против гепатита В имеет заметный эффект, если бы данные не были получены на столь разнородных группах.

Все перечисленные методы изучения уровня защиты населения России от инфекций ни по отдельности, ни в совокупности не обеспечивают получения достоверных данных о популяционном иммунитете и не могут служить в качестве надежных прогностических инструментов. Необходимо создание новой национальной системы прямого сероэпидемиологического мониторинга маркеров иммунитета. Однако перед тем, как высказать свои соображения по этому вопросу, обратимся к мировому опыту.

Зарубежные программы серологического мониторинга и их практические результаты

Для оценки охвата прививками в США и странах ЕС создаются или уже функционируют информационные системы иммунизации, в которых регистрируются все факты введения вакцин людям. В соответствии с критериями Centers for Disease Control Prevention [78] такая система:

— определяется как функционирующая на популяционном уровне компьютеризированная конфиденциальная база данных, учитывающая все вакцины и дозы, введенные уполномоченными организациями и сотрудниками лицам, проживающим в регионе;

— в короткие сроки предоставляет специалистам консолидированную информацию о прививочном анамнезе конкретного пациента;

— агрегирует масштабные данные о вакцинации на уровне популяции для использования в целях эпидемиологического надзора, контроля общественного здоровья, оценки охвата прививками и расчета показателей заболеваемости вакциноуправляемыми инфекциями.

В 2016 г. в Европе такие системы действовали на национальном уровне в 10 странах (Германия, Швеция, Нидерланды, Норвегия и др.), в 5 странах существовало более одной субнациональной системы (Великобритания, Австрия и др.) и еще в 6 странах такие системы были введены в качестве пилотных проектов (Франция, Болгария

и др.) [79]. В Глобальном плане действий в отношении вакцин на 2015–2020 гг. такие системы расцениваются как «неотъемлемая часть хорошо функционирующих систем здравоохранения» [80]. Такие системы повышают качество оценки вакцинации, но не способны оценить истинный уровень популяционного иммунитета, поскольку введение вакцины не обязательно означает успешную иммунизацию человека. По этой и другим причинам (несоответствие документированного количества вакцинаций истинному, несовершенство системы учета вакцинаций и др.) в разных странах выполняются субнациональные и национальные программы исследований популяционного вакциноиндуцированного иммунитета, в рамках которых систематически о населении собирают некоторую информацию (демографические параметры, анамнез жизни, прививочный анамнез и др.) и отбирают биоматериал (чаще всего — кровь). Образцы помещают в хранилища-биобанки [81] и используют для сероэпидемиологических лабораторных исследований. В качестве примеров рассмотрим несколько таких национальных программ.

Одно из наиболее обширных национальных исследований популяционного иммунитета было реализовано в Нидерландах в 2 этапа: в 1995–1996 гг. и в 2006–2007 гг. (эти этапы обозначаются проектами PIENTER 1 и PIENTER 2 соответственно, в настоящее время идет проект PIENTER 3). В ходе первого этапа было собрано 9 948 образцов сывороток крови, которые были протестированы на наличие антител к 7 инфекциям, входившим на тот момент в национальную программу иммунизации: дифтерии, столбняку, полиомиелиту, кори, паротиту, краснухе и гемофильной инфекции типа B [82, 83]. Также определяли серологические маркеры к гепатитам A, B и C (что для двух последних позволило определить хроническое носительство этих вирусов) и токсоплазме [84–86]. Во многом именно результаты, полученные в ходе проекта PIENTER 1, способствовали корректировке национальной программы иммунизации Нидерландов, и в ходе PIENTER 2 в перечень определяемых маркеров были добавлены антитела к возбудителям менингококковой инфекции, папилломавирусной инфекции, ветряной оспы и др. Всего на втором этапе исследовали 6 386 образцов на наличие 19 антител (для некоторых возбудителей определяли несколько видов серологических маркеров) [5, 87]. Отметим, что ход выполнения проектов PIENTER 1 и PIENTER 2 активно освещался исполнителями как в научных журналах, так и в общенациональных средствах массовой информации, что способствовало установлению авторитета Нидерландов в области инфекционного мониторинга на мировом уровне.

В Бельгии в 2006 г. провели национальное исследование распространенности маркеров 5 вакциноуправляемых инфекций (кори, паротита, краснухи, дифтерии и столбняка) на 3 974 образцах, в результате чего были определены возрастные группы населения с низким коллективным иммунитетом и даны рекомендации по проведению дополнительной иммунизации в этих группах [88]. Данные были уточнены и дополнены результатами исследований иммунитета к коклюшу в альтернативном исследовании других бельгийских авторов, выполненном в 2012 г. на 1 500 образцах [89, 20].

В Германии в 2003–2006 гг. были собраны и исследованы на наличие антител к кори, паротиту и краснухе около 13 900 образцов крови (отметим, что изначально образцы были собраны в рамках других программ национального здравоохранения) [90]. Аналогичные проекты в различном виде реализуются и в других странах (Китае, Японии, США, Италии и др.), что говорит об их востребованности. Сводная информация о других примерах реализации национальных программ мониторинга приведена в табл. 1.

Пожалуй, наиболее важным следствием проводимых серологических исследований является возможность их практического применения для уточнения истинных значений коллективного иммунитета в различных социальных группах и регионах, управления календарем вакцинации, определения эффективности программ вакцинации и определения объемов требуемых вакцин, диагностических и лекарственных средств.

Рутинная вакцинация позволяет достигать хорошей напряженности иммунитета, но, как показывает практика, для полного прекращения вспышек заболевания необходимо проведение дополнительных программ по вакцинации среди отдельных возрастных групп или на отдельных территориях. Основной задачей при этом является определение групп риска. Сигналом для проведения вакцинации может являться появление заболевших в отдельных восприимчивых коллективах, но такой индикатор может быть запаздывающим, приводящим к локальным эпидемиям с неприемлемым результатом. Особенно легко потерять контроль над ситуацией в случаях, когда на территории в течение длительного времени не выявляются заболевшие, что далеко не всегда означает достижение защитного действия коллективного иммунитета. Более надежно моделирование эпидемиологических процессов на основе данных серомониторинга [105]. Так, в ответ на вспышку дифтерии в Восточной Европе в конце 1990-х гг. в соседних странах провели серологическое исследование, которое выявило ответ на анатоксин ниже защитного уровня, после чего провели дополнительную вакцинацию среди взрослого населения [106].

Введение программ серологического надзора сыграло важную роль в успешном контроле кори во многих странах, где данные о возрасте восприимчивых к заболеванию индивидуумов повлияло на определение оптимального возраста для вакцинирования. В Великобритании в середине 1990-х гг. сочетание сероэпидемиологических исследований и математического моделирования позволило предсказать вспышку эпидемии кори [107, 108]. Затем была проведена кампания по вакцинации, в ходе которой 92 % детей в возрасте 5–16 лет были вакцинированы. Последующий серомониторинг показал, что, несмотря на успешность проведенной вакцинации в целом, высокая восприимчивость к вирусу кори сохранилась среди детей дошкольного возраста. Это позволило обосновать необходимость включения второй дозы MMR-вакцины (Measles/Mumps/Rubella) в рутинный календарь прививок детей в возрасте 4 лет [109]. Похожая ситуация наблюдалась в Австралии [110, 111]. Приведенные примеры говорят о высокой практической ценности серологического мониторинга для управления уровнем коллективного иммунитета применением вакцин, свойства которых хорошо изучены.

Примеры регулярной и своевременной корректировки национальной программы иммунизации по результатам сероэпидемиологических исследований в Нидерландах свидетельствуют о том, что серомониторинг стал незаменимым аналитическим инструментом [5]. Так, по результатам проекта PIENTER 1 была введена вакцинация против пневмококка, изменен график вакцинации против гепатита B, осуществлена замена одной вакцины другой (Infanrix-IPV + Hib на Pedicacel), а также применена комбинация вакцин, ранее использовавшихся по отдельности (DT-IPV и aP в 4 года) [112]. Все изменения календаря оценивали

в проекте PIENTER 2. На этом этапе были введены вакцины против менингококковой инфекции в 14 месяцев и 19 лет одновременно с MMR, а также вакцина против папилломавирусной инфекции для девочек 12 лет [5]. В случае введения новых вакцин последующее проведение сероэпидемиологического мониторинга позволяет оценить их эффективность и определить продолжительность иммунитета, полученного вакцинацией. Также возможен контроль состава циркулирующих штаммов и серотипов для разработки новых вакцин, в том числе дополненных актуальными штаммами [113–115].

Лабораторные методы изучения популяционного иммунитета

Важнейшую роль в изучении популяционного иммунитета играют скрининговые тест-системы, позволяющие проводить серологические исследования. Согласно [68], для проведения серологического мониторинга применяются следующие лабораторные методы: реакция пассивной гемагглютинации (РПГА) — для выявления антител к вирусу кори, дифтерийному и столбнячному анатоксинам; реакция агглютинации (РА) — для выявления агглютининов коклюшного микроба; иммуноферментный анализ (ИФА) — для выявления антител к вирусам кори, краснухи, эпидемического паротита, гепатита В, а также возбудителю коклюша; реакция нейтрализации цитопатического действия вируса в культуре клеток ткани — для выявления антител к вирусам полиомиелита. На данный момент ИФА — общепринятый и широко применяемый метод качественного и количественного определения антител IgG в сыворотке крови человека. Однако при необходимости одновременного определения иммунного статуса к нескольким инфекциям и при большом числе образцов этот метод требует больших затрат времени, поскольку каждый маркер требует отдельного анализа. Поэтому в широкомасштабных исследованиях эффективности иммунопрофилактики метод ИФА уступает место современному методу мультиплексного иммунного анализа (МИА), главным преимуществом которого является определение концентрации иммуноглобулинов одновременно к нескольким антигенам, при этом для анализа достаточно очень малых объемов сыворотки (около 5 мкл [116]), что важно при обследовании детей. Другим преимуществом мультиплексных тест-систем является их гибкость — возможность расширения панели анализа добавлением новых антигенов, входящих в состав вакцин [117].

Существует несколько коммерческих платформ, позволяющих создавать мультиплексные тест-системы. Они отличаются технологиями определения и пробоподготовки, расходными материалами, однако их объединяет то, что твердой фазой для проведения иммуноферментного анализа являются полистироловые микросферы. К примеру, одна из наиболее известных диагностических платформ — xMAP (Multiple Analyte Profiling). Ее ключевым компонентом, являются полистироловые микросферы, которые внутри содержат точные количества 2–3 спектрально отличных флуорохромов, сочетание которых используется для создания панелей из 50–500 различных закодированных флуорохромами регионов, что позволяет объединять микросферы различных регионов в одну мультиплексную систему [118].

Важно отметить, что большинство созданных на данный момент мультиплексных систем для мониторинга популяционного иммунитета к вакциноуправляемым заболеваниям являются «домашними», максимально оптимизированными под конкретные задачи. Они предназначены для определения антител IgG в сыворотке крови человека как минимум к одному патогену, при этом могут содержать до 23 антигенов, как, например, тест-система для одновременной детекции антител к 23 капсульным антигенам пневмококка [119]. Некоторые исследователи при создании таких тест-систем преследовали цель сравнения их с общепринятыми методиками (ИФА) и определения таких характеристик, как чувствительность, воспроизводимость и специфичность. Другие — создавали мультиплексную тест-систему как инструмент для серологического мониторинга иммунного статуса населения одновременно к нескольким инфекциям. Например, команда бельгийских ученых разработала систему для детекции антител против дифтерии, столбняка и коклюша, чтобы оценить состояние популяционного иммунитета жителей Бельгии к этим инфекциям, сравнить полученные данные с данными серологических исследований прошлых лет и решить, можно ли применять эту тест-систему в более масштабных исследованиях [20]. Тест-система включает 5 антигенов: дифтерийный, столбнячный и коклюшный токсины, филаментозный гемагглютинин и пертактин, — которые с помощью специальной методики [118] «пришиты» к поверхности магнитных полистироловых микросфер. Выборка образцов сывороток крови бельгийцев в возрасте 20–29,9 года была протестирована с использованием созданной пентаплексной тест-системы, а валидацию и сравнение с методом ИФА проводили на отдельной выборке из 37 образцов сывороток. В результате удалось установить, что в исследованной выборке образцов сывороток концентрация антител к дифтерийному токсину оказалась ниже протективного уровня (< 0,1 МЕ/мл) в 26,4 % случаев, к столбнячному токсину — в 8,6 % случаев. Что касается параметров тест-системы, то она обладает высокой корреляцией результатов между отдельными моноплексными системами в ее составе и мультиплексом в сборе [20]. Результаты, полученные с помощью данной тест-системы, также хорошо коррелируют с результатами коммерческих ИФА-тест-систем (табл. 2). В соответствии с существующими нормативными положениями FDA (Food and Drug Administration, США) и EMA (European Medicines Agencies, ЕС) валидированный анализ для количественного определения антител должен характеризоваться коэффициентом вариации получаемых результатов ≤ 20 % [120]. Исходя из этого, можно заключить, что точность результатов, полученных с помощью МИА на основе xMAP-технологии, высока. Еще одной важной характеристикой серодиагностической тест-системы является нижний предел чувствительности (LOD), и для каждого антигена в составе мультиплексной системы он индивидуален. Описываемая пентаплексная тест-система продемонстрировала достаточное для скрининговых целей значение LOD (табл. 2).

Другая тест-система для определения антител к тем же 5 антигенам была предложена голландскими исследователями [121]. На небольшой выборке образцов сывороток они оценивали, отвечает ли эта система общепринятым требованиям серодиагностики. Пентаплекс продемонстрировал более низкий предел количественного определения (LLOQ), чем метод иммуноферментного анализа: например, LLOQ для коклюшного токсина был равен 0,00078 ФЕ/мл в мультиплексной тест-системе и 2 ЕА/мл — при ИФА, а для дифтерийного токсина — 0,00006 МЕ/мл и 0,01 МЕ/мл соответственно [121]. При этом коэффициент

Таблица 1. Программы серологического мониторинга

Источник	Национальная система / программа	Страна	Инфекция	Проблема/цель	Период исследования, гг.	Метод	Число участников
[91]	National Epidemiological Surveillance of Vaccine-Preventable Disease (NESVPD)	Япония	Коклюш	В 2013 г. была обнаружена высокая распространенность антител к токсину возбудителя коклюша среди взрослых японцев.	2013–2014	ИФА-тест собственной разработки	252
[92]	Well-Child-Care Program of Ambulatory Healthcare Services	ОАЭ	Грипп А и В	От гриппа прививаются группы риска. Обосновать необходимость вакцинации от гриппа А и В всех детей на национальном уровне.	2014–2015	Коммерческий ИФА	294
[93]			Корь, паротит, краснуха, коклюш, дифтерия, столбняк, полиомиелит, ветряная оспа, Hib-инфекция	Определить среди детей ОАЭ к 9 вакциноуправляемым инфекциям, включенным в календарь прививок.			227
[94]	Самостоятельное серологическое исследование	Израиль	Гепатит А	Установить уровни серопревалентности IgG среди населения Израиля до и после введения вакцинации от гепатита А в национальный календарь прививок для грудных детей.	1997–1998 и 2011	Коммерческий ИФА	1 883 — до начала вакцинации; 2 027 — через 12 лет после вакцинации
[95]	DRC Demographic and Health Survey (DHS)	Конго	Краснуха	Вакцинация от краснухи не предусмотрена в национальном календаре Конго. Необходимо изучить бремя инфекции.	2013–2014	Коммерческий ИФА	7 195
[96]	Healthy Life In an Urban Setting (HELIUS)	Нидерланды	Папиллома-вирусная инфекция	Определить, различаются ли достоверно уровни содержания антител к типам (штаммам) вируса «высокого риска» среди мужчин и женщин разных этнических групп.	2011–2014	In-house МИА	4 637
[97]	The European Sero-Epidemiology Network (ESEN).	Италия	Коклюш	На фоне повышения инцидентности коклюша в странах с высоким охватом прививками населения определить серопревалентность коклюша во взрослых возрастных группах.	1996–1997 и 2012–2013	ИФА, стандартизованный ESEN	637 — в 2012–2013 гг.; 1 037 — в 1996–1997 гг.
[98]	The National Measles Case Based Surveillance System	Эфиопия	Краснуха	Изучить серопревалентность краснухи на данной территории с целью принятия решений по дополнению календаря антикраснушной вакциной.	2009–2015	Коммерческий ИФА	17 066
[99]	Самостоятельное серологическое исследование	Никарагуа	Гепатит А	2-кратная вакцинация от гепатита А эффективно защищает от этого заболевания, но в эндемичных районах это дорого. Оценить эффективность однократной вакцинации.	2003–2012	Коммерческий ИФА	130
[100]	Самостоятельное серологическое исследование	Камбоджа	Столбняк	Национальное серологическое исследование иммунитета к столбняку среди женщин Камбоджи 15–39 лет.	2012	In-house ИФА и МИА	2 150
[101]	PIENTER 2	Нидерланды	Дифтерия	Оценка национальной программы иммунизации по дифтерии в сравнении с аналогичным исследованием, проведенным 11 лет назад.	2006–2007	In-house МИА	6 383 — после вакцинации; 1 518 — без вакцинации
[102]	Самостоятельное серологическое исследование под эгидой китайского CDC	Китай	Коклюш, дифтерия	Определение уровня гуморального иммунитета против дифтерии и коклюша в Пекине.	2012	Коммерческий ИФА	2 147
[103]	Самостоятельное серологическое исследование под эгидой китайского CDC	Китай	Гепатит В	Определение уровня гуморального иммунитета против гепатита В в одной из провинций Китая для оценки результатов введения вакцинации в сравнении с результатами 12-летней давности.	2012	Коммерческий ИФА	13 207
[104]	National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES I и III)	США	Ветряная оспа	Определение уровня серопревалентности вируса ветряной оспы среди американской популяции в 1999–2004 гг.	1999–2004	ИФА (протокол CDC)	16 683

корреляции между результатами, полученными обоими методами, оказался достаточно высоким (табл. 3).

Специфичность каждого моноплекса в составе таких тест-систем чаще всего проверяется в экспериментах с гомологичным и гетерологичным ингибированием [116, 119–121]. Так, сыворотку с заведомо известным высоким содержанием антител IgG ко всем исследуемым инфекциям аликвотируют на соответствующее количеству антигенов число аликвот, каждую из которых инкубируют с одним из антигенов. После преинкубации к сывороткам добавляют суспензию микросфер со всеми исследуемыми антигенами. Полученные данные при сравнении их с результатами контроля, в котором отсутствовала стадия преинкубации с антигенами, позволяют делать выводы о специфичности каждого моноплекса в составе мультиплексной системы. Считается, что приемлемые пределы чувствительности (гомологичного ингибирования) — 80–120 % [120]. Специфичность тест-системы, созданной голландскими исследователями [121], оказалась очень высокой (табл. 2). Ее хорошие диагностические характеристики сочетаются

Рандомизация	Результат
Три возрастных группы: 4–7 лет, 10–14 лет и 35 лет — по 84 человека из 6 префектур. Учитывались пол, возраст, место жительства и дата сбора материала.	Высокая серопревалентность антител к токсину коклюша обусловлена не вакцинацией, а заболеванием коклюшем во взрослом возрасте.
Возраст: 4,1 года (медиана), 1,9–12,5 лет (разброс). Участники — дети, не привитые от гриппа, без острых и хронических заболеваний и регулярных медицинских манипуляций.	Серонегативные по гриппу А — 77 %, по гриппу В — 59 %. Большинство детей восприимчивы к гриппу, что говорит в пользу рутинной вакцинации этой возрастной группы.
Возраст: 1,9–5,9 года (разброс). Участники — дети, привитые в соответствии с национальным календарем прививок, без острых и хронических заболеваний и регулярных медицинских манипуляций.	Среди 30–60 % детей отмечен низкий уровень содержания в сыворотке крови антител к возбудителям коклюша, ветряной оспы и паротита. Необходима корректировка национальной программы иммунизации для улучшения этих показателей.
Сыворотки, полученные в банке, собирались от людей всех регионов Израиля. Учитывались пол, возраст (0–1,5; 1,6–4; 5–13; 14–19; 20–24; 25–34; 35–44; 45–54; 55–64; 65+ лет), место жительства, дата сдачи крови и популяционная группа (евреи или арабы).	Приведенные к возрасту уровни HAV-антител достоверно увеличились с 47 до 67 % и с 83 до 88 % среди еврейского и арабского населения соответственно. Снижение заболеваемости гепатитом А в стране является следствием введения и широкого охвата населения прививками от этой инфекции.
В исследовании принимали участие дети в возрасте 0,5–4,9 года. Стратификация по возрасту, полу, количеству детей в семье, возрасту и образованию матери, месту проживания. Также учитывались данные о вакцинации.	33 % детей были позитивны по IgG к вирусу краснухи.
Случайным образом выбранные в исследование 4 637 мужчин и женщин в возрасте 18–44 лет — невакцинированные от ВПЧ жители Амстердама, стратифицированные по этнической принадлежности (голландцы, суринамцы, ганцы, марокканцы и турки). Выбирали до 20 участников в год жизни в возрасте от 18 до 44 лет (= 27 лет жизни) каждого пола и этнической группы.	Серопревалентность штаммов ВПЧ «высокого риска» была достоверно различной для женщин разных этнических групп, чего не наблюдали для мужчин.
Результаты исследования 637 образцов сывороток от людей возрастных групп 20–29, 30–39 и 60+ лет, отобранные в 2012–2013 гг., сравнивали с результатами исследования 1 037 образцов сывороток, отобранными в 1996–1997 гг.	Возбудитель коклюша циркулирует среди взрослого населения Италии с достоверно более высокой интенсивностью, что требует введения дополнительных превентивных мер.
Образцы сывороток были получены от пациентов с подозрением на корь и серологически негативных по этому заболеванию. Рандомизация проводилась по полу, возрасту (группы < 1 года, 1–4, 5–9, 10–14, > 14 лет) и по региону проживания.	Краснуха высокоэндемична для Эфиопии особенно среди детей до 10 лет. Для принятия решения о введении рутинной вакцинации от краснухи необходимо ввести программу Rubella Surveillance System.
В исследовании принимали участие дети в возрасте 1,7–17 лет. Обследовались в динамике в течение 7,5 года после однократной вакцинации от гепатита А. Учитывались демографические и социоэкономические факторы.	Введение детям из высокоэндемичных по гепатиту А районов одной дозы HAV-вакцины является достаточным для активации иммунной памяти и может обеспечить долгосрочную защиту.
Участвовали женщины в возрасте 15–39 лет, стратифицированные на группы с шагом в 5 лет. Также было проведено разделение страны на 5 территорий. Случайным образом были отобраны жительницы выделенных 611 кластеров этих территорий.	Уровень серопревалентности столбняка составил 88 % в указанной группе.
Внутри каждого из 5 регионов страны были случайным образом отобраны 8 муниципалитетов пропорционально их размеру. Случайным образом были отобраны и стратифицированы по возрасту 380–500 человек в каждом из 40 муниципалитетов. Возрастные группы: 0, 1–4, 5–9, 10–14, ..., 75–79 лет.	Несмотря на высокий охват прививками от дифтерии в целом по стране риск распространения дифтерии в некоторых географических кластерах, где жители отказываются от вакцинации по религиозным мотивам, остается высоким.
Возраст участников: от 3 мес. до 74 лет. Стратификация по полу, месту жительства (местные, приезжие), возрасту (0–1, > 40 лет и для возраста 1–40 лет — группы с шагом в 5 лет). Учитывалось наличие вакцинации.	Установлено, что у 50–70 % взрослого населения Пекина отсутствовали защитные антитела против дифтерии, и во всех возрастных группах отмечен уровень иммунитета к коклюшу менее 25 %, что указывает на потенциальный риск распространения этих заболеваний.
Возраст участников: от 1 до 14 лет (< 5, 5–9 и 10–14 лет). Первый этап стратификации выполнен по признаку экономического развития: по 10 округов из бедных, средних и богатых регионов. На втором и третьем этапе с учетом городского и сельского проживания из 534 подрегионов и районов случайным образом выбрали 60 деревень и городских населенных пунктов.	Превалентность HBsAg и anti-HBc были 0,8 и 2,6 % соответственно, а в группе < 5 лет — 0,5 %. Установлено существенное снижение числа детей, позитивных по HBsAg, за 20 лет вакцинации.
Возраст: 6–49 лет. Стратификация по возрасту, полу, показателю бедности, семейному положению и месту рождения.	Серопревалентность вируса ветряной оспы среди детей повышается с возрастом и является равномерно высокой среди взрослого населения США в 1999–2004 гг.

с быстротой постановки реакции, большой пропускной способностью теста и потребностью в малых количествах образца и антигенов для проведения анализа.

Возбудители вакциноуправляемых инфекций — *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium tetani* и *Haemophilus influenzae* типа b — стали объектами для создания триплексной тест-системы исследователями из США [122]. Она включает три антигена: столбнячный и дифтерийный токсоиды, капсульный полисахарид *H. influenzae*, конъюгированный с сывороточным альбумином человека (HbO-HA). Тест-система была создана для оценки иммуногенности комбинированных вакцин. С помощью нее удалось определить, что 92,6 % образцов сывороток в выборке содержат протективное количество антител IgG к столбнячному токсоиду (≥ 0,1 МЕ/мл), 80,2 % — к дифтерийному токсоиду (≥ 0,1 МЕ/мл) и 39 % — к капсульному полисахариду *H. influenzae*. Референтным методом, с которым сравнивали эффективность мультиплексной системы, являлся ИФА, и был показан высокий уровень корреляции между результатами, полученными двумя методами (табл. 2).

Кроме того, исследователи отметили высокое соответствие результатов, полученных обоими методами, при тестировании сывороток до и после вакцинации [123].

Отдельного внимания заслуживают работы по созданию мультиплексных тест-систем для определения антител к *Streptococcus pneumoniae* (табл. 2). Такие системы, как правило, содержат большой набор антигенов — от 9 [117] до 23 серотипов капсульного полисахарида [119]. Сложность составления панелей из пневмококковых полисахаридов заключается, во-первых, в модификации технологии «пришивки» полисахаридных молекул к поверхности полистироловых микросфер: добавляется промежуточное звено — поли-L-лизин, связующий компонент между микросферами и антигеном. Во-вторых, появляется необходимость исключать антитела к растворимым полисахаридам клеточной стенки пневмококка (некапсульной природы) и полисахариду С, свойственному некапсульным штаммам *S. pneumoniae*, которые не обеспечивают иммунитет к этому патогену. Поэтому в состав раствора для предварительного разведения сывороток включают абсорбенты — препараты растворимых полисахаридов клеточной стенки, в том числе полисахарид С и полисахарид серотипа 22F [117, 122]. Такие же приемы применяют и в референтных ИФА-методиках, что позволяет повысить специфичность тест-системы и узнать ее истинную чувствительность.

Разработанная британскими учеными мультиплексная тест-система для количественного определения в сыворотке крови антител IgG к 9 серотипам полисахарида *S. pneumoniae* была валидирована на стандартной контрольной сыворотке 89-SF [117]. После этого ее проверили на выборке образцов сывороток крови людей, не прошедших и прошедших вакцинацию различными вакцинами против *S. pneumoniae*, в сравнении с ИФА. Тест-система отличалась отсутствием взаимного влияния моноплексных систем в ее составе, достаточно высокой специфичностью и чувствительностью, отвечающей требованиям FDA и EMA: коэффициент вариации не превышал 20 %

Таблица 2. Аналитические характеристики мультиплексных тест-систем, разрабатываемых в рамках серологических исследований

Источник	Страна	Технология	Патогены	Количество определяемых антигенов	Объем выборки образцов сывороток крови, n	Воспроизводимость	Нижний предел чувствительности	Корреляция с результатами ИФА, R^2
[116]	Нидерланды	xMAP Luminex	Вирусы кори, паротита, краснухи и ветряной оспы	4: нативные очищенные антигены	70	CV* в пределах одной постановки — 5–14 % CV между постановками — 12–16 %	0,00024 — для вируса кори, 0,053 — для вируса паротита, 0,00129 — для вируса краснухи и 0,00024 — для вируса ветряной оспы	0,953–0,983
[20]	Бельгия	xMAP Luminex	*Bordetella pertussis, Corynebacterium diphtheriae, Clostridium tetani*	5: дифтерийный, столбнячный и коклюшный токсины, филаментозный гемагглютинин и пертактин	670	CV* в пределах одной постановки — 0,44–2,47 % CV между постановками — 2,11–2,67 %	0,00031 — для DT*, 0,00035 — для TT*, 0,012 — для PT*, 0,032 — для FHA*, 0,2 — для Prn* (для всех — мЕА/мл)	0,89–0,98
[122]	США	xMAP Luminex	*Streptococcus pneumoniae*	14 серотипов полисахаридов *S. pneumoniae*: 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 12F, 14, 18C, 19F, и 23F	50	Не опубликована	Не опубликован	0,85–0,95
[121]	Нидерланды	xMAP Luminex	*Bordetella pertussis, Corynebacterium diphtheriae, Clostridium tetani*	5: дифтерийный, столбнячный и коклюшный токсины, филаментозный гемагглютинин, и пертактин	28–70	CV* в пределах одной постановки — 7–9 % CV между постановками — 10–13 %,	0,00002 — для DT*, 0,00001 — для TT*, 0,26 — для PT*, 0,10 — для FHA*, 0,22 — для Prn* (для всех — мЕА/мл)	0,948–0,984
[119]	США	xMAP Luminex	*Streptococcus pneumoniae*	23 серотипа полисахаридов *S. pneumoniae*:1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F и 33F	Стандарт сыворотки крови человека 89S-2	Неизвестно	Неизвестно	0,90 для серотипов 1, 4, 5, 6B, 9V, 14, 16C, 19F и 23F
[124]	Нидерланды	BioPlex 100 (Bio-Rad)	*Streptococcus pneumoniae*	13 серотипов полисахаридов *S. pneumoniae*: 1, 3, 4, 5,6A, 6B, 7F,9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F	188	Неизвестно	Неизвестно	Неизвестно
[117]	Британия	BioPlex (Bio-Rad)	*Streptococcus pneumoniae*	9 серотипов полисахаридов *S. pneumoniae*: 1, 4, 5, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F	120	CV* в пределах одной постановки — 5,2–8,34 % CV между постановками — 12,1–19,2 %	32,3–109,7 пг/мл	0,91–0,96
[123]	США	xMAP Luminex	*Corynebacterium diphtheriae, Clostridium tetani, Haemophilus influenzae тип b*	3: дифтерийный токсоиды, капсульный полисахарид *Haemophilus influenzae*, конъюгированный с сывороточным альбумином человека (HbO-HA)	81	Неизвестно	Неизвестно	Неизвестно

Примечание. CV — коэффициент вариации, DT — дифтерийный токсин, TT — столбнячный токсин, PT — коклюшный токсин, FHA — филаментозный гемагглютинин, Prn — пертактин.

(табл. 2). Кроме того, была показана стабильность мультиплексной тест-системы после 12 мес. хранения при +4 °С, при этом снижение интенсивности флуоресценции составило всего 10–19 %. Результаты, полученные двумя методами, коррелировали между собой, поэтому потенциально мультиплексная тест-система может заменить ИФА в качестве метода для мониторинга популяционного иммунитета к *S. pneumoniae* в силу быстроты выполнения анализа и одновременной детекции антител ко всем антигенам — компонентам вакцины.

Более широкая панель для определения антител IgG к пневмококковым полисахаридам была разработана командой исследователей из Нидерландов, в основе их тест-системы — 13 серотипов полисахаридов [124]. Тест-систему разработали для оценки гуморального иммунного ответа на 7-валентную вакцину (PCV-7) при исследовании образцов сывороток крови, полученных до вакцинации и 11 мес. спустя у младенцев в возрасте 2, 3 и 4 мес. В панель были включены также и невакцинные серотипы полисахаридов, что позволило выявить увеличение концентрации антител IgG к полисахариду серотипа 6A, не входящему в состав вакцины PCV-7, в образцах сывороток крови после вакцинации благодаря кросс-реактивности с серотипом 6B. Средние геометрические концентрации антител, определенные мультиплексным иммунным анализом, оказались несколько выше таковых, определенных методом ИФА. Однако коэффициент корреляции между этими двумя методиками высок (табл. 2). Различия в результатах ИФА и МИА позволили исследователям предположить, что утвержденная наименьшая протективная концентрация IgG к пневмококковым полисахаридам (0,35 мкг/мл) должна быть пересмотрена для использования в МИА и, возможно, следует рассматривать ее для каждого серотипа отдельно [124]. Похожее исследование было проведено несколькими годами ранее в США (табл. 2) [122]. В панель антигенов включили 14 серотипов пневмококковых полисахаридов, а оценку параметров созданного мультиплекса проводили на выборке образцов сывороток крови, полученных от людей до и после вакцинации. В экспериментах с гетерологичным и гомологичным ингибированием тест-система показала высокий уровень специфичности по каждому из антигенов за исключением двух близкородственных серотипов полисахаридов — 9N и 9V. Однако для некоторых серотипов гетерологичное ингибирование достигало 50 %. Явления кросс-реактивности не удалось избежать предварительным инкубированием образцов сывороток с пневмококковым полисахаридом C, но дополнительная преадсорбция с полисахаридом серотипа 22F значительно снизила уровень гетерологичного ингибирования. Результаты, полученные методами ИФА и МИА, в данном исследовании хорошо согласуются.

Уникальность другой тест-системы для серодиагностики антител IgG к полисахаридам *S. pneumoniae* заключается в том, что она способна детектировать иммуноглобулины одновременно к 23 серотипам полисахаридов (табл. 2) [119]. Кроме того, помимо микросфер с серотипами полисахаридов она включает внутренний контроль — микросферы с полисахаридами клеточной стенки *S. pneumoniae* и второй контроль — микросферы с полисахаридом серотипа PnPS25, который не входит в состав ни одной вакцины против пневмококковой инфекции и позволяет оценивать воспроизводимость результатов (это особенно актуально в пре- и поствакцинных серологических исследованиях). Все параметры этой тест-системы проверялись на контрольной стандартной антипневмококковой сыворотке 89S-2 (FDA), которая содержит IgG к пневмококковым антигенам и была получена из сывороток крови людей, вакцинированных 23-валентной вакциной против *S. pneumoniae*. Результаты, полученные с помощью МИА, хорошо коррелируют с результатами, полученными методом ИФА, а гомологичное ингибирование характерно для всех антигенов за исключением 2, 3, 4 и 5 серотипов пневмококкового полисахарида, в случае которых не наблюдали ни гомологичное, ни гетерологичное ингибирование антигенами [119].

Для вирусных инфекций, таких как корь, паротит, краснуха и ветряная оспа, которые входят в календарь прививок большинства стран ВОЗ, также разрабатывают мультиплексные тест-системы. В исследовании [116] использовали нативные очищенные препараты вирусов для пришивки к магнитным микросферам (табл. 2). Систему тестировали на 70 образцах сывороток крови людей, получавших и не получавших вакцины от исследуемых инфекций. По результатам тестирования системы на основе xMAP-технологии исследователи заключили, что она обладает высокими специфичностью и точностью. Кроме того, для детекции антител IgG к каждому вирусу в составе мультиплексной системы был найден нижний предел LLOQ в сравнении с ИФА (табл. 3), который показал, что мультиплексная тест-система характеризуется более высокой чувствительностью для всех 4 вирусов.

Именно мультиплексные тест-системы в силу их высоких диагностических характеристик и экономичности должны использоваться в широкомасштабных серологических исследованиях.

Перспективные методы контроля иммунологической памяти

Несмотря на широкое практическое внедрение иммунологических методов и их высокую ценность для проведения серологического мониторинга, все больше исследований говорят об их недостаточности и необходимости разработки новых подходов [125]. Ограничения существующих методов сводятся к невозможности оценки клеточного звена иммунитета и определения маркера строго в определенных популяциях клеток, а также небольшому количеству одновременно выявляемых маркеров. Новые подходы должны учитывать фундаментальные свойства иммунологической памяти и молекулярные особенности патогенов. В конечном счете, появление новых методов может определить открытие совершенно новых свойств иммунной системы и переосмысление уже известных фактов. Определение специфических антител — основной метод оценки иммунологической памяти к какой-либо инфекции, и этот подход описан в предшествующих разделах статьи. Здесь же мы хотим поговорить об ограничениях этого подхода и проанализировать использованием новых методов в эпидемиологических исследованиях.

Таблица 3. Корреляция результатов исследования, полученных с помощью методов МИА и ИФА (Smits et al., [116])

Вирус	МИА LLOQ, мМЕ/мл	ИФА LLOQ, мМЕ/мл
Корь	0,72	20
Краснуха	3,86	3 000
Ветряная оспа	0,71	660
Паротит	160	4 000

Иммунологическая память как параметр адаптивного иммунитета проявляет динамические свойства. Она изменяется в процессе онтогенеза человека и под влиянием перенесенных им инфекционных заболеваний, вакцинации, особенностей собственной микробиоты и образа жизни [125–128]. Прежде всего, в течение жизни изменяется соотношение нативных клеток к клеткам памяти в пользу последних, что ведет к ухудшению качественных характеристик иммунологической памяти в старости [129–131]. Если в младенчестве разнообразие рецепторов адаптивного иммунитета у отдельных людей обладает некоторым сходством, то к старости различия становятся существенными, отражая иммунологическую летопись прожившего жизнь человека [127, 128]. У здоровых людей различаются состав клеточных популяций, профили цитокинов и иммуноглобулинов [125]. Факторами влияния являются генетическое своеобразие человека, его возраст, пол, состав микробиоты его кишечника, вакцинация, образ жизни, особенности окружающей среды, времена года и циркадные ритмы, но, к сожалению, мало что известно о действии этих факторов на качественные характеристики иммунитета. Ведется активный поиск маркеров, позволяющих связать качественно-количественные особенности иммунитета отдельных людей с наличием заболевания или вероятностью его развития в будущем [125].

В статье, описывающей перспективы создания всемирного банка сывороток [21], предлагается делить все требующие мониторинга патогены на 4 группы. Первая группа содержит хорошо иммунизирующие, антигенно-стабильные патогены (корь, краснуха и оспа). Вторая группа содержит хорошо иммунизирующие, но антигенно-изменчивые патогены (грипп, инвазивные бактериальные инфекции и лихорадка денге). Третья группа включает инфекции, для которых антитела не считаются протективными, такие как туберкулез, у которого иммунный ответ на уровне антител варьирует в зависимости от стадии инфекции; малярия, при которой заражение эритроцитов ведет к появлению нескольких вариантов антител; ВИЧ. Четвертая и самая обширная группа включает инфекции, которые не приводят к появлению достоверно устойчивого количества антител или для которых присутствие специфических антител в организме не связано с защитой от инфекций в дальнейшем. К ним относятся разнообразные кишечные инфекции и вирус папилломы человека.

Для первой группы инфекций формируемый гуморальный иммунитет является протективным, его наличие, определенное серологическими методами, является однозначным маркером перенесенной инфекции (или вакцинации). Для второй группы наличие антител может служить, с некоторыми оговорками, маркером зашиты от инфекций, а также может использоваться для разработки вакцин и моделирования пандемий. Для обеих групп разработанные на сегодняшний день серологические методы являются практически исчерпывающими для определения напряженности иммунитета на популяционном уровне. Сложностью является определение причины возникновения иммунитета: вследствие перенесенного заболевания или же вакцинации [21, 132]. Так, для гепатита В по наличию антител анти-HBsAg и анти-HBcore можно говорить о перенесенном заболевании, а при наличии только первых в отсутствие вторых — о вакцинации [133], но для других инфекций возможно введение в профилактические вакцины специальных иммунологических меток [134]. Для рекомбинантной вакцины против туберкулеза «ГамТБвак», разрабатываемой авторами настоящего обзора, возможно использование ответа на декстран-связывающий домен, участвующий в депонировании на декстрановый адъювант, как маркер вакцинации [135].

В отношении третьей и четвертой групп инфекций можно сказать, что, хотя антитела не являются подтверждением наличия иммунитета против патогена, они указывают на текущую или перенесенную инфекцию. В этом случае серологические данные могут быть полезными для оценки охвата населения программами вакцинации, если вакцинация приводит к появлению долговременного гуморального иммунитета [21]. Между тем, компромисс в данном случае допускается только потому, что отсутствуют надежные маркеры протективности, которые свидетельствовали бы о наличии иммунологической защиты. Разработка таких маркеров была бы полезна не только для эпидемиологического мониторинга, но и для разработки новых высокоэффективных вакцин. Вакцины против легочной формы туберкулеза, малярии и ВИЧ до сих пор не разработаны в том числе потому, что надежные маркеры, указывающие на протективность, по-прежнему не найдены. Но как для третьей, так и для четвертой группы инфекций известны случаи иммунологически опосредованной устойчивости, а отсутствие протективного гуморального ответа в таких случаях объясняется значимой ролью клеточного иммунитета [21, 136].

Для определения клеточного иммунитета известен способ, который называется IGRA (Interferon Gamma Release Assay). Суть метода заключается в определении уровня продукции интерферона гамма (IFNγ) лимфоцитами цельной крови или PBMC-фракции (субпопуляции мононуклеарных клеток периферической крови) при воздействии антигенами патогена [137]. Определение содержания IFNγ проводится методом ИФА. Этот подход широко используется для диагностики туберкулеза и других инфекций, вызываемых внутриклеточными патогенами (например, туляремии, лейшманиоза и цитомегаловируса) [138], но, как и в случае с антителами, его результат сводится к определению наличия инфекции, а не маркера устойчивости. Какие же методы могут подойти для разработки маркеров протективности для инфекций, устойчивость к которым определяется клеточными компонентами иммунитета?

Среди перспективных методов можно назвать проточную цитометрию и ее модификацию, включающую сортировку клеток. Этот метод позволяет проводить анализ единичных клеток с использованием флуоресцентно меченных антител и маркеров клеточных компартментов с измерением до 30 параметров одновременно в сотнях тысяч и миллионах отдельных клеток [139]. Так можно получать глубокие знания о дифференциации и свойствах клеточных популяций на статистически достоверных выборках. В рутинном эпидемиологическом мониторинге метод может быть применим в случае, если маркеры протективности или восприимчивости потребуется искать в строго определенных популяциях клеток. Разработчикам таких маркеров необходимо максимально упрощать протокол исследования. Мешать внедрению таких методов будут также более высокие требования, предъявляемые к работе с живыми клетками. С использованием функции сортировки клеток на специальных модификациях цитометров возможно выделение популяций клеток, в которых определение маркеров протективности будет произведено другими методами. В этом случае отсортированные клетки могут быть заморожены и заложены в биобанк до проведения анализа.

Вторым перспективным методом является определение разнообразия клеточных рецепторов Т-лимфоцитов [128] и В-лимфоцитов, продуцирующих антитела, с использованием секвенирования нового поколения (next-generation sequencing, NGS). Разнообразие рецепторов в определенных субпопуляциях клеток дает возможность глубокого изучения иммунологической памяти. Расшифровка информации о рецепторах может многое рассказать о том, чем человек болел и чем болеет сейчас, и даже предсказать, чем он заболеет в обозримом будущем. Фактически современные технологии позволяют определять, какие антитела продуцирует конкретный человек и против каких линейных эпитопов имеется клеточная память. К сожалению, пока нельзя определить специфичность всех рецепторов в совокупности. Требуется развитие биоинформатики и кибернетики, включающей машинное обучение и искусственный интеллект, а также проведение масштабных исследований, позволяющих оценить корреляцию фенотипа иммунной системы с разнообразием вариабельных локусов рецепторов адаптивного иммунитета. Недостатками применения NGS в эпидемиологическом мониторинге являются сложность пробоподготовки материала для исследования, высокая стоимость анализа и оборудования, потребность в высококвалифицированном персонале.

Результаты использования описанных новых методов могут оказаться неоценимыми для фундаментальной иммунологии. Вероятно, новые маркеры, обнаруженные этими методами, можно будет адаптировать для использования в более простых диагностических процедурах: мультиплексном иммунологическом анализе [140], IGRA-тесте, полимеразной цепной реакции, проточной цитометрии [139] или масс-спектрометрии [141].

Предложения по организации полноценной системы сероэпидемиологического мониторинга в России и ожидаемые экономические показатели

Основываясь на мировом опыте и знаниях о перспективных методах изучения популяционного иммунитета, мы предлагаем меры по организации системы сероэпидемиологического мониторинга в России в соответствии с принципами, упомянутыми в начале нашей работы.

Мониторинг должен осуществляться под эгидой Министерства здравоохранения РФ, Роспотребнадзора или иного ведомства, способного обеспечить необходимый административный ресурс для взаимодействия с региональными ЛПУ в вопросах сбора образцов для исследований. Всего же организационная структура системы мониторинга должна включать четыре уровня.

1. *Сбор образцов*. Обеспечивается с привлечением региональных департаментов здравоохранения (которые является заинтересованными потребителями эпидемиологической информации) и муниципальных ЛПУ на уровне поликлиник с учетом того, что необходим сбор образцов от условно здорового населения. На данном уровне формируются группы для исследований, проводится анкетирование участников, отбираются образцы крови, производится их первичная обработка (отделение сыворотки) и транспортировка собранных образцов с сопутствующей документацией в централизованный биобанк.

2. *Регистрация, паспортизация и архивирование собранных образцов* в специализированном централизованном биобанке, имеющем статус национального банка сывороток крови в соответствии с определением [23]. Биобанк в создаваемой системе мониторинга имеет центральное и интегрирующее значение [142], поскольку в силу своего устройства и назначения он способен: а) аккумулировать собранные образцы в необходимом значительном количестве, обеспечивать их аликвотирование и длительное хранение в стандартных условиях; б) вести автоматизированный учет образцов в виде базы данных, включающей информацию о дате и месте получения образца, анкетных данных донора, результатах исследований, что исключает ошибки при проведении тестов и анализе их результатов, повышает достоверность полученных данных, позволяет автоматически получать и обрабатывать статистику о встречаемости серологических маркеров инфекций.

3. *Лабораторная часть* для скрининга всех полученных образцов на наличие серологических маркеров методом ИФА в мультиплексном формате, что обеспечит определение десятков аналитов для каждого образца в ходе одного исследования и существенно сократит затраты, в том числе временные, на исследование. Лаборатории, задействованные в мониторинге, должны иметь технологическую и юридическую возможность работы с материалом (кровью), потенциально содержащим патогенные биологические агенты (ПБА) III–IV групп, а также проводить диагностику без наработки культур в отношении ПБА II группы [143, 144].

4. *Аналитический центр* для обработки полученных данных, прогнозирования тенденций, и предоставления в органы государственного здравоохранения исчерпывающей информации в виде отчетов, удобных для использования всеми заинтересованными органами и службами.

Что касается объема и структуры исследований, то в соответствии с зарубежным опытом для принятия управленческих решений в области коррекции национальных программ иммунопрофилактики, необходимо изучать наличие протективного уровня антител к инфекциям у 0,02–0,05 % населения страны [5, 20, 87, 88, 90]. Применительно к России это 30–75 тыс. условно здоровых человек. Участники исследования должны заполнять письменное информированное согласие и анкету — базовый эпидемиологический опросник (пол и возраст, социально-экономическое положение участника, административно-территориальная принадлежность, известный вакцинальный статус, наличие хронических инфекционных заболеваний, основные факторы риска в отношении инфекционных заболеваний). Мотивация участников исследования может определяться небольшим денежным вознаграждением и предоставлением пациенту достоверных данным о состоянии его иммунитета.

Вся обследуемая выборка должна позволять производить стратификацию в когорты численностью не менее 500 человек, формируемые по определенным эпидемиологическим признакам. Численность когорт в 500 и более человек позволяет достичь точности определения (доверительного интервала) доли людей, являющихся носителями изучаемого маркера, на уровне ± 5 % в диапазоне популяционной встречаемости маркера 40–60 % и точности ± 2,5 % — в диапазоне встречаемости маркера 90–100 % ($p < 0,05$) [145], что достаточно для определения параметров популяционного иммунитета [88]. Основная стратификация должна происходить по возрасту. Исходя из данных о периодах вакцинации и возрастных изменениях в приобретенном иммунитете [146, 147], а также основываясь на зарубежном опыте [148], мы рекомендуем стратификацию по группам в соответствии с возрастами, определяемыми национальным календарем прививок [30] с уточнениями: дети в возрасте до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 15

и 18 мес., до 2 лет и далее с разницей в 1 год — до 11 лет, затем с разницей в 3 года — до 35 лет, далее — с разницей в 5 лет (всего не менее 35 возрастных групп численностью более 500 человек каждая). В связи с тем, что массовый отбор крови у детей до года сопровождается рядом технологических и этических трудностей, на пилотном этапе мониторинга допустимо стратифицировать детские возраста в соответствии с «декретированными» возрастами уже упоминавшийся статистической формы № 6 [28]: до 1 года, до 2 лет, далее с разницей в 1 год — до 18 лет. Такой подход (стратификация по возрасту с максимальной детализацией) будет полезен не только для определения реальной иммунизированной части населения, но и для изучения эффективности проводимых программ вакцинации в разных возрастах.

Важной является также стратификация по регионально-территориальному и социально-экономическому признакам. Мы предполагаем, что система здравоохранения России (по крайней мере, в части всеобщих программ вакцинации) действует с одинаковой эффективностью на всех граждан России вне зависимости от их территориального или имущественного статуса, но, во-первых, объективность этого предположения может быть подтверждена или опровергнута серологическим мониторингом, а во-вторых, не стоит забывать о том, что инфекции имеют разную эндемичность в зависимости от климатических зон и уровня экономического развития региона, что должно неизбежно отражаться на картине иммунитета населения. Достаточно адекватной для целей сероэпидемиологического мониторинга выглядит стратификация населения по регионам и социально-экономическим признакам, разработанная в ходе выполнения медико-социологического исследования «Обследование домашних хозяйств и здоровья населения России» (Russian Longitudinal Monitoring Survey, RLMS) в 1992–1998 гг. [149]. В исследовании вся территория России была разделена на 10 климатогеографических зон и 10 зон качества жизни. Для построения репрезентативной выборки с отбором территориальных участков ЛПУ и домохозяйств на них в рамках определенных зон целесообразно использовать методику, применявшуюся в исследовании ЭССЕ-РФ (2012–2014 гг.) [150] (она аналогична американской программе NHANES: National Health and Nutrition Examination Survey [151]). Здесь мы не будем останавливаться на статистических деталях формирования выборок, отметим только, что, согласно приведенным источникам, методология построения репрезентативных для населения всей страны (даже такой большой и разнообразной, как Россия) является отработанной и готовой к применению.

Что касается спектра определяемых маркеров иммунитета, то мы рекомендуем уже на первых этапах мониторинга детектировать методом мультиплексного ИФА антитела ко всем вакциноуправляемым инфекциям, взяв за основу перечень из национального календаря прививок. Этот перечень содержит 23 инфекции. Отдельная методология должна быть разработана для гриппа из-за смены сезонных штаммов [152, 153] и туберкулеза, т. к. наличие общих антител IgG в крови не всегда служит показателем защищенности [135].

В идеале описанные поперечные исследования (cross-sectional studies [25]), т. е. получение одномоментного среза данных по популяционному иммунитету у населения страны, должны проводиться регулярно, с частотой один раз в 6–7 лет, поскольку именно за этот период организм современного человека приобретает основной иммунитет к вакциноуправляемым инфекциям (и значительной части инфекций вообще) [31, 146, 154], т. е. происходит смена «иммунизированных поколений».

Какова будет стоимость предлагаемых мероприятий? По оценкам авторов настоящей работы, стоимость одного раунда общероссийского серологического мониторинга в пилотном варианте (10 регионов, 30 000 образцов, определение 30 видов антител) составит около 300 млн рублей, из них: 62 млн — сбор образцов, включая вознаграждение участников, стоимость расходных материалов и документальной работы, оплату рабочего времени задействованных врачей региональных ЛПУ; 23 млн — дооснащение региональных центров сбора образцов оборудованием для первичной пробоподготовки; 16 млн — логистические расходы; 99 млн — материалы для серодиагностики в мультиплексном формате; 100 млн — содержание лабораторно-аналитического центра (обслуживание биобанка и другого оборудования, зарплаты сотрудников, управленческие расходы). Будут ли оправданы эти расходы для государственного бюджета? Несомненно.

Экономический эффект от мониторинга наступит после дополнительной вакцинации людей из выявленных групп риска и будет выражаться в снижении ущерба от медицинских последствий заболеваний вакциноуправляемыми инфекциями. Методика оценки этого ущерба разработана специалистами ЦНИИ эпидемиологии [155, 156]. Так, согласно [34, 50], совместные медицинские потери от заболеваемости инфекциями, управляемыми средствами специфической профилактики (коклюш, корь, паротит, столбняк, краснуха, дифтерия, острый вирусный гепатит В, гепатит А, бруцеллез, туляремия, брюшной тиф, бешенство, некоторые геморрагические лихорадки, такие как клещевой энцефалит и желтая лихорадка) ежегодно составляют около 6 млрд руб. Этих потерь можно избежать при условии создания полноценного коллективного иммунитета к перечисленным инфекциям за счет дополнительной вакцинации людей из групп риска. В этом контексте затраты в 300 млн рублей на мониторинг не выглядят чрезмерными даже с учетом того, что он будет иметь смысл, только если за ним последуют затраты на дополнительную вакцинацию. Эмпирические оценки соотношения расходов на вакцинацию и полученного экономического эффекта от нее колеблются в диапазоне от 1 : 5,7 до 1 : 14,4 [157], т. е. вакцинация безусловно экономически оправдана.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Усложнение современных календарей вакцинации, миграция и старение населения, отказ от вакцинации по различным соображениям ведут к необходимости внедрения в России отдельной системы мониторинга иммунологической памяти на популяционном уровне, позволяющей оценивать ландшафт защищенности от инфекций в современном обществе и выявлять восприимчивый к инфекциям контингент населения. Ее внедрение позволит уточнить истинные значения коллективного иммунитета в различных социальных группах и регионах, управлять календарем вакцинации, определять эффективность вакцин и программ вакцинации, а также даст возможность рассчитать объем требуемых вакцин, диагностических и лекарственных средств и усилий для обеспечения полной защиты населения в соответствии с [23].

Действующие в России методы изучения защиты населения от инфекций ни по отдельности, ни в совокупности не дают представления о реальном популяционном

иммунитете и не могут служить в качестве надежных прогностических инструментов: данные о прививаемости и заболеваемости нарушают принцип релевантности по отношению к общей группе населения, а проводимые серологические исследования слишком фрагментарны и локальны и противоречат принципам глобальности, непрерывности и однородности данных.

Новая система должна включать: сбор репрезентативной коллекции образцов крови граждан, создание биологических банков биоматериала (сыворотки, ДНК, РНК и клеток); разработку скрининговых тест-систем, определяющих в образце качество иммунологической памяти; проведение исследований для определения популяционного иммунитета; моделирование эпидемиологических процессов с использованием данных об уровне популяционного иммунитета. Без разработки и внедрения подобной системы невозможна дальнейшая рациональная вакцинопрофилактика и обеспечение требуемого уровня биологической безопасности, гарантируемой гражданам России Конституцией.

Литература

1. Sheerin D, Openshaw PJ, Pollard AJ. Issues in vaccinology: Present challenges and future directions. Eur J Immunol. 2017 Sep 1. DOI: 10.1002/eji.201746942.
2. Всемирная организация здравоохранения [Интернет]. Женева, Швейцария: c2017– [процитировано: сентябрь 2017 г.] 10 ведущих причин смерти в мире. Информационный бюллетень ВОЗ за 2015 год. Доступно по ссылке: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/ru/index1.html
3. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2016. 21th ed. France: World Health Organisation; 2016. Доступно по ссылке: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/250441/1/9789241565394-eng.pdf
4. who.int [Интернет]. Женева, Швейцария: Всемирная организация здравоохранения; c2017– [процитировано: сентябрь 2017 г.]. Доступно по ссылке: http://www.who.int/ru/
5. van der Klis FR, Mollema L, Berbers GA, de Melker HE, Coutinho RA. Second national serum bank for population-based seroprevalence studies in the Netherlands. Neth J Med. 2009; Jul-Aug; 67 (7): 301–8.
6. De Melker HE, Conyn-Van Spaendonck MAE. Immunosurveillance and the evaluation of national immunization programmes: a population-based approach. Epidemiol Infect. 1998; 121 (3): 637–43. DOI: 10.1017/S0950268898001587.
7. Cesaro S, Giacchino M, Fioredda F, Barone A, Battisti L, Bezzio S et al. Guidelines on vaccinations in paediatric haematology and oncology patients. Biomed Res Int. 2014: 707691. DOI: 10.1155/2014/707691.
8. Xu GJ, Kula T, Xu Q, Li MZ, Vernon SD, Ndung'u T et al. Viral immunology. Comprehensive serological profiling of human populations using a synthetic human virome. Science. 2015 Jun 5; 348 (6239): aaa0698. DOI: 10.1126/science.aaa0698.
9. Wolfe RM. Update on adult immunizations. J Am Board Fam Med. 2012 Jul-Aug; 25(4): 496–510. DOI: 10.3122/jabfm.2012.04.100274.
10. Fine P, Eames K, Heymann DL. "Herd immunity": A rough guide. Clin Infect Dis. 2011 Apr1; 52 (7): 911–6. DOI: 10.1093/cid/cir007.
11. Martin V, Bryan Wu YC, Kipling D, Dunn-Walters D. Ageing of the B-cell repertoire. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2015 Sep 5; 370 (1676). pii: 20140237. DOI: 10.1098/rstb.2014.0237.
12. Chao DL, Dimitrov DT. Seasonality and the effectiveness of mass vaccination. Math Biosci Eng. 2016 Apr 1; 13 (2): 249–59. DOI: 10.3934/mbe.2015001.
13. Wilson SE, Deeks SL, Hatchette TF, Crowcroft NS. The role of seroepidemiology in the comprehensive surveillance of vaccine-preventable diseases. CMAJ. 2012 Jan 10; 184 (1): E70–6. DOI: 10.1503/cmaj.110506.
14. Коток А. Беспощадная иммунизация. М.: Изд-во «Гомеопатическая Медицина»; 2004. 448 с.
15. Михаил Гельфанд. В вопросе вакцинации государство должно вести себя как просвещенный диктатор. Сноб [Интернет]. 19 сентября 2017 г. Доступно по ссылке: https://snob.ru/selected/entry/129150?utm_source=push&utm_medium=push_notification&utm_campaign=breaking&utm_content=article
16. Мац А. Н. Врачам об антипрививочном движении и его вымыслах в СМИ. Педиатрическая фармакология. 2009; 6 (6): 12–35.
17. Всемирная организация здравоохранения [Интернет]. Женева, Швейцария: c2017– [процитировано: сентябрь 2017 г.] Ложные идеи о вакцинации. Онлайновые вопросы и ответы. Март 2016 г. Доступно по ссылке: http://www.who.int/features/qa/84/ru/
18. Bocquier A, Ward J, Raude J, Peretti-Watel P, Verger P. Socioeconomic differences in childhood vaccination in developed countries: a systematic review of quantitative studies. Expert Rev Vaccines. 2017. DOI: 10.1080/14760584.2017.1381020. Epub 2017 Sep 21.
19. Schoeppe J, Cheadle A, Melton M, Faubion T, Miller C, Matthys J et al. The Immunity Community: A Community Engagement Strategy for Reducing Vaccine Hesitancy. Health Promot Pract. 2017 Sep; 18 (5): 654–61. DOI: 10.1177/1524839917697303.
20. Caboré RN, Piérard D, Huygen K. A Belgian Serosurveillance/Seroprevalence Study of Diphtheria, Tetanus and Pertussis Using a Luminex xMAP Technology-Based Pentaplex. Vaccines (Basel). 2016 May 10; 4 (2). pii: E16. DOI: 10.3390/vaccines4020016.
21. Metcalf CJ, Farrar J, Cutts FT, Basta NE, Graham AL, Lessler J et al. Use of serological surveys to generate key insights into the changing global landscape of infectious disease. Lancet. 2016 Aug 13; 388 (10045): 728–30. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)30164-7.
22. Giammanco A, Chiarini A, Stroffolini T, De Mattia D, Chiaramonte M, Moschen ME, et al. Seroepidemiology of pertussis in Italy. Rev Infect Dis. 1991 Nov-Dec; 13 (6): 1216–20.
23. Основы государственной политики в области обеспечения химической и биологической безопасности Российской Федерации на период до 2025 года и дальнейшую перспективу (утв. Президентом РФ 1 ноября 2013 г. № Пр-2573).
24. Распоряжение Правительства Российской Федерации от 15.12.2014 № 2561-р «Об утверждении концепции федеральной целевой программы "Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2015–2020 годы)"».
25. Флетчер Р., Флетчер С., Вагнер Э. Клиническая эпидемиология: Основы доказательной медицины. М.: Изд-во «Медиа-Сфера»; 1998. 346 с.
26. Покровский В. И., Брико Н. И. Эпидемиология. Учебник. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2016. 368 с.
27. Приказ Федеральной службы государственной статистики от 28 января 2014 г. № 52 «Об утверждении статистического инструментария для организации Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека федерального статистического наблюдения за заболеваемостью населения инфекционными и паразитарными болезнями и профилактическими прививками».
28. Приказ Федеральной службы государственной статистики от 16 сентября 2016 г. № 518 «Об утверждении статистического инструментария для организации Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека федерального статистического наблюдения за профилактическими прививками против инфекционных заболеваний».
29. Федеральный закон от 17 сентября 1998 г. № 157-ФЗ «Об иммунопрофилактике инфекционных болезней» (в ред. от 19 декабря 2016 г.).
30. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федера-

ции от 21 марта 2014 г. № 125н «Об утверждении национального календаря профилактических прививок и календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям» (с изм. на 13 апреля 2017 г.).
31. Брико Н. И. Оценка качества и эффективности иммунопрофилактики. Лечащий врач [Интернет]. 2012; (10). Доступно по ссылке: https://www.lvrach.ru/2012/10/15435557/].
32. Постановление Правительства РФ от 30 июня 2004 г. № 322 «Об утверждении Положения о Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека» (в ред. от 24 января 2017 г., с приложениями).
33. Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.3.2367-08 «Организация иммунопрофилактики инфекционных болезней». Утверждены Постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 4 июня 2008 г. № 34. Введены в действие с 1 сентября 2008 г.
34. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2016 году: Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 2017. 220 с.
35. Цвиркун О. В. Эпидемический процесс кори в различные периоды вакцинопрофилактики [диссертация]. М.: Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии; 2014.
36. Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.1.2952-11 «Профилактика кори, краснухи и эпидемического паротита». Утверждены Постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 28 июля 2011 г. № 108.
37. Watson JC, Hadler SC, Dykewicz CA, Reef S, Phillips L. Measles, mumps and rubella – vaccine use and strategies for elimination of measles, rubella, and congenital rubella and control of mumps; recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). MMWR Recomm Rep. 1998 May 22; 47 (RR-8): 1–57.
38. McLean HQ, Fiebelkorn AP, Temte JL, Wallace GS; Centers for Disease Control and Prevention. Prevention of measles, rubella, congenital rubella syndrome, and mumps, 2013: summary recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). MMWR Recomm Rep. 2013 Jun 14; 62 (RR-04): 1–34.
39. World Health Organization. Europe launches plan for accelerated action to eliminate measles and rubella. Copenhagen, Denmark: WHO Regional Office for Europe; 2013. Доступно по ссылке: http://www.euro.who.int/en/health-topics/communicable-diseases/measles-andrubella/news/news/2013/09/whoeurope-launches-plan-for-accelerated-action-toeliminate-measles-and-rubella
40. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 3 июня 1996 № 226/79 от «О введении профилактических прививок против гепатита В».
41. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 27 июня 2001 г. № 229 «О национальном календаре профилактических прививок и календаре профилактических прививок по эпидемическим показаниям».
42. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2012 году: Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 2013. 176 с.
43. Демографический ежегодник России 2015. Стат. сб. М.: «Росстат». 2015. 263 с.
44. Повестка совещания «Об итогах реализации приоритетного национального проекта в сфере здравоохранения в 2007 году и ходе реализации в 2008 году» от 14 июля 2008 года. Протокол селекторного совещания у Руководителя Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главного государственного санитарного врача Российской Федерации Г. Г. Онищенко. Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2008; 4 (41): 32–4.
45. Онищенко Г. Г., Меркулов И. В., Петров Е. Ю., Желобов В. Е., Шевчук Н. А., Селедцова О. В. О ходе иммунизации населения в рамках национального календаря профилактических прививок. Протокол селекторного совещания у руководителя Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Протокол № 13 от 20.07.2010).
46. Статистический учет и отчетность учреждений здравоохранения. М.: Министерство здравоохранения и социального развития Российской Федерации; 2006. 81 с.
47. Форма № 058/у. Экстренное извещение об инфекционном заболевании, пищевом, остром профессиональном отравлении, необычной реакции на прививку. Утверждена Приказом Минздрава СССР от 04.10.1980 № 1030 (ред. от 31.12.2002) «Об утверждении форм первичной медицинской документации учреждений здравоохранения».
48. О правомочности действия приказа Минздрава СССР от 4 октября 1980 года № 1030 «Об утверждении форм первичной медицинской документации учреждений здравоохранения». Письмо Министерство здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 30 ноября 2009 г. № 14-6/242888.
49. Кишкун А. А., Арсенин С. Л. Основные направления реформирования лабораторной службы России. Медицинский алфавит. 2011; 4: 4–10.
50. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2015 году: Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 2016. 200 с.
51. Rolfes MA, Foppa IM, Garg S, Flannery B, Brammer L, Singleton JA et al. Estimated Influenza Illnesses, Medical Visits, Hospitalizations, and Deaths Averted by Vaccination in the United States. Centers for Disease Control and Prevention [Интернет]. [обновлено 19 апреля 2017 г.] Доступно по ссылке: https://www.cdc.gov/flu/about/disease/2015-16.htm
52. Nakamura Y, Sugawara T, Kawanohara H, Ohkusa Y, Kamei M, Oishi K. Evaluation of estimated number of influenza patients from national sentinel surveillance using the national database of electronic medical claims. Jpn J Infect Dis. 2015; 68 (1): 27–9. DOI: 10.7883/yoken.JJID.2014.092.
53. Murakami Y, Hashimoto S, Kawado M, Ohta A, Taniguchi K, Sunagawa T, et al. Estimated number of patients with influenza A(H1)pdm09, or other viral types, from 2010 to 2014 in Japan. PLoS One. 2016; 11 (1): e0146520. DOI: 10.1371/journal.pone.0146520.
54. Zaraket H, Saito R. Japanese Surveillance Systems and Treatment for Influenza. Curr Treat Options Infect Dis. 2016; 8 (4): 311–28. DOI: 10.1007/s40506-016-0085-5.
55. Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.1.2.3117-13 «Профилактика гриппа и других острых респираторных вирусных инфекций". Утверждены Постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 18 ноября 2013 г. № 63.
56. Hyams K.C. Risks of chronicity following acute hepatitis B virus infection: a review. Clin Infect Dis. 1995; 20 (4): 992–1000.
57. Методические указания МУ 3.1.2792-10 «3.1. Профилактика инфекционных болезней. Эпидемиологический надзор за гепатитом В». Утверждены и введены в действие Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 20 декабря 2010 г.
58. Всемирная организация здравоохранения [Интернет]. Женева, Швейцария: c2017– [процитировано: сентябрь 2017 г.] Глобальная стратегия сектора здравоохранения по вирусному гепатиту 2016–2021. На пути к ликвидации вирусного гепатита. Доступно по ссылке: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/250042/1/WHO-HIV-2016.06-rus.pdf
59. Вязов С. О., Компаниец А. А., Ананьев В. А., Листовская Е. К., Дардик Ф. Г., Пирожкова З. П. Выявление HBsAg анти-HBs у здорового населения различных городов СССР. Вопросы вирусологии. 1985; 2: 231–3.
60. Сомова А. В., Голосова Т. В., Марголина А. Н., Багрянцева С. Ю. Серодиагностика вирусных гепатитов С и В среди различных групп населения. Вопросы вирусологии. 1992; 4: 105–7.
61. Шахгильдян И. В., Михайлов М. И., Онищенко Г. Г. Парен-

теральные вирусные гепатиты (эпидемиология, диагностика, профилактика). М.: ГОУ ВУНМЦ; 2003. 384 с.
62. Мануйлов В. А., Осипова Л. П., Нетесова И. Г., Чуб Е. В., Безуглова Л. В., Norder H. и др. Распространенность различных генотипов и субтипов HBs-антигена вируса гепатита В в группах коренного населения Сибири. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2015; 1: 28–35.
63. Ray Kim W. Epidemiology of Hepatitis B in the United States. Hepatology. 2009; 49 (5): 28–34.
64. Международная классификация болезней десятого пересмотра МКБ-10, 1989. Рекомендована к применению в РФ Инструкцией по использованию Международной статистической классификации болезней и проблем, связанных со здоровьем. десятого пересмотра (для пользующегося МКБ-10) (утв. Министерством здравоохранения РФ 25 мая 1998 г. № 2000/52-98).
65. Руководство по кодированию причин смерти. М.: ЦНИИОИЗ; 2008. 74 с.
66. Приказ Минздрава РФ от 21.03.2003 № 117 «О реализации "Программы ликвидации кори в российской федерации к 2010 году"» (с приложениями).
67. Петровский Б. В. Энциклопедический словарь медицинских терминов. М.: Изд-во «Советская Энциклопедия»; 1984. 1591 с.
68. Методические указания МУ 3.1.2943-11 «Организация и проведение серологического мониторинга состояния коллективного иммунитета к инфекциям, управляемым средствами специфической профилактики (дифтерия, столбняк, коклюш, корь, краснуха, эпидемический паротит, полиомиелит, гепатит В)». Утверждены и введены в действие Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 15 июля 2011 г.
69. Odland JO, Sergejeva IV, Ivaneev MD, Jensen IP, Stray-Pedersen B. Seropositivity of cytomegalovirus, parvovirus and rubella in pregnant women and recurrent aborters in Leningrad County, Russia. Acta Obstet Gynecol Scand. 2001 Nov; 80 (11): 1025–9.
70. Григорьева Т. Д., Белопольская М. А., Вашукова С. С., Макарова Н. Г., Андреева Н. В. Особенности лабораторных исследований при диагностике краснухи у беременных. Журнал инфектологии, 2014; 6 (3): 44–50.
71. Агафонов А. П., редактор. Эпидемический паротит. Современные представления о возбудителе, клиника, диагностика, профилактика. Новосибирск: Медико-биологический Союз; 2007. 82 с.
72. Отрашевская Е. В., Красильников И. В., Игнатьев Г. М. Изучение спектра и уровня нейтрализующей генотип-специфической активности сывороток детей и подростков, иммунизированных российской паротитной вакциной. Вопросы вирусологии. 2010; 55 (6):15–9.
73. Контарова Е. О. Эффективность вакцинопрофилактики эпидемического паротита на ряде территорий Российской Федерации [диссертация]. М.: Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов имени М. П. Чумакова; 2013.
74. Мукомолов С. Л., Болсун Д. Д., Красняков В. К., Левакова И. А., Грибанов А. Ю., Синявская Е. А. и др. Частота антител к поверхностному и ядерному антигенам вируса гепатита В у населения Санкт-Петербурга в 2013 году. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2014; 5: 43–9.
75. Netesova IG, Swenson PD, Osipova LP, Gubina MA, Posukh OL, Netesov SV. Determination of HBsAg subtypes in Western Siberian part of Russia. J Med Virol. 2003; 71: 183–7.
76. Мануйлов В. А., Нетесова И. Г., Осипова Л. П., Шустов А. В., Баяндин Р. Б., Кочнева Г. В. и др. Генетическая вариабельность изолятов вируса гепатита В у населения Шурышкарского района Ямало-Ненецкого Автономного Округа. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2005; 4: 30–3.
77. Семененко Т. А., Зубкин М. Л., Ярош Л. В., Червинко В. И., Фролова Н. Ф., Суслов А. П. Скрытый гепатит В и мутантные формы вируса гепатита В у реципиентов почечного трансплантата с хроническими заболеваниями печени. Инфекционные болезни. 2016; 14 (3): 6–13. DOI: 10.20953/1729-9225-2016-3-6-13.
78. Centers for Disease Control Prevention (CDC) [Интернет]. Atlanta, GA: CDC [процитировано в сентябре 2017 г.]. Immunization Information Systems (IIS). Доступно по ссылке: https://www.cdc.gov/vaccines/programs/iis/index.html
79. Derrough T, Olsson K, Gianfredi V, Simondon F, Heibel H, Danielsson N, et.al. Immunisation Information Systems – useful tools for monitoring vaccination programmes in EU/EEA countries, 2016. Euro Surveill. 2017; 22 (17): 5–15. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.17.30519.
80. World Health Organisation. European Vaccine Action Plan 2015–2020. Geneva, Switzerland: WHO [процитировано в сентябре 2017 г.]. Доступно по ссылке: http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0007/255679/WHO_EVAP_UK_v30_WEBx.pdf?ua=1
81. Karimi-Busheri F. editor. Biobanking in the 21st Century. Advances in Experimental Medicine and Biology 864. Springer; 2015. DOI: 10.1007/978-3-319-20579-3.
82. Van den Hof S, de Melker HE, Berbers GA, der Kraak PH, Spaendonck MA. Antibodies to Haemophilus influenzae serotype b in the Netherlands a few years after the introduction of routine vaccination. Clin Infect Dis. 2001 Jan; 32 (1): 2–8. DOI: 10.1086/317538.
83. de Melker HE, van den Hof S, Berbers GA, Conyn-van Spaendonck MA. Evaluation of the national immunisation programme in the Netherlands: immunity to diphtheria, tetanus, poliomyelitis, measles, mumps, rubella and Haemophilus influenzae type b. Vaccine. 2003 Jan 30; 21 (7–8): 716–20.
84. Veldhuijzen IK, Conyn-van Spaendonck MA, Dorigo-Zetsma JW. Seroprevalentie van hepatitis B en C in de Nederlandse bevolking. Infectieziekten Bull. 1999; 10: 182–4.
85. Termorshuizen F, Dorigo-Zetsma JW, de Melker HE, van den Hof S, Conyn-van Spaendonck MA. The prevalence of antibodies to hepatitis A virus and its determinants in The Netherlands: a population-based survey. Epidemiol Infect. 2000 Jun; 124 (3): 459–66.
86. Kortbeek LM, de Melker HE, Veldhuijzen IK, Conyn-van Spaendonck MA. Population-based Toxoplasma seroprevalence study in The Netherlands. Epidemiol Infect. 2004 Oct; 132 (5): 839–45.
87. Mollema L, de Melker HE, Hahné SJM, van Weert JWM, Berbers GAM, van der Klis FRM. PIENTER 2-project: second research project on the protection against infectious diseases offered by the national immunization programme in the Netherlands. RIVM report 230421001/2009. Bilthoven, the Netherlands: RIVM; 2009.
88. Theeten H, Hutse V, Hens N, Yavuz Y, Hoppenbrouwers K, Beutels P, et al. Are we hitting immunity targets? The 2006 age-specific seroprevalence of measles, mumps, rubella, diphtheria and tetanus in Belgium. Epidemiol Infect. 2011 Apr; 139 (4): 494–504. DOI: 10.1017/S0950268810001536.
89. Huygen K, Rodeghiero C, Govaerts D, Leroux-Roels I, Melin P, Reynders M, et al. Bordetella pertussis seroprevalence in Belgian adults aged 20–39 years, 2012. Epidemiol Infect. 2014 Apr; 142 (4): 724–8. DOI: 10.1017/S0950268813002458.
90. Poethko-Müller C., Mankertz A. Seroprevalence of measles-, mumps- and rubella-specific IgG antibodies in German children and adolescents and predictors for seronegativity. PLoS One. 2012; 7 (8): e42867. DOI: 10.1371/journal.pone.0042867.
91. Moriuchi T, Otsuka N, Hiramatsu Y, Shibayama K, Kamachi K. A high seroprevalence of antibodies to pertussis toxin among Japanese adults: Qualitative and quantitative analyses. PLoS ONE. 2017 12 (7): e0181181. DOI: 10.1371/journal.pone.0181181.
92. Alsuwaidi AR, Al-Mekaini LA, Kamal SM, Narchi H, Souid AK. Seroprevalence of influenza A and B viruses among unvaccinated children in the United Arab Emirates: a cross-sectional study. BMC Res Notes. 2017 Aug 10; 10 (1): 379. DOI: 10.1186/s13104-017-2720-8.
93. Al-Mekaini LA, Kamal SM, Al-Jabri O, Soliman M, Alshamsi H, Narchi H et al. Seroprevalence of vaccine-preventable diseases among young children in the United Arab Emirates. Int J Infect Dis. 2016 Sep; 50: 67–71. DOI: 10.1016/j.ijid.2016.07.012.
94. Bassal R, Weil M, Cohen D, Sofer D, Mendelson E, Shohat T. Seroprevalence of Hepatitis A Twelve Years After the

Implementation of Toddlers' Vaccination: A Population-Based Study in Israel. Pediatr Infect Dis J. 2017 Oct; 36 (10): e248–e251. DOI: 10.1097/INF.0000000000001640.
95. Alfonso VH, Doshi RH, Mukadi P, Higgins SG, Hoff NA, Bwaka A et al. Prevalence of Rubella Antibodies Among Children in the Democratic Republic of the Congo. Pediatr Infect Dis J. 2017 Jul 19. DOI: 10.1097/INF.0000000000001703.
96. Alberts CJ, Michel A, Bruisten S, Snijder MB, Prins M, Waterboer T et al. High-risk human papillomavirus seroprevalence in men and women of six different ethnicities in Amsterdam, the Netherlands: The HELIUS study. Papillomavirus Res. 2017 Jun; 3: 57–65. DOI: 10.1016/j.pvr.2017.01.003.
97. Palazzo R, Carollo M, Fedele G, Rizzo C, Rota MC, Giammanco A et al. Evidence of increased circulation of Bordetella pertussis in the Italian adult population from seroprevalence data (2012–2013). J Med Microbiol. 2016 Apr 13; 65: 649–57. DOI: 10.1099/jmm.0.000264.
98. Getahun M, Beyene B, Gallagher K, Ademe A, Teshome B, Tefera M et al. Epidemiology of rubella virus cases in the pre-vaccination era of Ethiopia, 2009–2015. BMC Public Health. 2016 Nov 18; 16 (1): 1168. DOI: 10.1186/s12889-016-3841-z.
99. Mayorga O, Bühler S, Jaeger VK, Bally S, Hatz C, Frösner G et al. Single-Dose Hepatitis A Immunization: 7.5-Year Observational Pilot Study in Nicaraguan Children to Assess Protective Effectiveness and Humoral Immune Memory Response. J Infect Dis. 2016 Nov 15; 214 (10): 1498–1506. DOI: 10.1093/infdis/jiw411.
100. Scobie HM, Mao B, Buth S, Wannemuehler KA, Sørensen C, Kannarath C et al. Tetanus Immunity among Women Aged 15 to 39 Years in Cambodia: a National Population-Based Serosurvey, 2012. Clin Vaccine Immunol. 2016 Jul 5; 23 (7): 546–54. DOI: 10.1128/CVI.00052-16.
101. Swart EM, van Gageldonk PG, de Melker HE, van der Klis FR, Berbers GA, Mollema L. Long-Term Protection against Diphtheria in the Netherlands after 50 Years of Vaccination: Results from a Seroepidemiological Study. PLoS One. 2016 Feb 10; 11 (2): e0148605. DOI: 10.1371/journal.pone.0148605.
102. Li X, Chen M, Zhang T, Li J, Zeng Y, Lu L. Seroepidemiology of diphtheria and pertussis in Beijing, China: A cross-sectional study. Hum Vaccin Immunother. 2015; 11 (10): 2434–9. DOI: 10.1080/21645515.2015.1062954.
103. Yonghao G, Jin X, Jun L, Pumei D, Ying Y, Xiuhong F et al. An epidemiological serosurvey of hepatitis B virus shows evidence of declining prevalence due to hepatitis B vaccination in central China. Int J Infect Dis. 2015 Nov; 40: 75–80. DOI: 10.1016/j.ijid.2015.10.002.
104. Reynolds MA, Kruszon-Moran D, Jumaan A, Schmid DS, McQuillan GM. Varicella seroprevalence in the U.S.: data from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999–2004. Public Health Rep. 2010 Nov-Dec; 125 (6): 860–9. DOI: 10.1177/003335491012500613.
105. Lessler J, Metcalf CJE, Cutts FT, Grenfell BT. Impact on Epidemic Measles of Vaccination Campaigns Triggered by Disease Outbreaks or Serosurveys: A Modeling Study. PLoS Med. 2016; 13: 1–14. DOI: 10.1371/journal.pmed.1002144.
106. Edmunds WJ1, Pebody RG, Aggerback H, Baron S, Berbers G, Conyn-van Spaendonck MA et al. The seroepidemiology of diphtheria in western Europe. ESEN Project. European Sero-Epidemiology Network. Epidemiol Infect. 2000; 125: 113–25.
107. Ramsay M1, Gay N, Miller E, Rush M, White J, Morgan-Capner P et al. The epidemiology of measles in England and Wales: rationale for the 1994 national vaccination campaign. Commun Dis Rep CDR Rev. 1994 Nov 11; 4 (12): R141–6.
108. Gay NJ, Hesketh LM, Morgan-Capner P, Miller E. Interpretation of serological surveillance data for measles using mathematical models: implications for vaccine strategy. Epidemiol Infect. 1995; 115 (1): 139–56.
109. Osborne K1, Gay N, Hesketh L, Morgan-Capner P, Miller E. Ten years of serological surveillance in England and Wales: methods, results, implications and action. Int J Epidemiol. 2000; 29: 362–8.
110. Gilbert GL1, Escott RG, Gidding HF, Turnbull FM, Heath TC, McIntyre PB et al. Impact of the Australian Measles Control Campaign on immunity to measles and rubella. Epidemiol Infect. 2001; 127: 297–303.
111. Campbell M. Young adult measles vaccination. Commun Dis Intell. 2000 Aug; 24 (8): 241–2.
112. De Melker HE, van Lier EH. The National Immunisation Programme in the Netherlands; developments in 2008. RIVM report 210021009/2009. Bilthoven, the Netherlands: RIVM; 2009.
113. Markowitz LE, Sternberg M, Dunne EF, McQuillan G, Unger ER. Seroprevalence of human papillomavirus types 6, 11, 16, and 18 in the United States: National Health and Nutrition Examination Survey 2003-2004. J Infect Dis. 2009 Oct 1; 200 (7): 1059–67. DOI: 10.1086/604729.
114. Diedrich S, Weinbrecht A, Schreier E. Seroprevalence and molecular epidemiology of enterovirus 71 in Germany. Arch Virol. 2009; 154 (7): 1139–42. DOI: 10.1007/s00705-009-0413-x.
115. Prins-Van Ginkel AC, Berbers GAM, Grundeken LH, Tcherniaeva I, Wittenberns JI, Elberse K et al. Dynamics and determinants of pneumococcal antibodies specific against 13 vaccine serotypes in the pre-vaccination era. PLoS One. 2016 Jan 21. DOI: 10.1371/journal.pone.0147437.
116. Smits GP, Van Gageldonk PG, Schouls LM, Van der Klis FRM, Berbers GAM. Development of a bead-based multiplex immunoassay for simultaneous quantitative detection of IgG serum antibodies against measles, mumps, rubella, and varicella-zoster virus. Clin. Vaccine Immunol. 2012; 19 (3): 396–400. DOI: 10.1128/CVI.05537-11.
117. Lal G, Balmer P, Stanford E, Martin S, Warrington R, Borrow R. Development and validation of a nonaplex assay for the simultaneous quantitation of antibodies to nine Streptococcus pneumoniae serotypes. J Immunol Methods. 2005 Jan; 296 (1–2): 135–47. DOI: 10.1016/j.jim.2004.11.006.
118. Luminexcorp.com [Интернет]. Luminex Corporation; c2006–2017 [процитировано в сентябре 2017 г.]. The xMAP cookbook. 3rd ed. Доступно по ссылке: http://info.luminexcorp.com/en-us/download-the-xmap-cookbook
119. Biagini RE, Schlottmann SA, Sammons DL, Smith JP, Snawder JC, Striley CA et al. Method for simultaneous measurement of antibodies to 23 pneumococcal capsular polysaccharides. Clin Diagn Lab Immunol. 2003 Sep; 10 (5): 744–50.
120. Wild D, editor. The immunoassay handbook.4th ed. Elsevier; 2013.
121. van Gageldonk PG, van Schaijk FG, van der Klis FR, Berbers GA. Development and validation of a multiplex immunoassay for the simultaneous determination of serum antibodies to Bordetella pertussis, diphtheria and tetanus. J Immunol Methods. 2008 Jun 1; 335 (1–2): 79–89. DOI: 10.1016/j.jim.2008.02.018.
122. Pickering JW, Martins TB, Greer RW, Schroder MC, Astill ME, Litwin CM et al. A multiplexed fluorescent microsphere immunoassay for antibodies to pneumococcal capsular polysaccharides. Am J Clin Pathol. 2002 Apr; 117 (4): 589–96. DOI: 10.1309/4KEH-AGY7-UT5H-41XJ.
123. Pickering JW, Martins TB, Schroder MC, Hill HR. Comparison of a multiplex flow cytometric assay with enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of antibodies to tetanus, diphtheria, and Haemophilus influenzae type b. Clin Diagn Lab Immunol. 2002 Jul; 9 (4): 872–6. DOI: 10.1128/CDLI.9.4.872-876.2002.
124. Elberse KE, Tcherniaeva I, Berbers GA, Schouls LM. Optimization and application of a multiplex bead-based assay to quantify serotype-specific IgG against Streptococcus pneumoniae polysaccharides: response to the booster vaccine after immunization with the pneumococcal 7-valent conjugate vaccine. Clin Vaccine Immunol. 2010 Apr; 17 (4): 674–82. DOI: 10.1128/CVI.00408-09.
125. Brodin P, Davis MM. Human immune system variation. Nat Rev Immunol. 2017; 17: 21–9. DOI: 10.1038/nri.2016.125.
126. Weinberger B, Herndler-Brandstetter D, Schwanninger A, Weiskopf D, Grubeck-Loebenstein B. Biology of immune responses to vaccines in elderly persons. Clin Infect Dis. 2008 Apr 1; 46 (7): 1078–84. DOI: 10.1086/529197.
127. Gibson KL, Wu YC, Barnett Y, Duggan O, Vaughan R, Kondeatis E et al. B-cell diversity decreases in old age and is

correlated with poor health status. Aging Cell. 2009 Feb; 8 (1): 18–25. DOI: 10.1111/j.1474-9726.2008.00443.x.
128. Britanova OV, Shugay M, Merzlyak EM, Staroverov DB, Putintseva EV, Turchaninova MA et al. Dynamics of Individual T Cell Repertoires: From Cord Blood to Centenarians. J Immunol. 2016 Jun 15; 196 (12): 5005–13. DOI: 10.4049/jimmunol.1600005.
129. Gavazzi G, Krause KH. Ageing and infection. Lancet Infect Dis. 2002 Nov; 2 (11): 659–66. DOI: 10.1016/S1473-3099(02)00437-1.
130. Ahmed M, Lanzer KG, Yager EJ, Adams PS, Johnson LL, Blackman MA. Clonal expansions and loss of receptor diversity in the naive CD8 T cell repertoire of aged mice. J Immunol. 2009 Jan 15; 182 (2): 784–92.
131. Chen WH, Kozlovsky BF, Effros RB, Grubeck-Loebenstein B, Edelman R, Sztein MB. Vaccination in the elderly: an immunological perspective. Trends Immunol. 2009 Jul; 30 (7): 351–9. DOI: 10.1016/j.it.2009.05.002.
132. Chen TH, Lee F, Lin YL, Dekker A, Chung WB, Pan CH et at. Differentiation of foot-and-mouth disease-infected pigs from vaccinated pigs using antibody-detecting sandwich ELISA. J Vet Med Sci. 2011 Aug; 73 (8): 977–84.
133. Hollinger FB, Liang TJ. Hepatitis B virus. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Martin MA, Lamb RA, Roizman B. Fields Virology. Vol. 4. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 2001.
134. Qiu J, Wang W, Wu J, Zhang H, Wang Y, Qiao J. Characterization of periplasmic protein BP26 epitopes of Brucella melitensis reacting with murine monoclonal and sheep antibodies. PLoS One. 2012; 7 (3): e34246. DOI: 10.1371/journal.pone.0034246.
135. Tkachuk AP, Gushchin VA, Potapov VD, Demidenko AV, Lunin VG, Gintsburg AL. Multi-subunit BCG booster vaccine GamTBvac: Assessment of immunogenicity and protective efficacy in murine and guinea pig TB models. Cardona P-J, ed. PLoS ONE. 2017; 12 (4): e0176784. DOI: 10.1371/journal.pone.0176784.
136. Carter MJ, Mitchell RM, Sauteur PMM, Kelly DF, Trück J. The antibody-secreting cell response to infection: Kinetics and clinical applications. Front Immunol. 2017 Jun 1; 8: 630. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00630.
137. Whitworth HS, Scott M, Connell DW, Dongés B, Lalvani A. IGRAs--the gateway to T cell based TB diagnosis. Methods. 2013 May 15; 61 (1): 52–62. DOI: 10.1016/j.ymeth.2012.12.012.
138. Huo Z, Peng L. Accuracy of the interferon-γ release assay for the diagnosis of active tuberculosis among HIV-seropositive individuals: a systematic review and meta-analysis. BMC Infect Dis. 2016 Jul 22; 16: 350. DOI: 10.1186/s12879-016-1687.
139. Chattopadhyay PK, Roederer M. A mine is a terrible thing to waste: high content, single cell technologies for comprehensive immune analysis. Am J Transplant. 2015 May; 15 (5): 1155–61. DOI: 10.1111/ajt.13193.
140. Lundberg M, Eriksson A, Tran B, Assarsson E, Fredriksson S. Homogeneous antibody-based proximity extension assays provide sensitive and specific detection of low-abundant proteins in human blood. Nucleic Acids Res. 2011 Aug; 39 (15): e102. DOI: 10.1093/nar/gkr424.
141. Frei AP, Bava FA, Zunder ER, Hsieh EW, Chen SY, Nolan GP et al. Highly multiplexed simultaneous detection of RNAs and proteins in single cells. Nat Methods. 2016 Mar; 13 (3): 269–75. DOI: 10.1038/nmeth.3742.
142. Семененко Т. А. Роль банка сывороток крови в системе биологической безопасности страны. Вестник Росздравнадзора. 2010; (3): 55–8.
143. Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней. Санитарно-эпидемиологические правила». Введены Постановлением главного государственного санитарного врача РФ от 28 января 2008 г. № 4.
144. Методические указания МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I - IV групп патогенности. Методические указания». М.: Роспотребнадзор; 2009. 42 с.
145. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика; 1999. 462 с.
146. Фельдблюм И. В. Вакцинопрофилактика как жизнесберегающая технология и инструмент демографической политики. Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2011; 2: 12–7.
147. Семененко Т. А., Русакова Е. В., Щербаков А. Г., Гайдаренко А. Д., Готвянская Т. П., Евсеева Л. Ф. и др. Состояние популяционного иммунитета в отношении управляемых инфекций (по материалам Банка сывороток крови). Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2012; 6: 10–5.
148. Mollema L, Smits GP, Berbers GA, Van Der Klis FR, Van Binnendijk RS, De Melker HE et al. High risk of a large measles outbreak despite 30 years of measles vaccination in The Netherlands. Epidemiol Infect. 2014 May; 142 (5): 1100–8. DOI: 10.1017/S0950268813001532.
149. Mroz T, Mancini D, Popkin BM. Monitoring Economic Conditions in the Russian Federation: The Russia Longitudinal Monitoring Survey 1992–1998. Report. Chapel Hill, N. C.: Carolina Population Center; 1999.
150. Бойцов С. А., Чазов Е. И., Шляхто Е. В., Шальнова С. А., Конради А. О., Карпов Ю. А. и др. Эпидемиология сердечно-сосудистых заболеваний в различных регионах России (ЭССЕ-РФ). Обоснование и дизайн исследования. Профилактическая медицина. 2013; 16 (6): 25–34.
151. Centers for Disease Control Prevention (CDC) [Интернет]. Atlanta, GA: CDC [процитировано в сентябре 2017 г.]. National Health and Nutrition Examination Survey. Доступно по ссылке: https://www.cdc.gov/nchs/nhanes/index.htm
152. Wu JT, Ho A, Ma ES, Lee CK, Chu DK, Ho PL et al. Estimating infection attack rates and severity in real time during an influenza pandemic: analysis of serial cross-sectional serologic surveillance data. PLoS Med. 2011 Oct; 8 (10): e1001103. DOI: 10.1371/journal.pmed.1001103.
153. Seroepidemiological studies of pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus. Wkly Epidemiol Rec. 2010 Jun 11; 85 (24): 229–35. PMID:20545056.
154. Семенов Б. Ф., Зверев В. В., Хаитов Р. М. Ожидаемые события в развитии вакцинопрофилактики до 2020–2030 гг. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2010; 2: 105–11.
155. Шаханина И. Л., Радуто О. И., Осипова Л. А., Приказчикова Г. С. Экономическая эффективность вакцинопрофилактики: методика оценки. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2004; (3): 12–6.
156. Методические указания МУ 3.3.1878-04 «Иммунопрофилактика инфекционных болезней. Экономическая эффективность вакцинопрофилактики. Методические указания». Утверждены главным государственным санитарным врачом РФ 4 марта 2004 г.
157. Бектимиров Т. А. Экономические приоритеты вакцинопрофилактики – опыт разных стран. Бюллетень «Вакцинация. Новости вакцинопрофилактики». 2000; 1 (7): 14–20.

References

1. Sheerin D, Openshaw PJ, Pollard AJ. Issues in vaccinology: Present challenges and future directions. Eur J Immunol. 2017 Sep 1. DOI: 10.1002/eji.201746942.
2. World Health Organization [Internet]. Geneva, Switzerland: c2017– [cited 2017 Sep] The top 10 causes of death. Fact sheet 2015. Available from: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/ru/index1.html
3. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2016. 21th ed. France: World Health Organisation; 2016. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/250441/1/9789241565394-eng.pdf
4. who.int [Internet]. Geneva, Switzerland: World Health Organization; c2017– [cited 2017 Sep]. Available from: http://www.who.int/ru/
5. van der Klis FR, Mollema L, Berbers GA, de Melker HE,

Coutinho RA. Second national serum bank for population-based seroprevalence studies in the Netherlands. Neth J Med. 2009; Jul-Aug; 67 (7): 301–8.
6. De Melker HE, Conyn-Van Spaendonck MAE. Immunosurveillance and the evaluation of national immunization programmes: a population-based approach. Epidemiol Infect. 1998; 121 (3): 637–43. DOI: 10.1017/S0950268898001587.
7. Cesaro S, Giacchino M, Fioredda F, Barone A, Battisti L, Bezzio S et al. Guidelines on vaccinations in paediatric haematology and oncology patients. Biomed Res Int. 2014: 707691. DOI: 10.1155/2014/707691.
8. Xu GJ, Kula T, Xu Q, Li MZ, Vernon SD, Ndung'u T et al. Viral immunology. Comprehensive serological profiling of human populations using a synthetic human virome. Science. 2015 Jun 5; 348 (6239): aaa0698. DOI: 10.1126/science.aaa0698.
9. Wolfe RM. Update on adult immunizations. J Am Board Fam Med. 2012 Jul-Aug; 25(4): 496–510. DOI: 10.3122/jabfm.2012.04.100274.
10. Fine P, Eames K, Heymann DL. "Herd immunity": A rough guide. Clin Infect Dis. 2011 Apr1; 52 (7): 911–6. DOI: 10.1093/cid/cir007.
11. Martin V, Bryan Wu YC, Kipling D, Dunn-Walters D. Ageing of the B-cell repertoire. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2015 Sep 5; 370 (1676). pii: 20140237. DOI: 10.1098/rstb.2014.0237.
12. Chao DL, Dimitrov DT. Seasonality and the effectiveness of mass vaccination. Math Biosci Eng. 2016 Apr 1; 13 (2): 249–59. DOI: 10.3934/mbe.2015001.
13. Wilson SE, Deeks SL, Hatchette TF, Crowcroft NS. The role of seroepidemiology in the comprehensive surveillance of vaccine-preventable diseases. CMAJ. 2012 Jan 10; 184 (1): E70–6. DOI: 10.1503/cmaj.110506.
14. Kotok A. Besposhchadnaya immunizatsiya. Moscow: Izd-vo «Gomeopaticheskaya Meditsina»; 2004. 448 p. Russian.
15. Mikhail Gel'fand. V voprose vaktsinatsii gosudarstvo dolzhno vesti sebya kak prosveshchennyy diktator. Snob [Internet]. 2017 Sep 19. Available from: https://snob.ru/selected/entry/129150?utm_source=push&utm_medium=push_notification&utm_campaign=breaking&utm_content=article
16. Mats AN. [Information for physicians of the anti-vaccination movement and its myth in mass media]. Pediatric Pharmacology. 2009; 6 (6): 12–35. Russian.
17. World Health Organization [Internet]. Geneva, Switzerland: c2017– [cited 2017 Sep]. Questions and answers on immunization and vaccine safety. Online Q&A. 2016 March. Available from: http://www.who.int/features/qa/84/ru/. Russian.
18. Bocquier A, Ward J, Raude J, Peretti-Watel P, Verger P. Socioeconomic differences in childhood vaccination in developed countries: a systematic review of quantitative studies. Expert Rev Vaccines. 2017. DOI: 10.1080/14760584.2017.1381020. Epub 2017 Sep 21.
19. Schoeppe J, Cheadle A, Melton M, Faubion T, Miller C, Matthys J et al. The Immunity Community: A Community Engagement Strategy for Reducing Vaccine Hesitancy. Health Promot Pract. 2017 Sep; 18 (5): 654–61. DOI: 10.1177/1524839917697303.
20. Caboré RN, Piérard D, Huygen K. A Belgian Serosurveillance/Seroprevalence Study of Diphtheria, Tetanus and Pertussis Using a Luminex xMAP Technology-Based Pentaplex. Vaccines (Basel). 2016 May 10; 4 (2). pii: E16. DOI: 10.3390/vaccines4020016.
21. Metcalf CJ, Farrar J, Cutts FT, Basta NE, Graham AL, Lessler J et al. Use of serological surveys to generate key insights into the changing global landscape of infectious disease. Lancet. 2016 Aug 13; 388 (10045): 728–30. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)30164-7.
22. Giammanco A, Chiarini A, Stroffolini T, De Mattia D, Chiaramonte M, Moschen ME, et al. Seroepidemiology of pertussis in Italy. Rev Infect Dis. 1991 Nov-Dec; 13 (6): 1216–20.
23. Osnovy gosudarstvennoy politiki v oblasti obespecheniya khimicheskoy i biologicheskoy bezopasnosti Rossiyskoy Federatsii na period do 2025 goda i dal'neyshuyu perspektivu (approves by the President of the Russian Federation, 2013 Nov 1, no. Pr-2573). Russian.
24. Decree of the Government of the Russian Federation from 15.12.2014 no. 2561-r "Ob utverzhdenii kontseptsii federal'noy tselevoy programmy "Natsional'naya sistema khimicheskoy i biologicheskoy bezopasnosti Rossiyskoy Federatsii (2015–2020 gody)". Russian.
25. Fletcher R, Fletcher S, Vagner E. Klinicheskaya epidemiologiya: Osnovy dokazatel'noy meditsiny. Moscow: Media-Sfera; 1998. 346 p. Russian.
26. Pokrovskiy VI, Briko NI. Epidemiologiya. Uchebnik. Moscow: GEOTAR-Media; 2016. 368 p. Russian.
27. Order of the Federal Agency of Statistics of the Russian Federation from 28.01.2014 no. 52 "Ob utverzhdenii statisticheskogo instrumentariya dlya organizatsii Federal'noy sluzhboy po nadzoru v sfere zashchity prav potrebiteley i blagopoluchiya cheloveka federal'nogo statisticheskogo nablyudeniya za zabolevaemost'yu naseleniya infektsionnymi i parazitarnymi boleznyami i profilakticheskimi privivkami". Russian.
28. Order of the Federal Agency of Statistics of the Russian Federation from 16.09.2016 no. 518 "Ob utverzhdenii statisticheskogo instrumentariya dlya organizatsii Federal'noy sluzhboy po nadzoru v sfere zashchity prav potrebiteley i blagopoluchiya cheloveka federal'nogo statisticheskogo nablyudeniya za profilakticheskimi privivkami protiv infektsionnykh zabolevaniy". Russian.
29. Federal law from 17.09.1998 no. 157-FZ "Ob immunoprofilaktike infektsionnykh bolezney" (edition from 19.12.2016). Russian.
30. Order of the Ministry of Health of the Russian Federation from 21.03.2014 no. 125n "Ob utverzhdenii natsional'nogo kalendarya profilakticheskikh privivok i kalendarya profilakticheskikh privivok po epidemicheskim pokazaniyam" (with changes on 13.04.2017). Russian.
31. Briko NI. [Assessment of immunoprophylaxis quality and efficiency]. Lechashchiy vrach [Internet]. 2012; (10). Available from: https://www.lvrach.ru/2012/10/15435557/. Russian.
32. Decree of the Government of the Russian Federation from 30.06.2004 № 322 "Ob utverzhdenii Polozheniya o Federal'noy sluzhbe po nadzoru v sfere zashchity prav potrebiteley i blagopoluchiya cheloveka" (edition from 24.01.2017, with supplements). Russian.
33. Sanitary and Epidemiological Rules SP 3.3.2367-08 "Organizatsiya immunoprofilaktiki infektsionnykh bolezney". Approved with Decree of the Chief Sanitary Officer of the Russian Federation from 04.06.2008 no. 34. Implemented from 01.09.2008. Russian.
34. O sostoyanii sanitarno-epidemiologicheskogo blagopoluchiya naseleniya v Rossiyskoy Federatsii v 2016 godu: Gosudarstvennyy doklad. Moscow: Federal'naya sluzhba po nadzoru v sfere zashchity prav potrebiteley i blagopoluchiya cheloveka; 2017. 220 p. Russian.
35. Tsvirkun OV. Epidemicheskiy protsess kori v razlichnye periody vaktsinoprofilaktiki [dissertation]. Moscow, Russia: Central Research Institute of Epidemiology; 2014. Russian.
36. Sanitary and Epidemiological Rules SP 3.1.2952-11 "Profilaktika kori, krasnukhi i epidemicheskogo parotita". Approved with Decree of the Chief Sanitary Officer of the Russian Federation from 28.07.2011 no. 108. Russian.
37. Watson JC, Hadler SC, Dykewicz CA, Reef S, Phillips L. Measles, mumps and rubella – vaccine use and strategies for elimination of measles, rubella, and congenital rubella and control of mumps; recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). MMWR Recomm Rep. 1998 May 22; 47 (RR-8): 1–57.
38. McLean HQ, Fiebelkorn AP, Temte JL, Wallace GS; Centers for Disease Control and Prevention. Prevention of measles, rubella, congenital rubella syndrome, and mumps, 2013: summary recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). MMWR Recomm Rep. 2013 Jun 14; 62 (RR-04): 1–34.
39. World Health Organization. Europe launches plan for accelerated action to eliminate measles and rubella. Copenhagen, Denmark: WHO Regional Office for Europe; 2013. Available from: http://www.euro.who.int/en/health-topics/communicable-diseases/measles-andrubella/news/news/2013/09/whoeurope-launches-plan-for-accelerated-action-toeliminate-measles-and-rubella
40. Order of the Ministry of Health of the Russian Federation from 03.06.1996 no. 226/79 "O vvedenii profilakticheskix privivok

protiv gepatita V". Russian.
41. Order of the Ministry of Health of the Russian Federation from 27.06.2001 no. 229 "O natsional'nom kalendare profilakticheskikh privivok i kalendare profilakticheskikh privivok po epidemicheskim pokazaniyam". Russian.
42. O sostoyanii sanitarno-epidemiologicheskogo blagopoluchiya naseleniya v Rossiyskoy Federatsii v 2012 godu: Gosudarstvennyy doklad. Moscow: Federal'naya sluzhba po nadzoru v sfere zashchity prav potrebiteley i blagopoluchiya cheloveka; 2013. 176 p. Russian.
43. Demograficheskiy ezhegodnik Rossii 2015. Stat. sb. Moscow: Rosstat; 2015. 263 p. Russian.
44. Povestka soveshchaniya "Ob itogakh realizatsii prioritetnogo natsional'nogo proekta v sfere zdravookhraneniya v 2007 godu i khode realizatsii v 2008 godu" ot 14 iyulya 2008 goda. Protokol celektornogo soveshchaniya u Rukovoditelya Federal'noy sluzhby po nadzoru v sfere zashchity prav potrebiteley i blagopoluchiya cheloveka, Glavnogo gosudarstvennogo sanitarnogo vracha Rossiyskoy Federatsii G. G. Onishchenko. Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika. 2008; 4 (41): 32–4. Russian.
45. Onishchenko GG, Merkulov IV, Petrov EYu, Zhelobov VE, Shevchuk NA, Seledtsova OV. O khode immunizatsii naseleniya v ramkakh natsional'nogo kalendarya profilakticheskikh privivok. Protokol selektornogo soveshchaniya u rukovoditelya Federal'noy sluzhby po nadzoru v sfere zashchity prav potrebiteley i blagopoluchiya cheloveka (Protokol no. 13 ot 20.07.2010). Russian.
46. Statisticheskiy uchet i otchetnost' uchrezhdeniy zdravookhraneniya. Moscow: Ministerstvo zdravookhraneniya i sotsial'nogo razvitiya Rossiyskoy Federatsii; 2006. 81 p. Russian.
47. Form no. 058/u "Ekstrennoe izveshchenie ob infektsionnom zabolevanii, pishchevom, ostrom professional'nom otravlenii, neobychnoy reaktsii na privivku". Approved with Order of the Ministry of Healths of USSR from 04.10.80 no. 1030 (edition from 31.12.2002) "Ob utverzhdenii form pervichnoy meditsinskoy dokumentatsii uchrezhdeniy zdravookhraneniya". Russian.
48. O pravomochnosti deystviya prikaza Minzdrava SSSR ot 4 oktyabrya 1980 goda no. 1030 "Ob utverzhdenii form pervichnoy meditsinskoy dokumentatsii uchrezhdeniy zdravookhraneniya". Letter of the Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation from 30.11.2009 no. 14-6/242888. Russian.
49. Kishkun AA, Arsenin SL. Osnovnye napravleniya reformirovaniya laboratornoy sluzhby Rossii. Meditsinskiy alfavit. 2011; 4: 4–10. Russian.
50. O sostoyanii sanitarno-epidemiologicheskogo blagopoluchiya naseleniya v Rossiyskoy Federatsii v 2015 godu: Gosudarstvennyy doklad. Moscow: Federal'naya sluzhba po nadzoru v sfere zashchity prav potrebiteley i blagopoluchiya cheloveka; 2016. 200 p. Russian.
51. Rolfes MA, Foppa IM, Garg S, Flannery B, Brammer L, Singleton JA et al. Estimated Influenza Illnesses, Medical Visits, Hospitalizations, and Deaths Averted by Vaccination in the United States. Centers for Disease Control and Prevention [Internet]. [updated 2017 Apr 19] Available from: https://www.cdc.gov/flu/about/disease/2015-16.htm
52. Nakamura Y, Sugawara T, Kawanohara H, Ohkusa Y, Kamei M, Oishi K. Evaluation of estimated number of influenza patients from national sentinel surveillance using the national database of electronic medical claims. Jpn J Infect Dis. 2015; 68 (1): 27–9. DOI: 10.7883/yoken.JJID.2014.092.
53. Murakami Y, Hashimoto S, Kawado M, Ohta A, Taniguchi K, Sunagawa T, et al. Estimated number of patients with influenza A(H1)pdm09, or other viral types, from 2010 to 2014 in Japan. PLoS One. 2016; 11 (1): e0146520. DOI: 10.1371/journal.pone.0146520.
54. Zaraket H, Saito R. Japanese Surveillance Systems and Treatment for Influenza. Curr Treat Options Infect Dis. 2016; 8 (4): 311–28. DOI: 10.1007/s40506-016-0085-5.
55. Sanitary and Epidemiological Rules SP 3.1.2.3117-13 "Profilaktika grippa i drugikh ostrykh respiratornykh virusnykh infektsiy". Approved with Decree of the Chief Sanitary Officer of the Russian Federation from 18.11.2013 no. 63. Russian.
56. Hyams K.C. Risks of chronicity following acute hepatitis B virus infection: a review. Clin Infect Dis. 1995; 20 (4): 992–1000.
57. Methodic Guide MU 3.1.2792-10 «3.1. Profilaktika infektsionnykh bolezney. Epidemiologicheskiy nadzor za gepatitom B». Approved and implemented by the Chief Sanitary Officer of the Russian Federation from 2010 Dec 20. Russian.
58. World Health Organization [Internet]. Geneva, Switzerland: c2017– [cited 2017 Sep] Global'naya strategiya sektora zdravookhraneniya po virusnomu gepatitu 2016–2021. Na puti k likvidatsii virusnogo gepatita. VOZ, iyun' 2016. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/250042/1/WHO-HIV-2016.06-rus.pdf. Russian.
59. Vyazov SO, Kompaniets AA, Anan'ev VA, Listovskaya EK, Dardik FG, Pirozhkova ZP. Vyyavlenie HBsAg anti-HBs u zdorovogo naseleniya razlichnykh gorodov SSSR. Voprosy virusologii. 1985; 2: 231–3. Russian.
60. Somova AV, Golosova TV, Margolina AN, Bagryantseva SYu. Serodiagnostika virusnykh gepatitov C i B sredi razlichnykh grupp naseleniya. Voprosy virusologii. 1992; 4: 105–7. Russian.
61. Shakhgil'dyan IV, Mikhaylov MI, Onishchenko GG. Parenteral'nye virusnye gepatity (epidemiologiya, diagnostika, profilaktika). Moscow: GOU VUNMTs; 2003. 384 p. Russian.
62. Manuilov VA, Osipova LP, Netesova IG, Chub EV, Bezuglova LV, Norder H et al. [Prevalence of HBsAg and genotypes of native population groups of Siberia]. Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya. 2015; 1: 28–35. Russian.
63. Ray Kim W. Epidemiology of Hepatitis B in the United States. Hepatology. 2009; 49 (5): 28–34.
64. International Classifications of Diseases, 10th Revision, 1989. Recommended for use in the Russian Federation with instruction "Instruktsiya po ispol'zovaniyu Mezhdunarodnoy statisticheskoy klassifikatsii bolezney i problem, svyazannykh so zdorov'em, desyatogo peresmotra (dlya pol'zuyushchegosya MKB-10)" (approved by the Ministry of Health of the Russian Federation from 25.05.1998 no. 2000/52-98). Russian.
65. Rukovodstvo po kodirovaniyu prichin smerti. Moscow: TsNIIOIZ; 2008. 74 p. Russian.
66. Order of the Ministry of Health of the Russian Federation from 21.03.2003 no. 117 "O realizatsii "Programmy likvidatsii kori v rossiyskoy federatsii k 2010 godu" (s prilozheniyami). Russian.
67. Petrovskiy BV. Entsiklopedicheskiy slovar' meditsinskikh terminov. Moscow: Izd-vo "Sovetskaya Entsiklopediya"; 1984. 1591 p. Russian.
68. Methodic Guide MU 3.1.2943-11 "Organizatsiya i provedenie serologicheskogo monitoringa sostoyaniya kollektivnogo immuniteta k infektsiyam, upravlyaemym sredstvami spetsificheskoy profilaktiki (difteriya, stolbnyak, koklyush, kor', krasnukha, epidemicheskiy parotit, poliomielit, gepatit B)". Approved and implemented by the Chief Sanitary Officer of the Russian Federation from 15.07.2011. Russian.
69. Odland JO, Sergejeva IV, Ivaneev MD, Jensen IP, Stray-Pedersen B. Seropositivity of cytomegalovirus, parvovirus and rubella in pregnant women and recurrent aborters in Leningrad County, Russia. Acta Obstet Gynecol Scand. 2001 Nov; 80 (11): 1025–9.
70. Grigor'eva TD, Belopol'skaya MA, Vashukova SS, Makarova NG, Andreeva NV. [Features of laboratory tests for diagnosis of rubella in pregnant women]. Zhurnal infektologii, 2014; 6 (3): 44–50. Russian.
71. Agafonov AP, editor. Epidemicheskiy parotit. Sovremennye predstavleniya o vozbuditele, klinika, diagnostika, profilaktika. Novosibirsk: Mediko-biologicheskiy Soyuz; 2007. 82 p. Russian.
72. Otrashevskaya EV, Krasil'nikov IV, Ignat'ev GM. [Investigation of genotype-specific serum neutralizing activity in children and adolescents immunized with Russian mumps vaccine]. Voprosy virusologii. 2010; 55 (6):15–9. Russian.
73. Kontarova E.O. Effektivnost' vaktsinoprofilaktiki epidemicheskogo parotita na ryade territoriy Rossiyskoy Federatsii [dissertatsiya]. Moscow, Russia: Chumakov Research Center for Poliomyelitis and Viral Encephalitis; 2013. Russian.
74. Mukomolov SL, Bolsun DD, Krasnyakov VK, Levakova IA, Gribanov AYu et al. [Frequency of antibodies against surface and nuclear antigens of hepatitis B virus in population of St. Petersburg in 2013]. Journal of Microbiology, Epidemiology and

Immunobiology. 2014; 5: 43–9. Russian.
75. Netesova IG, Swenson PD, Osipova LP, Gubina MA, Posukh OL, Netesov SV. Determination of HBsAg subtypes in Western Siberian part of Russia. J Med Virol. 2003; 71: 183–7.
76. Manuilov VA, Netesova IG, Osipova LP, Shustov AV, Bayandin RB, Kochneva GV et al. [Genetic variability of hepatitis B virus isolates among population of Shuryshkarsky district of Yamal-Nenets autonomous region]. Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya. 2005; 4: 30-34. Russian.
77. Semenenko TA, Zubkin ML, Yarosh LV, Chervinko VI, Frolova NF, Suslov AP. [Latent hepatitis B and mutant forms hepatitis B virus in kidney transplant recipients with chronic liver diseases]. 2016; 14 (3): 6–13. DOI: 10.20953/1729-9225-2016-3-6-13. Russian.
78. Centers for Disease Control Prevention (CDC) [Internet]. Atlanta, GA: CDC [cited 2017 Sep]. Immunization Information Systems (IIS). Available from: https://www.cdc.gov/vaccines/programs/iis/index.html
79. Derrough T, Olsson K, Gianfredi V, Simondon F, Heibel H, Danielsson N, et.al. Immunisation Information Systems – useful tools for monitoring vaccination programmes in EU/EEA countries, 2016. Euro Surveill. 2017; 22 (17): 5–15. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.17.30519.
80. World Health Organisation. European Vaccine Action Plan 2015–2020. Geneva, Switzerland: WHO [cites 2017 Sep]. Available from: http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0007/255679/WHO_EVAP_UK_v30_WEBx.pdf?ua=1
81. Karimi-Busheri F. editor. Biobanking in the 21st Century. Advances in Experimental Medicine and Biology 864. Springer; 2015. DOI: 10.1007/978-3-319-20579-3.
82. Van den Hof S, de Melker HE, Berbers GA, der Kraak PH, Spaendonck MA. Antibodies to Haemophilus influenzae serotype b in the Netherlands a few years after the introduction of routine vaccination. Clin Infect Dis. 2001 Jan; 32 (1): 2–8. DOI: 10.1086/317538.
83. de Melker HE, van den Hof S, Berbers GA, Conyn-van Spaendonck MA. Evaluation of the national immunisation programme in the Netherlands: immunity to diphtheria, tetanus, poliomyelitis, measles, mumps, rubella and Haemophilus influenzae type b. Vaccine. 2003 Jan 30; 21 (7–8): 716–20.
84. Veldhuijzen IK, Conyn-van Spaendonck MA, Dorigo-Zetsma JW. Seroprevalentie van hepatitis B en C in de Nederlandse bevolking. Infectieziekten Bull. 1999; 10: 182–4.
85. Termorshuizen F, Dorigo-Zetsma JW, de Melker HE, van den Hof S, Conyn-van Spaendonck MA. The prevalence of antibodies to hepatitis A virus and its determinants in The Netherlands: a population-based survey. Epidemiol Infect. 2000 Jun; 124 (3): 459–66.
86. Kortbeek LM, de Melker HE, Veldhuijzen IK, Conyn-van Spaendonck MA. Population-based Toxoplasma seroprevalence study in The Netherlands. Epidemiol Infect. 2004 Oct; 132 (5): 839–45.
87. Mollema L, de Melker HE, Hahné SJM, van Weert JWM, Berbers GAM, van der Klis FRM. PIENTER 2-project: second research project on the protection against infectious diseases offered by the national immunization programme in the Netherlands. RIVM report 230421001/2009. Bilthoven, the Netherlands: RIVM; 2009.
88. Theeten H, Hutse V, Hens N, Yavuz Y, Hoppenbrouwers K, Beutels P, et al. Are we hitting immunity targets? The 2006 age-specific seroprevalence of measles, mumps, rubella, diphtheria and tetanus in Belgium. Epidemiol Infect. 2011 Apr; 139 (4): 494–504. DOI: 10.1017/S0950268810001536.
89. Huygen K, Rodeghiero C, Govaerts D, Leroux-Roels I, Melin P, Reynders M, et al. Bordetella pertussis seroprevalence in Belgian adults aged 20–39 years, 2012. Epidemiol Infect. 2014 Apr; 142 (4): 724–8. DOI: 10.1017/S0950268813002458.
90. Poethko-Müller C., Mankertz A. Seroprevalence of measles-, mumps- and rubella-specific IgG antibodies in German children and adolescents and predictors for seronegativity. PLoS One. 2012; 7 (8): e42867. DOI: 10.1371/journal.pone.0042867.
91. Moriuchi T, Otsuka N, Hiramatsu Y, Shibayama K, Kamachi K. A high seroprevalence of antibodies to pertussis toxin among Japanese adults: Qualitative and quantitative analyses. PLoS ONE. 2017 12 (7): e0181181. DOI: 10.1371/journal.pone.0181181.
92. Alsuwaidi AR, Al-Mekaini LA, Kamal SM, Narchi H, Souid AK. Seroprevalence of influenza A and B viruses among unvaccinated children in the United Arab Emirates: a cross-sectional study. BMC Res Notes. 2017 Aug 10; 10 (1): 379. DOI: 10.1186/s13104-017-2720-8.
93. Al-Mekaini LA, Kamal SM, Al-Jabri O, Soliman M, Alshamsi H, Narchi H et al. Seroprevalence of vaccine-preventable diseases among young children in the United Arab Emirates. Int J Infect Dis. 2016 Sep; 50: 67–71. DOI: 10.1016/j.ijid.2016.07.012.
94. Bassal R, Weil M, Cohen D, Sofer D, Mendelson E, Shohat T. Seroprevalence of Hepatitis A Twelve Years After the Implementation of Toddlers' Vaccination: A Population-Based Study in Israel. Pediatr Infect Dis J. 2017 Oct; 36 (10): e248–e251. DOI: 10.1097/INF.0000000000001640.
95. Alfonso VH, Doshi RH, Mukadi P, Higgins SG, Hoff NA, Bwaka A et al. Prevalence of Rubella Antibodies Among Children in the Democratic Republic of the Congo. Pediatr Infect Dis J. 2017 Jul 19. DOI: 10.1097/INF.0000000000001703.
96. Alberts CJ, Michel A, Bruisten S, Snijder MB, Prins M, Waterboer T et al. High-risk human papillomavirus seroprevalence in men and women of six different ethnicities in Amsterdam, the Netherlands: The HELIUS study. Papillomavirus Res. 2017 Jun; 3: 57–65. DOI: 10.1016/j.pvr.2017.01.003.
97. Palazzo R, Carollo M, Fedele G, Rizzo C, Rota MC, Giammanco A et al. Evidence of increased circulation of Bordetella pertussis in the Italian adult population from seroprevalence data (2012–2013). J Med Microbiol. 2016 Apr 13; 65: 649–57. DOI: 10.1099/jmm.0.000264.
98. Getahun M, Beyene B, Gallagher K, Ademe A, Teshome B, Tefera M et al. Epidemiology of rubella virus cases in the pre-vaccination era of Ethiopia, 2009–2015. BMC Public Health. 2016 Nov 18; 16 (1): 1168. DOI: 10.1186/s12889-016-3841-z.
99. Mayorga O, Bühler S, Jaeger VK, Bally S, Hatz C, Frösner G et al. Single-Dose Hepatitis A Immunization: 7.5-Year Observational Pilot Study in Nicaraguan Children to Assess Protective Effectiveness and Humoral Immune Memory Response. J Infect Dis. 2016 Nov 15; 214 (10): 1498–1506. DOI: 10.1093/infdis/jiw411.
100. Scobie HM, Mao B, Buth S, Wannemuehler KA, Sørensen C, Kannarath C et al. Tetanus Immunity among Women Aged 15 to 39 Years in Cambodia: a National Population-Based Serosurvey, 2012. Clin Vaccine Immunol. 2016 Jul 5; 23 (7): 546–54. DOI: 10.1128/CVI.00052-16.
101. Swart EM, van Gageldonk PG, de Melker HE, van der Klis FR, Berbers GA, Mollema L. Long-Term Protection against Diphtheria in the Netherlands after 50 Years of Vaccination: Results from a Seroepidemiological Study. PLoS One. 2016 Feb 10; 11 (2): e0148605. DOI: 10.1371/journal.pone.0148605.
102. Li X, Chen M, Zhang T, Li J, Zeng Y, Lu L. Seroepidemiology of diphtheria and pertussis in Beijing, China: A cross-sectional study. Hum Vaccin Immunother. 2015; 11 (10): 2434–9. DOI: 10.1080/21645515.2015.1062954.
103. Yonghao G, Jin X, Jun L, Pumei D, Ying Y, Xiuhong F et al. An epidemiological serosurvey of hepatitis B virus shows evidence of declining prevalence due to hepatitis B vaccination in central China. Int J Infect Dis. 2015 Nov; 40: 75–80. DOI: 10.1016/j.ijid.2015.10.002.
104. Reynolds MA, Kruszon-Moran D, Jumaan A, Schmid DS, McQuillan GM. Varicella seroprevalence in the U.S.: data from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999–2004. Public Health Rep. 2010 Nov-Dec; 125 (6): 860–9. DOI: 10.1177/003335491012500613.
105. Lessler J, Metcalf CJE, Cutts FT, Grenfell BT. Impact on Epidemic Measles of Vaccination Campaigns Triggered by Disease Outbreaks or Serosurveys: A Modeling Study. PLoS Med. 2016; 13: 1–14. DOI: 10.1371/journal.pmed.1002144.
106. Edmunds WJ1, Pebody RG, Aggerback H, Baron S, Berbers G, Conyn-van Spaendonck MA et al. The seroepidemiology of diphtheria in western Europe. ESEN Project. European Sero-Epidemiology Network. Epidemiol Infect. 2000; 125: 113–25.
107. Ramsay M1, Gay N, Miller E, Rush M, White J, Morgan-

Capner P et al. The epidemiology of measles in England and Wales: rationale for the 1994 national vaccination campaign. Commun Dis Rep CDR Rev. 1994 Nov 11; 4 (12): R141–6.
108. Gay NJ, Hesketh LM, Morgan-Capner P, Miller E. Interpretation of serological surveillance data for measles using mathematical models: implications for vaccine strategy. Epidemiol Infect. 1995; 115 (1): 139–56.
109. Osborne K1, Gay N, Hesketh L, Morgan-Capner P, Miller E. Ten years of serological surveillance in England and Wales: methods, results, implications and action. Int J Epidemiol. 2000; 29: 362–8.
110. Gilbert GL1, Escott RG, Gidding HF, Turnbull FM, Heath TC, McIntyre PB et al. Impact of the Australian Measles Control Campaign on immunity to measles and rubella. Epidemiol Infect. 2001; 127: 297–303.
111. Campbell M. Young adult measles vaccination. Commun Dis Intell. 2000 Aug; 24 (8): 241–2.
112. De Melker HE, van Lier EH. The National Immunisation Programme in the Netherlands; developments in 2008. RIVM report 210021009/2009. Bilthoven, the Netherlands: RIVM; 2009.
113. Markowitz LE, Sternberg M, Dunne EF, McQuillan G, Unger ER. Seroprevalence of human papillomavirus types 6, 11, 16, and 18 in the United States: National Health and Nutrition Examination Survey 2003-2004. J Infect Dis. 2009 Oct 1; 200 (7): 1059–67. DOI: 10.1086/604729.
114. Diedrich S, Weinbrecht A, Schreier E. Seroprevalence and molecular epidemiology of enterovirus 71 in Germany. Arch Virol. 2009; 154 (7): 1139–42. DOI: 10.1007/s00705-009-0413-x.
115. Prins-Van Ginkel AC, Berbers GAM, Grundeken LH, Tcherniaeva I, Wittenberns JI, Elberse K et al. Dynamics and determinants of pneumococcal antibodies specific against 13 vaccine serotypes in the pre-vaccination era. PLoS One. 2016 Jan 21. DOI: 10.1371/journal.pone.0147437.
116. Smits GP, Van Gageldonk PG, Schouls LM, Van der Klis FRM, Berbers GAM. Development of a bead-based multiplex immunoassay for simultaneous quantitative detection of IgG serum antibodies against measles, mumps, rubella, and varicella-zoster virus. Clin. Vaccine Immunol. 2012; 19 (3): 396–400. DOI: 10.1128/CVI.05537-11.
117. Lal G, Balmer P, Stanford E, Martin S, Warrington R, Borrow R. Development and validation of a nonaplex assay for the simultaneous quantitation of antibodies to nine Streptococcus pneumoniae serotypes. J Immunol Methods. 2005 Jan; 296 (1–2): 135–47. DOI: 10.1016/j.jim.2004.11.006.
118. Luminexcorp.com [Internet]. Luminex Corporation; c2006–2017 [cited 2017 Sep]. The xMAP cookbook. 3rd ed. Available from: http://info.luminexcorp.com/en-us/download-the-xmap-cookbook
119. Biagini RE, Schlottmann SA, Sammons DL, Smith JP, Snawder JC, Striley CA et al. Method for simultaneous measurement of antibodies to 23 pneumococcal capsular polysaccharides. Clin Diagn Lab Immunol. 2003 Sep; 10 (5): 744–50.
120. Wild D, editor. The immunoassay handbook.4th ed. Elsevier; 2013.
121. van Gageldonk PG, van Schaijk FG, van der Klis FR, Berbers GA. Development and validation of a multiplex immunoassay for the simultaneous determination of serum antibodies to Bordetella pertussis, diphtheria and tetanus. J Immunol Methods. 2008 Jun 1; 335 (1–2): 79–89. DOI: 10.1016/j.jim.2008.02.018.
122. Pickering JW, Martins TB, Greer RW, Schroder MC, Astill ME, Litwin CM et al. A multiplexed fluorescent microsphere immunoassay for antibodies to pneumococcal capsular polysaccharides. Am J Clin Pathol. 2002 Apr; 117 (4): 589–96. DOI: 10.1309/4KEH-AGY7-UT5H-41XJ.
123. Pickering JW, Martins TB, Schroder MC, Hill HR. Comparison of a multiplex flow cytometric assay with enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of antibodies to tetanus, diphtheria, and Haemophilus influenzae type b. Clin Diagn Lab Immunol. 2002 Jul; 9 (4): 872–6. DOI: 10.1128/CDLI.9.4.872-876.2002.
124. Elberse KE, Tcherniaeva I, Berbers GA, Schouls LM. Optimization and application of a multiplex bead-based assay to quantify serotype-specific IgG against Streptococcus pneumoniae polysaccharides: response to the booster vaccine after immunization with the pneumococcal 7-valent conjugate vaccine. Clin Vaccine Immunol. 2010 Apr; 17 (4): 674–82. DOI: 10.1128/CVI.00408-09.
125. Brodin P, Davis MM. Human immune system variation. Nat Rev Immunol. 2017; 17: 21–9. DOI: 10.1038/nri.2016.125.
126. Weinberger B, Herndler-Brandstetter D, Schwanninger A, Weiskopf D, Grubeck-Loebenstein B. Biology of immune responses to vaccines in elderly persons. Clin Infect Dis. 2008 Apr 1; 46 (7): 1078–84. DOI: 10.1086/529197.
127. Gibson KL, Wu YC, Barnett Y, Duggan O, Vaughan R, Kondeatis E et al. B-cell diversity decreases in old age and is correlated with poor health status. Aging Cell. 2009 Feb; 8 (1): 18–25. DOI: 10.1111/j.1474-9726.2008.00443.x.
128. Britanova OV, Shugay M, Merzlyak EM, Staroverov DB, Putintseva EV, Turchaninova MA et al. Dynamics of Individual T Cell Repertoires: From Cord Blood to Centenarians. J Immunol. 2016 Jun 15; 196 (12): 5005–13. DOI: 10.4049/jimmunol.1600005.
129. Gavazzi G, Krause KH. Ageing and infection. Lancet Infect Dis. 2002 Nov; 2 (11): 659–66. DOI: 10.1016/S1473-3099(02)00437-1.
130. Ahmed M, Lanzer KG, Yager EJ, Adams PS, Johnson LL, Blackman MA. Clonal expansions and loss of receptor diversity in the naive CD8 T cell repertoire of aged mice. J Immunol. 2009 Jan 15; 182 (2): 784–92.
131. Chen WH, Kozlovsky BF, Effros RB, Grubeck-Loebenstein B, Edelman R, Sztein MB. Vaccination in the elderly: an immunological perspective. Trends Immunol. 2009 Jul; 30 (7): 351–9. DOI: 10.1016/j.it.2009.05.002.
132. Chen TH, Lee F, Lin YL, Dekker A, Chung WB, Pan CH et at. Differentiation of foot-and-mouth disease-infected pigs from vaccinated pigs using antibody-detecting sandwich ELISA. J Vet Med Sci. 2011 Aug; 73 (8): 977–84.
133. Hollinger FB, Liang TJ. Hepatitis B virus. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Martin MA, Lamb RA, Roizman B. Fields Virology. Vol. 4. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 2001.
134. Qiu J, Wang W, Wu J, Zhang H, Wang Y, Qiao J. Characterization of periplasmic protein BP26 epitopes of Brucella melitensis reacting with murine monoclonal and sheep antibodies. PLoS One. 2012; 7 (3): e34246. DOI: 10.1371/journal.pone.0034246.
135. Tkachuk AP, Gushchin VA, Potapov VD, Demidenko AV, Lunin VG, Gintsburg AL. Multi-subunit BCG booster vaccine GamTBvac: Assessment of immunogenicity and protective efficacy in murine and guinea pig TB models. Cardona P-J, ed. PLoS ONE. 2017; 12 (4): e0176784. DOI: 10.1371/journal.pone.0176784.
136. Carter MJ, Mitchell RM, Sauteur PMM, Kelly DF, Trück J. The antibody-secreting cell response to infection: Kinetics and clinical applications. Front Immunol. 2017 Jun 1; 8: 630. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00630.
137. Whitworth HS, Scott M, Connell DW, Dongés B, Lalvani A. IGRAs--the gateway to T cell based TB diagnosis. Methods. 2013 May 15; 61 (1): 52–62. DOI: 10.1016/j.ymeth.2012.12.012.
138. Huo Z, Peng L. Accuracy of the interferon-γ release assay for the diagnosis of active tuberculosis among HIV-seropositive individuals: a systematic review and meta-analysis. BMC Infect Dis. 2016 Jul 22; 16: 350. DOI: 10.1186/s12879-016-1687.
139. Chattopadhyay PK, Roederer M. A mine is a terrible thing to waste: high content, single cell technologies for comprehensive immune analysis. Am J Transplant. 2015 May; 15 (5): 1155–61. DOI: 10.1111/ajt.13193.
140. Lundberg M, Eriksson A, Tran B, Assarsson E, Fredriksson S. Homogeneous antibody-based proximity extension assays provide sensitive and specific detection of low-abundant proteins in human blood. Nucleic Acids Res. 2011 Aug; 39 (15): e102. DOI: 10.1093/nar/gkr424.
141. Frei AP, Bava FA, Zunder ER, Hsieh EW, Chen SY, Nolan GP et al. Highly multiplexed simultaneous detection of RNAs and proteins in single cells. Nat Methods. 2016 Mar; 13 (3): 269–75. DOI: 10.1038/nmeth.3742.
142. Semenenko TA. [The role of blood serum bank in the national biological safety]. Vestnik Roszdravnadzora. 2010; (3): 55–8. Russian.
143. Sanitary and Epidemiological Rules SP 1.3.2322-08

"Bezopasnost' raboty s mikroorganizmami III–IV grupp patogennosti (opasnosti) i vozbuditelyami parazitarnykh bolezney. Sanitarno-epidemiologicheskie pravila". Approved with Decree of the Chief Sanitary Officer of the Russian Federation from 28.01.2008 no 4. Russian.

144. Methodic Guide MU 1.3.2569-09 "Organizatsiya raboty laboratoriy, ispol'zuyushchikh metody amplifikatsii nukleinovykh kislot pri rabote s materialom, soderzhashchim mikroorganizmy I–IV grupp patogennosti. Metodicheskie ukazaniya". Moscow: Rospotrebnadzor; 2009. 42 p. Russian.
145. Glants S. Mediko-biologicheskaya statistika. Moscow: Praktika; 1999. 462 p. Russian.
146. Fel'dblyum IV. [Prophylactic vaccination as life-saving technology and a tool of demographic policy]. Epidemiologiya i infektsionnye bolezni. Aktual'nye voprosy. 2011; 2: 12–7. Russian.
147. Semenenko TA, Rusakova EV, Shcherbakov AG, Gaidarenko AD, Gotvyanskaya TP, Evseyeva LF et al. [Herd immunity against controlled infections (according to the materials of the serum bank)]. Epidemiologiya i infektsionnye bolezni. Aktual'nye voprosy. 2012; 6: 10–5. Russian.
148. Mollema L, Smits GP, Berbers GA, Van Der Klis FR, Van Binnendijk RS, De Melker HE et al. High risk of a large measles outbreak despite 30 years of measles vaccination in The Netherlands. Epidemiol Infect. 2014 May; 142 (5): 1100–8. DOI: 10.1017/S0950268813001532.
149. Mroz T, Mancini D, Popkin BM. Monitoring Economic Conditions in the Russian Federation: The Russia Longitudinal Monitoring Survey 1992–1998. Report. Chapel Hill, N. C.: Carolina Population Center; 1999.
150. Boitsov SA, Chazov EI, Shlykhto EV, Shalnova SA, Konradi AO, Karpov YuA et al. [Epidemiology of cardiovascular diseases in different regions of Russia (ESSE-RF). The rational for and design of the study]. Profilakticheskaya meditsina. 2013; 16 (6): 25–34. Russian.
151. Centers for Disease Control Prevention (CDC) [Internet]. Atlanta, GA: CDC [cited 2017 Sep]. National Health and Nutrition Examination Survey. Available from: https://www.cdc.gov/nchs/nhanes/index.htm
152. Wu JT, Ho A, Ma ES, Lee CK, Chu DK, Ho PL et al. Estimating infection attack rates and severity in real time during an influenza pandemic: analysis of serial cross-sectional serologic surveillance data. PLoS Med. 2011 Oct; 8(10): e1001103. doi: 10.1371/journal.pmed.1001103.
153. WHO. Seroepidemiological studies of pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus. Weekly Epidemiologic Record 2010; 24: 229-236. PMID:20545056.
154. Semenov BF, Zverev VV, Khaitov RM. [Prospects for development of immunoprophylaxis up to 2020–2030]. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii. 2010; 2: 105–11. Russian.
155. Shakhanina IL, Raduto OI, Osipova LA, Prikazchikova GS. [Economic efficiency of vaccinal prevention: methods of assessment]. Epidemiologiya i infektsionnye bolezni. 2004; 3: 12–6. Russian.
156. Methodic Guide MU 3.3.1878-04 "Immunoprofilaktika infektsionnykh bolezney. Ekonomicheskaya effektivnost' vaktsinoprofilaktiki. Metodicheskie ukazaniya". Approved with Decree of the Chief Sanitary Officer of the Russian Federation from 04.03.2004. Russian.
157. Bektimirov TA. Ekonomicheskie prioritety vaktsinoprofilaktiki – opyt raznykh stran. Byulleten' "Vaktsinatsiya. Novosti vaktsinoprofilaktiki". 2000; 1 (7): 14–20. Russian.

ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ПАМЯТЬ, ФОРМИРУЕМАЯ В ОТВЕТ НА ВАКЦИНАЦИЮ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНОЙ РЕКОМБИНАНТНОЙ ВАКЦИНОЙ «ГамТБвак»: КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ВАКЦИНЫ НА ЗДОРОВЫХ ДОБРОВОЛЬЦАХ

Д. А. Клейменов[1] ✉, Е. П. Мазунина[1], В. Г. Лунин[1], Е. Ю. Коптев[1], В. А. Мануйлов[1,2], В. А. Гущин[1,3], А. П. Ткачук[1]

[1] Лаборатория трансляционной биомедицины,
Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи, Москва

[2] Институт молекулярной медицины,
Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва

[3] Кафедра вирусологии, биологический факультет,
Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва

В настоящее время единственной применяемой в мире вакциной против туберкулеза является БЦЖ — живой аттенуированный штамм *Mycobacterium bovis*. Она защищает детей от милиарного туберкулеза и туберкулезного менингита, но не уберегает взрослых от легочного туберкулеза и реактивации латентной формы инфекции. Для повышения эффективности вакцины БЦЖ у взрослых и подростков разрабатываются рекомбинантные бустерные вакцины, несущие антигены как *M. bovis*, так и *M. tuberculosis*. В статье приводятся первые данные о безопасности и иммуногенности кандидатной рекомбинантной вакцины для профилактики туберкулеза «ГамТБвак». Изучали иммуногенность препарата на 12 добровольцах. Оценку проводили по изменению у испытуемых параметров клеточного и гуморального иммунитета (методами IGRA-тест и мультиплексный иммунологический xMAP анализ соответственно) в течение 20 нед. после введения препарата. На 140-й день с момента первой вакцинации у 10 (83 %) из 12 иммунизированных «ГамТБвак» добровольцев сохранялся положительный клеточный ответ на все антигены, входящие в состав вакцины, по сравнению с уровнем до вакцинации. Оба смысловых антигена CFP10 и ESAT6 индуцировали достоверную выработку IgG антител с 98-го и 140-го дней наблюдения соответственно. Антиген Ag85A вызывал сравнительно низкий гуморальный ответ. В целом, изучаемая рекомбинантная вакцина «ГамТБвак» обладает необходимым уровнем безопасности и активирует клеточное и гуморальное звенья адаптивного иммунитета, формирует клеточную память.

Ключевые слова: иммунологическая память, гуморальный иммунитет, клеточный иммунитет, туберкулез, БЦЖ, *M. bovis*, *M. tuberculosis*, IGRA, суспензионный иммунологический анализ, ESAT6, CFP10, Ag85

Финансирование: работа выполнена при поддержке Министерства здравоохранения РФ и ФАНО России (государственное задание № 0574-2014-0023).

✉ **Для корреспонденции:** Клейменов Денис Александрович
ул. Гамалеи, д. 18, г. Москва, 123098; 10000let@rambler.ru

Статья получена: 20.09.2017 **Статья принята к печати:** 20.10.2017

IMMUNOLOGICAL MEMORY FORMED IN RESPONSE TO ADMINISTRATION OF GamTBvac RECOMBINANT TUBERCULOSIS VACCINE CANDIDATE: CLINICAL TRIALS IN HEALTHY VOLUNTEERS

Kleymenov DA[1] ✉, Mazunina EP[1], Lunin VG[1], Koptev EYu[1], Manuilov VA[1,2], Gushchin VA[1,3], Tkachuk AP[1]

[1] Laboratory of Translational Biomedicine,
N. F. Gamaleya Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

[2] Institute of Molecular Medicine,
I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

[3] Department of Virology, Faculty of Biology,
Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

So far BCG, a live attenuated *Mycobacterium bovis* strain remains the only available vaccine for tuberculosis prevention and control. Although BCG is effective against miliary tuberculosis and tuberculous meningitis in children, it barely protects adults and adolescents from the pulmonary form of the disease or reactivation of the latent infection. Still, its effectiveness can be increased by using recombinant booster vaccines containing both *M. bovis* and *M. tuberculosis* antigens. This article reports preliminary data on the safety and immunogenicity of a recombinant vaccine candidate, GamTBvac, developed for tuberculosis prevention. Its immunogenicity was studied in 12 volunteers. Over the course of 20 weeks following GamTBvac administration, we measured cell-mediated and humoral immune responses using interferon-gamma release assays and multiplex xMAP-based immunoassays. On day 140 after the first administration of the vaccine, 10 participants of the study (83 %) still showed a positive cellular response to all antigens contained in the vaccine. Both sense antigens CFP10 and ESAT6 induced production of IgG antibodies between days 98 and 140 of the observation. The Ag85 antigen induced a relatively weak humoral response. On the whole, the recombinant GamTBvac is safe and activates cell-mediated and humoral components of the adaptive immunity, forming immunological memory.

Keywords: immunological memory, humoral immunity, cell-mediated immunity, tuberculosis, BCG, *M. bovis*, *M. tuberculosis*, IGRA, suspension immunoassay, ESAT6, CFP10, Ag85

Funding: this work was supported by the Russian Ministry of Health and the Federal Agency for Scientific Organizations (state task no. 0574-2014-0023)

✉ **Correspondence should be addressed:** Denis Kleymenov
ul. Gamalei, d. 18, Moscow, Russia, 123098; 10000let@rambler.ru

Received: 20.09.2017 **Accepted:** 20.10.2017

Согласно расчетам, приведенным в [1], за последние 200 лет от туберкулеза умерло более одного миллиарда человек. Это больше, чем количество людей, скончавшихся в тот же период от оспы, малярии, чумы, гриппа, холеры и СПИДа вместе взятых. К концу XIX в. каждая пятая из смертей от любых причин была связана с туберкулезом [1]. Ситуация изменилась после введения вакцины БЦЖ (BCG, Bacillus Calmette–Guérin) в 20-х гг. 20 в., и в какой-то момент была надежда полностью победить туберкулез, учитывая радикальное снижение заболеваемости в Европе и Америке [2]. Прогресс в борьбе с туберкулезом остановился во многом по причине свойств самой вакцины БЦЖ. Так, было установлено, что вакцинация БЦЖ защищает детей в раннем возрасте от милиарного туберкулеза и туберкулезного менингита, но не способна обеспечить высокую степень защиты от аэрозольных форм инфекции подростков и взрослых. Кроме того, выяснилось, что эффективность вакцинации варьирует от высокой в северных районах Европы и Северной Америки до ничтожной в южных экваториальных районах мира [2]. Таким образом, несмотря на наличие вакцины БЦЖ и на то, что в настоящее время туберкулез является достаточно успешно излечимым заболеванием, он по-прежнему входит в тройку основных причин смерти от инфекционных заболеваний. В 2015 г. зафиксировано 10,4 млн новых случаев активного туберкулеза, и не менее 1,8 млн человек погибли от этой болезни [3].

Другой стороной проблемы туберкулеза является увеличение заболеваемости его мультирезистентными формами. Известно, что в 2015 г. было зафиксировано около полумиллиона новых случаев туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ-туберкулеза). Основная проблема МЛУ-туберкулеза — очень высокая стоимость лечения (более $ 10 000 за курс) при прогнозе выздоровления лишь в 50 % случаев. Уже сейчас, по оценкам экспертов, около 50 млн человек во всем мире являются латентно инфицированными МЛУ-туберкулезом. Между тем вероятность перехода латентной формы в активную может быть более 10 % в течение жизни [4]. В России особенно остро стоит проблема распространения МЛУ-туберкулеза. Так, в общей мировой заболеваемости МЛУ-туберкулезом совместный вклад Индии, Китая и России — 45 % [3]. Общая заболеваемость туберкулезом в самой России остается высокой и составляет в среднем 115 на 100 000 жителей, а в отдельных регионах показатель доходит до 160 случаев [5].

Глобальным планом ВОЗ является сокращение заболеваемости туберкулезом на 90 % и смертности от туберкулеза на 95 % к 2035 г. [3]. Эта амбициозная цель не может быть достигнута без разработки новых высокоэффективных вакцин. Из разрабатываемых на сегодняшний день вакцин существенную долю составляют рекомбинантные, включающие в свой состав антигены *Mycobacterium tuberculosis*, некоторые их которых присутствуют в БЦЖ [6]. Композиции антигенов в таких вакцинах определяются тем, что они разрабатываются как бустерные вакцины, которые направлены на усиление иммунитета, сформированного БЦЖ, а не для первичной вакцинации новорожденных [7]. Примером такого препарата является разработанная авторами рекомбинантная вакцина «ГамТБвак», состоящая из двух фьюжен-белков микобактериальных антигенов (Ag85A и ESAT6-CFP10), слитых с декстран-связывающим доменом (dextran-binding domain, DBD), иммобилизованным на декстране. Адъювант вакцины представлен ДЭАЭ-декстраном и CpG-олигонуклеотидами (агонист рецептора TLR9). Обоснование выбора антигенной композиции вакцины и ее формуляции представлено в нашей предыдущей работе [8].

Доклинические исследования показали высокую иммуногенность и эффективность композиции «ГамТБвак» в модельных экспериментах на мышах и морских свинках [8]. На обеих инфекционных моделях «ГамТБвак» проявила защитный эффект против штамма H37Rv *M. tuberculosis* как при аэрозольном, так и при внутривенном заражении. Как и предполагалось, «ГамТБвак» показала особенно сильный эффект в случае применения ее в качестве бустерной вакцины на фоне предшествующей иммунизации БЦЖ. Успешное завершение доклинических исследований позволило нам начать клинические исследования по изучению безопасности и иммуногенности вакцины на здоровых добровольцах (далее — КИ) (разрешение Минздрава России от 10.04.2015 № 179; протокол исследования доступен в международной базе данных NIH [9]). В настоящей работе представлены первые результаты экспериментов по изучению иммуногенности вакцины на здоровых БЦЖ-вакцинированных добровольцах.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Дизайн и протокол клинического исследования

Клинические исследования проводились в соответствии с законодательством Российской Федерации, с соблюдением отечественных и международных регуляторных и этических норм [10–13]. Всего в КИ фазы I/IIa (изучение безопасности и иммуногенности) принимали участие 60 здоровых БЦЖ-вакцинированных добровольцев обоих полов в возрасте от 18 до 49 лет. Дизайн протокола исследования предполагал три этапа (рис. 1). Одним из критериев невключения на этапе скрининга (помимо фармакологических или острых клинических показателей) был положительный результат на наличие латентной туберкулезной инфекции, определяемый лабораторно тестом QuantiFERON-TB Gold (Qiagen, США) [14, 15]. На первом этапе КИ с участием 24 добровольцев изучали безопасность однократного введения вакцины «ГамТБвак», при этом 12 человек получали плацебо, а 12 — ¼ предполагаемой дозы применения. Оценку безопасности проводили при наступлении нежелательных явлений (по классификации ВОЗ, цит. по [16]) в течение 20 нед. наблюдения после введения препарата, включающего медицинское обследование (медицинский осмотр, электрокардиограмма, общие анализы мочи и крови, рентгенограмма органов грудной клетки и др.). Второй этап КИ был посвящен изучению иммуногенности препарата при двукратном введении с двухмесячным интервалом и проходил с участием 12 добровольцев, каждый из которых получил по ¼ предполагаемой дозы применения препарата. Иммуногенность вакцины на данном этапе оценивали по изменению параметров клеточного и гуморального иммунитета испытуемых (см. ниже) в течение 20 нед. после введения препарата. На третьем этапе КИ (который по состоянию на момент выхода публикации завершается, и результаты которого не включены в настоящую работу), проводимом для подбора оптимальной дозы, участвуют еще 24 добровольца, половина из которых получила дозу в ½ рекомендуемой, а оставшиеся — полную (максимальную) дозу вакцины.

Наработка рекомбинантных антигенов M. tuberculosis

Для экспрессии антигенов, входящих в состав вакцины (Ag85A, ESAT6-CFP10), слитых с декстран-связывающим доменом [8], использовали клетки *Escherichia coli* штамма BL21(DE3) pLysS, культуры растили на питательной среде LB (lysogeny broth), содержащей 100 мкг/мл ампициллина и 25 мкг/мл хлорамфеникола, при температуре 37 °C и перемешивании. Индукцию экспрессии проводили при оптической плотности культуры 0,7–1 (при 600 нм) путем добавления к суспензии изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозида (IPTG) до конечной концентрации 0,5 мМ и продолжали инкубацию при 30 °C в течение 4 ч при перемешивании. Бактериальную культуру *E. coli* после проведения экспрессии центрифугировали 20 мин при 6000 g и 4 °C. Осадок бактерий лизировали в буфере, содержащем 20 мМ Трис-HCl с pH 8, 200 мМ NaCl, Тритон-X100 0,1 % по объему, после растворения клеток в буфере добавляли лизоцим до 25 мкг/мл и инкубировали в течение 30 мин при RT, затем проводили обработку ультразвуком. В зависимости от используемого метода выделение рекомбинантных антигенов проводили либо из фракции осадка после лизиса клеток, либо из фракции супернатанта. Центрифугирования лизата проводили при 17 000 g в течение 20 мин.

Препараты Ag85A-his8, DBD-his8, ESAT6-his8 получали из лизатов культур-продуцентов, несущих экспрессионный вектор pET42b с соответствующими вставками генов, кодирующих белки *M. tuberculosis*. Экспрессируемые белки оказывались в нерастворимой фракции лизата — тельцах включения. Перед растворением телец включения в буфере, содержащем 8 М мочевину, мы проводили три раунда их отмывки от растворимых белковых и небелковых примесей лизирующим буфером, осаждая центрифугированием. Растворенные в 8 М мочевине микобактериальные антигены ренатурировали с помощью пульс-ренатурации и проводили очистку на аффинной хроматографической колонке HisPrep FF 16/10 (GE, США) по стандартному протоколу, рекомендованному производителем.

Препарат антигена CFP10 получали из лизатов культур-продуцентов, несущих экспрессионный вектор pTXB1, с соответствующей вставкой гена, кодирующего белок CFP10. Очистку растворимого белка CFP10 проводили с использованием аффинного хроматического сорбента Chitin Resin (NEB, США) по стандартному протоколу, рекомендованному производителем.

Определение клеточного иммунитета

Для определения Т-клеточной популяции, чувствительной к антигенам *M. tuberculosis*, использовали подход, известный как IGRA-тест (interferon-gamma release assay [17, 18]), в ранее описанной нами модификации [19]. Кратко, для этого 100 мкл цельной крови, отобранной в вакуумную пробирку с гепарином лития в качестве антикоагулянта и содержащей лейкоцитарную фракцию, добавляли к 600 мкл полной ростовой среды (90 % среда 199, 10 % эмбриональная телячья сыворотка, 2 мМ L-глутамин, 10 мМ HEPES, 50 мкг/мл гентамицина сульфат; производитель компонентов — «ПанЭко», Россия). Описанным образом для каждой пробы получали четыре аликвоты. В два раствора добавляли рекомбинантные антигены, входящие в состав вакцины «ГамТБвак»: DBD-Ag85A и DBD-ESAT6-CFP10, с конечной концентрацией в ПРС 50 мкг/мл. Отдельно в среду с кровью добавляли неспецифический индуктор интерферона-гамма в лимфоцитах (конканавалин А из *Canavalia ensiformis* производства Sigma-Aldrich, Германия) в качестве положительного контроля стимуляции и отрицательный контроль (стерильный бессолевой 20 мМ ТРИС, pH 7,5). Таким образом, для каждого из образцов крови проводили четыре реакции стимуляции в отдельных пробирках: антигенами DBD-Ag85A, DBD-ESAT6-CFP10, положительным и отрицательным контролями. Среду с кровью, содержащую живые лимфоциты, стимулирующие антигены и контроли, инкубировали в течение 72 ч в стерильных влажных условиях при +37 °C. После завершения инкубации количество интерферона-гамма в среде определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием набора А-8752 гамма-Интерферон-ИФА-БЕСТ («Вектор-Бест», Россия). Положительный ответ на стимуляцию учитывали как превышение уровня интерферона-гамма над уровнем спонтанной продукции в образце с отрицательным контролем [15, 19]. Для каждого из 12 участников данного этапа исследования забор крови и стимуляцию клеток антигенами проводили перед введением вакцины (0-й день) и на 1, 42, 63, 98 и 140-й дни после иммунизации.

Проведение суспензионного иммунологического анализа для определения гуморального иммунитета

Для серологического определения уровня антител отдельно к антигенам Ag85A, ESAT6, CFP10, DBD, а также к их фьюжен-формам DBD-Ag85A, DBD-ESAT6-CFP10, с использованием полученных рекомбинантных белков были разработаны шесть соответствующих моноплексных тест-систем на основе технологии xMAP (Luminex Corporation, США) [20].

Оптимальные для каждого антигена или фьюжен-формы количества (от 5 до 20 мкг/10^6 микросфер) коньюгировали с 6 регионами (таблица). Сенсибилизацию микросфер выполняли в соответствии с протоколом, приведенным в официальном издании компании Luminex «The xMAP Cookbook, 3rd ed.» [20], методом карбодиимидной химии.

Концентрации антигенов, используемых для конъюгации микросфер

Антиген	Концентрация для конъюгации, мкг/10^6 микросфер	Регион микросфер
DBD-ESAT6-CFP10	5	61
CFP-10	20	33
ESAT-6	10	25
DBD	20	55
DBD-Ag85A	20	67
Ag85A	20	42

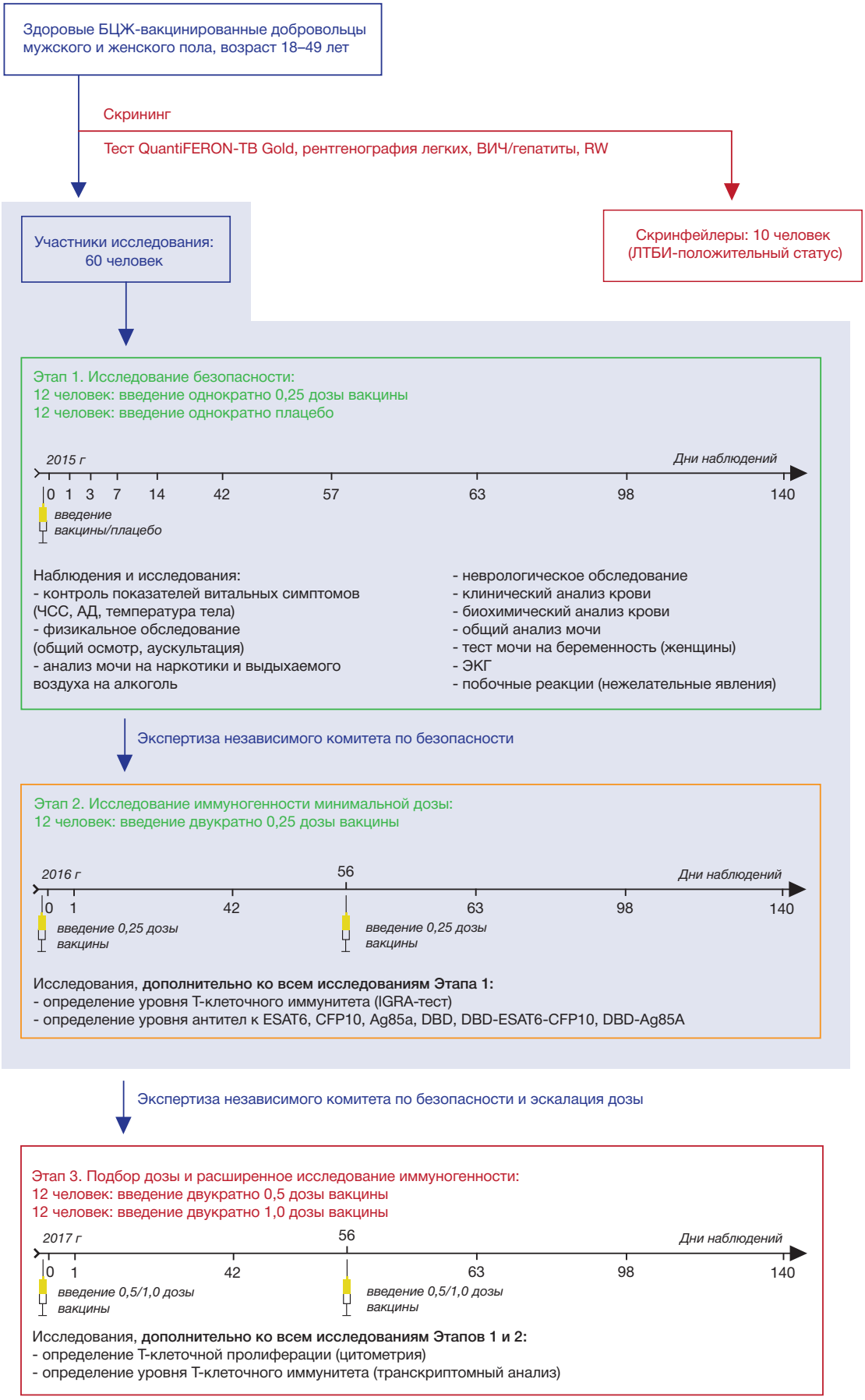


Рис. 1. Диаграмма, отображающая дизайн исследования. Выделением отмечена часть протокола клинических исследований (Этапы 1 и 2), результаты по которым представлены в данной статье

Микросферы (1 × 10^6 шт) активировали 10 мкл 50 мг/мл (в дист. H_2O) 1-Этил-3-[3-диметиламинопропил] карбодиимид гидрохлорид (EDC) и 10 мкл 50 мг/мл (в дист. H_2O) N-гидроксисульфосукцинимида натриевая соль (s-NHS) в 80 мкл активирующего буферного раствора (0,1 M NaH2PO4, pH 6,2) в течение 20 мин при 25 °C с вращением 20 об/мин. После этого активированные микросферы промывали два раза и ресуспендировали в 500 мкл буферного раствора для связывания (50 мМ MES, pH 5,0) с добавлением каждого из антигенов к своему региону. После инкубации в течение 2 ч в темноте при 25 °C с вращением 20 об/мин и трех этапов промывки блокирующим буферным раствором микросферы ресуспендировали в 1 мл буферного раствора для хранения и использовали для анализа не менее чем через 16 ч. Подсчет микросфер, оставшихся после процедуры сенсибилизации, осуществляли с помощью автоматического счетчика клеток TC20 (Bio-RAD Laboratories, США). В качестве блокирующего буферного раствора/буферного раствора для хранения сенсибилизированных микросфер использовали PBS-TBN (PBS, 0,1 % BSA, 0,02 % Tween-20, 0,05 % NaN_3).

Процедуру постановки иммунологического анализа проводили по схеме непрямого серологического исследования в соответствии с протоколом [20]. В лунку планшета (96-луночный, полистирол, Microlon, плоскодонный прозрачный; Greiner, Австрия) добавляли 50 мкл PBS-TBN с 2500 микросферами одного региона и 50 мкл сыворотки, предварительно разведенной PBS-TBN в 50 раз (итоговое разведение сыворотки 1 : 100). Смесь инкубировали на шейкере-термостате PST-60HL-4 (Biosan, Латвия) 60 мин, при +25 °C и 800 об/мин. Далее проводили отмывку с помощью ручного магнитного сепаратора MILLIPLEX (Merck Millipore, Германия): 2 цикла добавления–перемешивания на шейкере, 30 с, 800 об/мин — удаления 100 мкл PBS-TBN в каждой лунке (такие условия отмывки применяли на всех этапах). Затем микросферы ресуспендировали в 50 мкл PBS-TBN и к ним добавляли 50 мкл препарата козьих антител против IgG человека, коньюгированных с фикоэритрином (One Lambda/Thermo Fisher Scientific Inc., США) в концентрации 5 мкг/мг в PBS-TBN. Итоговое разведение коньюгата в каждой лунке соответствовало 2,5 мкг/мл. Смесь вновь инкубировали на шейкере-термостате 30 мин, при +25 °C и 800 об/мин, а затем вновь отмывали. По окончании отмывки ресуспендировали микросферы в 100 мкл PBS-TBN. Для обработки результатов использовали анализатор MAGPIX (Luminex, США). В расчет брали не менее 100 микросфер каждого региона на лунку.

Количественный учет результатов детекции антител осуществляли в единицах MFI (median fluorescence intensity). Для каждого образца из полученного значения вычиталось значение отрицательного контроля (нормальная кроличья сыворотка). Для каждого из 12 участников данного этапа исследования забор сыворотки крови и определение уровня антител ко всем перечисленным антигенам проводили перед введением вакцины (0-й день) и на 1, 42, 63, 98 и 140-й дни после иммунизации.

Статистическая обработка данных

Обработку данных проводили с использованием программ MS Excel и GraphPad Prism 6. Статистическую значимость различий для клеточного и гуморального ответа определяли с использованием критерия Вилкоксона для сопряженных пар. Различия считали значимыми при значении $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Безопасность вакцины «ГамТБвак» в минимальной дозе

В ходе КИ (рис. 1) нежелательных явлений, в том числе серьезных, не зафиксировано. Все выявленные отклонения лабораторных показателей и показателей ЭКГ были расценены исследователями сертифицированного клинического центра [9] как клинически незначимые. Отмечены случаи развития гиперемии в месте введения препарата, которая регистрировалась у 6 добровольцев через 24 ч после введения препарата «ГамТБвак» и купировалась самостоятельно на 3-й день. Данное изменение описано в инструкции к исследуемому препарату, имеет первую степень тяжести по классификации ВОЗ [16] и не было расценено как клинически значимое. Таким образом, можно заключить, что препарат «ГамТБвак» в ¼ предполагаемой дозы применения [8]: белковый антиген DBD-Ag85A (микобактериальный белок Ag85A, слитый с декстран-связывающим доменом) — 0,006 мг; белковый антиген DBD-ESAT6-CFP10 (микобактериальный белок ESAT6, слитый с микобактериальным белком CFP10, слитый с декстран-связывающим доменом) — 0,006 мг; декстран с молекулярной массой 500 000 Да — 2,5 мг; ДЭАЭ-декстран с молекулярной массой 500 000 Да — 0,125 мг; CpG-олигонуклеотиды с последовательностью 5’-ggGGGACGA:TCGTCgggggg-3’ — 0,0375 мг, — обладает высоким уровнем безопасности.

Клеточный иммунитет

Клеточный иммунитет играет ключевую роль в защите от туберкулезной инфекции, поэтому изучение клеточного иммунитета в ответ на вакцинацию — основная задача для подтверждения иммуногенности вакцин против туберкулеза [6, 21, 22]. Наиболее часто используемым методом является оценка секреции лимфоцитами ИНФ-γ в ответ на стимуляцию антигенами, входящими в состав вакцины, в модификациях, использующих IGRA-тест, метод ELISPOT (Enzyme-Linked ImmunoSpot), проточную цитометрию. В случае изучения иммуногенности вакцины «ГамТБвак» была использована модификация IGRA-теста.

В экспериментах по определению выработки ИНФ-γ Т-лимфоцитами в ответ на стимуляцию рекомбинантными антигенами *M. tuberculosis* было обнаружено, что оба антигена, входящих в состав вакцины: DBD-Ag85A и DBD-ESAT6-CFP10, индуцируют достоверное повышение продукции ИНФ-γ (рис. 2, А, Б). При этом достоверное повышение ответа на DBD-Ag85A проявляется уже после первой иммунизации с 42-го дня. Поскольку Ag85A экспрессируется *M. bovis*, а все добровольцы, принимавшие участие в клинических исследованиях, были вакцинированы БЦЖ согласно календарю профилактических прививок, ранний клеточный ответ на Ag85A можно объяснить проявлением бустерного эффекта к БЦЖ [9]. Клеточный ответ на DBD-ESAT6-CFP10 становится выраженным через месяц после второй иммунизации «ГамТБвак», начиная с 98-го дня. На 140-й день с момента первой вакцинации у 10 (83 %) из 12 иммунизированных «ГамТБвак» добровольцев сохранялся положительный клеточный ответ на все антигены, входящие в состав вакцины, по сравнению с уровнем до вакцинации.

Таким образом, можно заключить, что используемая в составе вакцины «ГамТБвак» антигенная композиция является иммуногенной и приводит к формированию Т-клеточного ответа. При этом оба антигенных фьюжена

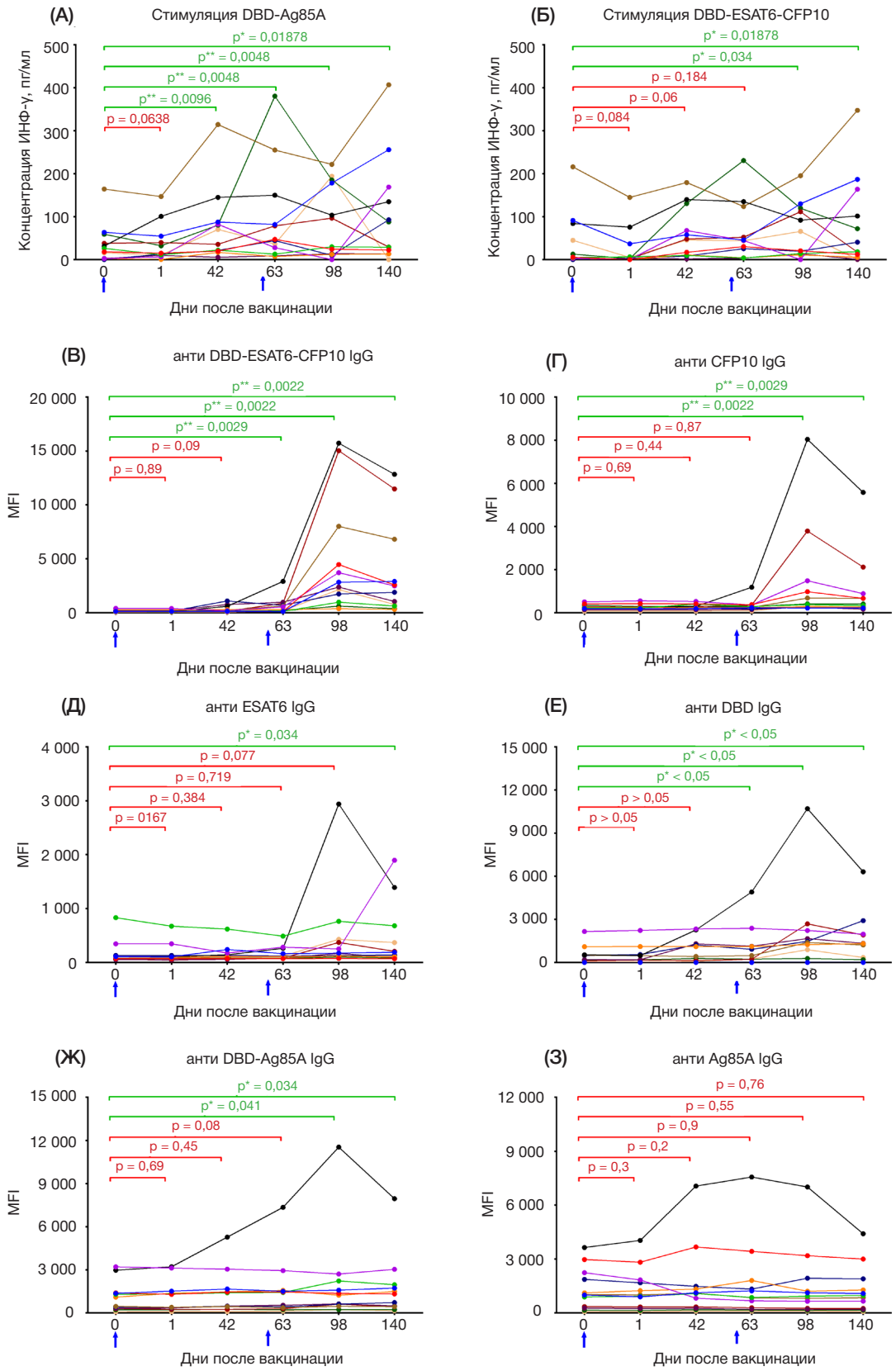


Рис. 2. Иммуногенность вакцины «ГамТБвак» у 12 добровольцев.
(А), **(Б)** Оценка клеточного иммунитета. Применяли ранее разработанную модификацию теста IGRA [19], оценивающего уровень секреции ИНФ-γ лимфоцитами цельной крови в ответ на стимуляцию антигенами DBD-Ag85A **(А)** и DBD-ESAT6-CFP10 **(Б)**. Из значений необработанных данных был вычтен уровень спонтанной продукции ИНФ-γ.
(В) — **(З)** Оценка уровня антител к компонентам вакцины DBD-ESAT6-CFP10 **(В)** и его составляющих: CFP10 **(Г)**, ESAT6 **(Д)**, DBD **(Е)**, а также DBD-Ag85A **(Ж)** и его ключевого компонента Ag85A **(З)**. Проводили с использованием технологии xMAP
При расчете уровня статистической значимости использовали критерий Вилкоксона для сопряженных пар. Значения p обозначены зеленым цветом при наличии достоверных различий показателей по дням вакцинации при сравнении с нулевым визитом (*p < 0,05 и **p < 0,01), красным цветом — при отсутствии статистически значимых различий. Синими стрелками отмечены дни введения вакцины «ГамТБвак».

обладают выраженной иммуногенностью, но с разной динамикой развития иммунного ответа.

Гуморальный иммунитет

Изучение динамики накопления в сыворотке крови испытуемых антител класса G к антигенам, входящим в состав вакцины «ГамТБвак» (DBD-Ag85A и DBD-ESAT6-CFP10), показало, что оба антигенных фьюжена в той или иной мере индуцируют выработку антител (рис. 2, В–З). Антиген DBD-ESAT6-CFP10 оказался более сильным индуктором гуморального иммунитета (рис. 2, В). Достоверное повышение антительного ответа наблюдалось с 63-го дня после первой иммунизации. В последней точке наблюдений (140-й день) у 11 (92 %) из 12 добровольцев было показано наличие антител к данному фьюжену. Детальный анализ иммуногенности отдельных антигенов в составе фьюжена показал, что оба смысловых антигена CFP10 (рис. 2, Г) и ESAT6 (рис. 2, Д) индуцировали выработку IgG антител с 98-го и 140-го дней наблюдения соответственно ($p^{**} = 0{,}0022$ и $p^{*} = 0{,}034$). Любопытно, что DBD также проявил иммуногенность в составе фьюжена, причем даже раньше, чем смысловые антигены, начиная с 63-го дня (рис. 2, Е) после иммунизации.

Другой фьюжен DBD-Ag85A показал сравнительно низкую иммуногенность (рис. 2, Ж). Достоверные различия по этому антигену наблюдались с 98-го дня ($p^{*} = 0{,}041$) после иммунизации. Однако статистический анализ данных показал отсутствие достоверной связи ($p > 0{,}05$) между вакцинацией и продукцией IgG антител к Ag85A (рис. 2, З).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В рамках проведенной части I фазы клинических испытаний вакцины «ГамТБвак» показано, что при двукратном введении вакцина обладает приемлемым профилем безопасности в изученных дозах для здоровых БЦЖ-вакцинированных добровольцев, не имеющих латентной инфекции. Серьезных нежелательных явлений не выявлено ни у одного из пациентов. Отмечены случаи развития гиперемии в месте введения препарата, которая была зарегистрирована у 6 добровольцев через 24 ч после введения препарата «ГамТБвак» и купировалась самостоятельно на 3-й день. Данное изменение описано в инструкции к исследуемому препарату, имеет первую степень тяжести по классификации ВОЗ [16] и не было расценено как клинически значимое.

Полученные результаты показали, что клеточное звено иммунитета активировалось у 10 (83 %) из 12 добровольцев, получивших вакцину «ГамТБвак». При этом антиген DBD-Ag85A стимулировал бустерный эффект, проявившийся уже после первой иммунизации (рис. 2, А). Наиболее вероятно, что эффект активировал именно Ag85A, так как в случае второго антигена DBD-ESAT6-CFP10 развитие иммунологической памяти наблюдали только после второй иммунизации (рис. 2, Б). В рамках проведенного исследования не был изучен вклад каждого из антигенов фьюжена в отдельности в активацию клеточного звена иммунитета. Между тем ранее на мышиной модели вклад каждого из антигенов «ГамТБвак» был детально исследован [8]. Так, было показано, что наибольшую иммуногенность проявляют Ag85A и ESAT6, тогда как эффект CFP10 менее выражен, хотя и достоверен при использовании в бустерной вакцинации после БЦЖ. Тогда же было изучено, что вклад DBD в активацию клеточного звена иммунитета является незначительным [8]. Это соответствует результатам ранее проводимых других клинических исследований. Так, в серии клинических исследований рекомбинантных вакцин (H1, H4, H56), проводимых Государственным институтом сывороток (Копенгаген, Дания), было показано, что Ag85, как и ESAT6, проявляют высокую иммуногенность [21–23]. Формируемую данными антигенами клеточную память наблюдали в течении полугода после первой иммунизации. В рамках данного исследования иммунизация «ГамТБвак» ведет к формированию клеточной памяти, достоверно сохраняющейся на финальный 140-й день исследований.

Вопреки классическим представлениям о преимущественной роли клеточного иммунитета для борьбы с туберкулезом, в последние несколько лет все более значимая роль отводится гуморальному иммунитету [6, 24]. В этой связи изучение активации гуморального звена иммунитета противотуберкулезными вакцинами приобретает все большее значение. В случае «ГамТБвак» гуморальный ответ формировался на все антигены фьюжена DBD-ESAT6-CFP10 (рис. 2, В–Е). Наиболее ранний и сильный ответ был отмечен в отношении антигена CFP10 (рис. 2, Г). Таким образом, CFP10 является индуктором как клеточного, так и гуморального иммунитета. Достоверный ответ на ESAT6 появляется позднее и с меньшей интенсивностью, но, по всей видимости, все же вносит свой вклад в общую иммуногенность DBD-ESAT6-CFP10 (рис. 2, В, Д).

Устойчивый и сильный гуморальный ответ на «вспомогательный» антиген DBD (рис. 2, Е), разумеется, не имеет отношения к защите от туберкулеза, однако антитела к DBD могут служить в будущих исследованиях в качестве серологического маркера и стать индикатором проведенной иммунизации в случае недокументированного вакцинального статуса пациента, что важно в популяционных исследованиях и для нужд персонализированной медицины.

Неожиданной оказалась низкая иммуногенность антигена Ag85A в отношении гуморального иммунитета (рис. 2, З), который, по всей видимости, не вносит вклада в общую иммуногенность DBD-Ag85A (рис. 2, Ж). В экспериментах на животных Ag85A индуцировал высокий титр антител как в случае применения «ГамТБвак» в качестве единственной вакцины, так и в случае бустерной после иммунизации БЦЖ [8]. Отсутствие стимуляции гуморального иммунитета можно объяснить неправильным фолдингом Ag85A, используемого для конъюгации с микросферами xMAP. Против данного предположения говорит тот факт, что у части добровольцев титр антител, по всей видимости, является априорно высоким во всех исследуемых точках. Вторым объяснением может быть то, что именно повышенный титр антител, имеющихся после вакцинации БЦЖ, приводит к быстрой нейтрализации небольших количеств белка, приносимых вакцинацией, без запуска бустерного эффекта. Проверка данных предположений требует отдельных экспериментов.

Изучение вклада каждого из антигенов в развитие гуморального иммунитета при проведении доклинических и клинических исследований противотуберкулезных вакцин является важным в свете смещения парадигмы относительно роли гуморального ответа в туберкулезной инфекции [24]. Между тем для большинства исследований противотуберкулезных вакцин вообще не приводятся данные по антительному ответу [22, 23] или приводятся для всех антигенов без дифференциации [21]. Приведенные данные по «ГамТБвак» показывают, что антигены в

составе вакцины могут иметь диаметрально противоположный вклад в иммунологическую память клеточного и гуморального типа.

ВЫВОДЫ

Изучаемая рекомбинантная вакцина «ГамТБвак» обладает необходимым уровнем безопасности и активирует клеточное и гуморальное звенья адаптивного иммунитета, формирует клеточную память. В рамках проведенного исследования получены данные, указывающие на формирование устойчивого клеточного и гуморального иммунитета при введении ¼ теоретически расчетной дозы. Это позволяет рассчитывать на успешное завершение текущей фазы клинических исследований (Этапа 3), в ходе которых иммуногенность вакцины будет доказана с использованием альтернативных высокотехнологичных методов, таких как проточная цитометрия и анализ транскриптома клеток иммунной системы. Положительные результаты послужат основанием для начала фазы IIb, целью которой будет подтверждение профилактической эффективности вакцины.

Литература

1. Kaufmann SHE, Weiner J, von Reyn CF. Novel approaches to tuberculosis vaccine development. Int J Infect Dis. 2017 Mar; 56: 263–7. DOI^: 10.1016/j.ijid.2016.10.018
2. Nguipdop-Djomo P, Heldal E, Rodrigues LC, Abubakar I, Mangtani P. Duration of BCG protection against tuberculosis and change in effectiveness with time since vaccination in Norway: A retrospective population-based cohort study. Lancet Infect Dis. 2016 Feb; 16 (2): 219–26. DOI^: 10.1016/S1473-3099(15)00400-4
3. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2016. 21th ed. Geneva: World Health Organization; 2016. 214 p.
4. Glaziou P, Sismanidis C, Floyd K, Raviglione M. Global Epidemiology of Tuberculosis. Cold Spring Harb Perspect Med. 2015 Feb; 5 (2): a017798. DOI^: 10.1101/cshperspect.a017798
5. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2016 году: Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 2017. 220 с.
6. Karp CL, Wilson CB, Stuart LM. Tuberculosis vaccines: Barriers and prospects on the quest for a transformative tool. Immunol Rev. 2015 Mar; 264 (1): 363–81. DOI^: 10.1111/imr.12270. PubMed PMID: 25703572.
7. Frick M. The Tuberculosis Vaccines Pipeline: A New Path to the Same Destination? [Интернет]. 2015 Pipeline Report. HIV, HCV, and TB. London, NY: HIV i-Base/Treatment Action Group; July 2015 [дата обращения: 9 октября 2017 г.]. Доступно по: http://www.pipelinereport.org/2015/tb-vaccines
8. Tkachuk AP, Gushchin VA, Potapov VD, Demidenko AV, Lunin VG, Gintsburg AL. Multi-subunit BCG booster vaccine GamTBvac: Assessment of immunogenicity and protective efficacy in murine and guinea pig TB models. PLoS One. 2017; 12 (4): e0176784. DOI^: 10.1371/journal.pone.0176784
9. Evaluation of the Safety and Immunogenicity of the Recombinant Subunit Vaccine "GamTBvac" Against the Tuberculosis [Интернет]. U. S. National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03255278 [дата обращения: 9 октября 2017 г.]. Доступно по: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03255278
10. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Guideline for good clinical practice E6(R1). Current Step 4 version. Dated 10 June 1996 [Интернет]; [дата обращения: 9 октября 2017 г.]: [59 с.]. Доступно по: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Efficacy/E6/E6_R1_Guideline.pdf
11. Федеральный закон от 12.04.2010 № 61-ФЗ (ред. от 03.07.2016) «Об обращении лекарственных средств».
12. ГОСТ 33044-2014 Принципы надлежащей лабораторной практики. Межгосударственный стандарт. Дата введения: 1 августа 2015 г.
13. Приказ Министерства здравоохранения РФ от 1 апреля 2016 г. № 200н «Об утверждении правил надлежащей клинической практики».
14. Mazurek GH, Jereb J, Lobue P, Iademarco MF, Metchock B, Vernon A, et al. Guidelines for using the QuantiFERON-TB Gold test for detecting Mycobacterium tuberculosis infection, United States. MMWR Recomm Rep. 2005 Dec 16; 54 (RR-15): 49–55.
15. QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) ELISA Package Insert. Rev. 04. Hilden: QIAGEN GmbH; Feb 2016.
16. Мелихов О. Г., Атарщиков Д. С. Нежелательные явления в клинических исследованиях лекарственных средств. Кач. клин. практ. 2003; (2): 11–6.
17. Lalvani A, Brookes R, Wilkinson RJ, Malin AS, Pathan AA, Andersen P, et al. Human cytolytic and interferon gamma-secreting CD8+ T lymphocytes specific for Mycobacterium tuberculosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Jan 6; 95 (1): 270–5. PubMed PMID: 9419365.
18. Dewan PK, Grinsdale J, Liska S, Wong E, Fallstad R, Kawamura LM. Feasibility, acceptability, and cost of tuberculosis testing by whole-blood interferon-gamma assay. BMC Infect Dis. 2006 Mar 15; 6: 47. PubMed PMID: 16539718.
19. Плеханова М. А., Аксенова В. А., Ткачук А. П., Пацула Ю. И., Кривцова Л. А., Коломеец А. Н. Оценка специфических антигенов ранней стадии туберкулезной инфекции у детей. Туберк. и болезни легких. 2017; 95 (1): 27–33.
20. Luminex. The xMAP Cookbook. A collection of methods and protocols for developing multiplex assays with xMAP Technology. 3rd ed. [Интернет]; [дата обращения: 5 мая 2017 г.]. Доступно по: http://info.luminexcorp.com/en-us/download-the-xmap-cookbook
21. Luabeya AKK, Kagina BMN, Tameris MD, Geldenhuys H, Hoff ST, Shi Z, et al. First-in-human trial of the post-exposure tuberculosis vaccine H56:IC31 in Mycobacterium tuberculosis infected and non-infected healthy adults. Vaccine. 2015 Aug 7; 33 (33): 4130–40. DOI^: 10.1016/j.vaccine.2015.06.051
22. Geldenhuys H, Mearns H, Miles DJC, Tameris M, Hokey D, Shi Z, et al. The tuberculosis vaccine H4:IC31 is safe and induces a persistent polyfunctional CD4 T cell response in South African adults: A randomized controlled trial. Vaccine. 2015 Jul 9; 33 (30): 3592–9. DOI^: 10.1016/j.vaccine.2015.05.036
23. Reither K, Katsoulis L, Beattie T, Gardiner N, Lenz N, Said K, et al. Safety and immunogenicity of H1/IC31H®, an adjuvanted TB subunit vaccine, in HIV-infected adults with CD4+ lymphocyte counts greater than 350 cells/mm3: A phase II, multi-centre, double-blind, randomized, placebo-controlled trial. PLoS One. 2014; 9 (12): e114602. DOI^: 10.1371/journal.pone.0114602
24. Lu LL, Chung AW, Rosebrock TR, Ghebremichael M, Yu WH, Grace PS, et al. A Functional Role for Antibodies in Tuberculosis. Cell. 2016 Oct 6; 167 (2): 433–43.e14. DOI^: 10.1016/j.cell.2016.08.072

References

1. Kaufmann SHE, Weiner J, von Reyn CF. Novel approaches to tuberculosis vaccine development. Int J Infect Dis. 2017 Mar; 56: 263–7. DOI^: 10.1016/j.ijid.2016.10.018
2. Nguipdop-Djomo P, Heldal E, Rodrigues LC, Abubakar I, Mangtani P. Duration of BCG protection against tuberculosis and change in effectiveness with time since vaccination in Norway: A retrospective

population-based cohort study. Lancet Infect Dis. 2016 Feb; 16 (2): 219–26. DOI^: 10.1016/S1473-3099(15)00400-4
3. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2016. 21th ed. Geneva: World Health Organization; 2016. 214 p.
4. Glaziou P, Sismanidis C, Floyd K, Raviglione M. Global Epidemiology of Tuberculosis. Cold Spring Harb Perspect Med. 2015 Feb; 5 (2): a017798. DOI^: 10.1101/cshperspect.a017798
5. O sostoyanii sanitarno-epidemiologicheskogo blagopoluchiya naseleniya v Rossiyskoy Federatsii v 2016 godu. National Report. Moscow: Russian Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rospotrebnadzor); 2017. 220 p. Russian.
6. Karp CL, Wilson CB, Stuart LM. Tuberculosis vaccines: Barriers and prospects on the quest for a transformative tool. Immunol Rev. 2015 Mar; 264 (1): 363–81. DOI^: 10.1111/imr.12270. PubMed PMID: 25703572.
7. Frick M. The Tuberculosis Vaccines Pipeline: A New Path to the Same Destination? [Internet]. 2015 Pipeline Report. HIV, HCV, and TB. London, NY: HIV i-Base/Treatment Action Group; July 2015 [cited 2017 Oct 9]. Available from: http://www.pipelinereport.org/2015/tb-vaccines
8. Tkachuk AP, Gushchin VA, Potapov VD, Demidenko AV, Lunin VG, Gintsburg AL. Multi-subunit BCG booster vaccine GamTBvac: Assessment of immunogenicity and protective efficacy in murine and guinea pig TB models. PLoS One. 2017; 12 (4): e0176784. DOI^: 10.1371/journal.pone.0176784
9. Evaluation of the Safety and Immunogenicity of the Recombinant Subunit Vaccine "GamTBvac" Against the Tuberculosis [Internet]. U.S. National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03255278 [cited 2017 Oct 9]. Available from: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03255278
10. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Guideline for good clinical practice E6(R1). Current Step 4 version. Dated 10 June 1996 [Internet]; [cited 2017 Oct 9]: [59 p.]. Available from: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Efficacy/E6/E6_R1_Guideline.pdf
11. Federal'nyy zakon ot 12.04.2010 № 61-FZ (red. ot 03.07.2016) «Ob obrashchenii lekarstvennykh sredstv». Federal law of the Russian Federation. Russian.
12. GOST 33044-2014 Printsipy nadlezhashchey laboratornoy praktiki. Mezhgosudarstvennyy standart. Data vvedeniya: 1 avgusta 2015 g. State Standard. Identical to OECD Guide 1:1998 OECD Principles of good laboratory practice. Russian.
13. Prikaz Ministerstva zdravookhraneniya RF ot 1 aprelya 2016 g. № 200n «Ob utverzhdenii pravil nadlezhashchey klinicheskoy praktiki». Order of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation. Russian.
14. Mazurek GH, Jereb J, Lobue P, Iademarco MF, Metchock B, Vernon A, et al. Guidelines for using the QuantiFERON-TB Gold test for detecting Mycobacterium tuberculosis infection, United States. MMWR Recomm Rep. 2005 Dec 16; 54 (RR-15): 49–55.
15. QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) ELISA Package Insert. Rev. 04. Hilden: QIAGEN GmbH; Feb 2016.
16. Melikhov OG, Atarshchikov DS. Nezhelatel'nye yavleniya v klinicheskikh issledovaniyakh lekarstvennykh sredstv. Kachestvennaya klinicheskaya praktika. 2003; (2): 11–6. Russian.
17. Lalvani A, Brookes R, Wilkinson RJ, Malin AS, Pathan AA, Andersen P, et al. Human cytolytic and interferon gamma-secreting CD8+ T lymphocytes specific for Mycobacterium tuberculosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Jan 6; 95 (1): 270–5. PubMed PMID: 9419365.
18. Dewan PK, Grinsdale J, Liska S, Wong E, Fallstad R, Kawamura LM. Feasibility, acceptability, and cost of tuberculosis testing by whole-blood interferon-gamma assay. BMC Infect Dis. 2006 Mar 15; 6: 47. PubMed PMID: 16539718.
19. Plekhanova MA, Aksenova VA, Tkachuk AP, Patsula YI, Krivtsova LA, Kolomeets AN. Evaluation of specific antigens at the early stage of tuberculous infection in children. Tuberkulez i bolezni legkikh. 2017; 95 (1): 27–33. Russian.
20. Luminex. The xMAP Cookbook. A collection of methods and protocols for developing multiplex assays with xMAP Technology. 3rd ed. [Internet]; [cited 2017 May 5]. Available from: http://info.luminexcorp.com/en-us/download-the-xmap-cookbook
21. Luabeya AKK, Kagina BMN, Tameris MD, Geldenhuys H, Hoff ST, Shi Z, et al. First-in-human trial of the post-exposure tuberculosis vaccine H56:IC31 in Mycobacterium tuberculosis infected and non-infected healthy adults. Vaccine. 2015 Aug 7; 33 (33): 4130–40. DOI^: 10.1016/j.vaccine.2015.06.051
22. Geldenhuys H, Mearns H, Miles DJC, Tameris M, Hokey D, Shi Z, et al. The tuberculosis vaccine H4:IC31 is safe and induces a persistent polyfunctional CD4 T cell response in South African adults: A randomized controlled trial. Vaccine. 2015 Jul 9; 33 (30): 3592–9. DOI^: 10.1016/j.vaccine.2015.05.036
23. Reither K, Katsoulis L, Beattie T, Gardiner N, Lenz N, Said K, et al. Safety and immunogenicity of H1/IC31H®, an adjuvanted TB subunit vaccine, in HIV-infected adults with CD4+ lymphocyte counts greater than 350 cells/mm3: A phase II, multi-centre, double-blind, randomized, placebo-controlled trial. PLoS One. 2014; 9 (12): e114602. DOI^: 10.1371/journal.pone.0114602
24. Lu LL, Chung AW, Rosebrock TR, Ghebremichael M, Yu WH, Grace PS, et al. A Functional Role for Antibodies in Tuberculosis. Cell. 2016 Oct 6; 167 (2): 433–43.e14. DOI^: 10.1016/j.cell.2016.08.072

АДАПТИВНЫЙ ИММУНИТЕТ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРОГРЕССИРОВАНИЯ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ У ДЕТЕЙ

М. А. Плеханова ✉

Кафедра педиатрии ДПО, Центр повышения квалификации и профессиональной переподготовки специалистов,
Омский государственный медицинский университет, Омск

Клеточный иммунитет и цитокин интерферон гамма (ИФН-γ) имеют важное значение для формирования устойчивости организма к микобактериям туберкулеза (МБТ), но точный механизм появления иммунитета к туберкулезу (ТБ) неизвестен. В исследовании оценивали иммуный ответ при развитии ТБ и связь полиморфизма *rs2069705* (T-1488C) гена *IFNG* с выраженностью специфических иммунологических реакций у детей. Участниками исследования стали 310 детей до 18 лет, распределенные по 3 группам: группа ТБ — 110 детей с установленным по результатам комплексного обследования ТБ; группа ЛТИ — 156 детей с установленной латентной туберкулезной инфекцией; группа НТ — 44 ребенка, не инфицированные МБТ. Проводили иммунологические и молекулярно-генетические исследования, в частности, оценивали иммунный статус пациентов и распределение частот генотипов по изучаемому полиморфизму, в том числе в контексте эффективности вакцинирования против ТБ. Иммуный статус детей с ЛТИ характеризовался лишь слабо выраженной активацией клеточного иммунитета, а детей с ТБ — появлением у воспалительного процесса черт хронического за счет недостаточной функциональной активности клеток иммунной системы ($p < 0,05$). При оценке иммуного ответа по уровню синтеза ИФН-γ, индуцированного специфическими митогенами (PPD-L, CFP32B, Rv2660c, ESAT6, 85a и ESAT6-CFP10), установили снижение ответа у больных ТБ, которое было ассоциировано с гетерозиготным генотипом по полиморфизму *rs2069705* гена *IFNG* ($p < 0,05$). При гомозиготных генотипах TT и CC ответ усиливался. Также установили, что низкая эффективность противотуберкулезной вакцинации также связана с гетерозиготным генотипом (50 %), а высокая — с генотипом, гомозиготным по аллелю T (40 %), что может свидетельствовать о его протективной роли. Полученные результаты указывают на то, что изучаемый полиморфизм (гетерозиготный генотип) можно рассматривать в качестве маркера развития туберкулезной инфекции у детей.

Ключевые слова: микобактерии туберкулеза, туберкулез, иммунный ответ, интерферон гамма, антиген, PPD-L, CFP32B, Rv2660c, ESAT6, 85a, ESAT6-CFP10, *IFNG*, полиморфизм, дети

Финансирование: работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 16-16-55001.

✉ **Для корреспонденции:** Плеханова Мария Александровна
ул. Ленина, д. 12, г. Омск, 644099; dina-plus@mail.ru

Статья получена: 24.09.2017 **Статья принята к печати:** 25.10.2017

ADAPTIVE IMMUNITY AND GENETIC ASPECTS OF TUBERCULOSIS IN CHILDREN

Plekhanova MA ✉

Department of Pediatrics, Center of Continuing Professional Education and Retraining,
Omsk State Medical University, Omsk, Russia

Cell-mediated immunity and the cytokine interferon gamma (IFNγ) have an important role in promoting host resistance against tuberculosis-causing mycobacteria (TBM), but the exact mechanism of developing immunity against tuberculosis (TB) is unknown. In this work we evaluate the immune response in TB and the association between *IFNG* gene polymorphism *rs2069705* (T-1488C) and the intensity of specific immune reactions in children. The study was conducted in 310 children below 18 years distributed into 3 groups: the TB group included 110 children with TB confirmed by medical evaluation; the LTB group consisted of 156 children with latent infection; and the NTB group was represented by 44 non-infected children. A few immunoassays and molecular-genetic tests were performed; specifically, we evaluated the immune status of patients and the distribution of genotypic frequencies of the studied polymorphism, in the context of previous vaccination against TB. The cell-mediated immune response was mild in children with LTB, while in children with TB inflammation showed signs of chronicity due to the lack of functional activity of immune cells ($p < 0.05$). We also measured IFN-γ synthesis induced by specific mitogens (PPD-L, CFP32B, Rv2660c, ESAT6, 85a and ESAT6-CFP10), only to detect attenuation of the immune response in patients with TB, which was associated with the heterozygous *rs2069705* variant ($p < 0.05$). Children with homozygous TT and CC genotypes demonstrated a more pronounced immune response. Low effectiveness of the TB vaccine was shown to be associated with the heterozygous genotype (50 %), while its high effectiveness was associated with the homozygous T genotype (40 %), possibly indicating the protective role of the latter. Our findings suggest that the studied polymorphism (specifically, its heterozygous variant) can be a predictive marker of TB in children.

Keywords: Mycobacterium tuberculosis, tuberculosis, immune response, interferon gamma, antigen, PPD-L, CFP32B, Rv2660c, ESAT6, 85a, ESAT6-CFP10, *IFNG*, polymorphism, children

Funding: this work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (Grant ID 16-16-55001).

✉ **Correspondence should be addressed:** Maria Plekhanova
ul. Lenina, d. 12, Omsk, Russia, 644099; dina-plus@mail.ru

Received: 24.09.2017 **Accepted:** 25.10.2017

Исследования последних лет установили важность клеточного иммунитета и интерферона гамма (ИФН-γ) для защиты организма человека от микобактерий туберкулеза (МБТ), но механизмы формирования иммунологической компетентности в отношении туберкулеза (ТБ) остаются малоизученными [1]. Известно, что пролиферации лимфоцитов, ответственных за продукцию ИФН-γ, способствуют белки, секретируемые МБТ на ранней стадии инфекции [2]. В ряде исследований было установлено, что у больных ТБ с нерезистентными генотипами по гену ИФН-γ (*IFNG*) уровень синтеза этого цитокина различен и коррелирует со степенью тяжести заболевания [3, 4].

Также ведется поиск генов-кандидатов при ТБ, вызывающих нарушения врожденного и адаптивного иммунитета [1, 5–9]. Ранее большое внимание уделялось роли полиморфизма гена *IFNG* в развитии различных заболеваний, в том числе туберкулеза [3, 10–13].

Изучение иммунологических и генетических факторов регуляции противотуберкулезного иммунитета позволит не только лучше понять основы патогенеза заболевания, но и оптимизировать подход к его профилактике. В работе изучали иммунный ответ при разивитии ТБ и связь полиморфного варианта *rs2069705* (T-1488C) гена *IFNG* с выраженностью специфических иммунологических реакций у детей.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Проспективное исследование было проведено в 2014–2016 гг. В нем приняли участие 310 пациентов в возрасте до 18 лет, которые были разделены на 3 группы в зависимости от степени выраженности туберкулезной инфекции: 110 детей — с установленным ТБ (группа ТБ; средний возраст —9,5 ± 0,5 года, каждый второй ребенок (46,6 %) — в возрасте до 8 лет); 156 детей — с латентной туберкулезной инфекцией (ЛТИ), установленной по результатам туберкулинодиагностики при исключении ТБ (группа ЛТИ; средний возраст — 6,6 ± 0,3 года, 70,5 % детей — в возрасте до 8 лет); 44 ребенка, не инфицированных МБТ (группа НТ; средний возраст — 3,1 ± 0,4 года, 95,5 % детей — в возрасте до 8 лет). Группы детей не различались по половому признаку ($p > 0,05$).

Всем детям были проведены специфические иммунологические исследования, 169 — также молекулярно-генетические. Сравнение данных об иммунном статусе провели только среди детей до 8 лет, чтобы сопоставление результатов было корректным.

Диагноз «туберкулез» ставили по итогам комплексного обследования, включавшего различные лабораторные, в том числе бактериологические, молекулярно-генетические, лучевые методы исследования. Учитывали результаты туберкулинодиагностики: пробы Манту с 2 туберкулиновыми единицами (ТЕ) туберкулина (PPD-L) и пробы с аллергеном туберкулезным рекомбинантным (АТР) с использованием «Диаскинтест» («Генериум», Россия), который содержит 0,2 мкг рекомбинантного белка CFP10–ESAT6. Диагноз подтверждался центральной врачебно-контрольной комиссией.

В группе ТБ у 23 детей установили инфильтративный туберкулез легких, у 38 — первичный туберкулезный комплекс, у 46 — туберкулез внутригрудных лимфатических узлов (в одном случае сочетался с поражением верхнедолевого бронха слева), по одному случаю пришлось на очаговый и диссеминированный туберкулез легких и туберкулезный плеврит. В 4 случаях регистрировали сочетанное поражение туберкулезом иных органов: периферических лимфатических узлов, плечевой кости, кишечника. Также в 4 случаях наблюдали осложненное течение туберкулезного процесса (ателектаз, экссудативный плеврит, легочная диссеминация, кровохарканье). У 60,9 % (n = 67) пациентов установили туберкулез в фазе инфильтрации, у 10,9 % (n = 12) — в фазе распада и обсеменения, у 0,9 % (n = 1) — уплотнения и рассасывания, у 26,4 % (n = 29) — в фазе кальцинации. Бактериовыделение зарегистрировали в 12 случаях (10,9%), из них в 6 — была установлена лекарственная устойчивость к основным противотуберкулезным препаратам.

В группе ЛТИ у 75 детей установили ранний период первичной туберкулезной инфекции (РППТИ), а у 81 ребенка — инфицирование МБТ более одного года.

В группе НТ у 21 ребенка установили поствакцинальную аллергию, у 23 — положительную туберкулиновую анергию.

У детей, включенных в группу ТБ, средний размер инфильтрата по результатам туберкулинодиагностики (проба Манту) составил 12,6 ± 0,4 мм (95 % CI 11,8–13,5 мм), по результатам пробы с АТР — 14,95 ± 0,5 мм (95 % CI 13,9–16,0 мм). У детей в группе ЛТИ средние значения составили 10,3 ± 0,3 мм (95 % CI 9,7–10,9 мм) и 1,9 ± 0,4 мм (95 % CI 1,2–2,65 мм) соответственно . В группе НТ у детей с поствакцинальной аллергией средний размер инфильтрата по результатам пробы Манту составил 4,1 ± 0,4 мм (95 % CI 3,2–5,0 мм), при этом положительные реакции были отмечены в 9 случаях (42,9 %), в остальных — сомнительные. По результатам пробы с АТР у всех детей в этой группе зарегистрировали отрицательные реакции.

Мы располагали данными о противотуберкулезной вакцинации детей. Эффективность вакцинации оценивали по рубцу на месте введения вакцины БЦЖ (бацилла Кальметта–Герена; bacillus Calmette–Guerin, BCG) и реакции на туберкулин при проведении пробы Манту год спустя после прививки: при формировании рубца длиной 4–10 мм и положительной реакции на туберкулин вакцинацию расценивали как эффективную, при отсутствии рубца и отрицательной реакции на туберкулин — как неэффективную, в остальных случаях — как малоэффективную. В группе ТБ были вакцинированы 108 детей (98,2 %), но эффективной вакцинация была только для 31 ребенка. В группе ЛТИ были привиты 155 детей (99,4 %), эффективно — большинство (n = 97). В группе НТ вакцину получили 36 детей (81,8 %), она была эффективной в каждом четвертом случае.

Иммунологические и молекулярно-генетические исследования проводили на базе Омского научно-исследовательского института природно-очаговых инфекций при поступлении пациента в специализированный стационар и постановке на учет в противотуберкулезном диспансере.

Для оценки иммунного статуса выполнили стандартные иммунологические скрининговые тесты I уровня: определение содержания в сыворотке крови иммуноглобулинов IgG, IgA, IgM и IgE методом иммуноферментного анализа; оценку фагоцитарной активности нейтрофилов определением их способности поглощать инертные частицы латекса и тестированием с нитросиним тетразолием (НСТ-тест) в двух вариантах теста — спонтанном и стимулированном; оценку субпопуляционного состава Т-клеток (CD) с использованием панели моноклональных антител (DAKO, Дания). Также определяли содержание спонтанно синтезируемого интерферона гамма и интерферона гамма, синтез которого был индуцирован в течение 72 ч специфическими

антигенами (PPD-L, CFP32B, Rv2660c, ESAT6, 85a, ESAT6-CFP10), с использованием ИФА-тест-системы компании «Вектор-Бест» (Россия). Антигены были выделены в лаборатории трансляционной биомедицины отдела генетики и молекулярной биологии бактерий Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи (Москва) [14].

ДНК выделяли из сыворотки крови с помощью набора реагентов «ДНК-кровь» («ТестГен», Россия), идентификацию полиморфного маркера *rs2069705* гена *IFNG* в образцах проводили на амплификаторе iQ5 (BioRad, США) с использованием набора реагентов для полимеразной цепной реакции в модификации Flash («ТестГен») согласно инструкциям производителей. Генотипы анализировали в программном модуле «Дискриминация аллелей», поставляемом производителем амплификатора. Распределение частот генотипов проверяли на соответствие закону Харди–Вайнберга.

Минимальный размер выборки пациентов, достаточный для получения доказательных данных, был рассчитан в программе OpenEpi v3.0. Достоверность различий между группами определяли с помощью непараметрических критериев Краскела–Уоллиса (H), Манна–Уитни (U) и χ^2. Различия считали достоверными при $p < 0,05$. Рассчитывали отношение шансов (odds ratio, OR): если шанс (риск) был выше 1, развитие заболевания считали статистически значимым. Полученные данные обрабатывали с использованием программ OpenEpi v3.0 и Statistica v6.0.

Исследование было одобрено этическим комитетом Омской государственной медицинской академии (протокол № 51 от 10.10.2012). Родители или их законные представители подписали добровольное информированное согласие на участие детей в исследовании.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Данные сравнительного анализа результатов клинического и лабораторного обследования детей из групп ТБ и ЛТИ представлены в табл. 1. У детей с ЛТИ реже (9 %), чем у детей с ТБ (19,1 %), регистрировали проявления интоксикационного синдрома ($p = 0,008$) и чаще — нарушения носового дыхания за счет аденоидных вегетаций (16 % против 1,8 %, $p = 0,00008$), очаги хронической инфекции (18,6 % против 10 %, $p = 0,027$), проявления респираторного аллергоза (15,4 % против 0 %, $p = 0,000008$) и избыточную массу тела (10,3 % против 4,5 %, $p = 0,044$). Для группы ТБ были значимыми такие клинические симптомы, как гепато- и спленомегалия (OR 2,583 и 3,800 соответственно) и дефицит массы тела (OR 1,898). По данным лабораторного исследования крови, также были значимыми анемия (OR 1,872), ускорение СОЭ (OR 2,255), лимфоцитоз (OR 1,634) и эозинофилия (OR 5,371). Важно отметить, что только в 4 случаях эозинофилии из 40 она была обусловлена паразитарными инвазиями.

Результаты оценки иммунного статуса всех детей, участвовавших в исследовании, представлены в табл. 2. Достоверных различий по иммунологическим показателям между детьми с ЛТИ и детьми, не инфицированными МБТ, не было ($p > 0,05$) за исключением содержания спонтанно синтезируемого ИФН-γ ($p < 0,05$). Для всех групп отмечено незначительное в сравнении с референсными значениями повышение содержания лейкоцитов, характеризующих клеточное звено иммунитета, что может свидетельствовать о его активации за счет неспецифических процессов. При этом достоверными были различия для CD16, HLA DR и спонтанно синтезируемого ИФН-γ. В группе ТБ наблюдали активацию гуморального звена иммунитета: повышение в пределах референсных значений содержания IgG, IgA и значительное повышение IgE — до 306,6 ± 130,7 МЕ/мл. Фагоцитарная активность клеток также значимо возросла, а резервные возможности нейтрофилов снизились. Для всех перечисленных показателей изменения были статистически значимыми при сравнении с результатами в группе НТ.

Таким образом, иммунный статус детей с ЛТИ не отличался от такового у детей, не инфицированных МБТ, при этом наблюдали слабо выраженную активацию клеточного иммунитета. В группе ТБ признаков, указывающих на

Таблица 1. Результаты клинико-лабораторного обследования детей с туберкулезом и латентной туберкулезной инфекцией

Признаки	Группа ТБ (n = 110), абс. (%)	Группа ЛТИ (n = 156), абс. (%)	Критерий χ^2; p-value	OR
Интоксикационный синдром	21 (19,1)	14 (9)	5,778; 0,008	2,393
Бронхолегочный синдром	10 (9,1)	12 (7,7)	0,166; 0,342	1,2
Параспецифические реакции	21 (19,1)	36 (23,1)	0,609; 0,218	0,787
Периферическая лимфаденопатия	18 (16,4)	19 (12,2)	0,943; 0,166	1,411
Гипертрофия небных миндалин I–II степени	26 (23,6)	42 (26,9)	0,366; 0,273	0,84
Аденоиды	2 (1,8)	25 (16)	14,28; 0,00008	0,097
Кариес	6 (5,5)	14 (9)	1,149; 0,143	0,585
Гепатомегалия	7 (6,4)	4 (2,6)	2,349; 0,063	2,583
Спленомегалия	10 (9,1)	4 (2,6)	5,512; 0,009	3,8
Очаги хронической инфекции	11 (10)	29 (18,6)	3,726; 0,027	0,487
Респираторный аллергоз	0	24 (15,4)	18,6; 0,000008	0
Дефицит массы тела	24 (21,8)	20 (12,8)	3,783; 0,026	1,898
Избыточная масса тела	5 (4,5)	16 (10,3)	2,894; 0,044	0,417
Анемия	16 (14,5)	13 (8,3)	2,563; 0,054	1,872
Увеличение СОЭ	25 (22,7)	18 (11,5)	5,959; 0,007	2,255
Лейкоцитоз	16 (14,5)	28 (17,9)	0,541; 0,231	0,778
Лимфоцитоз	43 (39,1)	44 (28,2)	3,473; 0,031	1,634
Моноцитоз	19 (17,3)	25 (16)	0,073; 0,394	1,094
Эозинофилия	40 (36,4)	15 (9,6)	28,14; <0,0000001	5,371

Таблица 2. Результаты иммунологического анализа крови детей с туберкулезом и латентной туберкулезной инфекцией и детей, не инфицированных МБТ

Показатель	Референсное значение	Группа ТБ		Группа ЛТИ		Группа НТ	
		n	M ± SEM	n	M ± SEM	n	M ± SEM
CD3, %	54–82	15	65,8 ± 1,3	16	66,2 ± 1,3	10	69,1 ± 1,7
CD3, абс.	1,65	15	1,8 ± 0,1	9	2,2 ± 0,3	8	2,1 ± 0,2
CD4, %	30–50	15	40,4 ± 1,5	16	39,0 ± 1,3	10	40,8 ± 1,0
CD4, абс.	0,92	15	1,1 ± 0,1	9	1,2 ± 0,15	8	1,2 ± 0,1
CD8, %	18–38	15	29,4 ± 1,4	16	26,9 ± 1,2	10	28,9 ± 1,4
CD8, абс.	0,6	15	0,8 ± 0,06	9	0,9 ± 0,15	8	0,9 ± 0,09
CD16, %	6–18	14	11,4 ± 0,5**	20	13,4 ± 0,6	10	17,1 ± 2,7
CD16, абс.	0,31	14	0,3 ± 0,03**	15	0,4 ± 0,04	10	0,6 ± 0,1
CD20, %	6–22	15	16,2 ± 1,5	12	16,8 ± 1,75	3	14,0 ± 1,2
CD20, абс.	0,2	15	0,5 ± 0,07	5	0,6 ± 0,1	-	-
HLA DR, %	14–25	15	25,9 ± 1,4**	20	23,7 ± 1,6	9	21,8 ± 1,1
HLA DR, абс.	0,33	15	0,7 ± 0,07	15	0,7 ± 0,09	9	0,7 ± 0,07
ИФН-γ спон., пг/мл	0,16–10	50	21,1 ± 5,7**	110	20,5 ± 3,0***	43	12,9 ± 1,7
IgG, г/л	8,12–16,14	19	11,7 ± 0,6*,**	110	9,7 ± 0,2	43	8,9 ± 0,3
IgA, г/л	0,75–3,17	19	1,6 ± 0,1*,**	110	1,2 ± 0,06	43	1,0 ± 0,08
IgM, г/л	0,69–3,00	19	1,4 ± 0,2	110	1,15 ± 0,05	43	1,2 ± 0,08
IgE, МЕ/мл	< 150	19	306,6 ± 130,7*	108	79,3 ± 12,6	23	81,9 ± 25,5
Фагоцитоз с латексом, %	52–95	15	68,5 ± 3,1**	107	65,7 ± 1,4	33	53,3 ± 2,7
НСТ-тест:							
– спонтанный, %	6–12	16	14,4 ± 1,9**	109	20,9 ± 1,3	41	24,4 ± 1,6
– стимулированный, %	–	16	37,8 ± 3,2**	109	46,5 ± 2,2	41	56,5 ± 3,3

Примечание. * — p < 0,05 при сравнении результатов в группе ТБ и группе ЛТИ (критерий Манна–Уитни, U); ** — p < 0,05 при сравнении результатов в группе ТБ и группе НТ (критерий Манна–Уитни, U); *** — p < 0,05 при сравнении результатов в группе ЛТИ и группе НТ (критерий Манна–Уитни, U).

развитие иммунодефицита, также не установили, однако отмеченные изменения харктеризовали воспалительный процесс при ТБ у детей, в том числе приобретение им черт хронического процесса, в первую очередь за счет недостаточной функциональной активности клеток и недостаточной выработки интерферона гамма.

Для понимания вклада гена IFNG в механизм иммунологической защиты против МБТ мы исследовали его полиморфизм *rs2069705*. Среди детей с ТБ гетерозиготный генотип встречался в 51,9 % случаев, была установлена его ассоциация с заболеванием (OR 1,885; 95 % CI 1,019–3,487). Он встречался чаще среди детей как с вторичными (65 %), так и с первичными (47,5 %) формами туберкулеза, что позволяет говорить о высоком риске развития заболевания независимо от его генеза. Также установлена связь гетерозиготного генотипа с формированием инфильтратов (OR 1,737) с признаками деструкции (OR 1,458) легочной ткани, диссеминации (OR 1,75) и плеврального выпота (OR 1,9), с бактериовыделением (OR 1,458) и такими клиническими проявлениями туберкулеза, как параспецифические реакции (OR 2,059), периферическая лимфаденопатия (OR 2,4), дефицит массы тела (OR 1,429), гепато- и спленомегалия (OR 5,5), анемия (OR 2,059), повышение СОЭ (OR 3,4).

Учитывая ассоциацию полиморфизма *rs2069705* гена *IFNG* с адаптивным иммунитетом к туберкулезной инфекции, мы оценили эффективность вакцинации БЦЖ в контексте генотипов среди детей, у которых был установлен ранний период первичной туберкулезной инфекции (n = 32). В 12 случаях вакцинация была мало- или неэффективной, в половине из них у детей был гетерозиготный генотип. Вероятность низкой эффективности вакцинации составила 59,38 % (95 % CI 42,23–74,62 %). Среди детей, у которых прививка была эффективной (n = 20), чаще регистрировали гомозиготный генотип по аллелю T (40 %).

В исследованиях Д. С. Ожеговой [7] было установлено, что от полиморфизма T-1488C гена *IFNG* зависит уровень его экспрессии, поэтому мы предположили, что возможна связь изучаемых генотипов с уровнем синтеза интерферона гамма. При анализе содержания спонтанно синтезируемого ИФН-γ не было установлено значимых различий в зависимости от генотипа как среди детей с ЛТИ (H = 1,663; p = 0,435), так и с ТБ (H = 4,810; p = 0,090). Анализ содержания ИФН-γ, синтез которого был индуцирован специфичными антигенами [15], показал, что при развитии ТБ существует связь между генотипом и уровнем синтеза цитокина: при гетерозиготном генотипе содержание ИФН-γ под влиянием антигенов CFP32B, Rv2660c, ESAT6, Ag85a значимо снижалось (табл. 3). Учитывая это, мы также проанализировали частоту отрицательных результатов — отсутствие ответа на индукцию у детей, больных ТБ (табл. 4) — и определили связь с гетерозиготным генотипом. Подтвердилось наличие его ассоциации со снижением уровня синтеза ИФН-γ при индукции антигенами PPD-L, CFP32B, Rv2660c, ESAT6, 85a и ESAT6-CFP10.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

У подавляющего большинства инфицированных МБТ людей отсутствуют симптомы туберкулеза, и, хотя они не являются заразными, есть риск развития активной формы ТБ. По оценкам экспертов, риск реактивации ТБ в течение жизни для пациента с ЛТИ составляет 5–10 %, причем чаще всего он реализуется в течение 5 лет с момента первичного инфицирования [16, 17]. Тем не менее, по мнению ряда исследователей, этот риск зависит от

Таблица 3. Уровень синтеза интерферона гамма, индуцированного специфическими антигенами, в зависимости от генотипа (полиморфного варианта *rs2069705* (T-1488C) гена *IFNG*) у детей, больных туберкулезом

Антиген	Полиморфный вариант *rs2069705* (T-1488C) гена *IFNG*		Критерий Манна–Уитни (U); p-value
	TC	TT и CC	
	Me (Q25%; Q75%), n = 42	ME (Q25%; Q75%), n = 39	
PPD-L	1001,6 (698; 1200)	1380,7 (741,5; 1294,5)	703,5; 0,275
CFP32B	69,8 (10,2; 68)	95,8 (21; 122,5)	554,5; 0,018
Rv2660c	102,6 (12,2; 83)	149,6 (37,5; 195,5)	513; 0,006
ESAT6	101,5 (10,9; 57,4)	112,8 (26; 173)	523,5; 0,005
85a	65 (0,2; 40)	90,3 (6,5; 101)	549,5; 0,016
ESAT6-CFP10	440,4 (139; 761)	549,5 (187; 1133)	768; 0,630

Таблица 4. Частота отрицательных реакций на специфические антигены в зависимости от генотипа (полиморфного варианта *rs2069705* (T-1488C) гена *IFNG*) у детей, больных туберкулезом

Антиген	Полиморфный вариант *rs2069705* (T-1488C) гена *IFNG*				p-value	OR	95 % CI
	TC (n = 42)		TT и CC (n = 39)				
	абс.	%	абс.	%			
PPD-L	3	7,1	1	2,6	0,202	2,923	0,291–29,35
ESAT6-CFP10	8	19	3	7,7	0,068	2,824	0,691–11,53
ESAT6	40	95,2	24	61,5	0,0001	12,5	2,628–59,47
Rv2660c	37	88,1	30	76,9	0,092	2,22	0,672–7,33
CFP32B	34	81	19	48,7	0,0012	4,474	1,656–12,08
85a	34	81	19	48,7	0,0012	4,474	1,656–12,08

нескольких факторов, наиболее важным из которых является иммунный статус организма [18–21]. Результаты нашего исследования позволяют говорить о наличии специфического воспалительного процесса и отсутствии вторичного иммунодефицита.

Мы изучали ИФН-γ, основная функция которого — иммунорегуляция, включая активацию макрофагов, усиление Th-1-опосредованного ответа, индукцию экспрессии антигенов MHC типа II на антигенпрезентирующих клетках и др. [22]. При активации клеточного иммунитета продуцентами ИФН-γ являются активированные Th1-лимфоциты (основной активационный маркер — HLA DR) и натуральные клетки-киллеры (CD16), следовательно, наблюдаемое в нашем исследовании снижение количества NK-клеток (natural killer cells, NK cells) при ТБ могло привести к снижению уровня синтеза цитокина, а недостаток ИФН-γ мог стать причиной сниженной активности цитотоксических клеток. Этим можно объяснить факт повышения содержания спонтанно синтезируемого ИФН-γ еще при ЛТИ ($p < 0,05$), при этом можно предположить, что антигенная нагрузка не создавала условия для гиперактивации клеточного ответа. В период развития ТБ этот показатель оставался на уровне, характерном для ЛТИ ($p > 0,05$). Учитывая повышенное содержание спонтанно синтезируемого ИФН-γ, можно было бы предположить, что содержание IgE будет невысоким, т. к. ИФН-γ, будучи продуктом Th1-лимфоцитов, ингибирует пролиферацию Th2-лимфоцитов и индуцированное IL4 переключение синтеза Ig на IgE, а вместо этого способствует синтезу IgG2 [23]. Однако в нашем случае при развитии ТБ был отмечен высокий уровень синтеза IgE, и это может свидетельствовать о недостаточной продукции ИФН-γ и формировании хронического воспаления. Рядом исследователей установлена прямая связь между возникновением очагов хронической бактериальной или грибковой инфекции и гиперпродукцией IgE [24–26].

ИФН-γ также рассматривается как важнейший фактор активации макрофагов [22]. Макрофаги лизируют МБТ, обеспечивая антимикобактериальную защиту, в том числе через регуляцию синтеза про- и противовоспалительных цитокинов [27, 28]. Однако каков баланс клеток и медиаторов, необходимых для уничтожения МБТ и предотвращения патологии легких, до конца неясно, этот вопрос изучается [29]. В нашем исследовании отмечено снижение фагоцитарной активности клеток (снижение резервных возможностей нейтрофилов) при развитии ТБ, что также может свидетельствовать о недостаточной продукции ИФН-γ.

В работах М. М. Авербаха высказывалась гипотеза о существовании в лимфоцитах генов, контролирующих активацию клеток, синтезирующих медиаторы, и депрессии одного участка генома при депрессии другого участка, что может нарушать межклеточное взаимодействие при ТБ [30]. Исследователи пытаются установить генетические факторы риска ТБ [8, 9], в том числе активно изучают ген *IFNG*, который связан с продукцией цитокина ИФН-γ [3, 9] и полиморфизм T-1488C которого влияет на синтез регуляторного белка [7]. В нашем исследовании маркером высокого риска развития ТБ являлся его гетерозиготный генотип по изучаемому генетическому локусу (OR 4,667, 95 % CI 1,236–17,62; $p = 0,008$), при этом — как при первичном, так и вторичном по генезу варианте заболевания. Косвенным показателем этого является и низкая эффективность вакцинации БЦЖ, установленная в группе детей в ранним периодом первичной туберкулезной инфекции. Некоторые исследователи также рассматривают низкую эффективность прививки как фактор риска развития ТБ [18, 31]. Было также определено, что изучаемый полиморфизм гена *IFNG* (гетерозиготный генотип) ассоциирован с иммунным ответом против отдельных микобактериальных антигенов при развитии ТБ: отметили значительное снижение ответа на белки ранней стадии развития туберкулезной инфекции — CFP32B, Rv2660c, ESAT6, 85a [15] и незначительное снижение уровня синтеза ИФН-γ при индукции PPD-L и ESAT6-CFP10, что еще раз подчеркивает

важность оценки данных антигенов для ТБ. Также была определена протективная роль гомозиготного генотипа по аллелю Т и его связь с формированием противотуберкулезного иммунитета у детей.

Таким образом, результаты исследования позволяют рассматривать полиморфизм гена *IFNG* (T-1488C) в качестве дополнительного генетического фактора риска развития туберкулезной инфекции у детей и одной из причин недостаточной функциональной активности клеток, регулирующих синтез ИФН-γ.

ВЫВОДЫ

Оценивая иммунный ответ при развитии туберкулезной инфекции, установили активацию клеточного звена иммунитета, а при ее прогрессировании (от латентной к активной) недостаточную функциональную активность клеток. В качестве основного цитокина адаптивного иммунитета рассматривали ИФН-γ.

Выявлена связь полиморфизма T-1488C гена *IFNG* с выраженностью специфических иммунологических реакций. Гетерозиготный генотип связан с недостаточной продукцией цитокина на белки ранней стадии развития туберкулезной инфекции. Гомозиготный генотип по аллелю Т — с формированием протективного иммунитета.

Установлено, что гетерозиготный генотип полиморфного варианта гена *IFNG* (*rs2069705*) связан с развитием туберкулеза у детей с ЛТИ, что позволяет данный генотип рассматривать в качестве дополнительного фактора риска заболевания.

Литература

1. Abel L, El-Baghdadi J, Bousfiha AA, Casanova JL, Schurr E. Human genetics of tuberculosis: a long and winding road. Philos Trans R Soc B Biol Sci. 2014 May 12; 369 (1645): 20130428.
2. Brodin P, Rosenkrands I, Andersen P, Cole ST, Brosch R. ESAT-6 proteins: protective antigens and virulence factors? Trends Microbiol. 2004 Nov; 12 (11): 500–8.
3. Никулина Е. Л., Наследникова И. О., Уразова О. И., Воронкова О. В., Новицкий В. В., Некрасов Е. В. и др. Аллельный полиморфизм гена IFNγ при туберкулезе легких. Мед. иммунол. 2010; 12 (3): 259–64.
4. Поспелов А. Л. Роль мутаций некоторых генов естественного и приобретенного иммунитета в течении впервые выявленного туберкулеза у детей и подростков [автореф. диссертации]. М.: Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского; 2011. 24 с.
5. Alcaïs A, Fieschi C, Abel L, Casanova JL. Tuberculosis in children and adults: two distinct genetic diseases. J Exp Med. 2005 Dec 19; 202 (12): 1617–21.
6. Hasan Z, Jamil B, Ashraf M, Islam M, Dojki M, Irfan M, et al. Differential live Mycobacterium tuberculosis-, M. bovis BCG-, recombinant ESAT6-, and culture filtrate protein 10-induced immunity in tuberculosis. Clin Vaccine Immunol. 2009 Jul; 16 (7): 991–8.
7. Ожегова Д. С. Функциональная вариабельность генов подверженности инфекционным заболеваниям [автореф. диссертации]. Томск: Научно-исследовательский институт медицинской генетики Томского НИМЦ; 2009. 21 с.
8. El Baghdadi J, Grant AV, Sabri A, El Azbaoui S, Zaidi H, Cobat A, et al. [Human genetics of tuberculosis]. Pathol Biol (Paris). 2013 Jan; 61 (1): 11–6. French.
9. Cliff JM, Kaufmann SH, McShane H, van Helden P, O'Garra A. The human immune response to tuberculosis and its treatment: a view from the blood. Immunol Rev. 2015 Mar; 264 (1): 88–102.
10. Jouanguy E, Altare F, Lamhamedi S, Revy P, Emile JF, Newport M, et al. Interferon-gamma-receptor deficiency in an infant with fatal bacille Calmette-Guérin infection. N Engl J Med. 1996 Dec 26; 335 (26): 1956–61.
11. Quesniaux V, Fremond C, Jacobs M, Parida S, Nicolle D, Yeremeev V, et al. Toll-like receptor pathways in the immune responses to mycobacteria. Microbes Infect. 2004 Aug; 6 (10): 946–59.
12. Рыдловская А. В., Симбирцев А. С. Функциональный полиморфизм гена TNFγ и патология. Цитокины и воспаление. 2005; 4 (3): 4–10.
13. Симбирцев А. С., Громова А. Ю. Функциональный полиморфизм генов регуляторных молекул воспаления. Цитокины и воспаление. 2005; 4 (1): 3–10.
14. Плеханова М. А. (RU), Пацула Ю. И. (RU), Аксенова В. А. (RU), Кривцова Л. А. (RU), Лунин В. Г. (RU), Ткачук А. П. (RU) и др., авторы; Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи (RU), патентообладатель. Способ оценки активности туберкулезной инфекции у детей и подростков. Патент РФ RU 2586279. 10 июня 2016 г.
15. Плеханова М. А. Влияние специфических белков микобактерии туберкулеза на иммунный ответ у детей. Вопр. практ. педиатр. 2017; 12 (3): 19–25.
16. Barry CE 3rd, Boshoff HI, Dartois V, Dick T, Ehrt S, Flynn J, et al. The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies. Nat Rev Microbiol. 2009 Dec; 7 (12): 845–55.
17. Ottenhoff TH, Kaufmann SH. Vaccines against tuberculosis: where are we and where do we need to go? PLoS Pathog. 2012; 8 (5): e1002607.
18. Русских Н. Ю. Факторы риска развития туберкулеза и особенности клинического течения заболевания у детей и подростков из социально-дезадаптированных семей [автореф. диссертации]. М.: Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза; 2008. 30 с.
19. Кузьмина И. К. Значение гиперергической чувствительности к туберкулину в диагностике туберкулеза органов дыхания и формировании групп риска у детей и подростков [автореф. диссертации]. М.: Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза; 2009. 28 с.
20. Бородулин Б. Е., Васнёва Ж. П., Ахмерова Т. Е. Субпопуляционная структура и функциональные особенности $CD4^+$-лимфоцитов у детей с положительными кожными туберкулиновыми пробами. Туберк. и бол. легких. 2013; 90 (6): 19–20.
21. de Martino M, Galli L, Chiappini E. Reflections on the immunology of tuberculosis: will we ever unravel the skein? BMC Infect Dis. 2014; 14 Suppl 1: S1.
22. Кетлинский С. А., Симбирцев А. С. Цитокины. СПб.: Фолиант; 2008. 552 с.
23. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, редакторы. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 4-е изд. St. Louis, MO: Elsevier Saunders; 2006. 2448 с.
24. Балаболкин И. И., Гребенюк В. Н. Атопический дерматит у детей. М.: Медицина; 1999. 240 с.
25. Смирнова Г. И. Аллергодерматозы у детей. М.: БУК Лтд; 1998. 299 с.
26. Торопова Н. П., Синявская О. А. Экзема и нейродермит у детей. Современные представления о патогенезе, клинике, лечении и профилактике. Екатеринбург: Уральский рабочий; 1993. 446 с.
27. Dey B, Bishai WR. Crosstalk between Mycobacterium tuberculosis and the host cell. Semin Immunol. 2014 Dec; 26 (6): 486–96.
28. Rajaram MVS, Ni B, Dodd CE, Schlesinger LS. Macrophage immunoregulatory pathways in tuberculosis. Semin Immunol. 2014 Dec; 26 (6): 471–85.
29. Flynn JL, Chan J, Lin PL. Macrophages and control of granulomatous inflammation in tuberculosis. Mucosal Immunol. 2011 May; 4 (3): 271–8.

30. Авербах М. М., редактор. Иммунология и иммунопатология туберкулеза. М.: Медицина; 1976. 311 с.
31. Касимцева О. В. (RU), Овсянкина Е. С. (RU), авторы; Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза (RU), патентообладатель. Способ оценки эпидемической опасности очага туберкулезной инфекции для контактных детей и подростков. Патент РФ RU 2307594. 10 октября 2007 г.

References

1. Abel L, El-Baghdadi J, Bousfiha AA, Casanova JL, Schurr E. Human genetics of tuberculosis: a long and winding road. Philos Trans R Soc B Biol Sci. 2014 May 12; 369 (1645): 20130428.
2. Brodin P, Rosenkrands I, Andersen P, Cole ST, Brosch R. ESAT-6 proteins: protective antigens and virulence factors? Trends Microbiol. 2004 Nov; 12 (11): 500–8.
3. Nikulina EL, Naslednikova IO, Urazova OI, Voronkova OV, Novitsky VV, Nekrasov EV, et al. [Allelic polymorphism of IFNγ gene in patients with pulmonary tuberculosis]. Meditsinskaya immunologiya. 2010; 12 (3): 259–64. Russian.
4. Pospelov AL. Rol' mutatsiy nekotorykh genov estestvennogo i priobretennogo immuniteta v techenii vpervye vyyavlennogo tuberkuleza u detey i podrostkov [abstract of the dissertation]. Moscow: Moskovskiy nauchno-issledovatel'skiy institut epidemiologii i mikrobiologii im. G. N. Gabrichevskogo; 2011. 24 p. Russian.
5. Alcaïs A, Fieschi C, Abel L, Casanova JL. Tuberculosis in children and adults: two distinct genetic diseases. J Exp Med. 2005 Dec 19; 202 (12): 1617–21.
6. Hasan Z, Jamil B, Ashraf M, Islam M, Dojki M, Irfan M, et al. Differential live Mycobacterium tuberculosis-, M. bovis BCG-, recombinant ESAT6-, and culture filtrate protein 10-induced immunity in tuberculosis. Clin Vaccine Immunol. 2009 Jul; 16 (7): 991–8.
7. Ozhegova DS. Funktsional'naya variabel'nost' genov podverzhennosti infektsionnym zabolevaniyam [abstract of the dissertation]. Tomsk: Research Institute of Medical Genetics of Tomsk NRMC; 2009. 21 p. Russian.
8. El Baghdadi J, Grant AV, Sabri A, El Azbaoui S, Zaidi H, Cobat A, et al. [Human genetics of tuberculosis]. Pathol Biol (Paris). 2013 Jan; 61 (1): 11–6. French.
9. Cliff JM, Kaufmann SH, McShane H, van Helden P, O'Garra A. The human immune response to tuberculosis and its treatment: a view from the blood. Immunol Rev. 2015 Mar; 264 (1): 88–102.
10. Jouanguy E, Altare F, Lamhamedi S, Revy P, Emile JF, Newport M, et al. Interferon-gamma-receptor deficiency in an infant with fatal bacille Calmette-Guérin infection. N Engl J Med. 1996 Dec 26; 335 (26): 1956–61.
11. Quesniaux V, Fremond C, Jacobs M, Parida S, Nicolle D, Yeremeev V, et al. Toll-like receptor pathways in the immune responses to mycobacteria. Microbes Infect. 2004 Aug; 6 (10): 946–59.
12. Rydlovskaya AV, Simbirtsev AS. [TNFγ functional gene polymorphism and pathology]. Tsitokiny i vospalenie. 2005; 4 (3): 4–10. Russian.
13. Simbirtsev AS, Gromova AYu. [Functional gene polymorphisms of the molecules regulating inflammation]. Tsitokiny i vospalenie. 2005; 4 (1): 3–10. Russian.
14. Plekhanova MA (RU), Patsula YuI (RU), Aksenova VA (RU), Krivtsova LA (RU), Lunin VG (RU), Tkachuk AP (RU), et al, inventors; N. F. Gamaleya Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology (RU), assignee. Sposob otsenki aktivnosti tuberkuleznoy infektsii u detey i podrostkov. Russian Federation patent RU 2586279. 2016 Jun 10. Russian.
15. Plekhanova MA. [Influence of mycobacterium tuberculosis-specific proteins on immune response in children]. Voprosy prakticheskoy pediatrii. 2017; 12 (3): 19–25. Russian.
16. Barry CE 3rd, Boshoff HI, Dartois V, Dick T, Ehrt S, Flynn J, et al. The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies. Nat Rev Microbiol. 2009 Dec; 7 (12): 845–55.
17. Ottenhoff TH, Kaufmann SH. Vaccines against tuberculosis: where are we and where do we need to go? PLoS Pathog. 2012; 8 (5): e1002607.
18. Russkikh NYu. Faktory riska razvitiya tuberkuleza i osobennosti klinicheskogo techeniya zabolevaniya u detey i podrostkov iz sotsial'no-dezadaptirovannykh semey [abstract of the dissertation]. Moscow: Central Tuberculosis Research Institute; 2008. 30 p. Russian.
19. Kuz'mina IK. Znachenie giperergicheskoy chuvstvitel'nosti k tuberkulinu v diagnostike tuberkuleza organov dykhaniya i formirovanii grupp riska u detey i podrostkov [abstract of the dissertation]. Moscow: Central Tuberculosis Research Institute; 2009. 28 p. Russian.
20. Borodulin BE, Vasneva ZhP, Akhmerova TE. Subpopulyatsionnaya struktura i funktsional'nye osobennosti $CD4^+$-limfotsitov u detey s polozhitel'nymi kozhnymi tuberkulinovymi probami. Tuberkulez i bolezni legkikh. 2013; 90 (6): 19–20. Russian.
21. de Martino M, Galli L, Chiappini E. Reflections on the immunology of tuberculosis: will we ever unravel the skein? BMC Infect Dis. 2014; 14 Suppl 1: S1.
22. Ketlinskiy SA, Simbirtsev AS. Tsitokiny. St Petersburg: Foliant; 2008. 552 p. Russian.
23. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, editors. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 4th ed. St. Louis, MO: Elsevier Saunders; 2006. 2448 p.
24. Balabolkin II, Grebenyuk VN. Atopicheskiy dermatit u detey. Moscow: Meditsina; 1999. 240 p. Russian.
25. Smirnova GI. Allergodermatozy u detey. Moscow: BUK Ltd; 1998. 299 p. Russian.
26. Toropova NP, Sinyavskaya OA. Ekzema i neyrodermit u detey. Sovremennye predstavleniya o patogeneze, klinike, lechenii i profilaktike. Ekaterinburg: Ural'skiy rabochiy; 1993. 446 p. Russian.
27. Dey B, Bishai WR. Crosstalk between Mycobacterium tuberculosis and the host cell. Semin Immunol. 2014 Dec; 26 (6): 486–96.
28. Rajaram MVS, Ni B, Dodd CE, Schlesinger LS. Macrophage immunoregulatory pathways in tuberculosis. Semin Immunol. 2014 Dec; 26 (6): 471–85.
29. Flynn JL, Chan J, Lin PL. Macrophages and control of granulomatous inflammation in tuberculosis. Mucosal Immunol. 2011 May; 4 (3): 271–8.
30. Averbakh MM, editor. Immunologiya i immunopatologiya tuberkuleza. Moscow: Meditsina; 1976. 311 p. Russian.
31. Kasimtseva OV (RU), Ovsyankina ES (RU), inventors; Central Tuberculosis Research Institute (RU), assignee. Sposob otsenki epidemicheskoy opasnosti ochaga tuberkuleznoy infektsii dlya kontaktnykh detey i podrostkov. Russian Federation patent RU 2307594. 2007 Oct 10. Russian.

ПРОТОКОЛ РАЗРАБОТКИ СКРИНИНГОВОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ПАМЯТИ К ВАКЦИНОУПРАВЛЯЕМЫМ ИНФЕКЦИЯМ: ОДНОВРЕМЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИТРА АНТИТЕЛ К КОРИ, ПАРОТИТУ, КРАСНУХЕ И ГЕПАТИТУ В

Е. П. Мазунина[1] ✉, Д. А. Клейменов[1], В. А. Мануйлов[1,2], В. А. Гущин[1,3], А. П. Ткачук[1]

[1] Лаборатория трансляционной биомедицины,
Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи, Москва

[2] Институт молекулярной медицины,
Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова (Сеченовский университет), Москва

[3] Кафедра вирусологии, биологический факультет,
Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва

Скрининговые мультиплексные тест-системы для оценки уровня содержания антител к вакциноуправляемым инфекциям активно используются в масштабных сероэпидемиологических исследованиях. Между тем, они отсутствуют в виде коммерчески доступных продуктов, т. к. задачи подобных исследований достаточно узкоспецифичны и ограничены разовым применением таких наборов. В результате исследователи должны самостоятельно разрабатывать и внедрять мультиплексные тест-системы при изучении иммунологической памяти населения. В работе обсуждаются теоретические и практические основы разработки мультиплексных скрининговых тест-систем, приводятся протоколы и рекомендации, основанные на практическом опыте авторов.

Ключевые слова: иммунологическая память, гуморальный иммунитет, вакциноуправляемые инфекции, корь, паротит, краснуха, гепатит В, серодиагностика, мультиплексный иммунный анализ

Финансирование: работа поддержана государственным заданием Министерства здравоохранения РФ.

✉ **Для корреспонденции:** Мазунина Елена Петровна
ул. Гамалеи, д. 18, г. Москва, 123098; naldinaelena@rambler.ru

Статья получена: 26.09.2017 **Статья принята к печати:** 10.10.2017

A PROTOCOL OF DEVELOPMENT OF A SCREENING ASSAY FOR EVALUATING IMMUNOLOGICAL MEMORY TO VACCINE-PREVENTABLE INFECTIONS: SIMULTANEOUS DETECTION OF ANTIBODIES TO MEASLES, MUMPS, RUBELLA AND HEPATITIS B

Mazunina EP[1] ✉, Kleymenov DA[1], Manuilov VA[1,2], Gushchin VA[1,3], Tkachuk AP[1]

[1] Laboratory of Translational Biomedicine,
N. F. Gamaleya Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

[2] Institute of Molecular Medicine,
I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

[3] Department of Virology, Faculty of Biology,
Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Multiplex screening assays for measuring antibodies to vaccine-preventable infections are routinely used in large-scale seroepidemiological studies, but not commercially available, because such studies are too specific and normally employ a particular type of the assay only once. This prompts researchers to develop their own solutions for exploring herd immunity. In this work we discuss theoretical principles and practical approaches to developing multiplex screening assays and give examples of protocols and recommendations based on our own experience in the field.

Keywords: immunological memory, humoral immunity, vaccine-preventable infections, measles, mumps, rubella, hepatitis B, serologic diagnosis, multiplex immunoassay

Funding: this work was supported by the Russian Ministry of Health.

✉ **Correspondence should be addressed:** Elena Mazunina
ul. Gamalei, d. 18, Moscow, Russia, 123098; naldinaelena@rambler.ru

Received: 26.09.2017 **Accepted:** 10.10.2017

Качественные характеристики скрининговых тест-систем при проведении масштабных сероэпидемиологических исследований играют решающую роль. Современные тест-системы позволяют проводить скрининг антител против различных инфекций, входящих в национальный календарь вакцинации, и разрабатываются под оборудование, использующее технологии мультиплексного суспензионного анализа. Этот подход позволяет существенно уменьшить требуемый для анализа объем сыворотки крови, увеличить скорость проведения исследования, снизить

его стоимость. Между тем проблемой является полное отсутствие коммерчески доступных мультиплексных тест-систем, готовых для использования в сероэпидемиологических исследованиях. Потребителями таких тест-систем являются в основном лаборатории, проводящие масштабные серологические исследования и изучающие в их рамках десятки тысяч образцов. Тем не менее объем рынка пока все же небольшой, и, кроме того, коммерческий потенциал тест-систем подрывает отсутствие унифицированных требований по составу определяемых антител со стороны потенциальных заказчиков. Это указывает на необходимость разработки мультиплексных тест-систем самими лабораториями, но решение таких задач требует высокой квалификации персонала: необходимо владение специальными методами для разработки и валидации тест-системы, которая будет использоваться для скрининга.

В данной работе приводится протокол разработки тест-системы для проведения мультиплексного иммунного анализа (МИА) антител к вакциноуправляемым инфекциям на примере кори, паротита, краснухи и гепатита В (рис. 1). Обсуждаются потенциальные сложности каждого этапа и пути их преодоления. Данная методика используется в лаборатории трансляционной биомедицины Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи (Москва). Детально описывается последовательность проведения работы на каждом из этапов на примере реальных данных. Мы надеемся, что приведенный протокол и демонстрация реальных данных сложностей станет отправной точкой для разработки мультиплексных суспензионных тест-систем в других лабораториях, что сделает получение данных об иммунологической памяти населения России к вакциноуправляемым инфекциям более эффективным и удобным.

I. Дизайн эксперимента

Рассмотренный здесь метод непрямого (серологического) иммуноанализа на магнитных микросферах и разрабатываемая тест-система были созданы на основе рекомендаций компании Luminex (США), производителя микросфер MagPlex™-C и анализатора MAGPIX [1], анализа литературы [2–10], в том числе серии руководств по планированию иммунологических исследований [11–13] и валидации тест-систем [11, 14–16], а также на основе собственных наработок.

Суть предлагаемого метода заключается в детекции антител в образцах крови с помощью антигенов (АГ), ковалентно связанных с поверхностью магнитных микросфер, и детектирующих антител (козьи антитела против IgG человека), коньюгированных с флюорохромной меткой фикоэритрином. Данный метод отличается от классических иммунометрических методов, например иммуноферментного анализа (ИФА), более широким динамическим диапазоном и возможностью одновременного определения до 50 отдельных аналитов, если для детекции сигнала использовать прибор MAGPIX. Общая схема метода показана на рис. 1.

Данный метод использовался для разработки тест-системы для мультиплексного иммунного анализа, общая схема процесса показана на рис. 2.

Разрабатываемая тест-система предназначена для одновременной детекции IgG против вируса кори, краснухи, эпидемического паротита и вируса гепатита В (anti-HBs) в сыворотке крови человека. Вся процедура пробоподготовки по протоколу готовой методики занимает 1 ч, включая инкубации, плюс около 10 мин отводится на распределение реактивов и отмывки. Анализ на приборе,

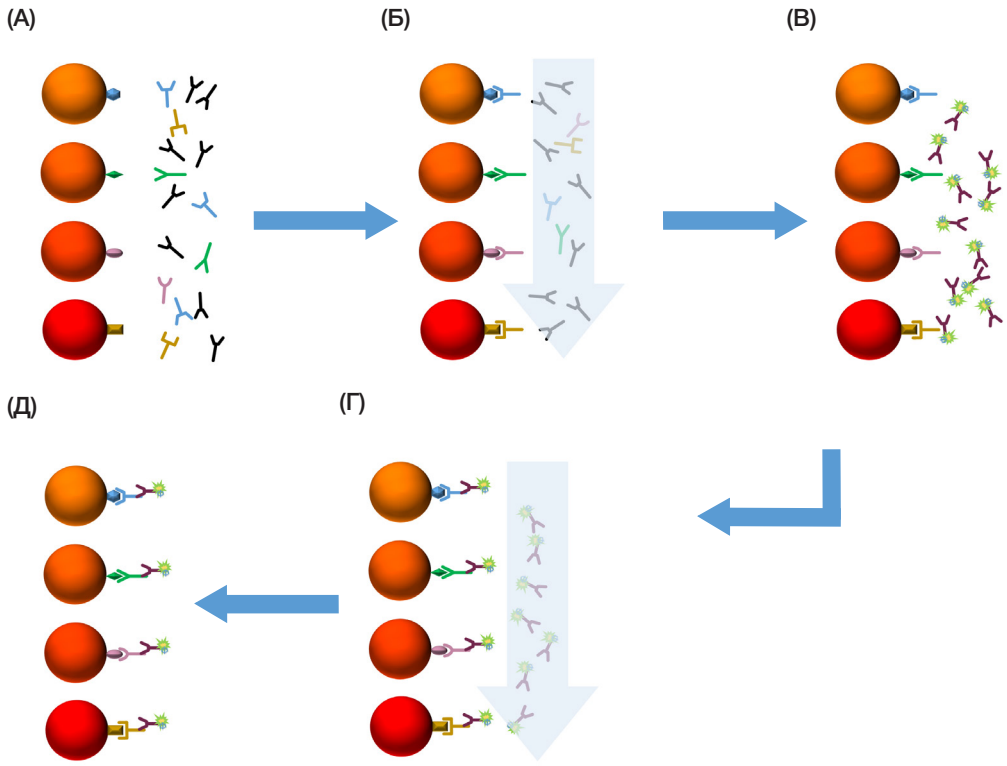


Рис. 1. Общая схема метода непрямого серологического мультиплексного иммунного анализа. Показаны микросферы четырех регионов, каждая из которых сенсибилизирована определенным антигеном. Добавление сыворотки к микросферам и первая инкубация **(А)**. Первая серия отмывок — удаление несвязавшихся компонентов сыворотки **(Б)**. Добавление к микросферам с иммунными комплексами антивидовых антител **(В)**, конъюгированных с флюорохромной меткой — фикоэритрином и вторая инкубация. Вторая серия отмывок — удаление несвязавшихся компонентов (конъюгата) **(Г)**. Микросферы с иммунокомплексами отправляются для анализа в мультиплексный анализатор MAGPIX **(Д)**

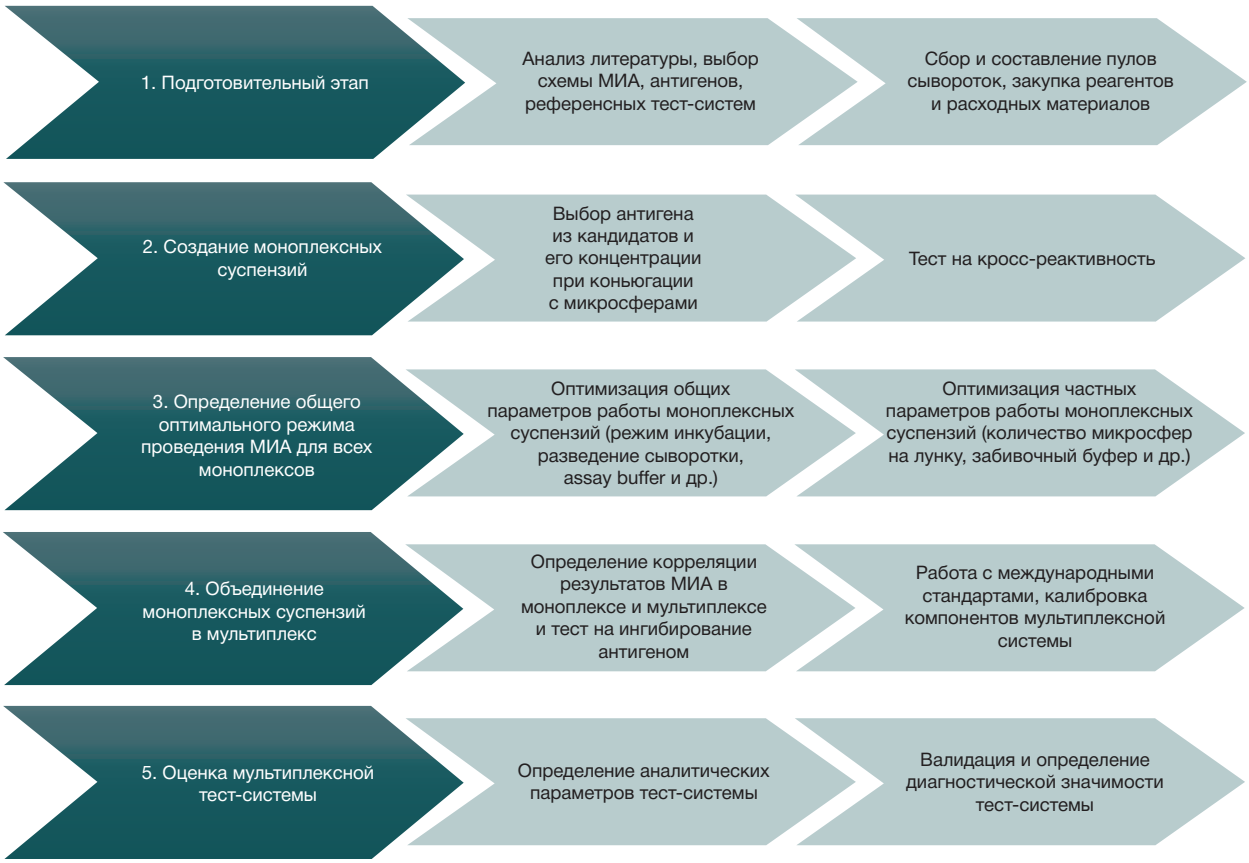


Рис. 2. Общая схема разработки мультиплексной тест-системы.

если используется 96-луночный планшет, занимает около 40 мин. Т. е. время от начала до получения результата составляет менее 2 ч. Рассмотрим подробнее основные этапы разработки тест-системы.

II. Получение моноплексных суспензий

1. Материалы

Для создания моноплексных суспензий необходимы следующие компоненты:

- антигены патогенов, для детекции IgG к которым предназначена мультиплексная тест-система (вирусы кори, эпидемического паротита, краснухи и гепатита В);
- магнитные карбоксилированные микросферы четырех различных регионов (MagPlex™-C);
- выборка сывороток, предварительно охарактеризованных с помощью лицензированной в России тест-системы;
- детектирующие антитела — антитела к IgG человека, конъюгированные с фикоэритрином (PE-Conjugated Goat Anti-Human IgG; One Lambda, Thermo Fisher Scientific, США).

К выбору антигенов подходили, исходя из цели создания мультиплекса. В данном случае основной целью работы была оценка популяционного иммунитета к вакциноуправляемым заболеваниям человека. Вакцины для профилактики заболеваний, вызываемых вирусами кори, краснухи и эпидемического паротита, зарегистрированные в России, являются живыми, поэтому были выбраны прежде всего нативные антигены. Также в разработку были включены и рекомбинантные АГ. Вакцинные препараты для профилактики гепатита В содержат рекомбинантный поверхностный антиген вируса (HBsAg) одного из двух субгенотипов ayw и adw, поэтому они и были выбраны для четвертого компонента мультиплексной суспензии (табл. 1).

Для того, чтобы иметь возможность определять IgG одновременно к четырем патогенам в одной реакции, необходимо иметь набор из соответствующего количества так называемых «регионов» магнитных микросфер (MagPlex™-C). Магнитные микросферы MagPlex, составляющие основу технологии xMAP, имеют микроскопические размеры (диаметр — 6,5 мкм) и окрашены различными концентрациями 2–3 флуорохромов, что позволяет создавать до 500 различных вариантов, или регионов, а, следовательно, и мультиплексные суспензии для детекции до 500 мишеней в одном образце. Магнитные свойства микросфер упрощают выполнение протоколов иммунных анализов таким образом, что с помощью магнитного штатива, на который помещается 96-луночный полистироловый планшет, можно простым встряхиванием удалить ту или иную жидкость из лунки, при этом примагниченные микросферы с иммунокомплексом останутся в ней.

Создание мультиплексной тест-системы включало в себя не только разработку набора микросфер, конъюгированных с антигенами, но и оценку работы этой мультиплексной суспензии на тестовых образцах — сыворотках крови человека. Панель сывороток должна включать образцы, охарактеризованные общепринятым, лицензированным методом. Мы использовали 98 образцов сывороток, охарактеризованных с помощью ИФА-тест-систем производства компании «Вектор-Бест» (Россия) и автоматических иммунологических анализаторов BioPlex

(краснуха, корь; Bio-Rad, США), Architect (краснуха, гепатит B; Abbott, США), Liason (эпидемический паротит; DiaSorin, Италия) и Immulite (краснуха; Siemens, Германия). Для сохранности сывороток и предотвращения многократных циклов замораживания–оттаивания все образцы были разведены в соотношении 1 : 2 предварительно автоклавированным 100 % глицерином и хранились при –20 °C.

Визуализацию иммунокомплексов «микросфера – антиген – IgG» осуществляли с помощью детектирующих антител. Для этого применяли широко используемый препарат козьих антител, конъюгированных с фикоэритрином, который избирательно взаимодействует только с тяжелыми цепями IgG человека (PE-Conjugated Goat Anti-Human IgG).

Для количественного определения антител в сыворотке крови была построена калибровочная кривая, относительно которой в дальнейшем определяли концентрацию IgG для исследуемого образца в международных единицах в миллилитре (МЕ/мл). Существуют международные стандарты (International Standarts, IS), содержащие известное количество иммуноглобулинов к тому или иному патогену, однако они поставляются в ограниченных количествах и поэтому использовались нами для калибровки вторичных стандартов (Secondary Standarts, SS) на основе имеющихся сывороток. В эксперименте использовали IS Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) из коллекции Национального института биологических стандартов и контролей (NIBSC, Великобритания) (табл. 2). SS в свою очередь являлись внутренним стандартом для создаваемой мультиплексной суспензии, относительно которого в дальнейшем отбирались калибровочные стандарты для каждого анализа [11]. Т. к. для эпидемического паротита стандартов IS ВОЗ не существует, в качестве SS использовали калибровочные образцы одной из коммерческих ИФА тест-систем. Также в состав иммунологических тест-систем входят сыворотки человека для контроля качества работы тест-системы, добавляемые как отдельные образцы. Мы использовали контроли из коллекции NIBSC (табл. 2).

2. Сенсибилизация микросфер — получение моноплексных суспензий

При разработке тест-системы были использованы два способа сенсибилизации микросфер. Оба они основаны на реакциях карбодиимидной химии, и один является модификацией другого. Для нативных антигенов краснухи и паротита, а также для рекомбинантного антигена кори использовали протокол ковалентного связывания антигена с поверхностью микросферы при помощи двухэтапной карбодиимидной химической реакции. Такой способ рекомендован, если сенсибилизирующая молекула имеет размер более 10 кДа. Для молекул менее 10 кДа, каким являлись рекомбинантные HBsAg, микросферы были предварительно, посредством одноэтапной карбодиимидной химической реакции, модифицированы химическим спейсером — дигидразидом адипиновой кислоты (ADH), с которым уже на втором этапе также карбодиимидной химической реакцией проводилось связывание АГ со спейсером на поверхности микросфер. Это было необходимо

Таблица 1. Антигены-кандидаты для включения в тест-систему

Заболевание	Тип	Коммерческое название антигена	Производитель
Гепатит B	Рекомб.	Вирус гепатита B, подтип ayw (HbsAg)	«Биалекса», Россия
		Вирус гепатита B, подтип adw (HbsAg)	
Краснуха	Рекомб.	Белок E1 вируса краснухи	«Биалекса», Россия
		Белок E2 вируса краснухи	
		Белок C вируса краснухи	
	Нативн.	Rubella K1S grade antigen	Microbix Biosystems, Канада
		Rubella K2S grade antigen	
		Rubella virus grade 2 antigen	Jena Bioscience, Германия
Корь	Рекомб.	Нуклеокапсидный белок вируса кори NCP	Биотехнологическая компания «Капель», Россия
	Нативн.	Measles grade 2 antigen	Microbix Biosystems, Канада
		Measles virus antigen (Premium)	Jena Bioscience, Германия
		Measles virus antigen	
Эпидемический паротит	Рекомб.	Нуклеокапсидный белок вируса паротита NCP	Биотехнологическая компания «Капель», Россия
	Нативн.	Mumps grade 2 antigen	Microbix Biosystems, Канада
		Mumps/Parotitis virus antigen	Jena Bioscience, Германия

Таблица 2. Стандарты и контрольные сыворотки, использованные при создании тест-системы

Заболевание	Название стандарта/контроля	Концентрация или кол-во антител	Источник
Гепатит B	WHO International Standard Second International Standard for anti-hepatitis B surface antigen (anti-HBs) immunoglobulin, human	100 IU в виале	NIBSC
	Anti-Hepatitis B Surface Antigen Quality Control Serum 1	219,0±16 IU/ml	NIBSC
Краснуха	WHO International Standard Anti Rubella Immunoglobulin, Human	1600 IU в виале	NIBSC
	Anti-Rubella Quality Control Reagent Sample 1	25,5±2,9 IU/ml	NIBSC
Корь	WHO International Standard 3rd International Standard for Anti-Measles	3 IU в виале	NIBSC
	Anti-Measles Quality Control Reagent Sample 1	754,6 mIU/ml	NIBSC
Эпидемический паротит	Anti-Mumps Quality Control Reagent Sample 1	728,6 EU/ml	NIBSC

для поднятия маленького пептида над шероховатой поверхностью микросферы и обеспечения возможности реакции между АГ и аналитом.

2.1 Сенсибилизация микросфер двухэтапной карбодиимидной химической реакцией (для сенсибилизации 10^6 микросфер)

Необходимые для процесса сенсибилизации микросфер растворы готовились в дистиллированной воде ($дH_2O$) с использованием следующих реактивов:

• $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ для активационного буфера (0,1 М NaH_2PO_4, pH 6,2);

• MES гидрат для буфера для связывания (50 мМ MES, pH 5,0);

• фосфатно-солевой буферный раствор с добавлением 0,02 % Tween-20, 0,1 % BSA, 0,05 % NaN_3, pH 7,4 (далее — PBS-TBN) — промывочный буфер;

• 1-этил-3-[3-диметиламинопропил] карбодиимид гидрохлорид (EDC) и N-гидроксисульфосукцинимида натриевая соль (s-NHS) — концентрация 50 мг/мл для каждого реагента. Готовятся непосредственно перед использованием;

Необходимое оборудование:

• магнитный штатив для 1,5 мл пробирок типа Eppendorf;

• ультразвуковая ванна;

• центрифуга типа Vortex;

• лабораторный ротатор;

• автоматический счетчик клеток или камера Горяева и микроскоп;

• пробирки low-bind 1,5 мл типа Eppendorf.

Протокол двухэтапной карбодиимидной коньюгации:

– подготовка микросфер:

1. флакон с микросферами перемешать на ротаторе в течение 2 мин при 20 об./мин;

2. необходимое количество микросфер перенести в пробирку, «заводской» объем довести до 250 мкл $дH_2O$;

3. вортекс/соникация — 20 с, поместить на магнитный штатив (далее — магнит) на 1 мин, удалить надосадочную жидкость;

– активация микросфер:

4. добавить в пробирку 80 мкл буфера для активации, вортекс — 20 с;

5. добавить по 10 мкл EDC и s-NHS, вортекс — 20 с;

6. оставить на 20 мин, перемешивая на вортексе по 20 с каждые 10 мин;

– отмывка № 1:

7. магнит — 1 мин, удалить надосадочную жидкость;

8. добавить в пробирку 250 мкл буфера для связывания;

9. вортекс/соникация — 20 с, магнит — 1 мин, удалить надосадочную жидкость;

10. повторить п. 8 и 9;

– сенсибилизация микросфер:

11. добавить в пробирку 100 мкл буфера для связывания, вортекс/соникация — 20 с;

12. добавить в пробирку необходимое количество количество антигена (табл. 3);

13. довести буфером для связывания объем до 500 мкл;

14. поместить пробирку на ротатор на 120 мин. при 20 об./мин в темное место;

– отмывка № 2:

15. магнит — 1 мин, удалить надосадочную жидкость;

16. добавить в пробирку 1000 мкл промывочного буфера;

17. вортекс/соникация — 20 с, магнит — 1 мин, удалить надосадочную жидкость;

18. повторить п. 16 и 17 еще 2 раза;

– завершение процедуры:

19. ресуспендировать микросферы в 1000 мкл буфера для хранения. Это может быть PBS-TBN или любой другой блокирующий буфер (определяется экспериментально);

20. измерить концентрацию микросфер на счетчике клеток или в камере Горяева. Исходя из этой цифры, рассчитать объем микросфер для приготовления в МИА;

21. сенсибилизированные микросферы хранить в темном месте на +4 °С и использовать в анализе через 16 ч (на следующий день).

2.2 Сенсибилизация микросфер двукратной одноэтапной карбодиимидной химической реакцией через спейсер (для сенсибилизации $1,5*10^6$ микросфер).

Необходимые для процесса сенсибилизации микросфер растворы готовили в дистиллированной воде ($дH_2O$) с использованием следующих реактивов:

• MES гидрат для буфера для связывания (0,1 М MES, pH 6,0);

• MES гидрат для промывочного буфера № 1 (0,1 М MES, pH 4,5);

• фосфатно-солевой буферный раствор с добавлением 0,02 % Tween20, 0,1 % BSA, 0,05 % NaN_3, pH 7,4 (далее — PBS-TBN) — промывочный буфер №2;

• раствор ADH в концентрации 100 мг/мл в буфере для связывания;

• EDC в концентрации 100 мг/мл в $дH_2O$. Для п7 и для п19 готовить раствор отдельно.

Необходимое оборудование:

• магнитный штатив для 1,5 мл пробирок типа Eppendorf;

• ультразвуковая ванна;

• центрифуга типа Vortex;

• лабораторный ротатор;

• автоматический счетчик клеток или камера Горяева и микроскоп;

• пробирки low-bind 1,5 мл типа Eppendorf.

Протокол двукратной одноэтапной карбодиимидной коньюгации:

– подготовка микросфер:

1. флакон с микросферами перемешать на ротаторе в течение 2 мин при 20 об./мин;

2. необходимое количество микросфер перенести в пробирку, «заводской» обьем довести до 250 мкл $дH_2O$;

3. вортекс/соникация — 20 с, магнит — 1 мин, удалить надосадочную жидкость;

4. добавить в пробирку 500 мкл буфера для связывания;

5. вортекс/соникация — 20 с, магнит — 1 мин, удалить надосадочную жидкость;

– сенсибилизация микросфер спейсером:

6. добавить в пробирку 30 мкл ADH (1 мг вещества на 500 000 микросфер);

7. добавить в пробирку 30 мкл EDC (1 мг вещества на 500 000 микросфер);

8. довести объем до 500 мкл буфером для связывания;

9. поместить пробирку на ротатор на 60 мин при 20 об./мин в темное место;

– отмывка № 1:

10. магнит — 1 мин, удалить надосадочную жидкость;

11. добавить в пробирку 500 мкл буфера для промывки №1;

12. магнит — 1 мин, удалить надосадочную жидкость;
13. повторить п. 11 и 12 еще 2 раза;
– завершение процедуры сенсибилизации микросфер спейсером:
14. ресуспендировать микросферы в 1 000 мкл буфера для промывки №1;
15. измерить концентрацию микросфер на счетчике клеток или в камере Горяева. Исходя из этого числа, рассчитать количество антигена для связывания;
– сенсибилизация микросфер со спейсером:
16. вортекс/соникация — 20 с, магнит — 1 мин, удалить надосадочную жидкость;
17. добавить в пробирку 100 мкл буфера для связывания, вортекс/соникация — 20 с;
18. добавить в пробирку необходимое количество пептида (табл. 3);
19. добавить в пробирку 30 мкл EDC (1 мг вещества на 500 000 микросфер);
20. довести объем до 500 мкл буфером для связывания;
21. поместить пробирку на ротатор на 120 мин при 20 об./мин в темное место;
– отмывка № 2:
22. магнит 1 мин, удалить надосадочную жидкость;
23. добавить в пробирку 1 000 мкл промывочного буфера № 2;
24. вортекс/соникация — 20 с, магнит — 1 мин, удалить надосадочную жидкость;
25. повторить п. 23 и 24 еще 2 раза;
– завершение процедуры:
26. ресуспендировать микросферы в 1 000 мкл буфера для хранения. Это может быть PBS-TBN или любой другой блокирующий буфер (определяется экспериментально). В данной тест-системе для моноплекса гепатита В используется PBS-TBN;
27. измерить концентрацию микросфер на счетчике клеток или в камере Горяева. Исходя из этой цифры, рассчитать объем микросфер для приготовления в МИА;
28. сенсибилизированные микросферы хранить в темном месте на +4 °С и использовать в анализе через 16 ч (на следующий день).

3. Протокол постановки мультиплексного непрямого (серологического) иммунного анализа

Прежде чем проверять параметры мультиплексной тест-системы, важно оценить работу каждой моноплексной суспензии по отдельности и подобрать оптимальные условия, общие для всех моноплексных систем. Такую оценку включает этап «Определение общего оптимального режима проведения МИА для всех моноплексов» (п. 3 на рис. 2). Для этого анализируются сыворотки по протоколу, описанному ниже.

Необходимые материалы:

• 96-луночный полистироловый планшет (далее — планшет);
• микропробирки объемом 0,5, 1,5 и 2 мл;
• набор охарактеризованных по наличию целевых IgG сывороток;
• суспензии готовых микросфер, коньюгированных с антигенами;
• стоковый 100-кратный раствор коньюгата детектирующих антител с фикоэритрином;
• фосфатно-солевой буферный раствор PBS-TBN.

Необходимое оборудование:

• магнитная подставка для планшета Magnetic Plate Separator (Luminex);
• центрифуга типа Vortex;
• термошейкер;
• ультразвуковая ванна;
• анализатор MAGPIX (Luminex).

Протокол проведения анализа:

1. заранее включить нагрев термошейкера до +37 °С и анализатор MAGPIX;
2. приготовить разведение сыворотки 1 : 50 буферным раствором PBS-TBN в микропробирках;
3. приготовить суспензию микросфер из расчета 2 500 микросфер на одну реакцию (одну лунку в планшете) в объеме 50 мкл:
• вортекс/соникация — 20 с,
• отобрать нужный объем суспензии в новую пробирку и довести объем суспензии до расчетного буферным раствором PBS-TBN;
4. в планшет внести по 50 мкл готовой суспензии микросфер и 50 мкл разведенной сыворотки (в итоге сыворотки тестируются в разведении 1 : 100);
5. первая инкубация (30 мин, +37 °С): закрепить планшет в термошейкере и установить режим перемешивания 800 об./мин и таймер на 30 мин;
6. во время первой инкубации приготовить раствор детектирующих антител: отобрать нужное количество стокового раствора антител и приготовить разведение 1 : 100 PBS-TBN из расчета 50 мкл готового раствора детектирующих антител на лунку (итоговая концентрация антител в лунке — 2,5 мкг/мл).
7. снять планшет с термошейкера и установить на магнитную подставку на 2 мин, после чего, не убирая планшет с подставки, удалить жидкость из планшета;
8. отмывка PBS-TBN: в лунки планшета многоканальной пипеткой внести по 100 мкл PBS-TBN, перемешать содержимое лунок на термошейкере в течение 30 с, установить планшет на магнитную подставку на 2 мин, удалить жидкость из планшета, повторить процедуру отмывки еще раз;
9. ресуспендировать микросферы 50 мкл PBS-TBN на лунку;
10. в каждую лунку внести 50 мкл готового раствора детектирующих антител (п. 6);
11. вторая инкубация (30 мин, +37 °С): закрепить планшет в термошейкере и установить режим перемешивания 800 об./мин и таймер на 30 мин;
12. отмывка PBS-TBN: см. п. 8;
13. после отмывки внести по 100 мкл PBS-TBN в каждую лунку, перемешать содержимое лунок на термошейкере в течение 30 с;
14. установить планшет в анализатор MAGPIX и запустить анализ.

Важно отметить, что такие параметры, как температура и время инкубации, разведение сыворотки, концентрация детектирующих антител, вариабельны, и их изменение может привести к увеличению или же снижению интенсивности флуоресценции (MFI — единицы измерения флуоресцентного сигнала в методике). Нахождение выгодных для всех 4 моноплексных систем параметров — суть оптимизации тест-системы.

4. Оптимизация работы моноплексных суспензий

Оптимизация — это неотъемлемая часть создания мультиплексной суспензии. Она подразумевает подбор таких

условий для каждого из моноплексов, при которых выполняется ряд требований к тест-системам:

• низкие значения MFI для отрицательного контроля, когда в качестве аналита выступает например кроличья сыворотка либо сыворотки человека, в которых отсутствуют все иммуноглобулины;

• как можно больший диапазон значений сигнала между образцами сывороток, содержащими и не содержащими искомые антитела;

• соответствие результатов, полученных с помощью моноплексных суспензий, результатам, полученным референсным методом (ИФА).

Оптимизация затрагивает как общие факторы (температура и время инкубации, разведение сыворотки и раствор для разведения сыворотки, концентрация детектирующих антител), влияющие на все 4 моноплекса, так и частные факторы, которые могут быть для каждой моноплексной суспензии индивидуальными (тип блокирующего буфера для микросфер, концентрация антигена при конъюгации с микросферами, количество микросфер каждой моноплексной суспензии в лунке). По результатам оптимизации вышеперечисленных параметров были выбраны оптимальные условия для всех моноплексных суспензий (табл. 3).

Ввиду того, что некоторые выбранные антигены могут быть рекомбинантными, полученными путем экспрессии их в *Escherichia coli*, необходимо учесть, что препарат целевого антигена может содержать примеси антигенов этого микроорганизма. Антитела к этой бактерии, потенциально находящиеся в каждой сыворотке человека, могут добавить ложноположительный сигнал в общее значение MFI. Для того чтобы избежать подобного эффекта, в состав буфера для разведения сывороток включали лизат *E. coli* (3 %), который связывает специфичные к ней иммуноглобулины в исследуемой сыворотке [5].

Еще одним важным пунктом оптимизации тест-системы является оценка кросс-реактивности каждого моноплекса. Желательно в процессе создания тест-системы провести такой тест как можно раньше. Эксперименты на кросс-реактивность показывают, например, насколько исследуемая моноплексная тест-система с антигеном к вирусу кори специфична в отношении детекции антител IgG к вирусу кори и не взаимодействует с антителами к другим инфекциям.

Постановка эксперимента на кросс-реактивность осуществляется по протоколу, описанному выше, при выбранных условиях (табл. 3). Так, сыворотку без антител IgG к вирусу кори, но с антителами IgG к остальным патогенам тестируют с моноплексной суспензией микросфер, конъюгированных с антигеном вируса кори. Таким же образом с помощью аналогично подобранных сывороток поступают с остальными моноплексными суспензиями. Если результаты показывают MFI на уровне предела чувствительности (LOD), то можно утверждать, что моноплексная суспензия не обладает перекрестной реактивностью, в обратном случае потребуется замена АГ.

На данном этапе разработки мультиплексной тест-системы была протестирована панель из 70 сывороток для детекции антител IgG к вирусам краснухи, кори и эпидемического паротита с помощью оптимизированных моноплексных суспензий. Проведение анализа осуществляли в соответствии с выбранными условиями (табл. 3). Результаты отображены на рис. 3–5 для метода МИА в единицах MFI, поскольку процедура калибровки и превращение тест-системы в количественную только предстоит. Для сравнения использовали результаты, полученные для той же панели сывороток, но с помощью метода ИФА («ВектоРубелла-IgG», «ВектоКорь-IgG», «ВектоПаротит-IgG»; «Вектор-Бест»).

Можно отметить, что дифференциация сывороток, содержащих и не содержащих антитела IgG к вирусу краснухи, с помощью моноплескной суспензии соответствует таковой в системе ИФА (рис. 3). Что же касается кори и паротита, то тут можно отметить достаточно высокие значения MFI для сывороток, не содержащих антитела IgG, которые близки, а в некоторых случаях превышают значения «серой зоны» (рис. 4–5). Это пример того, что моноплексные суспензии для детекции IgG к вирусам кори и эпидемического паротита требуют дополнительной оптимизации.

Безусловно, без этапа калибровки моноплексных тест-систем для детекции антител IgG к вышеперечисленным вирусам нельзя сравнивать результаты этих двух методов номинально, но все же их получение позволяет

Таблица 3. Некоторые оптимальные условия проведения анализа с помощью создаваемой тест-системы

Параметр		**Моноплексная суспензия**			
Вирус		Корь	Паротит	Краснуха	Гепатит B
Антиген	Название	Нуклеокапсидный белок вируса кори NCP	Mumps/Parotitis virus antigen (нативный)	Rubella K2S grade antigen (нативный)	HbsAg рекомбинантный, подтипы ayw и adw
	Концентрация, мкг/млн микросфер	5	10	10	20 (10 HbsAg ayw + 10 HbsAg adw)
Буфер для забивки микросфер		PBS-TBN			
Разведение сыворотки, буфер для разведения		1 : 100, PBS-TBN + лизат *E. coli*			
Концентрация детектирующих антител (Goat Anti-Human IgG)		2,5 мкг/мл			
Режим инкубации		• первая инкубация — 30 мин, вторая инкубация — 30 мин • температура инкубации — +37 °C • режим перемешивания — 800 об./мин			
Кол-во микросфер в лунке каждого моноплекса		2 500			

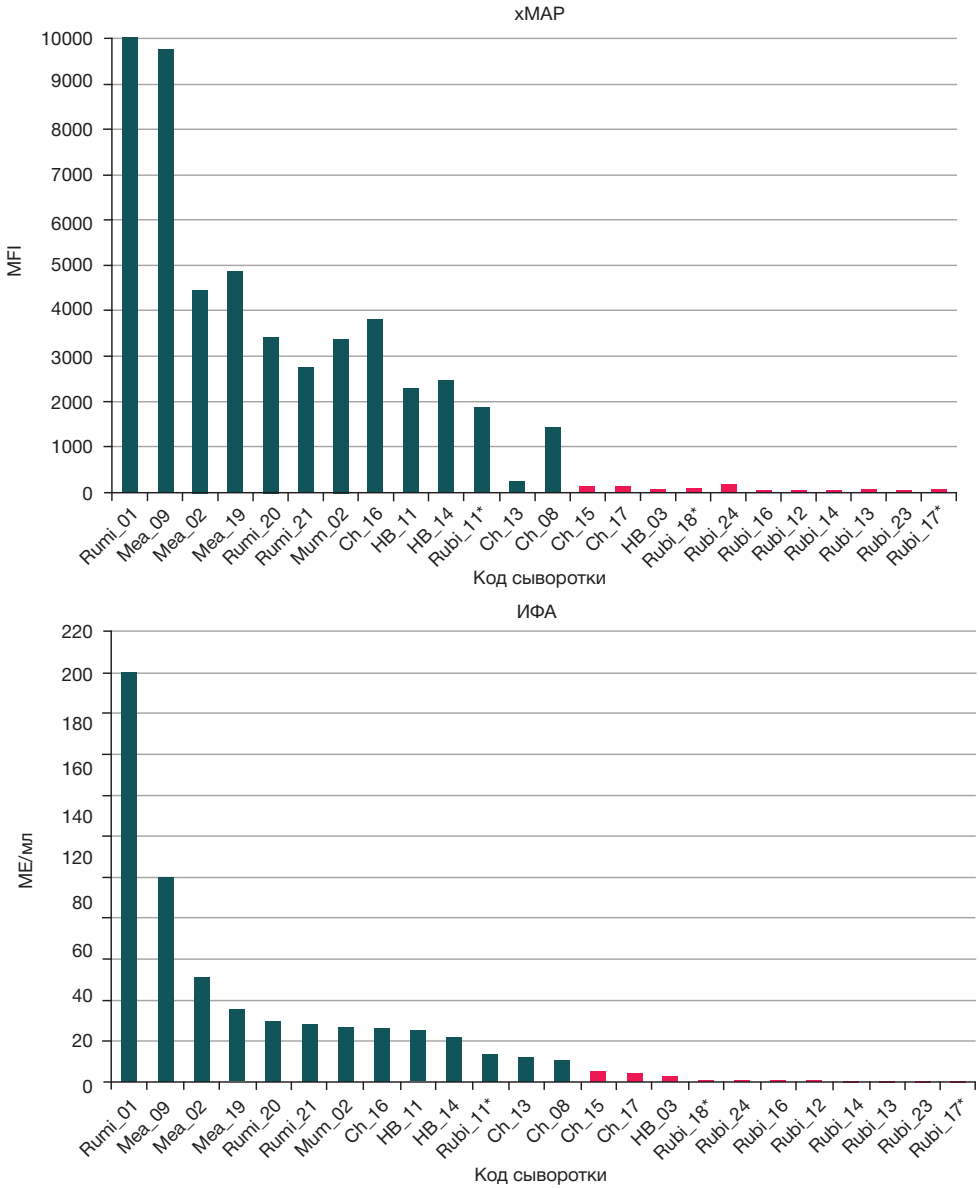


Рис. 3. Результаты определения антител IgG к вирусу краснухи в сыворотках крови человека методами xMAP и ИФА

до объединения моноплексов в мультиплексную суспензию судить о качестве работы моноплексной суспензии и решить, что дополнительная оптимизация не требуется и данная моноплексная тест-система готова к калибровке.

Созданные пулы сывороток были предварительно протестированы в постановках с моноплексными суспензиями в разведении от 1 : 100 до 1 : 409 600 4-кратным шагом. В результате были получены кривые, позволяющие также преварительно оценить потенциал этих пулов для использования в качестве вторичных стандартов (рис. 6).

III. Получение мультиплексных суспензий

После того, как каждая моноплексная суспензия прошла стадию оптимизации, предварительное тестирование на панели сывороток в сравнении с методом ИФА и был выбран единый режим проведения анализа, необходимо объединить моноплексные суспензии в мультиплекс и выяснить, как результаты, полученные в мультиплексной тест-системе, коррелируют с таковыми, полученными с помощью моноплексных суспензий по отдельности. Для этого осуществляют постановку, где панель сывороток анализируют параллельно с помощью мультиплексной суспензии и с помощью моноплексных суспензий [4], по результатам которой проводят корреляционный анализ.

Создаваемая тест-система для детекции антител IgG к вирусам кори, краснухи, эпидемического паротита и гепатита В в настоящий момент находится на стадии сравнения качественных характеристик моноплексных и мультиплексной суспензий в выбранных условиях. Далее приводится схема с описанием действий по валидации мультиплексной суспензии без примеров по выбранным патогенам.

Ранее на этапе оптимизации упоминалась такая характеристика тест-системы, как специфичность. Определение специфичности тест-системы является неотъемлемой частью валидации (см. п. 3 на рис. 2). Однако на этапе получения мультиплексной тест-системы специфичность определяется иначе, нежели кросс-реактивность. Проводят тесты гомологичного и гетерологичного ингибирования сывороток антигенами [3, 7–11]. Для теста на ингибирование необходимо выбрать сыворотку с заведомо известным высоким содержанием антител IgG ко всем 4 патогенам.

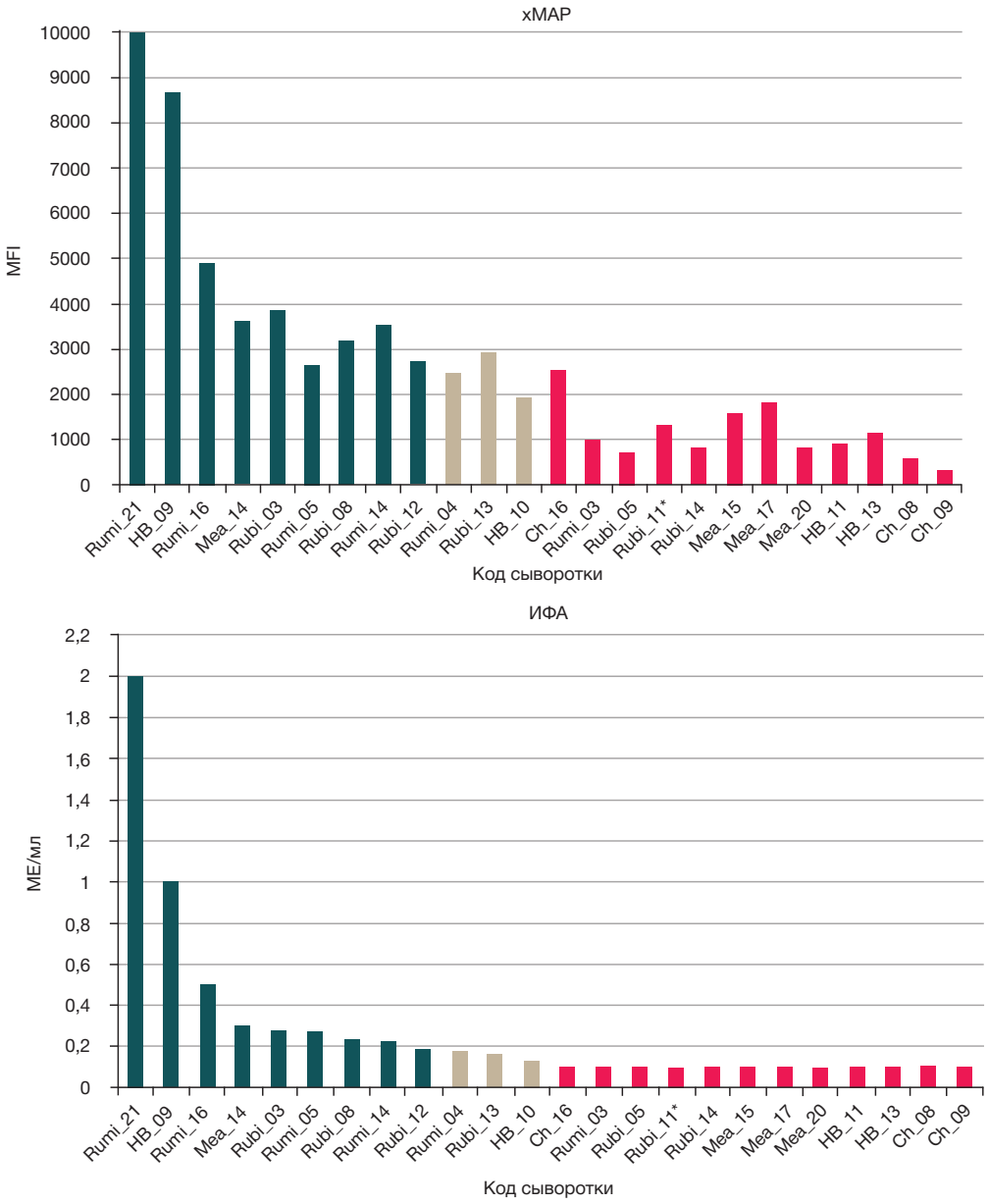


Рис. 4. Результаты определения антител IgG к вирусу кори в сыворотках крови человека методами xMAP и ИФА

Из выбранной сыворотки отбирают 4 аликвоты, каждая из которых подвергается предварительной инкубации с одним из 4 АГ. После преинкубации с антигенами к сыворотками добавляют мультиплексную суспензию микросфер. Параллельно в постановку включают контроль, в качестве которого выступает та же самая сыворотка, но без преинкубации с АГ. Гомологичное ингибирование в данном случае показывает специфичность моноплекса в составе мультиплексной системы в отношении гомологичного антигена, а гетерологичное ингибирование является показателем неспецифичной реакции моноплексных суспензий в отношении гетерологичных антигенов. Приемлемые пределы гомологичного и гетерологичного ингибирования — 80–120 % и менее 30 % соответственно.

Если тест-система демонстрирует специфичность в установленных пределах, то следующим шагом является стандартизация тест-системы — ее калибровка по международным стандартам (табл. 2). Для начала нужно отобрать сыворотки с высоким содержанием антител IgG для каждого патогена, сформировать из них положительный пул, возможно, будущий вторичный стандарт. Далее, в рамках одной постановки осуществить раститровку международного стандарта и созданного положительного пула сывороток 4-кратным шагом (в соответствии с рекомендациями [11]), начиная с разведения 1 : 100, с каждой из 4 моноплексных суспензий по протоколу, приведенному ранее, в единых выбранных условиях. По результатам данной постановки проводится построение калибровочных кривых по известным значениям международных стандартов (в МЕ/мл) и полученным в ходе данного эксперимента значениям для тех же стандартов, но в единицах MFI для каждой моноплексной суспензии. Благодаря полученным калибровочным кривым выясняются концентрации каждого аналита в положительном пуле сывороток, после чего проводится построение кривых раститровки и делаются выводы о том, подходит ли данный пул для вторичного стандарта, необходимо ли его предварительное разведение.

Для стандартизации мультиплексной суспензии проводят такую же постановку с раститровкой IS и SS в параллели, но уже в мультиплексной суспензии микросфер. Калибровочные кривые сравнивают с таковыми для моноплексов, полученными на предыдущем этапе, делают

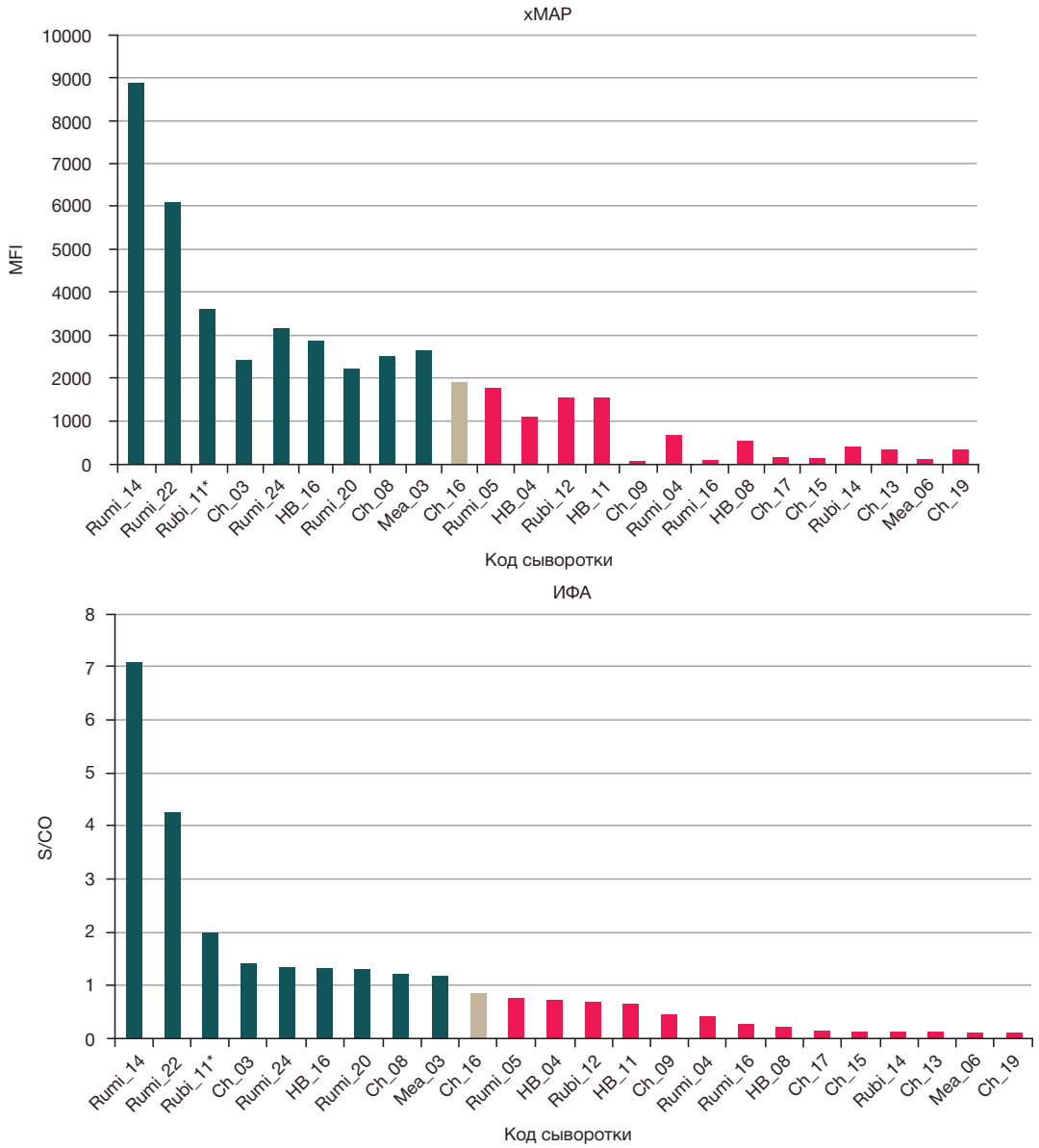


Рис. 5. Результаты определения антител IgG к вирусу эпидемического паротита в сыворотках крови человека методами xMAP и ИФА

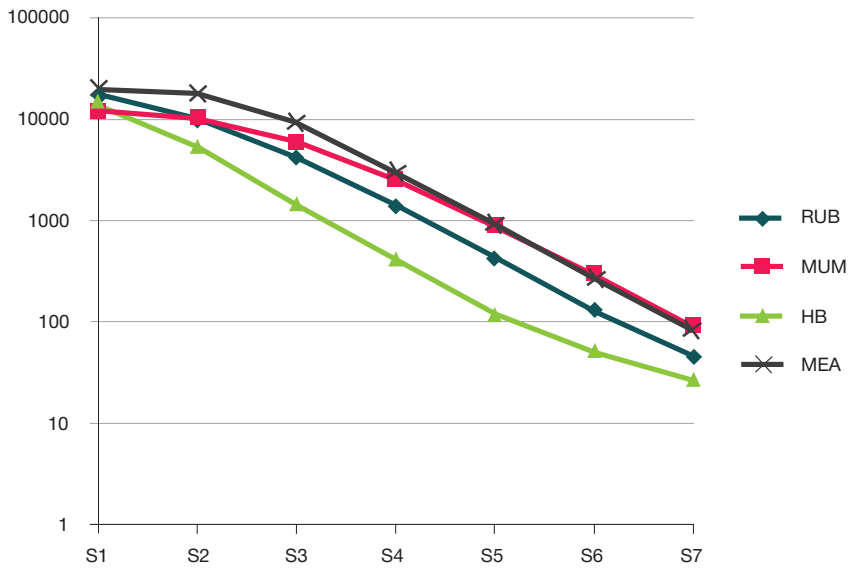


Рис. 6. Кривые разведения пулов сывороток с высоким содержанием антител к вирусам краснухи (RUB), кори (MEA), эпидемического паротита (MUM) и гепатита B (HB)

вывод об их корреляции. А также сравнивают кривые растворовки IS и SS, после чего делают заключение о пригодности кривой растворовки SS в качестве калибровочной кривой для мультиплексной суспензии.

Далее следует выбор оптимальной математической модели, которая бы наиболее точно описывала полученную калибровочную кривую и применялась в дальнейшем для расчета концентраций антител методом МИА, выраженных уже в международных единицах.

IV. Определение аналитических параметров, валидация и определение диагностической значимости тест-системы

Валидация — серия экспериментов, проводимых с целью достоверной оценки аналитических параметров тест-системы с помощью аттестованного аналитического метода. Цель валидации — удостовериться в возможности успешного использования разработанной тест-системы по назначению, а также определить ограничения при ее использовании в рутинной практике. Аналитических параметров у теста существует довольно много, и часть из них определяется и улучшается практически с самого начала разработки, например описанный выше тест на кросс-реактивность. Получается, что вообще любой эксперимент с сыворотками с заведомо известной концентрацией аналита (по данным какого-либо сертифицированного метода) в рамках создания тест-системы в какой-то степени является частью процесса валидации, или, другими словами, невозможно точно сказать, когда заканчивается создание тест-системы и начинается валидация.

Здесь будут рассмотрены основные аналитические параметры в контексте разрабатываемой тест-системы, а также предполагаемая схема ее валидации.

Чувствительность — это в широком смысле слова способность детектировать определенный аналит, а выразить ее можно через минимальную концентрацию этого аналита, достоверно детектируемую тест-системой. Выделяют аналитическую чувствительность тест-системы, когда делают несколько повторов нулевой пробы (без аналита) и среднее значение полученных результатов плюс 2–3 стандартных отклонения образуют описываемую характеристику. Ее еще называют пределом чувствительности, обнаружения или детекции (LOD). Другими словами, пределом обнаружения можно назвать минимальную концентрацию аналита, достоверно детектируемую (но необязательно количественно) рассматриваемой тест-системой. Выделяют верхний и нижний пределы количественного определения (ULOQ и LLOQ — upper & lover limit of quantification), т. е. максимальное и минимальное количества аналита, которые можно детектировать при определенных параметрах точности и воспроизводимости.

Существует также понятие функциональной чувствительности — минимальной концентрации аналита, при детекции которой в нескольких повторах коэффициент вариации будет меньше определенного значения (10–20 %).

Прецизионность — степень разброса результатов в серии измерений, выполненных с помощью данной тест-системы в отношении одного и того же образца, представляемая в виде коэффициента вариации (CV %). Он отражает степень разброса результатов, полученных в одинаковых условиях. Существует определенная иерархия уровней этого показателя. Выделяют прецизионность внутрипостановочную (вариабельность результатов в дублях/повторах в рамках одного запуска; считается приемлемой на уровне менее 10 %), межпостановочную (вариабельность результатов в рамках нескольких запусков методики; считается приемлемой на уровне менее 20 %), между лотами различных реагентов, между приборами и между различными исследователями, а также выделяют понятие воспроизводимости — прецизионности результатов использования методики между разными лабораториями.

Специфичность — в случае иммунологического метода это способность антитела реагировать только с одним антигеном, причем один из этой пары по совместительству является искомым аналитом. Мера способности антитела реагировать с другими веществами помимо антигена/аналита называется кросс-реактивностью.

Правильность — степень соответствия значения, полученного с использованием методики, и истинного значения измеряемой величины. Обязательная характеристика всех

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C1	C1	C1	Б	Б	Б	Б	Б	Б	C1	C1	C1
B	C2	C2	C2	Б	Б	Б	Б	Б	Б	C2	C2	C2
C	C3	C3	C3	О+Б (1)	О+Б (1)	О+Б (1)	О+М (1)	О+М (1)	О+М (1)	C3	C3	C3
D	C4	C4	C4	О+Б (2)	О+Б (2)	О+Б (2)	О+М (2)	О+М (2)	О+М (2)	C4	C4	C4
E	C5	C5	C5	О+Б (3)	О+Б (3)	О+Б (3)	О+М (3)	О+М (3)	О+М (3)	C5	C5	C5
F	C6	C6	C6	О+Б (4)	О+Б (4)	О+Б (4)	О+М (4)	О+М (4)	О+М (4)	C6	C6	C6
G	C7	C7	C7	О+Б (5)	О+Б (5)	О+Б (5)	О+М (5)	О+М (5)	О+М (5)	C7	C7	C7
H	C8	C8	C8	О+Б (6)	О+Б (6)	О+Б (6)	О+М (6)	О+М (6)	О+М (6)	C8	C8	C8

Рис. 7. Схема-дизайн постановки для валидации разработанной тест-системы. С1–8 — лунки для анализа стандартов-калибраторов и построения калибровочной кривой, Б — лунки для анализа стандартного дилюента, О+Б (образец+буфер) — образцы с аналитом в серии разведений со стандартным дилюентом, О+М (образец+матрикс) — образцы с аналитом в серии разведений с исходным матриксом образца (например, кроличьей сывороткой или сывороткой человека, лишенной антител)

количественных методик, определяемая путем постановки пробы с известной количественной характеристикой аналита в оцениваемой тест-системе. Отношение измеренного к ожидаемому называют степенью извлечения (recovery).

Линейность — способность с помощью методики (в пределах диапазона применения) получать результаты испытаний, прямо пропорциональные концентрации (количеству) анализируемого вещества в образце. Для установления линейности методики готовят серию стандартных растворов аналита в диапазоне концентраций 50–130 % путем разведения исходного стандартного раствора и проводят их количественное определение согласно разработанной методике. По результатам строится калибровочный график линейной зависимости найденных концентраций от введенных концентраций (в нормализованных координатах). Для оценки степени линейности рассчитывается коэффициент корреляции (r^2), угол наклона кривой (slope), значение точки пересечения с осью ординат (y-intercept).

Диапазон применения тест-системы — это интервал между наибольшей (ULOQ) и наименьшей (LLoQ) концентрацией аналита в анализируемом образце, для которого данная методика имеет приемлемый уровень *прецизионности*, *правильности* и *линейности*.

Помимо аналитических параметров для оценки диагностической значимости разработанной тест-системы при сравнении с референсным методом определяют также и диагностические показатели: диагностическую чувствительность — частоту обнаружения аналита в образцах, содержащих его по результатам применения референсного метода (в %); диагностическую специфичность — частоту отрицательного результата наличия аналита в образцах, не содержащих его по результатам применения референсного метода (в %) и др.

Для всех рассмотренных выше параметров существуют методики оценки в рамках валидационной схемы. На рис. 7 показан дизайн такой схемы, отражающей один запуск, в рамках которого можно получить практически все характеристики тест-системы. В лунках рядов 1–3 и 10–12 анализируются калибраторы в стандартном буфере для разведения (PBS-TBN). Мы получаем по 6 повторов 8 разведений калибровочных образцов. Эти данные будут содержать информацию о калибровочной кривой, внутрипостановочной прецизионности, верхнем и нижнем пределах количественного определения аналита. В лунках, обозначенных буквой Б — лунках-бланках, анализируется стандартный буфер для разведения (PBS-TBN) без аналита. Среднее значение этих 12 лунок можно использовать для определения фонового сигнала, предела детекции. В рядах 4–6 С–Н исследуются образцы с аналитом в серии разведений со стандартным буфером для разведения (PBS-TBN) в 3 повторах (О+Б — образец+буфер), а в рядах 7–9 С–Н — образцы с аналитом в серии разведений с исходным матриксом образца (например, кроличьей сывороткой или сывороткой человека, лишенной антител) (О+М — образец+матрикс). Полученная информация поможет оценить правильность методики, степень извлечения в используемом разбавителе, а также линейность и внутрипостановочную прецизионность. Для оценки межпостановочной прецизионности необходимо провести несколько описанных постановок. Для оценки специфичности проводят тесты на кросс-реактивность и ингибирование, описанные выше.

После проведения валидации планируется провести определение диагностической значимости тест-системы в сравнении с коммерческими ИФА-тест-системами. Для этих целей параллельно будет проанализировано не менее 400 сывороток — по 100 для каждой инфекции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мультиплексный иммунный анализ на основе технологии xMAP за последнее десятилетие успел зарекомендовать себя как быстрый, чувствительный и точный метод прямого, непрямого серологического, а также конкурентного иммуного анализа. В исследованиях по оценке популяционного иммунитета к вакциноуправляемым заболеваниям человека мультиплексные иммунологические тест-системы уже продемонстрировали эффективность одновременной детекции нескольких аналитов, быстроту проведения анализа и аналитические свойства, не уступающие свойствам стандартных методов. Создаваемая нами тетраплексная тест-система позволит осуществить масштабный скрининг иммунного статуса населения России в отношении кори, краснухи, эпидемического паротита и гепатита В, вакцинация против которых предусмотрена национальным календарем прививок. Представленный протокол может быть использован для разработки других тест-систем для оценки уровня содержания антител против других вакциноуправляемых и социально значимых инфекций.

Литература

1. Luminex. The xMAP Cookbook. A collection of methods and protocols for developing multiplex assays with xMAP Technology. 3-е изд. [Интернет]; [дата обращения: 5 мая 2017 г.]. Доступно по ссылке: http://info.luminexcorp.com/en-us/download-the-xmap-cookbook.
2. Biagini RE, Schlottmann SA, Sammons DL, Smith JP, Snawder JC, Striley CA, et al. Method for simultaneous measurement of antibodies to 23 pneumococcal capsular polysaccharides. Clin Diagn Lab Immunol. 2003 Sep; 10 (5): 744–50. PubMed PMID: 12965898.
3. Caboré RN, Piérard D, Huygen K. A Belgian Serosurveillance/Seroprevalence Study of Diphtheria, Tetanus and Pertussis Using a Luminex xMAP Technology-Based Pentaplex. Vaccines (Basel). 2016 May 10; 4 (2). pii: E16. DOI: 10.3390/vaccines4020016.
4. Crestani S, Leitolis A, Lima LF, Krieger MA, Foti L. Enhanced target-specific signal detection using an Escherichia coli lysate in multiplex microbead immunoassays with E. coli-derived recombinant antigens. J Immunol Methods. 2016 Aug; 435: 17–26. DOI: 10.1016/j.jim.2016.05.002.
5. Elberse KE, Tcherniaeva I, Berbers GA, Schouls LM. Optimization and application of a multiplex bead-based assay to quantify serotype-specific IgG against Streptococcus pneumoniae polysaccharides: response to the booster vaccine after immunization with the pneumococcal 7-valent conjugate vaccine. Clin Vaccine Immunol. 2010 Apr; 17 (4): 674–82. DOI: 10.1128/CVI.00408-09.
6. Lal G, Balmer P, Stanford E, Martin S, Warrington R, Borrow R. Development and validation of a nonaplex assay for the simultaneous quantitation of antibodies to nine Streptococcus pneumoniae serotypes. J Immunol Methods. 2005 Jan; 296 (1–2): 135–47. DOI: 10.1016/j.jim.2004.11.006.
7. van Gageldonk PG, van Schaijk FG, van der Klis FR, Berbers GA. Development and validation of a multiplex immunoassay for the simultaneous determination of serum antibodies to Bordetella pertussis, diphtheria and tetanus. J Immunol Methods. 2008 Jun 1; 335 (1–2): 79–89. DOI: 10.1016/j.jim.2008.02.018.
8. Pickering JW, Martins TB, Greer RW, Schroder MC, Astill ME, Litwin CM, et al. A multiplexed fluorescent microsphere

immunoassay for antibodies to pneumococcal capsular polysaccharides. Am J Clin Pathol. 2002 Apr; 117 (4): 589–96. DOI: 10.1309/4KEH-AGY7-UT5H-41XJ.
9. Pickering JW, Martins TB, Schroder MC, Hill HR. Comparison of a multiplex flow cytometric assay with enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of antibodies to tetanus, diphtheria, and Haemophilus influenzae Type b. Clin Diagn Lab Immunol. 2002 Jul; 9 (4): 872–6. PubMed PMID: 12093688.
10. Smits GP, van Gageldonk PG, Schouls LM, van der Klis FRM, Berbers GAM. Development of a bead-based multiplex immunoassay for simultaneous quantitative detection of IgG serum antibodies against measles, mumps, rubella, and varicella-zoster virus. Clin Vaccine Immunol. 2012 Mar; 19 (3): 396–400. DOI: 10.1128/CVI.05537-11.
11. Wild DG, редактор. The immunoassay handbook. 4-е изд. Theory and Applications of Ligand Binding, ELISA and Related Techniques. Oxford, UK: Elsevier; 2013. 1036 с.
12. Hnasko RM, редактор. ELISA: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology; vol. 1318. New York: Humana Press; 2015. DOI: 10.1007/978-1-4939-2742-5.
13. Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K, Grossman A, Arkin M, Auld D, et al, редакторы. Assay Guidance Manual [Интернет]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004–. [дата обращения: 2017 Oct 9]. Доступно по ссылке: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53196/.
14. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM). Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation. Май 2001. [Интернет]; [дата обращения: 9 октября 2017 г.]: [25 с.]. Доступно по: https://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidance/ucm070107.pdf.
15. European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use (CHMP). Guideline on validation of bioanalytical methods: Draft. Лондон; 19 ноября 2009 г. [Интернет]; [дата обращения: 9 октября 2017 г.]: [17 с.]. Доступно по ссылке: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/12/WC500018062.pdf.
16. Юргель Н. В., Младенцев А. Л., Бурдейн А. В., Гетьман М. А., Малин А. А., Косенко В. В., редакторы. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств (методические рекомендации). Часть I. В кн.: Руководство для предприятий фармацевтической промышленности (методические рекомендации). Часть I–III. М.: Спорт и Культура–2000; 2007. 192 с.

References

1. Luminex. The xMAP Cookbook. A collection of methods and protocols for developing multiplex assays with xMAP Technology. 3rd ed. [Internet]; [cited 2017 May 5]. Available from: http://info.luminexcorp.com/en-us/download-the-xmap-cookbook.
2. Biagini RE, Schlottmann SA, Sammons DL, Smith JP, Snawder JC, Striley CA, et al. Method for simultaneous measurement of antibodies to 23 pneumococcal capsular polysaccharides. Clin Diagn Lab Immunol. 2003 Sep; 10 (5): 744–50. PubMed PMID: 12965898.
3. Caboré RN, Piérard D, Huygen K. A Belgian Serosurveillance/Seroprevalence Study of Diphtheria, Tetanus and Pertussis Using a Luminex xMAP Technology-Based Pentaplex. Vaccines (Basel). 2016 May 10; 4 (2). pii: E16. DOI: 10.3390/vaccines4020016.
4. Crestani S, Leitolis A, Lima LF, Krieger MA, Foti L. Enhanced target-specific signal detection using an Escherichia coli lysate in multiplex microbead immunoassays with E. coli-derived recombinant antigens. J Immunol Methods. 2016 Aug; 435: 17–26. DOI: 10.1016/j.jim.2016.05.002.
5. Elberse KE, Tcherniaeva I, Berbers GA, Schouls LM. Optimization and application of a multiplex bead-based assay to quantify serotype-specific IgG against Streptococcus pneumoniae polysaccharides: response to the booster vaccine after immunization with the pneumococcal 7-valent conjugate vaccine. Clin Vaccine Immunol. 2010 Apr; 17 (4): 674–82. DOI: 10.1128/CVI.00408-09.
6. Lal G, Balmer P, Stanford E, Martin S, Warrington R, Borrow R. Development and validation of a nonaplex assay for the simultaneous quantitation of antibodies to nine Streptococcus pneumoniae serotypes. J Immunol Methods. 2005 Jan; 296 (1–2): 135–47. DOI: 10.1016/j.jim.2004.11.006.
7. van Gageldonk PG, van Schaijk FG, van der Klis FR, Berbers GA. Development and validation of a multiplex immunoassay for the simultaneous determination of serum antibodies to Bordetella pertussis, diphtheria and tetanus. J Immunol Methods. 2008 Jun 1; 335 (1–2): 79–89. DOI: 10.1016/j.jim.2008.02.018.
8. Pickering JW, Martins TB, Greer RW, Schroder MC, Astill ME, Litwin CM, et al. A multiplexed fluorescent microsphere immunoassay for antibodies to pneumococcal capsular polysaccharides. Am J Clin Pathol. 2002 Apr; 117 (4): 589–96. DOI: 10.1309/4KEH-AGY7-UT5H-41XJ.
9. Pickering JW, Martins TB, Schroder MC, Hill HR. Comparison of a multiplex flow cytometric assay with enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of antibodies to tetanus, diphtheria, and Haemophilus influenzae Type b. Clin Diagn Lab Immunol. 2002 Jul; 9 (4): 872–6. PubMed PMID: 12093688.
10. Smits GP, van Gageldonk PG, Schouls LM, van der Klis FRM, Berbers GAM. Development of a bead-based multiplex immunoassay for simultaneous quantitative detection of IgG serum antibodies against measles, mumps, rubella, and varicella-zoster virus. Clin Vaccine Immunol. 2012 Mar; 19 (3): 396–400. DOI: 10.1128/CVI.05537-11.
11. Wild DG, editor. The immunoassay handbook. 4th ed. Theory and Applications of Ligand Binding, ELISA and Related Techniques. Oxford, UK: Elsevier; 2013. 1036 p.
12. Hnasko RM, editor. ELISA: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology; vol. 1318. New York: Humana Press; 2015. DOI: 10.1007/978-1-4939-2742-5.
13. Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K, Grossman A, Arkin M, Auld D, et al, editors. Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004-. [cited 2017 Oct 9]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53196/.
14. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM). Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation. May 2001. [Internet]; [cited 2017 Oct 9]: [25 p.]. Available from: https://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidance/ucm070107.pdf.
15. European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use (CHMP). Guideline on validation of bioanalytical methods: Draft. London; 19 Nov 2009. [Internet]; [cited 2017 Oct 9]: [17 p.]. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/12/WC500018062.pdf.
16. Yurgel' NV, Mladentsev AL, Burdeyn AV, Get'man MA, Malin AA, Kosenko VV, editors. Rukovodstvo po validatsii metodik analiza lekarstvennykh sredstv (metodicheskie rekomendatsii). Part I. In: Rukovodstvo dlya predpriyatiy farmatsevticheskoy promyshlennosti (metodicheskie rekomendatsii). Parts I–III. Moscow: Sport i Kul'tura–2000; 2007. 192 p. Russian.

ОЦЕНКА ФАКТИЧЕСКОЙ ВОСПРИИМЧИВОСТИ ОТДЕЛЬНЫХ ГРУПП ДЕКРЕТИРОВАННОГО НАСЕЛЕНИЯ К ВИРУСАМ КОРИ, КРАСНУХИ И ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПАРОТИТА

А. В. Ноздрачева ✉, А. А. Грицик, С. Н. Кузин, Т. А. Семененко

Отдел эпидемиологии,
Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи, Москва

В условиях формирования «вакцинозависимости» современного общества приоритетным является изучение популяционного иммунитета, основанное на оценке распространенности антител к той или иной инфекции в крови доноров из различных, в том числе индикаторных, групп населения. В работе представлены данные о фактической восприимчивости россиян к таким вакциноуправляемым инфекциям, как корь, краснуха и эпидемический паротит. В качестве материала для исследования использовали образцы сывороток крови из Банка сывороток крови Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи (Москва): 866 образцов, в том числе 293 и 117 образцов от медицинских работников, полученных в 2011 г. и 2017 г. соответственно, 220 образцов от военнослужащих, полученных в 2016–2017 гг., и 236 образцов от условно здоровых доноров, полученных в 2016 г. Все образцы были исследованы методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием предназначенных для изучаемых инфекций тест-систем компании «Вектор-Бест» (Россия). Была выявлена значительная доля восприимчивых к кори (в среднем — 19,4 %) и эпидемическому паротиту (в среднем — 28,8 %) лиц, что не соответствует критерию эпидемического благополучия для этих инфекций (7 и 15 % соответственно) и создает условия для распространения инфекций в случае попадания возбудителей на территорию страны. Доля восприимчивых к краснухе людей составила в среднем 6,5 %, что отвечает критерию эпидемического благополучия (7 %).

Ключевые слова: вакцинопрофилактика, популяционный иммунитет, серологический мониторинг, корь, краснуха, эпидемический паротит, военнослужащие, медицинские работники

Финансирование: работа поддержана Министерством здравоохранения РФ в рамках государственного задания по теме: «Разработка подходов к функционированию банка сывороток крови при осуществлении сероэпидемиологического мониторинга в соответствии с международными стандартами» (№ 056-00157-16-02).

✉ **Для корреспонденции:** Ноздрачева Анна Валерьевна
ул. Гамалеи, д. 18, г. Москва, 123098; nozdracheva0506@gmail.com

Статья получена: 22.09.2017 **Статья принята к печати:** 10.10.2017

ESTIMATING THE ACTUAL SUSCEPTIBILITY OF DECREED POPULATION TO MEASLES, RUBELLA AND MUMPS

Nozdracheva AV ✉, Gritsik AA, Kuzin SN, Semenenko TA

Department of Epidemiology,
Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

As the modern society becomes more vaccine-dependent, the need arises for population immunity studies aimed to estimate the prevalence of antibodies against a particular infection in the donors from different populations, including sentinel groups. This work reveals the actual susceptibility of the Russian population to a number of vaccine preventable infections, including measles, rubella, and mumps. The study was conducted using blood serum samples provided by the Blood serum bank of Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology (Moscow). Of 866 samples used in the study, 293 and 117 samples had been collected from healthcare workers in 2011 and 2017, respectively; 220 samples had been obtained from military servants in 2016–2017, and 236 samples had been collected from healthy donors in 2016. All samples were studied by solid phase enzyme immunoassay using diagnostic kits by Vector-Best (Russia). We discovered that 19.4 % and 28.8 % of individuals were susceptible to measles and mumps, respectively, which is insufficient for ensuring epidemiological safety (the herd immunity thresholds for these diseases are 7 % and 15 %, respectively) and puts the population at risk of infection spread, should the pathogens enter the country. The proportion of individuals susceptible to rubella was 6.5 %, which is below the herd immunity threshold (7 %).

Keywords: preventive vaccination, herd immunity, serological surveillance, measles, rubella, mumps, military servants, healthcare workers

Funding: this work was supported by the Russian Ministry of Healthcare within the scope of the state task “Development of the Serum Bank for seroepidemiological surveillance in accordance with international standards” (No. 056-00157-16-02).

✉ **Correspondence should be addressed:** Anna Nozdracheva
ul. Gamalei, d. 18, Moscow, Russia, 123098; nozdracheva0506@gmail.com

Received: 22.09.2017 **Accepted:** 10.10.2017

По оценкам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), в мире ежегодно страдают от инфекций в среднем 2 млрд человек, из которых 17 млн — погибают [1]. Наиболее эффективным и экономически выгодным методом борьбы с инфекциями является вакцинопрофилактика (при условии ее повсеместного внедрения и приверженности ее целям медицинских работников различных служб и ведомств). Так, всеобщая вакцинация населения в 2016 г. позволила предотвратить приблизительно 2–3 млн смертей от инфекционных заболеваний, при этом еще около 1,5 млн смертей можно было избежать за счет роста охвата вакцинами [1].

Охват населения профилактическими прививками является одним из ключевых показателей качества прививочной работы в стране. Согласно рекомендациям ВОЗ, для большинства инфекций, управляемых средствами специфической профилактики (далее — вакциноуправляемых инфекций), указанный показатель должен составлять не менее 95 % для детей и 90 % — для взрослых. По данным официальной статистики [2], в России указанные значения показателя были достигнуты и поддерживаются на необходимом уровне. Значительное снижение заболеваемости и смертности от вакциноуправляемых инфекций является признаком эффективности проводимой прививочной работы.

Успех вакцинопрофилактики позволил ВОЗ сообщить о новой эре в сфере здравоохранения — эре ликвидации некоторых антропонозных инфекций: натуральной оспы (в 1980 г.), полиомиелита (в России не регистрируется с 2002 г.), а в перспективе — кори и краснухи (предполагалось, что этой цели удастся достигнуть к 2010 г.). В 2000 г. территория Американского региона была сертифицирована как свободная от эндемичной кори [3], однако уже в 2010 г. ситуация изменилась: подъем заболеваемости этой инфекцией был зарегистрирован не только в странах Северной и Южной Америки, но и в странах Европы, Африки, постсоветского пространства, в том числе в России [4]. В связи с этим достижение цели по элиминации кори было отложено сначала на 2015 г., а затем и на 2020 г.

Подъем заболеваемости корью вызвал обеспокоенность медицинского сообщества достоверностью значений основных показателей эффективности вакцинопрофилактики. Был выявлен ряд скрытых факторов различной природы, негативно влияющих на качество вакцинации: нарушение «холодовой цепи», необоснованность медицинских отводов от вакцинации, рост числа отказов родителей от вакцинации детей и нарушение сроков вакцинации. Следует отметить, что в России проблема отказов от вакцинации стоит достаточно остро. По данным Полибина и соавт. [5], у населения нашей страны снижена приверженность профилактическим мероприятиям в целом и вакцинации в частности. Анкетированием родителей было установлено, что среди детей в возрасте до 2 лет доля привитых составила только 80 %.

Основной причиной осложнения эпидемической ситуации по кори, по мнению многих авторов, стало накопление в популяции восприимчивых к инфекции лиц, т. е. снижение популяционного иммунитета [6–8]. Единственным и наиболее эффективным методом его оценки является серологический мониторинг [8, 9]. В рамках мониторинга по результатам лабораторного исследования сывороточного материала рассчитывают долю восприимчивых (серонегативных) к вакциноуправляемым инфекциям лиц. Критерием эпидемического благополучия по кори и краснухе является наличие в обследуемой группе не более 7 % серонегативных лиц, а по эпидемическому паротиту (ЭП) — 15 %.

Однако серологический мониторинг, проводимый в России, не лишен недостатков, одним из которых является отсутствие возможности сравнения результатов исследований сывороточного материала, собранного в разные годы, с учетом быстро меняющихся стандартов и методов лабораторной диагностики. Кроме того, не учитывается принадлежность обследуемых лиц к различным сферам профессиональной деятельности (например, для декретированных работников нормативно закреплены более строгие требования к вакцинации), а также состояние здоровья (различные инфекции влияют на гуморальный иммунитет). Этих недостатков лишены исследования с использованием материалов из банков сывороток.

Рядом отечественных авторов было отмечено вовлечение в эпидемический процесс по кори медицинских работников с формированием вспышечной заболеваемости в крупных лечебных учреждениях [10, 11]. Согласно действующему законодательству, медицинские работники относятся к декретированным группам населения и должны быть привиты против кори в возрасте до 55 лет (против краснухи и ЭП — до 35 лет) [12]. Таким образом, медицинские работники являются не только группой риска, но и индикаторной группой, по результатам обследования которой можно косвенно судить об эпидемическом благополучии в обществе в целом.

Целью исследования являлась оценка фактической восприимчивости населения России к кори, краснухе и эпидемическому паротиту путем анализа материалов из Банка сывороток крови Национального исследовательского центра эпидемиологии и эмбриологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи (Москва).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании использовали 866 образцов сыворотки крови:

— 293 образца, полученных в 2011 г. от медицинских работников, проживающих на территории Центрального федерального округа (ЦФО);

— 117 образцов, полученных в 2017 г. от медицинских работников, проживающих на территории ЦФО;

— 220 образцов, полученных в 2016–2017 гг. от военнослужащих, проходивших службу по контракту на территории войсковых частей Московской области (МО);

— 236 образцов, полученных в 2016 г. от условно здоровых доноров, проживающих на территории Москвы и МО.

В 2011 г. в России было отмечено обострение эпидемической обстановки по кори, а в 2017 г. были проведены дополнительные мероприятия по профилактике инфекции на государственном уровне, в том числе по вакцинации ранее не охваченного прививками населения, и увеличен прививочный возраст медицинских работников — с 35 до 55 лет [8, 12]. Военнослужащие представляют интерес как пример закрытого коллектива взрослых, где до настоящего времени регистрируют вспышки кори, краснухи и ЭП [13].

Прививочный анамнез всех доноров был неизвестен, документальное подтверждение проведенной вакцинации отсутствовало.

Исследование было организовано и проведено в соответствии с действующими нормативными документами [9]. Образцы сывороток изучали методом иммуноферментного анализа с использованием отечественных тест-систем

«ВектоКорь-IgG», «ВектоРубелла-IgG», «ВектоПаротит-IgG» («Вектор-Бест», Россия), следуя инструкциям фирмы-изготовителя.

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программ Microsoft Excel и Statistica 6.0 (StatSoft, США). Для проверки достоверности различий результатов между группами обследованных использовали критерий Хи-квадрат с поправкой Йетса. Для изучаемых показателей рассчитывали среднее значение (m) и 95 % доверительный интервал (CI) по методу Клоппера–Пирсона (точный метод).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты исследования по изучению напряженности иммунитета к управляемым инфекциям среди разных групп населения представлены в табл. 1.

Как видно, в отношении краснухи все обследованные группы населения в достаточной мере защищены: доля серонегативных лиц не превышает критерия эпидемического благополучия в 7 %.

Выявлена значительная доля восприимчивых лиц в отношении коревой инфекции среди обследованных, при этом наиболее восприимчивыми являются военнослужащие, где доля серонегативных лиц была максимальной и составила 25,5 %, что в 3,6 раза больше значения критерия эпидемического благополучия. В группе медицинских работников восприимчивыми были в среднем 7,7 % обследованных лиц.

Среди здоровых доноров в Москве и МО присутствует значительная доля лиц (21,2 %), способных при определенных условиях (в случае заноса инфекции в регион) участвовать в распространении кори с формированием очаговой заболеваемости, в том числе в закрытых коллективах военнослужащих. Таким образом, существующую эпидемическую обстановку по кори в Москве и МО можно охарактеризовать как неустойчивую.

Во всех обследованных нами группах населения выявлена значительная доля восприимчивых к ЭП лиц (29,6 % — среди военнослужащих, 32,2 % — среди доноров), что в среднем в 2 раза выше значения критерия эпидемического благополучия (для этой инфекции — не более 15 %) и создает условия для распространения заболевания в популяции в случае завоза инфекции.

Использование образцов из банка сывороток дает возможность исследовать материал, полученный в период, предшествующий исследованию, т. е. проводить «ретроспективные» серологические исследования. В нашей работе были использованы образцы сывороток крови, полученные от медицинских работников в 2011 г., в период роста заболеваемости корью в России, в том числе в Москве. При сравнении результатов, полученных для двух групп медицинских работников, выявили статистически значимые различия ($p < 0,05$) в отношении кори и ЭП (табл. 2).

За 6 лет доля восприимчивых к кори лиц среди обследованного контингента значительно снизилась и достигла нормативно рекомендуемого уровня: с 18,7 % в 2011 г. до 7,7 % в 2017 г., — что, возможно, стало результатом активной дополнительной вакцинации населения по эпидемическим показаниям. В отношении ЭП доля серонегативных лиц снизилась с 38,2 % до 20,5 %, но не достигла значения критерия эпидемического благополучия, что диктует необходимость проведения дополнительной вакцинации.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Опираясь на полученные нами данными, можно утверждать, что восприимчивость к краснухе индикаторных групп и населения в целом является низкой и соответствует критерию эпидемиологического благополучия по этой инфекции (доля серонегативных среди обследованных составила в среднем 6,5 %). Такие результаты согласуются с данными официальной статистики по спорадической заболеваемости населения краснухой: значение этого показателя в 2016 г. составило 0,11 случаев на 100 тыс. населения, а случаи врожденной краснухи не регистрировались [14]. Важно отметить, что за последние 6 лет доля серонегативных к этой инфекции лиц в индикаторноых группах не изменилась, что также является благоприятным прогностическим признаком.

Существует вероятность распространения коревой инфекции в случае ее заноса в страну, т. к. во всех обследованных группах выявлена доля восприимчивых лиц, не соответствующая критерию эпидемиологического благополучия (в среднем — 19,4 %). Наиболее уязвимыми оказались военнослужащие — 25,5 % серонегативных доноров. В исследовании [15] среди военнослужащих, проходивших службу по контракту, доля серопозитивных к вирусу кори лиц составила 72,4 ± 2,3 %.

В отношении эпидемического паротита получены результаты, свидетельствующие о значительном «иммунологическом потенциале» к распространению это инфекции

Таблица 1. Напряженность иммунитета к кори, краснухе и эпидемическому паротиту (ЭП) среди отдельных групп населения России (2016–2017 гг.)

Контингент	Доля серонегативных к вирусу кори, % [CI 95 %]	Доля серонегативных к вирусу краснухи, % [CI 95 %]	Доля серонегативных к вирусу ЭП, % [CI 95 %]
Медицинские работники	7,7* [3,6; 14,1]	5,1 [1,9; 10,8]	20,5 [13,6; 29,0]
Военнослужащие	25,5 [19,8; 31,8]	4,6 [2,2; 8,2]	29,6 [23,6; 36,1]
Здоровые доноры	21,2 [16,2; 27,0]	8,9* [5,6; 13,3]	32,2 [26,3; 38,6]
Всего	19,4 [16,2; 22,9]	6,5 [4,6; 8,8]	28,8 [25,1; 32,7]

Примечание. * — различия при сравнении с критерием эпидемического благополучия (7 %) статистически незначимы ($p > 0,05$).

Таблица 2. Напряженность иммунитета у медицинских работников

Контингент	Доля серонегативных к вирусу кори, % [CI 95 %]	Доля серонегативных к вирусу краснухи, % [CI 95 %]	Доля серонегативных к вирусу ЭП, % [CI 95 %]
Медицинские работники (2011 г.)	18,7 [14,5; 23,7]	4,7 [2,6; 7,9]	38,2 [32,6; 44,1]
Медицинские работники (2017 г.)	7,7 [3,6; 14,1]	5,1 [1,9; 10,8]	20,5 [13,6; 29,0]

среди населения, т. к. доля восприимчивых к ней людей была максимальной в группе здоровых доноров — 32,2 % (в среднем среди всех обследованных — 28,8 %). По данным официальной статистики, показатель заболеваемости ЭП имеет тенденцию к росту, но речь идет о спорадическом характере распространения инфекции [14].

Корь, краснуха и ЭП традиционно рассматриваются как вирусные инфекции с весьма схожим эпидемическим процессом, для профилактики которых используют живые аттенуированные вакцины в одинаковые сроки (вакцинация детей в 12 мес., ревакцинация — в 6 лет). Наблюдаемые нами и другими исследователями [16] различия по доле восприимчивых к этим инфекциям лиц, возможно, могут быть обусловлены различной иммунологической эффективностью коревого, краснушного и паротитного компонентов вакцины, которая, по оценкам зарубежных исследователей [17], составляет 97 % (варьирует в пределах 67–100 %), 97 % (94–100 %) и 88 % (66–95 %) соответственно.

ВЫВОДЫ

Слежение за состоянием популяционного иммунитета в динамике с помощью сероэпидемиологических исследований позволяет не только оценивать эффективность проводимой вакцинопрофилактики, но и прогнозировать дальнейшее развитие ситуации, а также планировать организацию профилактических мероприятий. Наши результаты показали необходимость организации дополнительных кампаний по иммунизации не охваченного прививками населения, в том числе военнослужащих. Наличие внутри разных групп населения большого числа восприимчивых к эпидемическому паротиту лиц указывает на возможность осложнения эпидемической ситуации по этой инфекции в ближайшем будущем, и уже сейчас могут быть спланированы профилактические мероприятия для предотвращения вспышек ЭП. Эпидемическая обстановка по краснухе является благоприятной, что означает возможность элиминации заболевания в перспективе.

Литература

1. Всемирная организация здравоохранения [Интернет]. Швейцария: ВОЗ; c2017 [дата обращения: 4 сентября 2017 г.]. Охват иммунизацией. Информационный бюллетень. Март 2017 г.; [прибл. 5 веб-стр.]. Доступно по ссылку: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs378/ru/.
2. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека [Интернет]. М.: Роспотребнадзор; c2017 [дата обращения: 4 сентября 2017 г.]. Новости. 25.05.2017. Об эпидемиологической ситуации по кори в Европе; [прибл. 1 веб-стр.]. Доступно по ссылке: http://rospotrebnadzor.ru/about/info/news/news_details.php?ELEMENT_ID=8341&sphrase_id=1097906.
3. Rasmussen SA, Jamieson DJ. What Obstetric Health Care Providers Need to Know About Measles and Pregnancy. Obstet Gynecol. 2015 Jul; 126 (1): 163–70. DOI: 10.1097/AOG.0000000000000903.
4. Всемирная организация здравоохранения [Интернет]. Швейцария: ВОЗ; c2017 [дата обращения: 4 сентября 2017 г.]. Корь. Информационный бюллетень № 286. Март 2017 г.; [прибл. 5 веб-стр.]. Доступно по ссылке: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs286/ru/.
5. Полибин Р. В., Миндлина А. Я., Герасимов А. А., Брико Н. И. Сравнительный анализ смертности от инфекционных болезней в Российской Федерации и некоторых странах Европы. Эпидемиол. и вакцинопрофил. 2017; 16 (3): 4–10.
6. Алешкин В. А., Тихонова Н. Т., Герасимова А. Г., Цвиркун О. В., Шульга С. В., Ежлова Е. Б. и др. Проблемы на пути достижения элиминации кори в Российской Федерации. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2016; (5): 29–34.
7. Всемирная организация здравоохранения [Интернет]. Швейцария: ВОЗ; c2017 [дата обращения: 4 сентября 2017 г.]. Вспышки кори в Европейском регионе ставят под угрозу элиминацию этой болезни. Пресс-релиз. Копенгаген, 28 марта 2017 г. [прибл. 2 веб-стр.]. Доступно по ссылке: http://www.euro.who.int/ru/media-centre/sections/press-releases/2017/measles-outbreaks-across-europe-threaten-progress-towards-elimination.
8. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека [Интернет]. М.: Роспотребнадзор; c2017 [дата обращения: 4 сентября 2017 г.]. Письмо от 24.04.2017 № 01/5110-17-32. «Об эпидемиологической ситуации по кори в Российской Федерации в 2016 году»; [9 стр.]. Доступно по ссылке: http://www.rospotrebnadzor.ru/deyatelnost/epidemiological-surveillance/?ELEMENT_ID=8192.
9. Управление Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Воронежской области [Интернет]. Воронеж: Управление Роспотребнадзора по Воронежской области; c2009–2017 [дата обращения: 4 сентября 2017 г.]. Методические указания. МУ 3.1.2943-11. «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)»; [11 стр.]. Доступно по ссылке: http://36.rospotrebnadzor.ru/documents/rekdoc1/9396.
10. Онищенко Г. Г., Ежлова Е. Б., Лазикова Г. Ф., Мельникова А. А., Ватолина А. А., Тихонова Н. Т. и др. Реализация программы ликвидации кори в Российской Федерации. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2011; (4): 51–6.
11. Семененко Т. А., Ежлова Е. Б., Ноздрачева А. В., Русакова Е. В. Особенности проявлений эпидемического процесса кори в Москве в 1992–2014 годах. Эпидемиол. и вакцинопрофил. 2015; 6 (85): 16–22.
12. Приказ Министерства здравоохранения РФ от 21 марта 2014 г. № 125н. «Об утверждении национального календаря профилактических прививок и календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям» [файл из интернета]; [дата обращения: 9 сентября 2017 г.]: 8 с. Доступно по ссылке: http://ohranatruda.ru/upload/iblock/a0c/zak1704.pdf.
13. Дубоделов Д. В. Эпидемиологическая характеристика и специфическая профилактика ветряной оспы и краснухи в воинских коллективах [автореф. диссертации]. М.: Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова; 2013. 24 с.
14. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека [Интернет]. М.: Роспотребнадзор; c2017 [дата обращения: 4 сентября 2017 г.]. Инфекционная заболеваемость в Российской Федерации за январь–декабрь 2016 г. (по данным формы № 1 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях»). 07.02.2017; [прибл. 1 веб-стр.]. Доступно по ссылке: http://rospotrebnadzor.ru/activities/statistical-materials/statictic_details.php?ELEMENT_ID=7804.
15. Юревич М. А., Никитюк Н. Ф. Оценка состояния иммунитета к кори у военнослужащих. Эпидемиол. и вакцинопрофил. 2008; (2): 37–9.
16. Топтыгина А. П. Комплексная оценка процессов формирования и поддержания иммунологической памяти на примере вакцинации против кори, краснухи и эпидемического паротита [автореф. диссертации]. М.: Московский научно-иссле-

довательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского; 2015. 48 с.
17. McLean HQ, Fiebelkorn AP, Temte JL, Wallace GS; Centers for Disease Control and Prevention. Prevention of measles, rubella, congenital rubella syndrome, and mumps, 2013: summary recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). MMWR Recomm Rep. 2013 Jun 14; 62 (RR-04): 1–34.

References

1. World Health Organization [Internet]. Switzerland: WHO; c2017 [cited 2017 Sep 4]. Immunization coverage. Fact sheet. July 2017; [about 4 screens]. Available from: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs378/en/.
2. Russian Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing [Internet]. Moscow: Rospotrebnadzor; c2017 [cited 2017 Sep 4]. News. 25.05.2017. Ob epidemiologicheskoy situatsii po kori v Evrope; [about 1 screen]. Available from: http://rospotrebnadzor.ru/about/info/news/news_details.php?ELEMENT_ID=8341&sphrase_id=1097906 Russian.
3. Rasmussen SA, Jamieson DJ. What Obstetric Health Care Providers Need to Know About Measles and Pregnancy. Obstet Gynecol. 2015 Jul; 126 (1): 163–70. doi: 10.1097/AOG.0000000000000903
4. World Health Organization [Internet]. Switzerland: WHO; c2017 [cited 2017 Sep 4]. Measles. Fact sheet N 286. March 2017; [about 5 screens]. Available from: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs286/en/.
5. Polibin RV, Mindlina AYa, Gerasimov AA, Briko NI. [Comparative Analysis of Mortality from Infectious Diseases in the Russian Federation and Some European Countries]. Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika. 2017; 16 (3): 4–10. Russian.
6. Aleshkin VA, Tikhonova NT, Gerasimova AG, Tsvirkun OV, Shulga SV, Ezhlova EB, et al. Problems towards measles elimination in Russian Federation. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol. 2016; (5): 29–34.
7. World Health Organization [Internet]. Switzerland: WHO; c2017 [cited 2017 Sep 4]. Measles outbreaks across Europe threaten progress towards elimination. Press release. Copenhagen, 28 March 2017; [about 2 screens]. Available from: http://www.euro.who.int/en/media-centre/sections/press-releases/2017/measles-outbreaks-across-europe-threaten-progress-towards-elimination.
8. Russian Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing [Internet]. Moscow: Rospotrebnadzor; c2017 [cited 2017 Sep 4]. Letter N 01/5110-17-32. 24.04.2017. Ob epidemiologicheskoy situatsii po kori v Rossiyskoy Federatsii v 2016 godu; [9 p.]. Available from: http://www.rospotrebnadzor.ru/deyatelnost/epidemiological-surveillance/?ELEMENT_ID=8192. Russian.
9. Department of the Russian Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing in Voronezhskaya Oblast' [Internet]. Voronezh: Department of Rospotrebnadzor in Voronezhskaya Oblast'; c2009–2017 [cited 2017 Sep 4]. Methodical instructions. MU 3.1.2943-11. "3.1. Profilaktika infektsionnykh bolezney. Organizatsiya i provedenie serologicheskogo monitoringa sostoyaniya kollektivnogo immuniteta k infektsiyam, upravlyaemym sredstvami spetsificheskoy profilaktiki (difteriya, stolbnyak, koklyush, kor', krasnukha, epidemicheskiy parotit, poliomielit, gepatit V)"; [11 p.]. Available from: http://36.rospotrebnadzor.ru/documents/rekdoc1/9396. Russian.
10. Onischenko GG, Ezhlova EB, Lazikova GF, Melnikova AA, Vatolina AA, Tikhonova NT, et al. [Implementation of measles elimination program in Russian Federation]. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol. 2011; (4): 51–6. Russian.
11. Semenenko TA, Ezhlova EB, Nozdracheva AV, Rusakova EV. [Manifestation Features of the Measles Epidemic Process in Moscow in 1992–2014]. Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika. 2015; 6 (85): 16–22. Russian.
12. Prikaz Ministerstva zdravookhraneniya RF ot 21 marta 2014 g. № 125n «Ob utverzhdenii natsional'nogo kalendarya profilakticheskikh privivok i kalendarya profilakticheskikh privivok po epidemicheskim pokazaniyam». Order of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation [file on the Internet]; [cited 2017 Sep 9]: 8 p. Available from: http://ohranatruda.ru/upload/iblock/a0c/zak1704.pdf. Russian.
13. Dubodelov DV. Epidemiologicheskaya kharakteristika i spetsificheskaya profilaktika vetryanoy ospy i krasnukhi v voinskikh kollektivakh [abstract of the dissertation]. Moscow: I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera; 2013. 24 p. Russian.
14. Russian Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing [Internet]. Moscow: Rospotrebnadzor; c2017 [cited 2017 Sep 4]. Infektsionnaya zabolevaemost' v Rossiyskoy Federatsii za yanvar'–dekabr' 2016 g. (po dannym formy № 1 «Svedeniya ob infektsionnykh i parazitarnykh zabolevaniyakh»). 07.02.2017; [about 1 screen]. Available from: http://rospotrebnadzor.ru/activities/statistical-materials/statictic_details.php?ELEMENT_ID=7804. Russian.
15. Yurevich MA, Nikityuk NF. Otsenka sostoyaniya immuniteta k kori u voennosluzhashchikh. Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika. 2008; (2): 37–9. Russian.
16. Toptygina AP. Kompleksnaya otsenka protsessov formirovaniya i podderzhaniya immunologicheskoy pamyati na primere vaktsinatsii protiv kori, krasnukhi i epidemicheskogo parotita. Moscow: Moskovskiy nauchno-issledovatel'skiy institut epidemiologii i mikrobiologii im. G. N. Gabrichevskogo; 2015. 48 p. Russian.
17. McLean HQ, Fiebelkorn AP, Temte JL, Wallace GS; Centers for Disease Control and Prevention. Prevention of measles, rubella, congenital rubella syndrome, and mumps, 2013: summary recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). MMWR Recomm Rep. 2013 Jun 14; 62 (RR-04): 1–34.

РОЛЬ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ПАМЯТИ В ФОРМИРОВАНИИ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЯИЧНИКОВ НА ЭТАПЕ НЕОАДЪЮВАНТНОГО ЛЕЧЕНИЯ

Е. Ю. Златник[1] ✉, Г. А. Неродо[2], А. Ю. Арджа[2], О. Н. Селютина[1], Е. С. Бондаренко[1]

[1] Лаборатория иммунофенотипирования опухолей,
Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, Ростов-на-Дону

[2] Отделение онкогинекологии,
Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, Ростов-на-Дону

Изучение роли иммунологической памяти, опосредованной Т-лимфоцитами, при злокачественных опухолях и их лечении — актуальная научная задача. Целью исследования была оценка роли Т-клеток иммунологической памяти в формировании противоопухолевого иммунитета у больных раком яичников на этапе неоадъювантного лечения, включающего химиоиммунотерапию с применением рекомбинантного интерферона-гамма (рИФНγ). Методы: проточная цитометрия для определения центральных (Tcm) и эффекторных (Tem) Т-клеток памяти (Tm) и наивных Т-лимфоцитов (Th0). Результаты: в крови больных по сравнению с донорами обнаружено высокое (Tm) и низкое (Th0) содержание Т-клеток среди $CD4^+$ и $CD8^+$ субпопуляций. В асцитической жидкости происходило накопление Tm, превышающих количество Th0 в 7,7 раза в субпопуляции $CD4^+$ и в 6,5 раза в субпопуляции $CD8^+$, в которой Tem преобладали над Tcm. После химиотерапии с препаратом рИФНγ в крови больных выявлено снижение уровня Th0, в крови и в асцитической жидкости — преобладание Tcm среди $CD8^+$ Tm, а у больных, получавших химиотерапию без иммунотерапии, преобладали Tem. Данные различия были расценены как благоприятные, поскольку сопровождались положительной клинической динамикой: меньшей частотой рецидивирования (46,7 против 80 % в контроле) и более длительным безрецидивным периодом (17,5 ± 1,6 против 11,3 ± 1,5 мес. в контроле). Таким образом, химиоиммунотерапия вызывает перераспределение субпопуляций Т-клеток в крови и в асцитической жидкости при раке яичников в сторону преобладания Tcm над Tem, что может быть одним из механизмов действия препарата «Ингарон» (рИФНγ).

Ключевые слова: рак яичников, асцитическая жидкость, кровь, проточная цитометрия, лимфоциты, Т-клетки памяти, Tcm, Tem, наивные Т-лимфоциты, интерферон-γ

✉ **Для корреспонденции:** Златник Елена Юрьевна
ул. 14-я линия, д. 63, г. Ростов-на-Дону, 344037; elena-zlatnik@mail.ru

Статья получена: 22.09.2017 **Статья принята к печати:** 30.09.2017

THE ROLE OF IMMUNOLOGICAL MEMORY IN ESTABLISHING ANTITUMOR IMMUNITY IN PATIENTS WITH OVARIAN CANCER UNDERGOING NEOADJUVANT THERAPY

Zlatnik EYu[1] ✉, Nerodo GA[2], Ardzha AYu[2], Seliutina ON[1], Bondarenko ES[1]

[1] Laboratory for Immunophenotyping of Tumors,
Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia

[2] Department of Gynecologic Oncology,
Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia

Understanding the role of immunological memory mediated by T-lymphocytes in patients with malignant tumors is a pressing issue. This study aimed to assess the contribution of memory T-cells to antitumor immunity in patients with ovarian cancer undergoing neoadjuvant chemoimmunotherapy with recombinant interferon-gamma (rIFNγ). Quantification of central (Tcm) and effector (Tem) memory T-cells (Tm), as well as naive T-lymphocytes (Th0), was done using flow cytometry. Compared to healthy females, untreated cancer patients were found to have more Tm and less Th0 cells in their blood $CD4^+$ and $CD8^+$ T-cell subpopulations. In cancer patients, Tm cells accumulated in the ascitic fluid, exceeding 7.7 times the number of $CD4^+$ Th0 cells and 6.5 times the number of $CD8^+$ Th0 cells, with Tem prevailing over Tcm. After chemotherapy with rIFNγ, blood Th0 decreased in cancer patients, while Tcm dominated the $CD8^+$ Tm subpopulation both in the blood and ascitic fluid. Tem cells were a prevalent cell type in patients who received chemotherapy without interferon-gamma. Decreased Th0 and Tcm prevalence were a positive sign accompanied by a good response to treatment, including lower relapse rates (46.7 % vs. 80 % in controls) and a longer relapse-free period (17.5 ± 1.6 vs. 11.3 ± 1.5 months in controls). Therefore, we conclude that chemoimmunotherapy alters proportions of T-cell subpopulations in the blood and ascitic fluid of patients with ovarian cancer, with Tcm cells prevailing over Tem, which may be one of the mechanisms of rIFNγ (Ingaron) action.

Keywords: ovarian cancer, ascitic fluid, blood, flow cytometry, lympocytes, memory T-cells, Tcm, Tem, Th0, interferon-gamma

✉ **Correspondence should be addressed:** Elena Zlatnik
14-ya liniya, d. 63, Rostov-on-Don, Russia, 344037; elena-zlatnik@mail.ru

Recieved: 22.09.2017 **Accepted:** 30.09.2017

Бурное развитие клеточных технологий, перспективных для противоопухолевого лечения, предлагает применение адоптивной иммунотерапии активированными *ex vivo* лимфоцитами периферической крови и опухолевого микроокружения (LAK- и TIL-клеток), CIK-лимфоцитов, ДК-вакцинации и пр. [1]. В работах последних лет высокую активность при ряде опухолей показала CAR-терапия [2].

Тем не менее эффект применения адоптивной иммунотерапии у онкологических больных не оправдывает ожиданий, что приводит к разочарованию клиницистов в таких подходах, альтернативных химиотерапии или использующихся в сочетании с ней [1]. Подобные противораковые стратегии нередко терпят поражение из-за иммуносупрессивных механизмов организма опухоленосителя, проявляющихся в дисбалансе и дисфункциях различных субпопуляций лимфоцитов, среди которых важную роль играют лимфоциты, обеспечивающие иммунологическую память. Феномен иммунологической памяти известен давно и присущ системе адаптивного иммунитета, включающего Т- и В-клеточные звенья. Роль лимфоцитов памяти представляется важной при любой хронической патологии, а для опухолевых заболеваний особенно актуальна иммунологическая память, опосредуемая Т-лимфоцитами. Особое значение при этом придается $CD8^+$-клеткам, так как частота встречаемости специфических цитотоксических Т-лимфоцитов против опухолевых антигенов намного выше среди $CD8^+$-клеток памяти, чем среди наивных [3]. У онкологических больных, как продемонстрировано на примере тетрамера меланомы мелан-А, отмечена различная способность наивных Т-лимфоцитов (Th0) и Т-клеток памяти (Tm) отвечать на стимуляцию опухолевым антигеном *ex vivo*, отсутствующая у клеток $CD45RA^+CCR7^+$ и наличествующая у $CD45RO^+CCR7^-$ [4, 5]. Некоторыми авторами уровень $CD8^+$-клеток памяти в опухоли при колоректальном раке и других солидных опухолях рассматривается как ключевой фактор общей выживаемости больных [6].

Как стало известно в конце XX в. после введения в широкий научно-лабораторный обиход методов иммунофенотипирования лимфоцитов, субпопуляция Tm-лимфоцитов гетерогенна и подразделяется в зависимости от экспрессии адгезионных, хемокиновых, костимулирующих рецепторов, от способности к продукции цитокинов и к ответу на них, возможности проникать через эндотелий и от других характеристик. На основании этих особенностей были определены основные субпопуляции Tm: центральные (Tcm) и эффекторные (Tem). Фенотип этих клеток характеризуется экспрессией CD45RO при отсутствии экспрессии CD45RA, а также наличием на Tcm рецепторов CCR7, CD62L, CD27 и CD28, тогда как на Tem-клетках экспрессия CCR7, CD62L и CD28 отсутствует, а CD27 сохраняется [7]. Th0 обладают высокой экспрессией CCR7, CD62L, CD27, CD28 и CD45RA при отсутствии CD45RO. Таким образом, иммунофенотипирование минимальной панелью моноклональных антител CD62L, CD45RA и CD45RO позволяет отнести Т-лимфоцит к субпопуляции Th0, Tcm или Tem.

Хроническая антигенная стимуляция вызывает изменения Th0, в ходе которых происходит не только указанное выше изменение их иммунофенотипа, но и снижение пролиферативной активности и выживаемости, а также ответа на гомеостатические цитокины (IL-7, IL-15) и способности к продукции IL-2; при этом нарастают эффекторные функции, в частности цитотоксичность. Рецепторы CD62L и CCR7, экспрессируемые Th0 и Tcm, способствуют их экстравазации через высокий эндотелий венул и миграции в Т-зависимые зоны периферических лимфоузлов, тогда как Tem населяют периферические ткани (печень, легкие), а также область воспалительного или опухолевого очага [8, 9]. Благодаря таким свойствам Tem выполняют «сторожевую» функцию, а Tcm обеспечивают защиту на системном уровне и быстрый ответ на последующие введения антигена [10, 11].

В отношении преимущественной противоопухолевой активности эффекторных или центральных Tm высказываются различные мнения, хотя чаще приоритет отдают Tcm [7, 9]. Есть данные о том, что вклад обоих видов клеток в противоопухолевую защиту хотя и разный по механизмам, но комплементарный, и для ее оптимального осуществления необходимы обе субпопуляции Tm [12]. В литературе приводятся сведения, что при адоптивной иммунотерапии наличие среди Tm $CD4^+$-лимфоцитов предотвращает истощение $CD8^+$-лимфоцитов [13], а, следовательно, необходимо использовать их гетерогенную смесь [12, 13].

Некоторые авторы, кроме основных субпопуляций Tm, выделяют еще одну резидентную (Trm), которая формируется из циркулирующих $CD8^+$ Tm, экспрессируя в патологическом очаге дополнительные рецепторы CD103 [14]. Есть сообщения о различных фенотипических характеристиках $CD8^+$ Tm в разных органах. Например, перитонеальная полость в нормальном состоянии содержит только эффекторные $CD4^+$- и $CD8^+$-лимфоциты, а при воспалении, кроме того, $CD4^+$ и $CD8^+$ Tm [14]. Сигналом к задержке Tm в очаге с последующей их трансформацией в Trm-клетки может быть поступление антигена [15] или «цитокиновый взрыв», наблюдаемый при воспалении. Trm-клетки описаны при воспалительных процессах [16, 17], но не при опухолевом росте.

Иммунологическим исследованиям при раке яичников посвящен ряд современных работ, планирующих разработку новых методов иммунотерапии [1, 18]. В ходе таких исследований авторами делаются неожиданные находки, касающиеся клеток иммунологической памяти, в частности, описана минорная субпопуляция Tm, экспрессирующих В-клеточный рецептор $CD20^+$ вместе с $IFN\gamma^+$ и $CD8^+$ [19], которая рассматривается как подавляющая опухолевый рост.

В норме в крови человека Tcm преобладают среди лимфоцитов субпопуляции $CD4^+$, а Tem в субпопуляции $CD8^+$ [11], при этом установлено различное содержание этих клеток в лимфоидных и нелимфоидных органах, а также некоторые различия их фенотипических и функциональных характеристик в зависимости от микроокружения [14].

Иммунная защита организма от опухоли осуществляется как на системном, так и на локальном уровне с участием различных клеточных факторов, а также их растворимых продуктов [18]. Однако роль присутствующих в микроокружении опухоли иммунокомпетентных клеток и цитокинов расценивается двояко, т. е. они рассматриваются как факторы не только способствующие ее регрессии, но и могущие стимулировать ее рост, тем более при распространенных стадиях [20–23].

Лечение рака яичников (РЯ) остается одной из сложных проблем в онкологии [24]. Согласно имеющимся в литературе данным, РЯ среди всех злокачественных опухолей находится на пятом месте по числу случаев, и, несмотря на постоянное совершенствование методов диагностики и лечения, занимает лидирующее место по показателю смертности. Хотя РЯ чувствителен к химиотерапии, он редко поддается полному излечению и склонен к частому

и раннему рецидивированию. Стандартом лечения РЯ III–IV стадий в настоящее время является хирургическое лечение в сочетании с химиотерапией, однако технические трудности, обусловленные распространенностью опухолевого процесса, не позволяют выполнить циторедуктивную операцию в оптимальном объеме. В том случае, когда провести операцию не представляется возможным, первым этапом лечения проводят неоадъювантную химиотерапию, а после операции выполняется адъювантная химиотерапия; наиболее часто для проведения химиотерапии используется комбинация «Паклитаксела» и «Карбоплатина» с интервалом в три недели [25].

Рекомбинантный интерферон-гамма (рИФНγ) «Ингарон», разработанный российскими учеными в виде формы для инъекций и направленный на стимуляцию клеточного иммунитета, обладает противовирусным, антипролиферативным и иммуномодулирующим действием [26]. Его противоопухолевое действие связано со способностью активировать естественные киллеры (NK-клетки), цитотоксические Т-лимфоциты и макрофаги. При применении в комбинации с цитостатиками он помогает преодолевать резистентность опухолевых клеток к химиотерапии, существенно повышая эффективность лечения [27]. Данный препарат исследовался и применялся при раке шейки матки, раке молочной железы, легкого, меланоме, колоректальном раке, продемонстрировав эффективность даже в далеко зашедших стадиях [28].

Целью работы было оценить роль Т-клеток иммунологической памяти в формировании противоопухолевого иммунитета у больных раком яичников на этапе неоадъювантного лечения, включающего химиоиммунотерапию с применением рекомбинантного интерферона-гамма.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на базе отделения онкогинекологии отдела органов репродуктивной системы и лаборатории иммунофенотипирования опухолей Ростовского научно-исследовательского онкологического института в период с 2013 по 2017 г. Обследованы 30 больных РЯ в возрасте от 34 до 77 лет; средний возраст — 54,9 ± 1,3 года. Все больные были первично выявленными; средняя продолжительность анамнеза составляла 7 мес. Все больные дали письменное добровольное информированное согласие на проведение лечения, все исследования выполнены в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации (2013). Исследование утверждено протоколом этического комитета РНИОИ № 24 от 23.11.2012.

Критериями включения больных в исследование были: возраст старше 18 лет; верифицированный цитологически или морфологически рак яичников III–IV стадии, асцитная форма; отсутствие предыдущего специального лечения.

Критерии исключения: выраженная сопутствующая патология (перенесенный инфаркт миокарда, декомпенсированный порок сердца, сахарный диабет); прохождение химиотерапии, лучевой терапии, хирургического вмешательства, иммунотерапии до начала исследуемого лечения; метастатическое поражение центральной нервной системы; беременность и лактация; любые причины, препятствующие регулярному лечению и наблюдению за пациентом.

Были сформированы две группы по 15 больных: основная, получавшая химиотерапию с иммунотерапией рИФНγ (ХИТ), и контрольная, получавшая химиотерапию (ХТ).

Сравнительный анализ двух групп больных, подвергшихся неоадъювантной химиотерапии с применением рИФНγ и без него, выявил, что в основной группе и в группе контроля с III стадией было по 11 (73,3 %) больных, с IV стадией — по 4 (26,7 %) больных; различия статистически незначимы ($p > 0,05$). В обеих группах наибольшее количество больных было в возрастной группе 50–59 лет: в основной группе — 5 (33,3 %) пациенток, в контрольной — 6 (40,0 %); статистически достоверной разницы не отмечено. Общее состояние больных оценивали по шкале ECOG–WHO, по которой у наибольшего числа больных было 2 балла: у 8 (53,3 %) и 9 (60,0 %) пациенток в основной и контрольной группах соответственно; различия статистически незначимы. Таким образом, на основании представленных данных следует, что больные сравниваемых групп в исходном состоянии были идентичны по возрасту, стадиям заболевания и общему состоянию, что дает право проводить сравнительный анализ.

Группу сравнения составили 20 практически здоровых женщин аналогичного возраста, у которых брали пробы крови.

Больных обследовали в динамике лечения: до и через 3 нед. после проведения ХТ (15 больных) и ХИТ (15 больных); такой промежуток между обследованиями был выбран в соответствии с интервалом между курсами лечения. Больные получили по 2–3 курса полихимиотерапии по схеме: «Карбоплатин» (AUC-6) внутривенно капельно, «Паклитаксел» 175 мг/м^2 внутривенно капельно, интервал между курсами 21 день. ХИТ выполняли следующим образом: рИФНγ («Ингарон» производства «Фармаклон», Россия) вводили внутримышечно в 1-й день 500 тыс. МЕ, во 2, 3, 5-й дни по 1 млн МЕ, в 4-й день проводили курс полихимиотерапии по той же схеме («Паклитаксел» + «Карбоплатин»). Обе группы больных были идентичны по возрасту, стадиям заболевания и общему состоянию.

В дальнейшем все больные подвергались хирургическому лечению, которое заключалось в экстирпации матки с придатками, экстирпации или резекции большого сальника или удалении придатков матки, в зависимости от эффективности проведенного лечения. В послеоперационном периоде больным основной группы выполнялась адъювантная ХИТ: на 9-й день после операции начинали вводить «Ингарон» внутримышечно по той же схеме. Проводили 2 курса лечения, включающего «Ингарон», затем 4 курса химиотерапии; всего больные получали 6 курсов адъювантного лечения. Больным контрольной группы выполняли 6 курсов ХТ.

Эффект неоадъювантного этапа лечения оценивали по наличию полной, частичной регрессии, общего эффекта, складывающегося из полной и частичной регрессии; стабилизации или прогрессирования опухоли согласно критериям ВОЗ для оценки эффективности лечения при солидных опухолях.

После окончания адъювантного лечения больных наблюдали в течение 3 лет, отмечали время наступления рецидива.

Кровь и асцитическую жидкость (АЖ) брали до начала и на этапах лечения. Общее количество исследованных образцов крови составило 98, АЖ — 47.

Проточная цитофлуориметрия лимфоцитов крови и АЖ. Измерения проводили на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto II (Becton Dickinson, США), оснащенном двумя лазерами с длинами волн возбуждения флуорофоров 488 нм и 633 нм с возможностью использовать до 6 моноклональных антител в одной пробирке

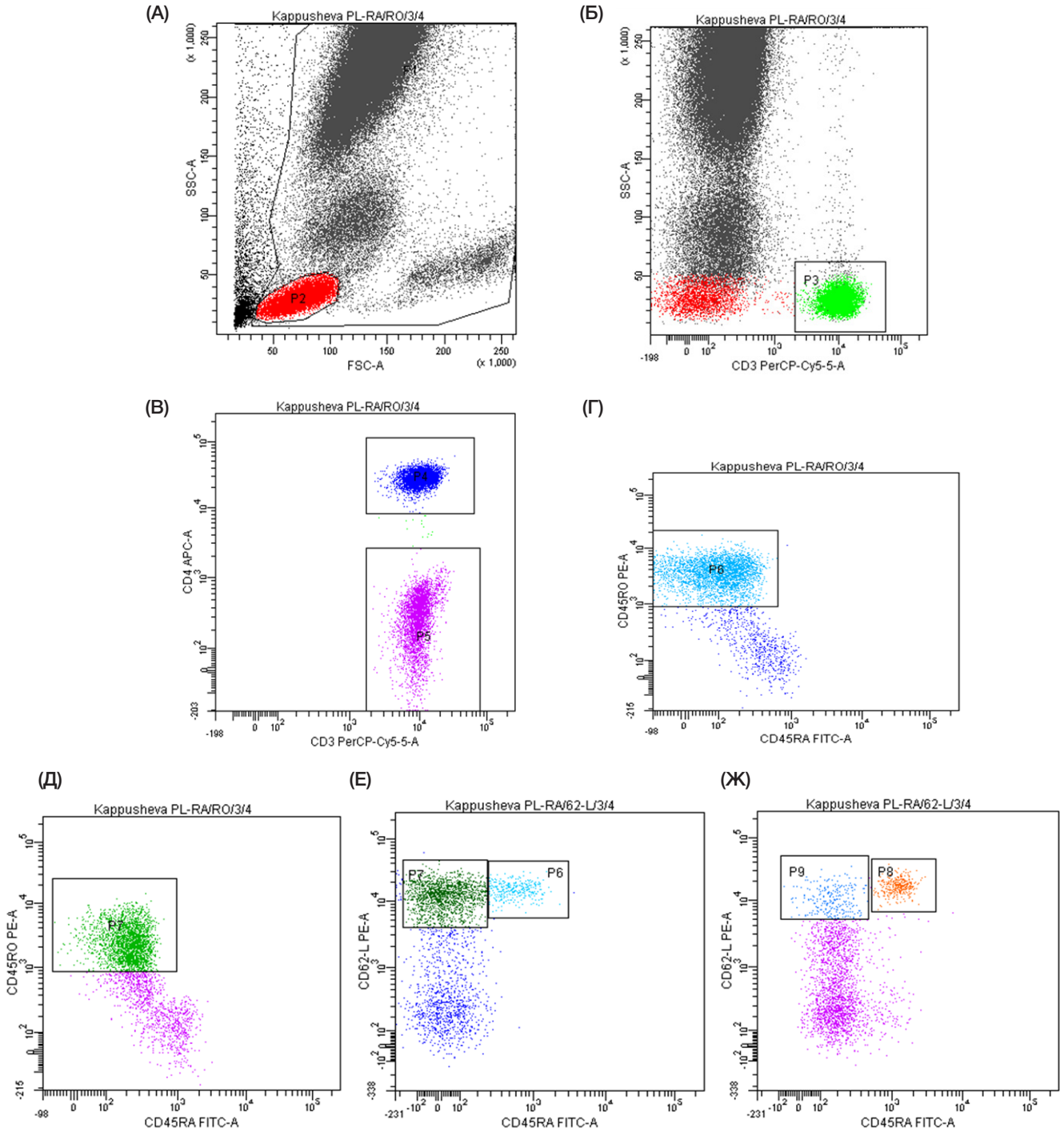


Рис. 1. Анализ Tm периферической крови методом проточной цитофлуориметрии: **(А)** — выделение региона лимфоцитов среди клеток крови; **(Б)** — определение популяции Т-лимфоцитов; **(В)** — распределение CD4 и CD8; **(Г)** — распределение CD45RA и CD45RO после логического ограничения по CD4; **(Д)** — распределение CD45RA и CD45RO после логического ограничения по CD8; **(Е)** — распределение CD45RA и CD62L после логического ограничения по CD4; **(Ж)** — распределение CD45RA и CD62L после логического ограничения по CD8

одновременно. Моноклональные антитела были конъюгированы со следующими флуорохромами: FITC, PE, PerCP-Cy5.5, PE-Cy7, APC, APC-Cy7. Инструментальные настройки прибора проводили с помощью стандартизированных флуоресцентных шариков BD FACS 7-color setup beads (BD Biosciences, США).

Процедура пробоподготовки и иммунофенотипическое окрашивание. Для оценки экспрессии рецепторов использовали иммунофенотипическое окрашивание. Окраску проводили с помощью флуоресцентно-меченых антител согласно протоколу производителя. На каждого обследованного приходилось 2 пробирки со следующими наборами моноклональных антител BD Multitest (Becton Dickinson, США):

1) CD45RA FITC/CD45RO PE/CD3 PerCP/CD4 APC (кат. № 340571) или CD45RA FITC/CD45RO PE/CD3 PerCP/CD8 APC (кат. № 340574);

2) CD45RA FITC/CD62L PE/CD3 PerCP/CD4 APC (кат. № 340977).

Данная панель антител позволяет определить содержание Th0, Tcm и Tem ($CD62L^+CD45RA^+CD45RO^-$, $CD62L^+CD45RA^-CD45RO^+$ и $CD62L^-CD45RA^-CD45RO^+$

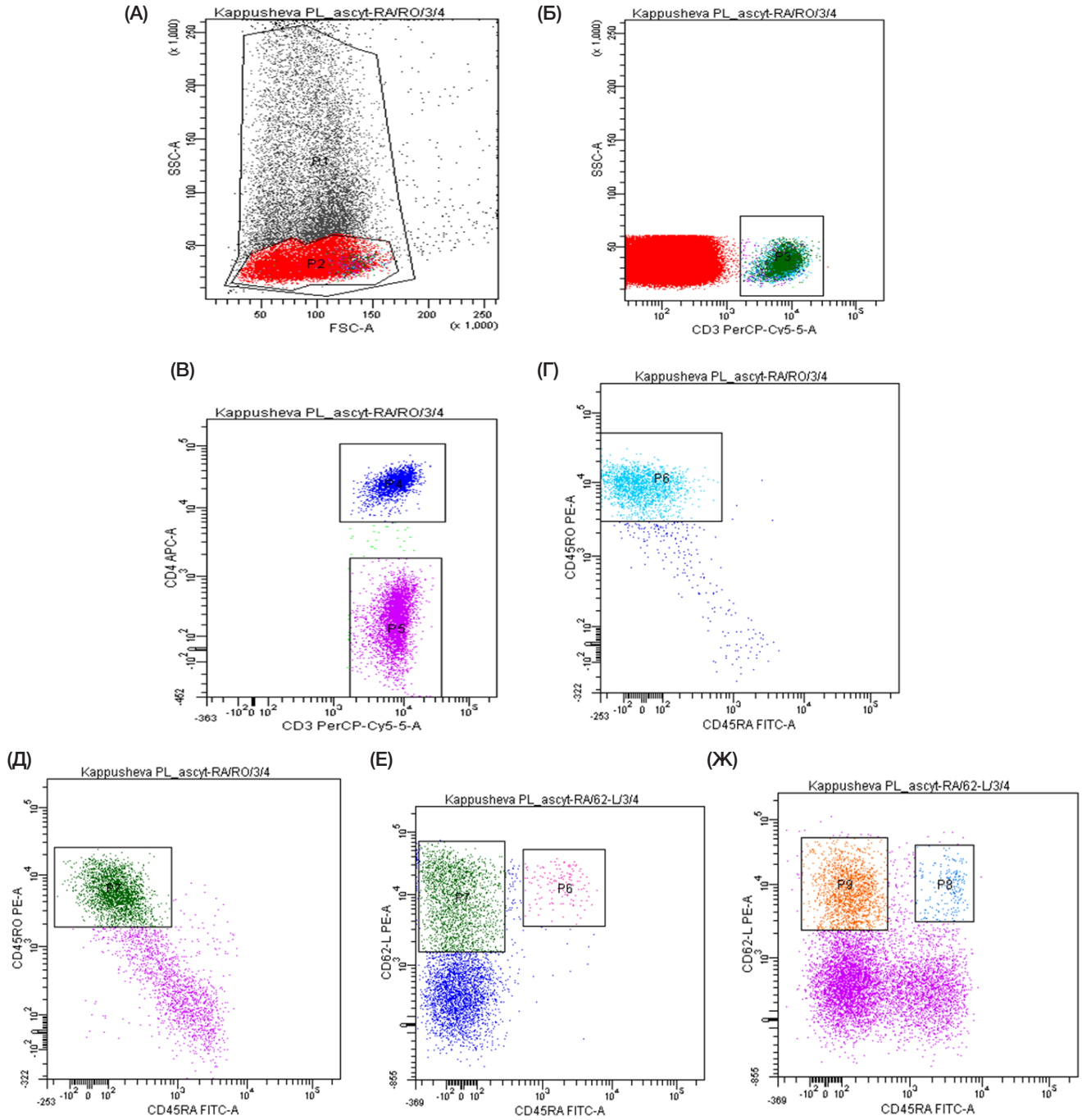


Рис. 2. Анализ Tm АЖ методом проточной цитофлуориметрии: **(А)** — выделение региона лимфоцитов; **(Б)** — определение популяции Т-лимфоцитов; **(В)** — распределение CD4 и CD8; **(Г)** — распределение CD45RA и CD45RO после логического ограничения по CD4; **(Д)** — распределение CD45RA и CD45RO после логического ограничения по CD8; **(Е)** — распределение CD45RA и CD62L после логического ограничения по CD4; **(Ж)** — распределение CD45RA и CD62L после логического ограничения по CD8

соответственно) среди $CD4^+$ и $CD8^+$ субпопуляций Tm. В каждом образце для анализа данных накапливали не менее 50 000 клеток.

Тактика гейтирования и анализ данных. С помощью графика Dot Plot по параметрам прямого (относительный размер клеток) и бокового (структура клеток) светорассеяния выделяли область лимфоцитов. В пределах этого региона по маркерам CD3, CD4 и CD8 рассчитывали процент Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов в общей популяции лимфоцитов. Далее анализировали процент Т-лимфоцитов с фенотипами $CD4^+CD45RO^+CD45RA^-$, $CD8^+CD45RO^+CD45RA^-$,$CD4^+CD45RA^+CD62L^+$, $CD8^+CD45RA^+CD62L^+$ в популяциях Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов. Для каждой пробы вычисляли коэффициенты Tm/Th0 среди $CD4^+$ и $CD8^+$ субпопуляций. Уровни Tcm и Tem определяли в процентах от количества Tm, принадлежащих к субпопуляциям $CD4^+$ и $CD8^+$; рассчитывали коэффициент Tem/Tcm. Примеры результатов проточной цитофлуориметрии крови и АЖ приведены на рис. 1 и 2.

Методы математической и статистической обработки. Математическую обработку цитофлуориметрических данных проводили в программе BD FACSDiva Software (Becton Dickinson, США). Для анализа результатов и статистической обработки использовали программный пакет Statistica 8.0 for Windows и MS Excel. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Использовали

также критерий Уилкоксона; оценку достоверности различий между частотой развития полного и общего эффекта, частотой рецидивирования проводили по критерию соответствия χ^2.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты исследования представлены в табл. 1–4 и на рис. 3 и 4. В пробах биологических жидкостей обнаружены различия содержания Tm- и Th0-лимфоцитов. Как видно из табл. 1, в крови больных РЯ выявлен статистически достоверно более высокий уровень Tm среди $CD3^+CD4^+$-клеток и более низкий уровень Th0 среди $CD3^+CD8^+$-клеток по сравнению с показателями здоровых женщин ($p < 0,05$). При сопоставлении уровней Tm в крови и в АЖ больных РЯ выявлено выраженное преобладание их в АЖ ($p < 0,05$); в отличие от них уровни Th0 в АЖ были статистически значимо ниже по сравнению с кровью больных ($p < 0,05$) (табл. 1).

При этом не наблюдалось статистически достоверных различий между уровнями $CD4^+$- и $CD8^+$-клеток в крови и в АЖ, хотя содержание лимфоцитов и моноцитов в АЖ значительно превышало показатели крови. Так, несмотря на значительно более высокий уровень лимфоцитов в АЖ (52,4 ± 5,5 против 17,4 ± 2,7 % в крови больных), содержание их основных субпопуляций в этих биологических жидкостях не имело статистически достоверных различий: уровень $CD4^+$-клеток в крови составлял 49,2 ± 3,1 %, в АЖ — 48,7 ± 3,2 %, а уровень $CD8^+$ — 18,4 ± 2,7 и 22,6 ± 3,3 % соответственно. Индекс $CD4^+/CD8^+$ в АЖ также не имел статистически достоверных отличий от показателя крови больных. Однако соотношение Tm/Th0, относящихся к обеим Т-клеточным субпопуляциям, было существенно выше в АЖ больных по сравнению с показателями их крови (7,7 ± 1,0 против 2,9 ± 0,5 для $CD4^+$-клеток и 6,5 ± 1,3 против 2,1 ± 0,3 для $CD8^+$-клеток соответственно; в обоих случаях $p < 0,05$), что говорит о выраженном преобладании Tm над Th0 именно в опухолевом очаге по сравнению с периферической кровью.

Установлен также ряд различий по содержанию субпопуляций Tm в исследуемых биологических жидкостях (табл. 2).

Как видно из табл. 2, уровни Tem среди субпопуляций $CD4^+$- и $CD8^+$-клеток в АЖ статистически достоверно превышали содержание этих клеток в крови больных, а также в крови здоровых женщин ($p < 0,05$). По содержанию Tcm найдено различие только в субпопуляции $CD8^+$ между их уровнем в АЖ больных и в крови здоровых женщин. Интересно, что не обнаружено статистически значимых различий исследуемых субпопуляций в крови больных и здоровых лиц.

Уровни Tem в субпопуляциях $CD4^+$ и $CD8^+$ в большинстве случаев оказались сходными, тогда как процент Tcm в субпопуляции $CD4^+$-клеток был в 2–2,3 раза выше, чем в $CD8^+$. Соотношение Tem/Tcm в пробах крови и АЖ характеризовалось преобладанием Tem в субпопуляции $CD8^+$-клеток, превышая 1,0, и преобладанием Tcm в субпопуляции $CD4^+$, где оно было ниже 1,0 (рис. 3).

Таким образом, сопоставление показателей системного и локального клеточного иммунитета при асцитных формах РЯ продемонстрировало преобладание Tm в крови больных по сравнению со здоровыми женщинами, а также в АЖ по сравнению с периферической кровью больных. При этом среди Tm, относящихся к $CD4^+$, отмечено преимущественное содержание Tcm, а среди $CD8^+$ Tm наблюдается преобладание Tem с накоплением последних в АЖ больных.

Анализ клинической динамики у больных основной и контрольной групп на этапе неоадъювантного лечения показал, что в основной группе, получавшей ХТ с рИФНγ, полная регрессия опухоли отмечена у 4 (26,7 %) больных, в контрольной группе — у 1 (6,7 %) больной. При оценке общего эффекта от проводимого лечения получены статистически достоверные различия показателей основной и контрольной групп (87,0 и 30,0 % соответственно). Прогрессирование заболевания отмечено только в группе без применения рИФНγ у 1 (6,7 %) больной.

После проведения 2–3 курсов неоадъювантной полихимиотерапии удалось выполнить оперативное лечение полного объема (экстирпация матки с придатками, резекция или экстирпация большого сальника) у 12 (80,0 %) больных основной группы и у 6 (40,0 %) — из контрольной; различия достоверны ($p < 0,05$). Неполный объем оперативного пособия, включающий удаление опухолей яичников с резекцией большого сальника, в основной группе был

Таблица 1. Количество Tm и Th0 субпопуляций $CD4^+$ и $CD8^+$ в крови и АЖ больных РЯ

Пробы	Tm, %		Th0, %	
	$CD4^+$	$CD8^+$	$CD4^+$	$CD8^+$
Кровь здоровых женщин (n = 20)	55,0 ± 3,7	35,0 ± 4,3	23,4 ± 3,2	27,7 ± 3,7
Кровь больных РЯ (n = 30)	64,5 ± 2,3*	40,8 ± 5,1	22,4 ± 4,1	18,5 ± 2,7*
АЖ больных РЯ (n = 30)	79,2 ± 4,0*,**	57,5 ± 3,1*,**	10,2 ± 1,6*,**	9,5 ± 2,5*,**

Примечание. * — достоверные отличия от показателей крови здоровых доноров ($p < 0,05$); ** — достоверные отличия от показателей крови больных ($p < 0,05$). Здесь и далее в табл. 2–4 для расчета достоверности различий применяли критерий Уилкоксона.

Таблица 2. Количество центральных и эффекторных Tm с фенотипом $CD4^+$ и $CD8^+$ в крови и АЖ больных РЯ

Пробы	Tm $CD4^+$		Tm $CD8^+$	
	Tcm, %	Tem, %	Tcm, %	Tem, %
Кровь здоровых женщин (n = 20)	41,7 ± 2,5	17,8 ± 2,3*	17,7 ± 2,5*	24,1 ± 3,6*
Кровь больных РЯ (n = 30)	42,0 ± 3,1	24,8 ± 1,8*	22,0 ± 1,5	28,2 ± 3,2*
АЖ больных РЯ (n = 30)	47,1 ± 3,3	39,8 ± 3,9	27,0 ± 2,0	42,1 ± 4,1

Примечание. * — достоверные отличия от показателей АЖ больных ($p < 0,05$).

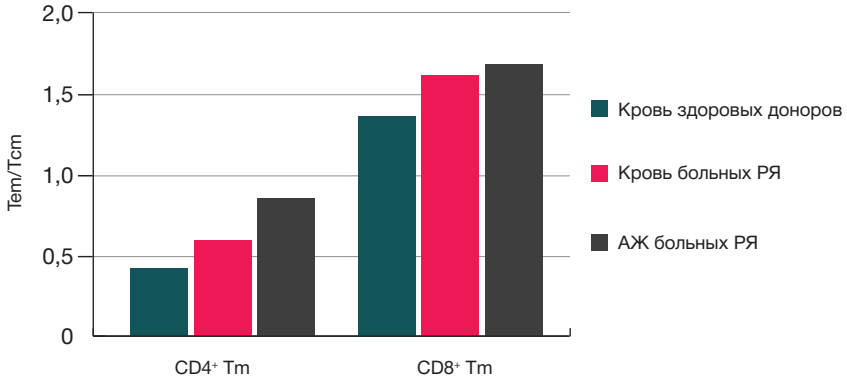


Рис. 3. Соотношение Tem/Tcm в субпопуляциях $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток памяти

выполнен у 3 (20,0 %) больных, а в контрольной группе — у 8 (53,3%) пациенток, еще у 1 (6,7 %) больной из той же группы была выполнена пробная лапаротомия.

После проведения адъювантного лечения больных наблюдали в течение 3 лет. Процент возникновения рецидива у больных основной группы составил 46,7 % против 80,0 % в контрольной группе (7 и 12 больных соответственно), а средний срок его возникновения был 17,5 ± 1,6 мес. и 11,3 ± 1,5 мес. соответственно; различия достоверны ($p < 0,05$).

Учитывая, что больным выполняли разные по объему операции, для иммунологического исследования мы отбирали тех, кому проводили операцию одинакового типа, а именно полного объема.

Изучение динамики уровней Tm и Th0 в крови больных при лечении с применением и без применения интерферона-гамма показало ряд различий (табл. 3). Обращает на себя внимание, что у больных основной группы, получавших ХТ с рИФНγ, произошло снижение уровней наивных Th0, статистически значимое к концу лечения ($p < 0,05$). В контрольной группе уровень этих клеток не отличался от исходного на протяжении всего срока наблюдения.

Соотношение Tm/Th0 в процессе лечения статистически достоверно возрастало у больных основной, но не контрольной группы (рис. 4). Так, соотношение Tm/Th0 среди $CD8^+$-клеток у больных основной группы возросло с 2,5 ± 0,5 до 3,4 ± 0,7, а в контрольной группе снизилось с 1,7 ± 0,3 до 1,4 ± 0,3, оказавшись достоверно ниже, чем в основной ($p < 0,05$). В субпопуляции $CD4^+$-лимфоцитов отмечено 2,5-кратное возрастание этого показателя в основной группе и отсутствие изменений в контрольной.

Несмотря на то, что содержание Tm не имело статистически достоверных различий в процессе лечения (табл. 3), оценка динамики процентного содержания Tcm и Tem у больных основной и контрольной групп показала наличие таких различий в субпопуляции Tm $CD8^+$ (табл. 4). В крови больных контрольной группы происходило постепенное снижение уровня Tcm, к концу лечения достигшее статистически значимого ($p < 0,05$); при этом уровни Tem не менялись.

Применение ХИТ с рИФНγ первоначально приводило к подобным изменениям, однако, в финале лечения количество Tcm оказалось выше, а уровень Tem ниже у больных основной группы по сравнению с контрольной (табл. 4). Таким образом, в крови больных контрольной группы к концу лечения преобладали Tem, а в основной группе — Tcm (соотношение Tem/Tcm составляло 2,27 ± 0,4 и 0,62 ± 0,18 соответственно; $p < 0,05$).

Динамику уровней исследуемых субпопуляций в АЖ можно было определить только в тех случаях и в те сроки, когда происходило накопление АЖ, т. е. в предоперационном периоде. Было установлено, что в субпопуляции $CD4^+$-лимфоцитов соотношение уровней Tm и Th0 в динамике ХИТ с применением рИФНγ статистически достоверно повышалось с 7,7 ± 1,0 до 13,0 ± 1,5 ($p < 0,05$). В АЖ больных той же группы отмечены изменения и в субпопуляции Tm $CD8^+$, где произошло снижение уровня Tem (13,6 ± 4,6 против 42,1 ± 4,1 % в контрольной группе; $p < 0,05$), а количество в ней Tcm имело тенденцию к повышению. Общее количество лимфоцитов после проведения ХИТ в АЖ составляло 42,2 ± 7,8 против 31,1 ± 7,1 % после ХТ (различия статистически недостоверны), однако после ХТ без рИФНγ отмечено их достоверное снижение по сравнению с исходным показателем (52,4 ± 5,5 %, $p < 0,05$). Кроме того, отмечены и другие статистически значимые различия: уровни $CD3^+$- и $CD4^+$-клеток были выше после ХИТ по сравнению с наблюдаемыми после ХТ, составив 82,1 ± 6,3 против 65,4 ± 6,5 % и 57,6 ± 5,7 против 42,6 ± 2,5 % соответственно; в обоих случаях $p < 0,05$).

Таким образом, в АЖ больных РЯ обнаружено более высокое содержание Tm как среди субпопуляций $CD4^+$, так и среди $CD8^+$ при более низких количествах Th0, чем

Таблица 3. Динамика содержания Tm и Th0 в крови больных РЯ основной и контрольной групп

Группа больных	Срок исследования	Tm, %		Th0, %	
		$CD4^+$	$CD8^+$	$CD4^+$	$CD8^+$
Основная (n = 12)	до лечения	65,8 ± 4,2	40,9 ± 5,2	20,5 ± 3,5*	17,2 ± 1,6*
	после 2–3 курсов ХИТ	64,6 ± 6,1	37,7 ± 4,5	15,7 ± 3,4	16,5 ± 2,3
	после окончания ХИТ	72,8 ± 5,9	35,7 ± 5,1	9,7 ± 2,7	10,4 ± 2,6
Контрольная (n = 6)	до лечения	66,3 ± 4,4	38,1 ± 4,7	23,6 ± 4,6	23,6 ± 5,6
	после 2–3 курсов ХТ	59,1 ± 7,1	31,6 ± 4,5	16,8 ± 3,9	18,8 ± 3,2
	после окончания ХТ	63,2 ± 7,3	37,5 ± 7,2	24,4 ± 6,2*	27,3 ± 7,5*

Примечание. * — достоверные отличия от показателей основной группы после окончания ХИТ ($p < 0,05$).

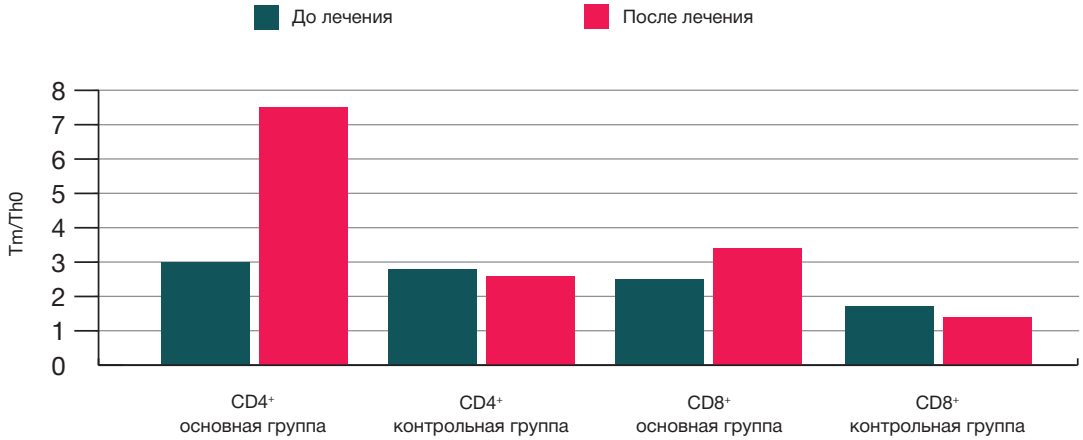


Рис. 4. Изменение соотношения Tm/Th0 в субпопуляциях $CD4^+$- и $CD8^+$-лимфоцитов в крови больных РЯ до и после лечения

в крови больных; при этом выявлено преобладание Tem среди Tm $CD8^+$. Показана разнонаправленная динамика Tem и Tcm клеток в крови и АЖ больных, подвергавшихся ХТ с включением и без включения препарата «Ингарон» (рИФНγ).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Учитывая важность биологической роли Tm при онкологических заболеваниях и возможность изменения их количества и соотношения субпопуляций при проведении иммунотерапии, нами было выполнено исследование уровней Tm, включая Tcm и Tem, а также Th0 в крови и асцитической жидкости больных РЯ до лечения и при проведении химиоиммунотерапии. Кроме ранее описанного нами присутствия в АЖ больных высокого количества лимфоцитов с преобладанием Tm [29], в данной работе показано превалирование среди последних Tem, преимущественно принадлежащих к субпопуляции $CD8^+$. Хотя пока не представляется возможным установить их специфичность и обосновать предположение об их возможной противоопухолевой активности, данные литературы свидетельствуют о том, что поскольку экспансия лимфоцитов, находящихся в составе лимфоидного инфильтрата в опухоли (опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов), носит клональный характер, в окружении опухоли преобладают антиген-специфические лимфоциты [6]. При этом у больных РЯ, судя по наличию распространенного опухолевого процесса, не происходит развития эффективных иммунных реакций, причинами чего могут быть особенности микроокружения опухоли. Опухолевые клетки, находящиеся в АЖ, видимо, активируют перитонеальные макрофаги и моноциты, что приводит к гиперпродукции цитокинов, обладающих проонкогенными свойствами [21]. Моноциты АЖ служат потенциальным источником макрофагов 2-го типа, поддерживающих опухолевый рост путем аутокринной продукции VEGF, EGF, TGFß, IL-6, IL-8, IL-10, чему способствует гипоксия, развивающаяся в опухолевой ткани [23, 30]. Эти же цитокины, а также хемокины, способные вырабатываться и опухолевыми клетками, стимулируют миграцию лимфоцитов в перитонеальную полость. По данным литературы, среди них находятся естественные Т-регуляторные клетки (T-regs), обладающие иммуносупрессивной и проонкогенной активностью, количество которых у больных РЯ выше, чем у здоровых женщин [31], а в АЖ значительно выше, чем в крови [32]. Возможно, они блокируют активность Т-лимфоцитов, в частности Tm, как и других лимфоцитов (NK^-, $CD8^+$), которые, несмотря на их высокое содержание, по-видимому, являются функционально неполноценными, как это было показано на примере $CD8^+$ Tm, хронически стимулируемых при вирусных инфекциях [7, 9, 33, 34]. Tm, в отличие от T-regs, подвергаются апоптозу при взаимодействии с FasL, экспрессируемым эндотелиоцитами опухолевых сосудов, что рассматривается как один из защитных механизмов опухоли [35]. Возможно, применение воздействий, направленных на снятие локальной иммуносупрессии, позволило бы добиться результативного включения клеточных факторов в противоопухолевый иммунный ответ с возможностью повышения эффективности лечения РЯ.

Как описано нами ранее, применение «Ингарона» в курсе химиотерапии, наряду с другими позитивными изменениями иммунного статуса, вызывает снижение уровня Th0 у больных РЯ [36]. В данной работе, где сделан акцент на изучение Tm у этих больных, показано, что

Таблица 4. Динамика содержания Tcm и Tem в крови больных РЯ основной и контрольной групп

Группа больных	Срок исследования	Tm $CD4^+$		Tm $CD8^+$	
		Tcm, %	Tem, %	Tcm, %	Tem, %
Основная (n = 12)	до лечения	43,0 ± 2,5	26,3 ± 3,8	24,4 ± 3,6	25,8 ± 3,3
	после 2–3 курсов ХИТ	39,8 ± 4,1	26,8 ± 3,3	13,3 ± 3,4*	22,6 ± 3,7
	после окончания ХИТ	42,8 ± 3,8	28,4 ± 5,1	22,2 ± 2,9**	13,9 ± 3,6*,**
Контрольная (n = 6)	до лечения	42,3 ± 3,6	25,5 ± 2,8	22,5 ± 2,3	30,6 ± 4,9
	после 2–3 курсов ХТ	45,3 ± 4,7	23,7 ± 3,7	17,8 ± 4,0	25,3 ± 2,9
	после окончания ХТ	43,1 ± 6,1	23,8 ± 4,7	12,6 ± 2,2*	28,7 ± 3,3

Примечание. * — достоверные отличия от показателей до лечения ($p < 0,05$); ** — достоверные отличия от соответствующих показателей контрольной группы ($p < 0,05$).

применение рИФНγ способствует увеличению преобладания Tm над уровнем Th0 в крови и в АЖ больных РЯ после химиоиммунотерапии, а также вызывает перераспределение Tm $CD8^+$ в пользу Tcm, в отличие от больных, получавших химиотерапию без рИФНγ, с чем отчасти может быть связано повышение клинического эффекта, наблюдаемое при включении данного иммунопрепарата в курс химиотерапии. Хотя в литературе описано, что при повторном введении антигена происходит нарастание пролиферативной активности и цитотоксичности как среди Tcm, так и среди Tem, входящих в субпопуляцию $CD8^+$ Т-клеток, считается, что эти свойства, а также более активное взаимодействие с антигенпрезентирующими клетками, более высокая антиген-индуцированная пролиферация, генерация цитотоксических Т-эффекторов и хоуминг во вторичные лимфоидные органы превалирует у Tcm [7, 37]. Это говорит о преимуществе опухоль-специфичных $CD8^+$ Tcm по сравнению с Tem как противоопухолевых факторов, что позволяет рассматривать полученные нами данные как один из механизмов реализации терапевтического действия «Ингарона» при асцитных формах РЯ.

ВЫВОДЫ

У больных асцитными формами рака яичников до лечения среди Tm, относящихся к $CD4^+$, отмечено преимущественное содержание Tcm, а среди субпопуляции $CD8^+$ — преобладание Tem с их накоплением в асцитической жидкости больных. Несмотря на высокие уровни Tm в крови и АЖ, их функция, по-видимому, является дефектной, вследствие чего представляется важным изучить возможность ее восстановления.

Положительная клиническая динамика у больных РЯ после завершения химиотерапии с рекомбинантным интерфероном-гамма по сравнению с получавшими только химиотерапию сопровождается снижением количества Th0 в крови больных, а среди $CD8^+$ Tm — формированием преобладания Tcm над Tem. Поскольку подобные изменения развиваются и в АЖ, такая модуляция иммунологического микроокружения опухоли может вносить вклад в развитие полученного клинического эффекта, в частности, более длительного безрецидивного периода у больных РЯ после введения рекомбинантного интерферона-гамма.

Литература

1. Cannon MJ, O'Brien TJ. Cellular immunotherapy for ovarian cancer. Expert Opin Biol Ther. 2009 Jun; 9 (6): 677–88. doi: 10.1517/14712590902932897
2. Golubovskaya V, Wu L. Different Subsets of T Cells, Memory, Effector Functions, and CAR-T Immunotherapy. Cancers (Basel). 2016 Mar 15; 8 (3): pii: E36. doi: 10.3390/cancers8030036
3. Beckhove Ph, Feuerer M, Dolenc M, Schuetz F, Choi C, Sommerfeldt N, et al. Specifically activated memory T cell subsets from cancer patients recognize and reject xenotransplanted autologous tumors. J Clin Invest. 2004 Jul 1; 114 (1): 67–76. doi: 10.1172/JCI200420278
4. Dunbar PR, Smith CL, Chao D, Salio M, Shepherd D, Mirza F, et al. A Shift in the Phenotype of Melan-A-Specific CTL Identifies Melanoma Patients with an Active Tumor-Specific Immune Response. J Immunol. 2000 Dec 1; 165 (11): 6644–52. doi: https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.11.6644
5. Valmori D, Scheibenbogen C, Dutoit V, Nagorsen D, Asemissen AM, Rubio-Godoy V, et al. Circulating Tumor-reactive CD8(+) T cells in melanoma patients contain a CD45RA(+) CCR7(-) effector subset exerting ex vivo tumor-specific cytolytic activity. Cancer Res. 2002 Mar 15; 62 (6): 1743–50.
6. Hadrup S, Donia M, Thor Straten P. Effector CD4 and CD8 T Cells and Their Role in the Tumor Microenvironment. Cancer Microenviron. 2013 Aug; 6 (2): 123–33. doi: 10.1007/s12307-012-0127-6
7. Klebanoff CA, Gattinoni L, Torabi-Parizi P, Kerstann K, Cardones AR, Finkelstein SE, et al. Central memory self/tumor-reactive CD8+ T cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Jul 5; 102 (27): 9571–6.
8. Weninger W, Crowley MA, Manjunath N, von Andrian UH. Migratory properties of naive, effector, and memory CD8 (+) T cells. J Exp Med. 2001 Oct 1; 194 (7): 953–66.
9. Wherry EJ, Teichgräber V, Becker TC, Masopust D, Kaech SM, Antia R, et al. Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. Nat Immunol. 2003 Mar; 4 (3): 225–34.
10. Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. Nature. 1999 Oct 14; 401 (6754): 708–12.
11. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. Annu Rev Immunol. 2004; 22: 745–63.
12. Church SE, Jensen SM, Antony PA, Restifo NP, Fox BA. Tumor-specific CD4+ T cells maintain effector and memory tumor-specific CD8+ T cells. Eur J Immunol. 2014 Jan; 44 (1): 69–79. doi: 10.1002/eji.201343718
13. Perret R, Ronchese F. Memory T cells in cancer immunotherapy: which CD8 T-cell population provides the best protection against tumours? Tissue Antigens. 2008 Sep; 72 (3): 187–94. doi: 10.1111/j.1399-0039.2008.01088.x
14. Shin H, Iwasaki A. Tissue-resident memory T cells. Immunol Rev. 2013 Sep; 255 (1): 165–81. doi: 10.1111/imr.12087
15. Zammit DJ, Turner DL, Klonowski KD, Lefrançois L, Cauley LS. Residual antigen presentation after influenza virus infection affects CD8 T cell activation and migration. Immunity. 2006 Apr; 24 (4): 439–49.
16. Shin H, Iwasaki A. A vaccine strategy that protects against genital herpes by establishing local memory T cells. Nature. 2012 Nov 15; 491 (7424): 463–7. doi: 10.1038/nature11522
17. Mackay LK, Stock AT, Ma JZ, Jones CM, Kent SJ, Mueller SN, et al. Long-lived epithelial immunity by tissue-resident memory T (TRM) cells in the absence of persisting local antigen presentation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 May 1; 109 (18): 7037–42. doi: 10.1073/pnas.1202288109
18. Preston CC, Goode EL, Hartmann LC, Kalli KR, Knutson KL. Immunity and immune suppression in human ovarian cancer. Immunotherapy. 2011 Apr; 3 (4): 539–56. doi: 10.2217/imt.11.20
19. de Bruyn M, Wiersma VR, Wouters MC, Samplonius DF, Klip HG, Helfrich W, et al. CD20+ T cells have a predominantly Tc1 effector memory phenotype and are expanded in the ascites of patients with ovarian cancer. Oncoimmunology. 2015 Mar 19; 4 (4): e999536. eCollection 2015 Apr. doi: 10.1080/2162402X.2014.999536
20. Balkwill F. Cancer and the chemokine network. Nat Rev Cancer. 2004 Jul; 4 (7): 540–50. doi: 10.1038/nrc1388
21. Бережная Н. М., Чехун В. Ф. Иммунология злокачественного роста. К.: Наукова Думка; 2005. 792 с.
22. Fidler IJ. The organ microenvironvent and cancer metastasis. Differentiation. 2002 Dec; 70 (9–10): 498–505.
23. Lewis CE, Pollard JW. Distinct role of macrophages in different tumor microenvirontments. Cancer Res. 2006 Jan 15; 66 (2): 605–12.
24. Ашрафян Л. А., Киселев В. И., Муйжнек Е. Л., Герфанова Е. В., Антонова И. Б., Кузнецов И. Н. и др. Современные принципы эффективной терапии рака яичников. Опухоли женск. репрод. системы. 2015; 11 (2): 68–75.

25. Тюляндин С. А., Деньгина Н. В., Коломиец Л. А., Морхов К. Ю., Нечушкина В. М., Покатаев И. А. и др. Практические рекомендации по лекарственному лечению рака яичников/ первичного рака брюшины/ рака маточных труб. Злокачеств. опухоли. 2016; (4 Спецвып. 2): 123–34.
26. Шмелев В. А., Личиницер М. Р., Абрамов М. Е., Кузнецов В. В., Славина Е. Г., Кадагидзе З. Г. Инновационный противоопухолевый цитокиновый препарат Ингарон. Мед. алфавит. Диагностич. радиол. и онкотер. 2013; (3–4): 60–8.
27. Неродо Г. А., Новикова И. А., Златник Е. Ю., Арджа А. Ю. Применение Ингарона в комплексе с химиотерапией у больных раком яичников III–IV стадий. Фундамент. исслед. 2015; 1–8: 1649–54.
28. Брюзгин В. В., Платинский Л. В. Роль цитокинов в химиотерапии злокачественных опухолей: практика применения цитокиновых препаратов. Рефнот и Ингарон при распространенных опухолевых процессах с множественными метастазами. Совр. онкол. 2014; 16 (1): 70–5.
29. Златник Е. Ю., Неродо Г. А., Новикова И. А., Бахтин А. В., Закора Г. И., Селютина О. Н. и др. Молекулярные и клеточные факторы локального иммунитета в асцитической жидкости при раке яичников. Мол. мед. 2016; 14 (3): 39–42.
30. Pollard JW. Tumor-educated macrophages promote tumor progression and metastasis. Nat Rev Cancer. 2004 Jan; 4 (1): 71–8.
31. Курганова Е. В., Тихонова М. А., Лебедева В. А., Ласкавая Е. Г., Коваленко В. Ф., Останин А. А. и др. Характеристика регуляторных Т-клеток у больных раком яичников. Сибирск. онкол. журн. 2008; 30 (6): 40–5.
32. Ласкавая Е. Г., Лебедева В. А., Наров Ю. И., Тихонова М. А., Курганова Е. В., Останин А. А. и др. Регуляторные $CD4^+$ и $CD8^+$ клетки у больных с доброкачественными и злокачественными образованиями яичников. Сибирск. онкол. журн. 2010; (Прилож. 1): 67–8.
33. Chu T, Tyznik AJ, Roepke S, Berkley AM, Woodward-Davis A, Pattacini L, et al. Bystander-activated memory CD8 T cells control early pathogen load in an innate-like, NKG2D-dependent manner. Cell Rep. 2013 Mar 28; 3 (3): 701–8. doi: 10.1016/j.celrep.2013.02.020
34. Pagès F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molidor R, et al. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. N Engl J Med. 2005 Dec 22; 353 (25): 2654–66.
35. Motz GT, Santoro SP, Wang LP, Garrabrant T, Lastra RR, Hagemann IS, et al. Tumor endothelium FasL establishes a selective immune barrier promoting tolerance in tumors. Nat Med. 2014 Jun; 20 (6): 607–15. doi: 10.1038/nm.3541
36. Неродо Г. А., Златник Е. Ю., Новикова И. А., Бахтин А. В., Закора Г. И., Арджа А. Ю. и др. Показатели клеточного иммунитета при применении ингарона в качестве терапии сопровождения при раке яичников. Рос. иммунол. журн. 2015; 1 (1): 141.
37. Roberts AD, Ely KH, Woodland DL. Differential contributions of central and effector memory T cells to recall responses. J Exp Med. 2005 Jul 4; 202 (1): 123–33.

References

1. Cannon MJ, O'Brien TJ. Cellular immunotherapy for ovarian cancer. Expert Opin Biol Ther. 2009 Jun; 9 (6): 677–88. doi: 10.1517/14712590902932897
2. Golubovskaya V, Wu L. Different Subsets of T Cells, Memory, Effector Functions, and CAR-T Immunotherapy. Cancers (Basel). 2016 Mar 15; 8 (3): pii: E36. doi: 10.3390/cancers8030036
3. Beckhove Ph, Feuerer M, Dolenc M, Schuetz F, Choi C, Sommerfeldt N, et al. Specifically activated memory T cell subsets from cancer patients recognize and reject xenotransplanted autologous tumors. J Clin Invest. 2004 Jul 1; 114 (1): 67–76. doi: 10.1172/JCI200420278
4. Dunbar PR, Smith CL, Chao D, Salio M, Shepherd D, Mirza F, et al. A Shift in the Phenotype of Melan-A-Specific CTL Identifies Melanoma Patients with an Active Tumor-Specific Immune Response. J Immunol. 2000 Dec 1; 165 (11): 6644–52. doi: https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.11.6644
5. Valmori D, Scheibenbogen C, Dutoit V, Nagorsen D, Asemissen AM, Rubio-Godoy V, et al. Circulating Tumor-reactive CD8(+) T cells in melanoma patients contain a CD45RA(+) CCR7(-) effector subset exerting ex vivo tumor-specific cytolytic activity. Cancer Res. 2002 Mar 15; 62 (6): 1743–50.
6. Hadrup S, Donia M, Thor Straten P. Effector CD4 and CD8 T Cells and Their Role in the Tumor Microenvironment. Cancer Microenviron. 2013 Aug; 6 (2): 123–33. doi: 10.1007/s12307-012-0127-6
7. Klebanoff CA, Gattinoni L, Torabi-Parizi P, Kerstann K, Cardones AR, Finkelstein SE, et al. Central memory self/tumor-reactive CD8+ T cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Jul 5; 102 (27): 9571–6.
8. Weninger W, Crowley MA, Manjunath N, von Andrian UH. Migratory properties of naive, effector, and memory CD8 (+) T cells. J Exp Med. 2001 Oct 1; 194 (7): 953–66.
9. Wherry EJ, Teichgräber V, Becker TC, Masopust D, Kaech SM, Antia R, et al. Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. Nat Immunol. 2003 Mar; 4 (3): 225–34.
10. Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. Nature. 1999 Oct 14; 401 (6754): 708–12.
11. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. Annu Rev Immunol. 2004; 22: 745–63.
12. Church SE, Jensen SM, Antony PA, Restifo NP, Fox BA. Tumor-specific CD4+ T cells maintain effector and memory tumor-specific CD8+ T cells. Eur J Immunol. 2014 Jan; 44 (1): 69–79. doi: 10.1002/eji.201343718
13. Perret R, Ronchese F. Memory T cells in cancer immunotherapy: which CD8 T-cell population provides the best protection against tumours? Tissue Antigens. 2008 Sep; 72 (3): 187–94. doi: 10.1111/j.1399-0039.2008.01088.x
14. Shin H, Iwasaki A. Tissue-resident memory T cells. Immunol Rev. 2013 Sep; 255 (1): 165–81. doi: 10.1111/imr.12087
15. Zammit DJ, Turner DL, Klonowski KD, Lefrançois L, Cauley LS. Residual antigen presentation after influenza virus infection affects CD8 T cell activation and migration. Immunity. 2006 Apr; 24 (4): 439–49.
16. Shin H, Iwasaki A. A vaccine strategy that protects against genital herpes by establishing local memory T cells. Nature. 2012 Nov 15; 491 (7424): 463–7. doi: 10.1038/nature11522
17. Mackay LK, Stock AT, Ma JZ, Jones CM, Kent SJ, Mueller SN, et al. Long-lived epithelial immunity by tissue-resident memory T (TRM) cells in the absence of persisting local antigen presentation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 May 1; 109 (18): 7037–42. doi: 10.1073/pnas.1202288109
18. Preston CC, Goode EL, Hartmann LC, Kalli KR, Knutson KL. Immunity and immune suppression in human ovarian cancer. Immunotherapy. 2011 Apr; 3 (4): 539–56. doi: 10.2217/imt.11.20
19. de Bruyn M, Wiersma VR, Wouters MC, Samplonius DF, Klip HG, Helfrich W, et al. CD20+ T cells have a predominantly Tc1 effector memory phenotype and are expanded in the ascites of patients with ovarian cancer. Oncoimmunology. 2015 Mar 19; 4 (4): e999536. eCollection 2015 Apr. doi: 10.1080/2162402X.2014.999536
20. Balkwill F. Cancer and the chemokine network. Nat Rev Cancer. 2004 Jul; 4 (7): 540–50. doi: 10.1038/nrc1388
21. Berezhnaya NM, Chekhun VF. Immunologiya zlokachestvennogo rosta. Kiev: Naukova Dumka; 2005. 792 p. Russian.
22. Fidler IJ. The organ microenvironvent and cancer metastasis. Differentiation. 2002 Dec; 70 (9–10): 498–505.
23. Lewis CE, Pollard JW. Distinct role of macrophages in different

tumor microenvirontments. Cancer Res. 2006 Jan 15; 66 (2): 605–12.
24. Ashrafyan LA, Kiselev VI, Muizhnek EL, Gerfanova EV, Antonova IB, Kuznetsov IN, et al. [Current principles of effective therapy for ovarian cancer.] Opukholi zhenskoy reproduktivnoy sistemy. 2015; 11 (2): 68–75. Russian.
25. Tyulyandin SA, Den'gina NV, Kolomiets LA, Morkhov KYu, Nechushkina VM, Pokataev IA, et al. Prakticheskie rekomendatsii po lekarstvennomu lecheniyu raka yaichnikov/ pervichnogo raka bryushiny/ raka matochnykh trub. Zlokachestvennye opukholi. 2016; (4 Suppl 2): 123–34. Russian.
26. Shmelev VA, Lichinitser MR, Abramov ME, Kuznetsov VV, Slavina EG, Kadagidze ZG. Innovatsionnyy protivoopukholevyy tsitokinovyy preparat Ingaron. Meditsinskiy alfavit. Diagnosticheskaya radiologiya i onkoterapiya. 2013; (3–4): 60–8. Russian.
27. Nerodo GA, Novikova IA, Zlatnik EYu, Ardzha AYu. [Application of Ingaron in combination with chemotherapy in patients with stage III–IV ovarian cancer]. Fundamental'nye issledovaniya. 2015; (1–8): 1649–54. Russian.
28. Bryuzgin VV, Platinskij LV. [The role of cytokines in the chemotherapy of malignant tumors: the practice of cytokines Refnot and Ingaron administration in advanced cancer with multiple metastases]. Sovremennaya onkologiya. 2014; 16 (1): 70–5. Russian.
29. Zlatnik EYu, Nerodo GA, Novikova IA, Bakhtin AV, Zakora GI, Selyutina ON, et al. [Molecular and cellular factors of local immunity in ascitic fluid of ovarian cancer patients]. Molekulyarnaya meditsina. 2016; 14 (3): 39–42. Russian.
30. Pollard JW. Tumor-educated macrophages promote tumor progression and metastasis. Nat Rev Cancer. 2004 Jan; 4 (1): 71–8.
31. Kurganova EV, Tikhonova MA, Lebedeva VA, Laskavaya EG, Kovalenko VF, Ostanin AA, et al. [Regulatory T-cells in ovarian cancer]. Sibirskiy onkologicheskiy zhurnal. 2008; 30 (6): 40–5. Russian.
32. Laskavaya EG, Lebedeva VA, Narov YuI, Tikhonova MA, Kurganova EV, Ostanin AA, et al. Regulyatornye $CD4^+$ i $CD8^+$ kletki u bol'nykh s dobrokachestvennymi i zlokachestvennymi obrazovaniyami yaichnikov. Sibirskiy onkologicheskiy zhurnal. 2010; (Suppl 1): 67–8. Russian.
33. Chu T, Tyznik AJ, Roepke S, Berkley AM, Woodward-Davis A, Pattacini L, et al. Bystander-activated memory CD8 T cells control early pathogen load in an innate-like, NKG2D-dependent manner. Cell Rep. 2013 Mar 28; 3 (3): 701–8. doi: 10.1016/j.celrep.2013.02.020
34. Pagès F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molidor R, et al. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. N Engl J Med. 2005 Dec 22; 353 (25): 2654–66.
35. Motz GT, Santoro SP, Wang LP, Garrabrant T, Lastra RR, Hagemann IS, et al. Tumor endothelium FasL establishes a selective immune barrier promoting tolerance in tumors. Nat Med. 2014 Jun; 20 (6): 607–15. doi: 10.1038/nm.3541
36. Nerodo GA, Zlatnik EYu, Novikova IA, Bakhtin AV, Zakora GI, Ardzha AYu, et al. Pokazateli kletochnogo immuniteta pri primenenii ingarona v kachestve terapii soprovozhdeniya pri rake yaichnikov. Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal. 2015; 1 (1): 141. Russian.
37. Roberts AD, Ely KH, Woodland DL. Differential contributions of central and effector memory T cells to recall responses. J Exp Med. 2005 Jul 4; 202 (1): 123–33.

ИССЛЕДОВАНИЕ ДОЛГОСРОЧНОГО ЭФФЕКТА ВЫСОКИХ ДОЗ ЦИКЛОФОСФАМИДА НА РЕПЕРТУАР Т-КЛЕТОЧНЫХ РЕЦЕПТОРОВ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С АУТОИММУННЫМИ ВАСКУЛИТАМИ

Е. М. Мерзляк[1], С. А. Касацкая[1], А. В. Сосновская[2], М. А. Израельсон[1], Д. Б. Староверов[1], Т. О. Наконечная[1], П. И. Новиков[2], Д. М. Чудаков[1], О. В. Британова[1] ✉

[1] Институт биоорганической химии имени академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

[2] Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва

Механизмы развития аутоиммунных васкулитов и полиангиитов мало изучены, однако известно, что патогенез этих заболеваний в значительной степени опосредуется Т-лимфоцитами. Циклофосфамид (ЦФ) широко используется для лечения аутоиммунных заболеваний. Клетки лимфоидного ряда (Т, В и NK-клетки), и в особенности наивные Т-лимфоциты, обладают высокой чувствительностью к ЦФ. Мы проанализировали репертуары Т-клеточных рецепторов (T-cell receptors, TCRs) периферической крови молодых (24–35 лет, n = 4) и пожилых (52–68 лет, n = 5) пациентов с синдромами Вегенера и Чарга–Стросса, получавших не ранее чем за 3 года до начала исследования ЦФ в высоких дозах. В контрольную группу включили здоровых доноров: 7 молодых и 14 пожилых людей. Мы не выявили описанных ранее вариантов TCRs, характерных для ANCA-ассоциированных васкулитов. Представленность «публичных» (часто встречающихся в популяции, в значительной степени формирующихся в эмбриональном периоде) вариантов TCRs в репертуарах молодых пациентов оказалась существенно ниже, чем в репертуарах здоровых доноров того же возраста, и была близка к таковой пожилых здоровых доноров. Мы предполагаем, что терапия высокими дозами ЦФ элиминирует значительную часть наивных Т-лимфоцитов молодых доноров, содержащих публичные варианты TCR эмбрионального происхождения. Отдаленные последствия таких изменений в структуре Т-клеточного иммунитета требуют дальнейшего изучения.

Ключевые слова: аутоиммунные заболевания, аутоимунный васкулит, циклофосфамид, Т-клеточный рецептор, наивный Т-лимфоцит, высокопроизводительное секвенирование

Финансирование: работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант № 16-15-00149. В исследовании было использовано оборудование Центра коллективного пользования ИБХ РАН, поддержанного Министерством образования и науки России, идентификатор соглашения — RFMEFI62117X0018.

✉ **Для корреспонденции:** Британова Ольга Владимировна
ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10, г. Москва, 117997; olbritan@gmail.com

Статья получена: 04.10.2017 **Статья принята к печати:** 25.10.2017

LONG-TERM EFFECT OF HIGH CYCLOPHOSPHAMIDE DOSES ON THE REPERTOIRE OF T-CELL RECEPTORS OF PERIPHERAL BLOOD T-LYMPHOCYTES IN PATIENTS WITH AUTOIMMUNE VASCULITIS

Merzlyak EM[1], Kasatskaya SA[1], Sosnovskaya AV[2], Israelson MA[1], Staroverov DB[1], Nakonechnaya TO[1], Novikov PI[2], Chudakov DM[1], Britanova OV[1] ✉

[1] Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

[2] I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Although mechanisms underlying development of autoimmune vasculitis and polyangiitis remain understudied, these pathologies are already known to be largely mediated by T-lymphocytes. Cyclophosphamide (CF) is widely used to treat autoimmune diseases. Lymphoid cells in general (T, B, and NK cells) and naive T-lymphocytes in particular are highly sensitive to CF. In this work we analyzed the repertoires of T-cell receptors (TCRs) in the peripheral blood of young (aged 24 to 35 years, n = 4) and elderly (aged 52 to 68 years, n = 5) patients with ANCA-associated vasculitis (Wegener granulomatosis and Churg–Strauss syndrome) treated with high doses of CF > 3 years before the study. The control group included 7 young and 14 elderly healthy individuals. We revealed no TCR variants previously reported as typically found in patients with ANCA-associated vasculitis. Relative frequency of “public" (often found in a population, largely formed during an embryonic period) TCR variants in the repertories of young patients was significantly lower than in the repertories of healthy donors of the same age, and was similar to the elderly healthy donors. We hypothesize that CF-treatment eliminates substantial proportion of naïve T-cells in the young donors, that contains "public" TCR variants of fetal origin. Long-term consequences of such changes in the structure of T-cell immunity require further investigations.

Keywords: autoimmune disease, autoimmune vasculitis, cyclophosphamide, T-cell receptor, naive T-lymphocyte, high-throughput sequencing

Funding: this work was supported by the Russian Science Foundation (Grant No. 16-15-00149). Equipment used in the study was provided by the shared facility of the Institute of Bioorganic Chemistry (the facility is supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation, project ID RFMEFI62117X0018).

✉ **Correspondence should be addressed:** Olga Britanova
ul. Miklukho-Maklaya, d. 16/10, Moscow, Russia, 117997; olbritan@gmail.com

Received: 04.10.2017 **Accepted:** 25.10.2017

Препараты, обладающие иммуносупрессивными свойствами, нашли широкое применение в терапии аутоиммунных заболеваний. Для лечения патологий с потенциально тяжелым течением, таких как аутоиммунные васкулиты, часто применяют цитостатический препарат циклофосфамид (ЦФ), иммуносупрессивные свойства которого не до конца изучены. ЦФ преобразуется в печени в 4-гидроциклофосфамид, который легко проникает в клетки, где подвергается дальнейшим изменениям: формируется либо активное цитотоксическое вещество фосфорамид, либо — при высоком содержании альдегиддегидрогеназы — неактивное соединение карбоксифосфамид. Клетки лимфоидного ряда (Т, В и NK-клетки) содержат небольшое количество альдегиддегидрогеназы и быстро гибнут при терапии высокими дозами ЦФ. Однако недифференцированные клетки, участвующие в гемопоэзе, характеризуются высоким содержанием альдегиддегидрогеназы и оказываются крайне устойчивыми к действию ЦФ. Таким образом, препарат имеет выраженный иммуносупрессивный, но не миелоаблативный эффект, т. к. стволовые клетки крови сохраняются и в дальнейшем происходит восстановление гемопоэза без необходимости трансплантации костного мозга [1]. Клинически подтверждено, что использование ЦФ в высоких дозах приводит к ремиссии у больных с разными типами аутоиммунных заболеваний (острой апластической анемией, миастенией гравис, склеродермией и др.), но только у 10 % больных не наблюдается рецидив в течение 5 лет после курса ЦФ [2].

В литературе существуют указания на специфическое воздействие ЦФ на наивные Т-клетки. Так, в работе Gladstone и соавт. [3] приводятся данные о лечении больных, страдающих рассеянным склерозом, с помощью ЦФ. Авторы показали существенное снижение числа наивных Т-лимфоцитов $CD45RA^{+}CD4^{+}$ по сравнению с популяцией клеток памяти $CD45RO^{+}CD4^{+}$. Практически все пациенты сохранили свой иммунологический статус, в том числе устойчивость к перенесенным в детстве инфекциям, которая поддерживается клетками памяти, что свидетельствует об их меньшей чувствительности к ЦФ.

Развитие технологий высокопроизводительного секвенирования качественно изменило глубину анализа репертуара Т-клеточных рецепторов (T-cell receptors, TCR). Совмещение этого подхода с иммунофенотипированием ранее позволило нам сделать ряд выводов о возрастных изменениях в адаптивной иммунной системе. В частности, на когорте доноров разного возраста, включая образцы пуповинной крови и материал от людей старше 100 лет, нами было продемонстрировано, что выраженное снижение доли наивных Т-лимфоцитов в периферической крови коррелирует с уменьшением разнообразия репертуара TCR, а также был описан ряд структурных изменений в нем [4].

Механизмы, лежащие в основе развития васкулитов, остаются малоизученными. Основным маркером заболевания является наличие антител к цитоплазматическим компонентам нейтрофилов (anti-neutrophil cytoplasmic antibody, ANCA). В случае гранулематоза с полиангиитом (ГПА, гранулематоз Вегенера) показано наличие антител к протеиназе-3 (PR-3), а в случае эозинофильного гранулематоза с полиангиитом (ЭГПА, синдром Чарга–Стросса) и микроскопического полиангиита — антител к миелопероксидазе. Считается, что ANCA участвуют в патогенезе заболеваний, взаимодействуя с антигенной мишенью и приводя к дегрануляции нейтрофилов, в результате чего разрушается эндотелий, а затем и сам сосуд [5]. Т-клетки также принимают активное участие в патогенезе перечисленных патологий. У пациентов, страдающих ими, наблюдается повышение числа циркулирующих в периферической крови активированных $CD4^{+}$ и $CD8^{+}$ Т-лимфоцитов и увеличение содержания воспалительных факторов, связанных с их активацией. Также гранулемы обычно инфильтрированы активированными Т-клетками [6, 7]. На животных моделях было показано снижение скорости клубочковой инфильтрации при деплеции Т-лимфоцитов [8].

Остается открытым вопрос о том, как ЦФ действует на различные функциональные популяции клеток крови и каково его влияние на адаптивную иммунную систему в долгосрочной перспективе. В последние несколько лет были опубликованы работы с использованием новых технологий, которые посвящены роли ЦФ в восстановлении TCR после аллогенной трансплантации клеток крови и костного мозга. Показано, что прием высоких доз ЦФ на 3–4 сутки после трансплантации существенно снижает риск возникновения острой и хронической реакции «трансплантат против хозяина», а также вирусных инфекций в целом и лимфопролиферативных посттрансплантационных заболеваний, связанных с вирусом Эпштейна–Бара, в частности [9]. В исследовании Kanakry и соавт. показано, что первыми восстанавливаются эффекторные клетки памяти и разнообразие их существенно ниже по сравнению с разнообразием аналогичных клеток донора [10].

В данной работе методом высокопроизводительного секвенирования были исследованы репертуары TCR периферической крови 9 доноров, страдающих васкулитами и имевших в анамнезе прием циклофосфамида в высоких дозах. Акцент сделан на сравнение характеристик репертуара бета-цепей TCR пациентов и здоровых доноров и поиск характерных вариантов TCR либо высокопредставленных V-beta и J-beta сегментов TCR, сцепленных с патологией. Проведена оценка долгосрочного эффекта ЦФ, оказываемого на репертуар TCR периферической крови.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Подбор доноров

В рамках исследования сформировали две группы — группу пациентов и группу здоровых доноров (контрольная группа). В каждой группе выделили условные подгруппы молодых (24–35 лет) и пожилых (52–68 лет) людей. В группу молодых пациентов включили 4 человека (3 мужчины и 1 женщина), пожилых — 5 человек (все — женщины), в контрольную группу — 7 (4 мужчины и 3 женщины) и 14 (6 мужчин, 8 женщин) соответственно. Пациенты страдали васкулитами и получали активную иммуносупрессивную терапию циклофосфамидом в высоких дозах не менее чем за 3 года до начала исследования. Когорту здоровых доноров формировали из добровольцев.

Исследование было одобрено локальным этическим комитетом Национального научно-практического центра детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева (Москва) (протокол № 2013-5/4). Все участники дали письменное информированное согласие на участие в исследовании.

Выделение мононуклеаров и иммунофенотипический анализ образцов периферической крови

У участников исследования получали по 8 мл периферической крови, которые использовали для клинического

анализа крови, а также для иммунофенотипирования, которое проводили так, как описано в работе [11]. Брали 100 мкл цельной периферической крови, инкубировали ее с моноклональными антителами: анти-CD45RA-Fitc (eBioscience, Thermo Fisher Scientific, США), CD27-PC5 (eBioscience), CD4-PE (Beckman Coulter, США), CD8-eFluor 405 (eBioscience), — и лизировали раствором Optilyse-C (Beckman Coulter). Образцы анализировали на проточном цитофлюориметре Cytomics CF500 (Beckman Coulter). Также из 6 мл периферической крови методом градиентного центрифугирования на фиколле («ПанЭко», Россия) выделяли мононуклеарную фракцию, которую использовали для дальнейших исследований.

Выделение тотальной РНК, получение библиотек кДНК TCR и их секвенирование

Тотальную РНК выделяли с помощью реагента Trizol (Invitrogen, США) по протоколу производителя. Количество выделенной РНК определяли по интенсивности флуоресценции интеркалирующего агента на QuBit 3 (Invitrogen), качество полученного препарата оценивали методом гель-электрофореза.

Библиотеки кДНК TCR получали так, как описано в работе [11]. Для синтеза кДНК бета-цепи TCR использовали набор реагентов Mint («Евроген», Россия) и 1,5 мкг РНК на одну реакцию синтеза. Реакцию проводили в соответствии с протоколом производителя. В зависимости от количества выделенной РНК число реакций синтеза для образца варьировало от 4 до 6. Структура праймеров для синтеза и свитч-адаптера, а также программа амплификации описаны в статье [11]. В последовательность свитч-адаптера были введены 12 случайных нуклеотидов для уникального баркодирования каждой синтезированной молекулы кДНК. Схема эксперимента приведена на рис. 1.

Полученную кДНК амплифицировали, объединяли, очищали на колонках Cleanup Standard («Евроген») и концентрировали. Концентрацию полученных библиотек определяли на QuBit 3 (Invitrogen), к концам кДНК лигировали адаптеры Illumina TruSeq (Illumina, США). Далее секвенировали библиотеки на платформе Illumina HiSeq 2000 (Illumina), парное чтение 150 + 150 нуклеотидов.

Биоинформатическая обработка и анализ данных секвенирования

Демультипликацию данных секвенирования и сборку групп прочтений по молекулярным баркодам проводили с помощью программы MiGEC [12], как описано в работе [11]. Для экстракции CDR3 и сборки Т-клеточных клонотипов использовали программу MiXCR [13]. Качественный анализ клонотипов (V- и J-usage, пересечение репертуаров разных образцов) и оценку разнообразия образцов проводили с помощью пакета программ VDJtools [14].

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ GraphPad Prism5 (Graph Pad Sofware, США). Анализ публичных клонотипов проводили с помощью алгоритмов R.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Цитометрический анализ Т-клеточных популяций в периферической крови

Содержание наивных Т-лимфоцитов определяли как в популяции $CD3^+$-клеток периферической крови, так и во фракциях $CD4^+$- и $CD8^+$-лимфоцитов пациентов, страдающих васкулитами и прошедших курс терапии ЦФ в высоких дозах. Популяцию наивных $CD3^+$-лимфоцитов выделяли по фенотипу $CD3^+CD45RA^+CD27^+$. Полученные данные были сопоставлены с ранее опубликованными нами для когорты здоровых доноров разного возраста [4, 11]. Значимого различия в содержании наивных Т-лимфоцитов у пациентов и здоровых доноров одного возраста обнаружено не было (рис. 2, А).

Анализ разнообразия TCR методом высокопроизводительного секвенирования

Молекулярное баркодирование библиотек кДНК позволило провести коррекцию нуклеотидных замен, произошедших в ходе амплификации и секвенирования библиотек, а для анализа репертуаров TCR пациентов с васкулитами были получены библиотеки кДНК с помощью специфической затравки синтеза и технологии кэп-свитч [4] (рис. 1). Эта технология позволяет равномерно амплифицировать фрагменты, соответствующие различным Т-клеточным рецепторам, не искажая данные о представленности различных вариабельных генных сегментов. Для подготовки библиотеки каждого образца была использована вся тотальная РНК, выделенная в среднем из 3,5 млн мононуклеаров. Вся полученная кДНК использовалась для дальнейшей амплификации. В результате секвенирования было получено более 30 млн прочтений (ридов), минимальное число ридов, соответствующих последовательностям TCR, для образца составило 1,3 x 10^6, максимальное — 6,5 x 10^6. Анализ данных секвенирования проводили с учетом молекулярных баркодов, введенных на стадии синтеза кДНК библиотек репертуаров TCR (рис. 1). В данном эксперименте учитывали только те молекулы кДНК, молекулярный баркод которых покрывался хотя бы 3 ридами. В результате для каждого образца было получено от 27 000 до 400 000 групп ридов, несущих уникальные

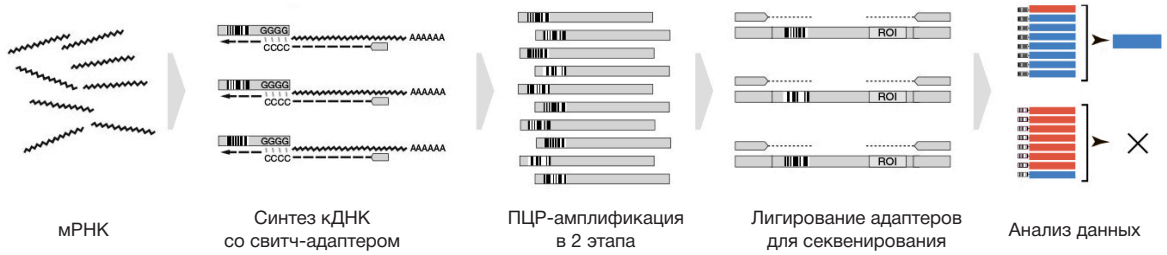


Рис. 1. Схема получения библиотек кДНК Т-клеточных рецепторов (T-cell receptors, TCR). Свитч-адаптер содержит уникальную последовательность, обозначенную на рисунке штрих-кодом. Наличие молекулярного баркода позволяет производить коррекцию ошибок, как в упрощенном виде показано на последнем этапе. Амплифицированный фрагмент содержит последовательность CDR3 бета-цепи TCR, которая определяет разнообразие рецепторов

молекулярные баркоды и соответствующих уникальным молекулам кДНК.

Данные секвенирования были нормированы путем экстракции 25 000 случайных молекул кДНК для каждого образца — по наименьшему результату для одного из пациентов. Иными словами, в дальнейшем при анализе учитывали 25 000 уникальных молекул кДНК бета-цепей TCR для каждого образца. Референтная группа была сформирована из данных секвенирования репертуаров TCR когорты здоровых доноров, которые ранее уже были проанализированы аналогичным методом и опубликованы [11]. Данные референтной группы также были проанализированы с нормировкой на 25 000 случайных молекулярных событий на образец. Наш предыдущий экспериментальный опыт показал, что одно событие может быть эквивалентно в среднем одной Т-клетке [15]. Таким образом, разнообразие Т-клеточного репертуара в данном эксперименте оценивали в среднем для 25 000 случайных Т-лимфоцитов периферической крови.

Анализ разнообразия репертуаров бета-цепей TCR проводили с применением таких статистических метрик, как оценка нижней границы разнообразия (индекс Chao1), индекс равномерности распределения (индекс Шеннона–Винера) и наблюдаемое разнообразие CDR3 на 25 000 Т-лимфоцитов.

Мы не выявили значительных изменений в структуре репертуаров TRCs у пациентов с васкулитами относительно результатов здоровых доноров (рис. 2, Б–Г). Однако можно отметить, что, несмотря на то, что доля наивных Т-клеток в периферической крови больных практически не отличалась от таковой у здоровых людей, значения индекса Chao1, рассчитанные для них, лежат по нижней границе (рис. 2, Б, Д), что свидетельствует в пользу снижения разнообразия репертуаров TCR.

Анализ использования вариабельных сегментов бета-цепей

В клинических данных вовлеченность клонального ответа Т-клеток в патогенез болезни зачастую оценивается без использования высокопроизводительного секвенирования — по спектратипам, т. е. распределениям длин участков CDR3 TCR в целом и TCR с конкретными V-сегментами.

Ранее для гранулематоза с полиангиитом (ГПА) [18] и эозинофильного гранулематоза с полиангиитом (ЭГПА) [17] анализ спектратипов TCR показал участие клонального либо олигоклонального ответа Т-клеток, несущих TCR с определенными вариантами V-сегментов. В более поздней работе методом проточной цитофлуометрии было показано значительное увеличение представленности одного или нескольких V-сегментов TCR в периферической крови пациентов с ЭГПА [23].

Эти данные явились предпосылкой для направленного поиска описанных V-сегментов в репертуарах Т-клеток пациентов с ГПА и ЭГПА. Мы проанализировали частоты встречаемости вариантов сегментов бета-цепи в репертуарах TCR пациентов и здоровых доноров и не выявили характерных паттернов экспрессии V- либо J-сегментов TCR, которые бы объединяли репертуары TCR пациентов или здоровых доноров в отдельные различимые кластеры.

Поиск CDR3, ассоциированных с ГПА и ЭГПА

На следующем этапе анализа мы провели поиск аннотированных в литературе последовательностей CDR3, ассоциированных как с ГПА, так и с ЭГПА [17, 18, 23], в данных секвенирования пациентов, включенных в наше исследование. Анализ проводили в клонсетах без количественной нормировки по каждому индивидууму. В результате нам не удалось обнаружить мотивы CDR3, опубликованные ранее как ассоциированные с ГПА либо ЭГПА.

Оценка содержания «публичных» клонотипов в репертуаре TCR

Исследования иммунных репертуаров методами высокопроизводительного секвенирования позволяют получить индивидуальный список вариантов последовательностей TCR, которые организм может использовать в адаптивном иммунном ответе. Прочтение миллионов вариантов TCR в наших исследованиях и работах других коллективов позволило обнаружить варианты TCR, которые формируются независимо в иммунных репертуарах неродственных доноров — неуникальные, или «публичные» варианты TCR [11, 19, 20]. Формирование одинаковых последовательностей TCR у неродственных доноров в процессе случайной сборки связывают с вероятностными процессами сборки TCR при рекомбинации, а также с формированием оптимальных клонов TCR для иммунного ответа на широко распространенные инфекции и с коэволюцией сборки TCR с персистирующими, передающимися в поколениях инфекциями. У родственных доноров обнаруживается больше общих вариантов TCR, чем «публичных» клонотипов у неродственных доноров, и в целом генетическое окружение когорты доноров может влиять на анализ «публичного» репертуара в каждом исследовании TCR.

В предыдущей нашей работе было показано, что доля «публичных» клонотипов в репертуаре TCR снижается с возрастом [4]. Таким образом, этот параметр может служить маркером старения репертуара TCR. Ранее нами был сформирован список клонотипов бета-цепей TCR человека, которые присутствуют в репертуарах Т-лимфоцитов разных доноров. В качестве источника «публичных» клонотипов были выбраны данные секвенирования репертуаров TCR пуповинной крови, характеризующиеся высоким разнообразием TCR и значительной долей «публичных» вариантов TCR в репертуаре. Мы отобрали клонотипы с совпадающей аминокислотной последовательностью участка CDR3, которые встретились как минимум в 4 из 8 образцов репертуаров TCR нормальной пуповинной крови. Этот список был обогащен вариантами коротких CDR3, которые формируются в процессе VDJ-рекомбинации, преимущественно в эмбриогенезе, с повышенной частотой [16] и вариантами, в которых отсутствуют случайные N-инсерции нуклеотидов на стыке сегментов V–D либо D–J генов TCR в результате упрощенной VDJ-рекомбинации в эмбриональном периоде до начала экспрессии TdT-трансферазы.

«Публичные» клонотипы бета-цепей TCR, возникшие в эмбриональный период, частично совпадают со списком «супер-публичных» вариантов TCR, которые могут быть обнаружены у взрослых здоровых доноров (от 8 до 85 лет, n = 68, «суперпубличные» клоны обнаруживаются как минимум в 20 образцах из 68; данные не опубликованы).

Как и при оценке разнообразия репертуаров TCR, в данном анализе использовались клонсеты, нормированные на 25 000 молекул кДНК. Используя список, содержащий 7 200 «публичных» клонотипов, мы провели сравнительный анализ частоты их встречаемости в клонсетах референтной когорты здоровых доноров и пациентов

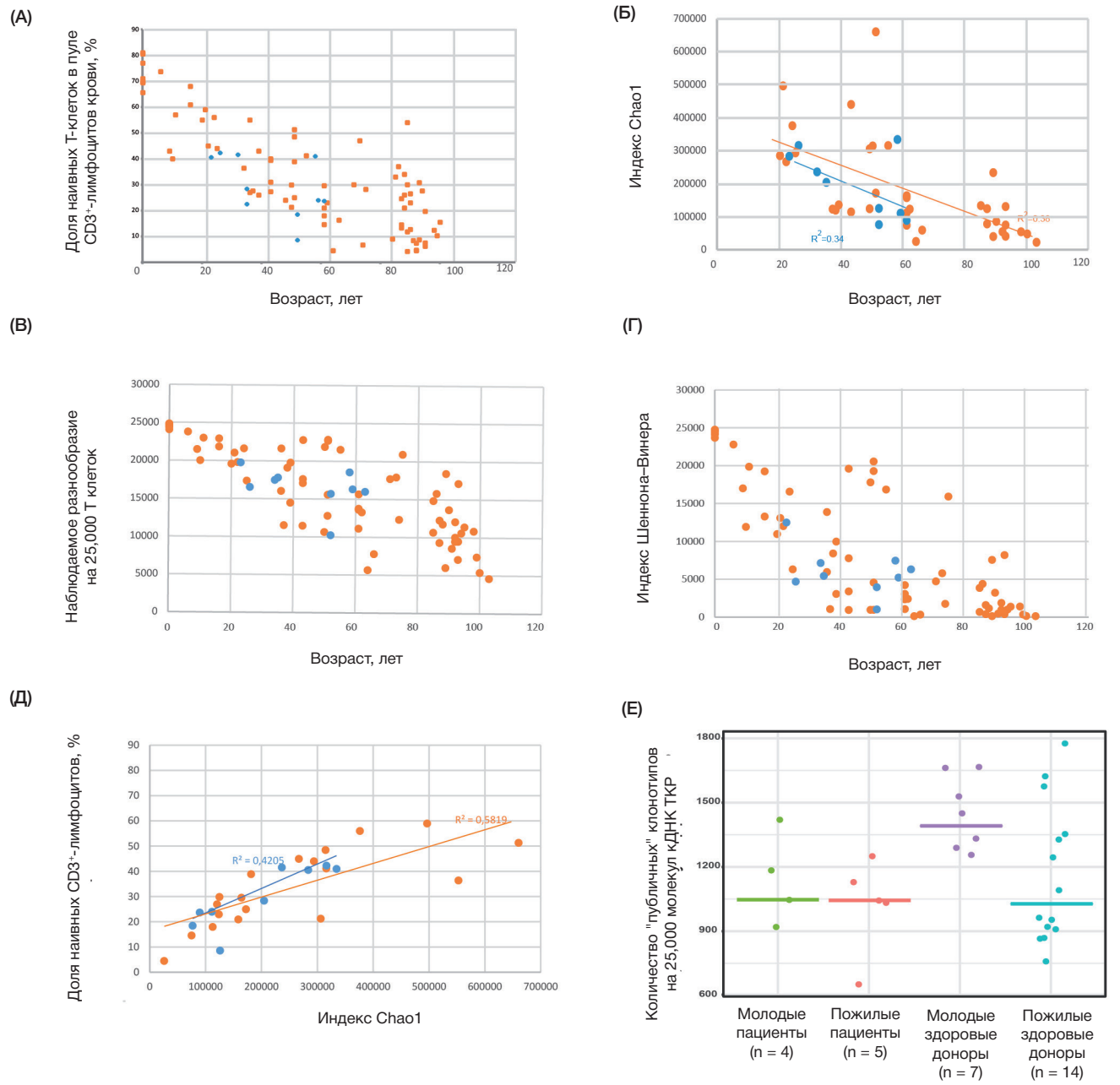


Рис. 2. Доля наивных Т-клеток среди CD3⁺-лимфоцитов периферической крови и разнообразие репертуаров бета-цепей Т-клеточных рецепторов (T-cell receptors, TCR) у пациентов с аутоиммунными васкулитами, получавшими терапию циклофосфамидом в высоких дозах (синие точки), и здоровых людей (оранжевые точки). **(А)** Доля наивных Т-клеток в общем пуле CD3⁺-лимфоцитов. Точки нанесены на график с учетом возраста участников исследования. **(Б)** Разнообразие TCR, оцененное по индексу Chao1. Основной вклад в значение индекса вносят клоны с низкой встречаемостью, т. е. преимущественно TCR наивных Т-лимфоцитов. **(В)** Разнообразие вариантов последовательности CDR3 на 25 000 случайных молекул кДНК бета-цепей TCR. **(Г)** Разнообразие бета-цепей TCR, оцененное по индексу Шеннона–Винера. Важно равномерное распределение клонотипов в репертуаре TCR. **(Д)** Доля наивных Т-клеток в общем пуле CD3⁺-лимфоцитов с учетом значений индекса Chao1. **(Е)** Количество «публичных» клонотипов в клонсетах в зависимости от возраста донора. Для **(Б–Е)** произведены расчеты на 25 000 произвольно выбранных молекул кДНК бета-цепей TCR

с васкулитами, который показал, что у молодых пациентов достоверно ниже число «публичных» клонотипов (p = 0,04, тест Манна–Уитни, рис. 2, Д) в репертуаре TCR по сравнению со здоровыми людьми того же возраста.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Как уже отмечалось, к настоящему времени не было опубликовано работ по глубокому секвенированию репертуаров TCR пациентов с ГПА и ЭГПА. В одной из работ анализ последовательностей Т-клеточных рецепторов с помощью секвенирования по Сэнгеру выявил у пациентов с ЭГПА общий мотив CDR3 среди высокопредставленных клонотипов Vbeta21 семейства TCR [17]. Также есть данные о доминирующем клонотипе Vbeta8 семейства при ГПА [18].

В настоящей работе нами не были обнаружены специфичные клонотипы или специфичные паттерны экспрессии семейств V- и J-сегментов, которые бы выделяли группу доноров, страдающих ГПА или ЭГПА, по сравнению со здоровыми донорами такого же возраста. Возможно, исследование на значительно большей выборке пациентов позволит установить Т-клеточные клоны, ассоциированные с болезнью. Так, в недавних исследованиях на выборке из

191 донора, страдающего анкилозирующим спондилитом, и 227 здоровых донорах удалось установить консенсусный мотив CDR3 Т-клонов, участвующих в патогенезе этого аутоиммунного заболевания [21]. Также анализ репертуаров TCR, полученных не из периферической крови, а из лимфоцитов, мигрирующих в места воспаления, в совокупности с новыми алгоритмами подсчета вероятности сборки той или иной последовательности CDR3 может привести к успешному решению проблемы идентификации аутоиммунных клонов [22].

Анализ разнообразия репертуаров TCR пациентов с васкулитами показал отсутствие значимых изменений в степени клональности и наблюдаемом разнообразии CDR3 по сравнению с референтной группой. Незначительное изменение в соотношении доли наивных Т-лимфоцитов и индекса границы нижнего разнообразия репертуара может указывать на незначительную клональную экспансию наивных Т-клеток на периферии, которые количественно восстановились до нормального уровня после лечения ЦФ.

Мы показали, что у молодых пациентов достоверно ниже число «публичных» клонотипов по сравнению со здоровыми донорами того же возраста. Такое изменение структуры репертуара TCR молодых пациентов после терапии ЦФ в высоких дозах может являться признаком преждевременного старения Т-клеточного адаптивного иммунитета. Можно утверждать, что заложенный в эмбриональный период набор «публичных» вариантов TCR наивных Т-лимфоцитов существенным образом элиминируется в результате терапии высокими дозами ЦФ. Дальнейшие исследования необходимы для того, чтобы показать, насколько существенны возможные отдаленные последствия таких изменений в структуре Т-клеточного иммунитета.

ВЫВОДЫ

В результате анализа репертуаров Т-клеточных рецепторов, полученных методом глубокого секвенирования, было установлено, что репертуары TCR после лечения циклофосфамидом в высоких дозах восстанавливаются в значительной степени. Вместе с тем количество «публичных» клонотипов у пациентов с аутоиммунными васкулитами снижено по сравнению со здоровыми донорами того же возраста, что свидетельствует о преждевременном старении репертуаров TCR.

В данной работе не было обнаружено клональных изменений TCR, сцепленных с аутоиммуными васкулитами. В полученных массивах данных у пациентов не были найдены аннотированные ранее в литературе Т-клеточные клонотипы.

Литература

1. Brodsky RA. High dose cyclophosphamide treatment for autoimmune disorders. ScientificWorldJournal. 2002 Jun 28; 2: 1808–15. DOI: 10.1100/tsw.2002.863.
2. DeZern AE, Styler MJ, Drachman DB, Hummers LK, Jones RJ, Brodsky RA Repeated treatment with high dose cyclophosphamide for severe autoimmune diseases. Am J Blood Res. 2013; 3 (1): 84–90.
3. Gladstone DE, Golightly MG, Brannagan TH 3rd. High dose cyclophosphamide preferentially targets naïve T (CD45/CD4/RA+) cells in CIDP and MS patients. J Neuroimmunol. 2007 Oct; 190 (1–2): 121–6. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2007.07.005.
4. Britanova OV, Shugay M, Merzlyak EM, Staroverov DB, Putintseva EV, Turchaninova MA et al. Dynamics of Individual T Cell Repertoires: From Cord Blood to Centenarians. J Immunol. 2016 Jun 15; 196 (12): 5005–13. DOI: 10.4049/jimmunol.1600005.
5. Wilde B, Thewissen M, Damoiseaux J, van Paassen P, Witzke O, Tervaert JWC. T cells in ANCA-associated vasculitis: what can we learn from lesional versus circulating T cells? Arthritis Res Ther. 2010; 12 (1): 204. DOI: 10.1186/ar2923.
6. McKinney EF, Willcocks LC, Broecker V, Smith KGC. The immunopathology of ANCA-associated vasculitis. Semin Immunopathol. 2014 Jul; 36 (4): 461–78. DOI: 10.1007/s00281-014-0436-6.
7. Giscombe R, Wang XB, Kakoulidou M, Lefvert AK. Characterization of the expanded T-cell populations in patients with Wegener's granulomatosis. J Intern Med. 2006 Sep; 260 (3): 224–30. DOI: 10.1111/j.1365-2796.2006.01688.x.
8. Ruth AJ, Kitching AR, Kwan RY, Odobasic D, Ooi JD, Timoshanko J et al. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies and effector CD4+ cells play nonredundant roles in anti-myeloperoxidase crescentic glomerulonephritis. J Am Soc Nephrol. 2006 Jul; 17 (7): 1940–9. DOI: 10.1681/ASN.2006020108.
9. Kanakry CG, Ganguly S, Zahurak M, Bolaños-Meade J, Thoburn C, Perkins B et al. Aldehyde dehydrogenase expression drives human regulatory T cell resistance to posttransplantation cyclophosphamide. Sci Transl Med. 2013 Nov 13; 5 (211): 211ra157. DOI: 10.1126/scitranslmed.3006960.
10. Kanakry CG, Coffey DG, Towlerton AM, Vulic A, Storer BE, Chou J et al. Origin and evolution of the T cell repertoire after posttransplantation cyclophosphamide. JCI Insight. 2016; 1 (5): e86252. DOI: 10.1172/jci.insight.86252.
11. Britanova OV, Putintseva EV, Shugay M, Merzlyak EM, Turchaninova MA, Staroverov DB et al. Age-related decrease in TCR repertoire diversity measured with deep and normalized sequence profiling. J Immunol. 2014 Mar 15; 192 (6): 2689–98. PubMed PMID:24510963 doi: 10.4049/jimmunol.1302064.
12. Shugay M, Britanova OV, Merzlyak EM, Turchaninova MA, Mamedov IZ, Tuganbaev TR et al. Towards error-free profiling of immune repertoires. Nat Methods. 2014 Jun; 11 (6): 653–5. DOI: 10.1038/nmeth.2960.
13. Shugay M, Bagaev DV, Turchaninova MA, Bolotin DA, Britanova OV, Putintseva EV et al. VD Jtools: Unifying Post-analysis of T Cell Receptor Repertoires. PLoS Comput Biol. 2015 Nov 25; 11 (11): e1004503. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1004503.
14. Bolotin DA, Poslavsky S, Mitrophanov I, Shugay M, Mamedov I, Putintseva E et al. MiXCR: software for comprehensive adaptive immunity profiling. Nat Methods. 2015 May; 12 (5): 380–1. DOI: 10.1038/nmeth.3364.
15. Egorov ES, Merzlyak EM, Shelenkov AA, Britanova OV, Sharonov GV, Staroverov DB et al. Quantitative profiling of immune repertoires for minor lymphocyte counts using unique molecular identifiers. J Immunol. 2015; 194 (12): 6155–63. DOI: 10.4049/jimmunol.1500215.
16. Pogorelyy MV, Elhanati Y, Marcou Q, Sycheva AL, Komech EA, Nazarov VI et al. Persisting fetal clonotypes influence the structure and overlap of adult human T cell receptor repertoires. PLoS Comput Biol. 2017 Jul 6; 13 (7): e1005572. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1005572.
17. Grunewald J, Halapi E, Wahlström J, Giscombe R, Nityanand S, Sanjeevi C et al. T-cell expansions with conserved T-cell receptor beta chain motifs in the peripheral blood of HLA-DRB1*0401 positive patients with necrotizing vasculitis. Blood. 1998; 92 (10): 3737–44.
18. Müschen M, Warskulat U, Perniok A, Even J, Moers C, Kismet B et al. Involvement of Soluble CD95 in Churg-Strauss Syndrome. Am J Pathol. 1999 Sep; 155 (3): 915–25. DOI: 10.1016/S0002-9440(1)65191-7.
19. Link CS, Eugster A, Heidenreich F, Rücker-Braun E,

Schmiedgen M, Oelschlägel U et al. Abundant cytomegalovirus (CMV) reactive clonotypes in the CD8+ T cell receptor alpha repertoire following allogeneic transplantation. Clin Exp Immunol. 2016 Jun; 184 (3): 389–402. DOI: 10.1111/cei.12770.
20. Ruggiero E, Nicolay JP, Fronza R, Arens A, Paruzynski A, Nowrouzi A et al. High-resolution analysis of the human T-cell receptor repertoire. Nat Commun. 2015 Sep 1; 6: 8081. DOI: 10.1038/ncomms9081.
21. Faham M, Carlton V, Moorhead M, Zheng J, Klinger M, Pepin F et al. Discovery of T Cell Receptor β Motifs Specific to HLA-B27-Positive Ankylosing Spondylitis by Deep Repertoire Sequence Analysis. Arthritis Rheumatol. 2017 Apr; 69 (4): 774–84. DOI: 10.1002/art.40028.
22. Komech E, Zvyagin I, Shmidt E, Klimenko A, Shostak N, Mamedov I, Lebedev Y. Shared T-cell clones are found in synovial fluid of patients with ankylosing spondylitis. In: Abstract book of 12th EJI-EFIS Tatra Immunology Conference; 2016 Sep 3–7; Strbske Pleso, Slovakia. p. 39.
23. Guida G, Vallario A, Stella S, Boita M, Circosta P, Mariani S et al. Clonal CD8+ TCR-Vbeta expanded populations with effector memory phenotype in Churg Strauss syndrome. Clin Immunol. 2008 Jul; 128 (1): 94–102. DOI: 10.1016/j.clim.2008.03.505.

References

1. Brodsky RA. High dose cyclophosphamide treatment for autoimmune disorders. ScientificWorldJournal. 2002 Jun 28; 2: 1808–15. DOI: 10.1100/tsw.2002.863.
2. DeZern AE, Styler MJ, Drachman DB, Hummers LK, Jones RJ, Brodsky RA Repeated treatment with high dose cyclophosphamide for severe autoimmune diseases. Am J Blood Res. 2013; 3 (1): 84–90.
3. Gladstone DE, Golightly MG, Brannagan TH 3rd. High dose cyclophosphamide preferentially targets naïve T (CD45/CD4/RA+) cells in CIDP and MS patients. J Neuroimmunol. 2007 Oct; 190 (1–2): 121–6. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2007.07.005.
4. Britanova OV, Shugay M, Merzlyak EM, Staroverov DB, Putintseva EV, Turchaninova MA et al. Dynamics of Individual T Cell Repertoires: From Cord Blood to Centenarians. J Immunol. 2016 Jun 15; 196 (12): 5005–13. DOI: 10.4049/jimmunol.1600005.
5. Wilde B, Thewissen M, Damoiseaux J, van Paassen P, Witzke O, Tervaert JWC. T cells in ANCA-associated vasculitis: what can we learn from lesional versus circulating T cells? Arthritis Res Ther. 2010; 12 (1): 204. DOI: 10.1186/ar2923.
6. McKinney EF, Willcocks LC, Broecker V, Smith KGC. The immunopathology of ANCA-associated vasculitis. Semin Immunopathol. 2014 Jul; 36 (4): 461–78. DOI: 10.1007/s00281-014-0436-6.
7. Giscombe R, Wang XB, Kakoulidou M, Lefvert AK. Characterization of the expanded T-cell populations in patients with Wegener's granulomatosis. J Intern Med. 2006 Sep; 260 (3): 224–30. DOI: 10.1111/j.1365-2796.2006.01688.x.
8. Ruth AJ, Kitching AR, Kwan RY, Odobasic D, Ooi JD, Timoshanko J et al. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies and effector CD4+ cells play nonredundant roles in anti-myeloperoxidase crescentic glomerulonephritis. J Am Soc Nephrol. 2006 Jul; 17 (7): 1940–9. DOI: 10.1681/ASN.2006020108.
9. Kanakry CG, Ganguly S, Zahurak M, Bolaños-Meade J, Thoburn C, Perkins B et al. Aldehyde dehydrogenase expression drives human regulatory T cell resistance to posttransplantation cyclophosphamide. Sci Transl Med. 2013 Nov 13; 5 (211): 211ra157. DOI: 10.1126/scitranslmed.3006960.
10. Kanakry CG, Coffey DG, Towlerton AM, Vulic A, Storer BE, Chou J et al. Origin and evolution of the T cell repertoire after posttransplantation cyclophosphamide. JCI Insight. 2016; 1 (5): e86252. DOI: 10.1172/jci.insight.86252.
11. Britanova OV, Putintseva EV, Shugay M, Merzlyak EM, Turchaninova MA, Staroverov DB et al. Age-related decrease in TCR repertoire diversity measured with deep and normalized sequence profiling. J Immunol. 2014 Mar 15; 192 (6): 2689–98. PubMed PMID:24510963 doi: 10.4049/jimmunol.1302064.
12. Shugay M, Britanova OV, Merzlyak EM, Turchaninova MA, Mamedov IZ, Tuganbaev TR et al. Towards error-free profiling of immune repertoires. Nat Methods. 2014 Jun; 11 (6): 653–5. DOI: 10.1038/nmeth.2960.
13. Shugay M, Bagaev DV, Turchaninova MA, Bolotin DA, Britanova OV, Putintseva EV et al. VD Jtools: Unifying Post-analysis of T Cell Receptor Repertoires. PLoS Comput Biol. 2015 Nov 25; 11 (11): e1004503. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1004503.
14. Bolotin DA, Poslavsky S, Mitrophanov I, Shugay M, Mamedov I, Putintseva E et al. MiXCR: software for comprehensive adaptive immunity profiling. Nat Methods. 2015 May; 12 (5): 380–1. DOI: 10.1038/nmeth.3364.
15. Egorov ES, Merzlyak EM, Shelenkov AA, Britanova OV, Sharonov GV, Staroverov DB et al. Quantitative profiling of immune repertoires for minor lymphocyte counts using unique molecular identifiers. J Immunol. 2015; 194 (12): 6155–63. DOI: 10.4049/jimmunol.1500215.
16. Pogorelyy MV, Elhanati Y, Marcou Q, Sycheva AL, Komech EA, Nazarov VI et al. Persisting fetal clonotypes influence the structure and overlap of adult human T cell receptor repertoires. PLoS Comput Biol. 2017 Jul 6; 13 (7): e1005572. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1005572.
17. Grunewald J, Halapi E, Wahlström J, Giscombe R, Nityanand S, Sanjeevi C et al. T-cell expansions with conserved T-cell receptor beta chain motifs in the peripheral blood of HLA-DRB1*0401 positive patients with necrotizing vasculitis. Blood. 1998; 92 (10): 3737–44.
18. Müschen M, Warskulat U, Perniok A, Even J, Moers C, Kismet B et al. Involvement of Soluble CD95 in Churg-Strauss Syndrome. Am J Pathol. 1999 Sep; 155 (3): 915–25. DOI: 10.1016/S0002-9440(1)65191-7.
19. Link CS, Eugster A, Heidenreich F, Rücker-Braun E, Schmiedgen M, Oelschlägel U et al. Abundant cytomegalovirus (CMV) reactive clonotypes in the CD8+ T cell receptor alpha repertoire following allogeneic transplantation. Clin Exp Immunol. 2016 Jun; 184 (3): 389–402. DOI: 10.1111/cei.12770.
20. Ruggiero E, Nicolay JP, Fronza R, Arens A, Paruzynski A, Nowrouzi A et al. High-resolution analysis of the human T-cell receptor repertoire. Nat Commun. 2015 Sep 1; 6: 8081. DOI: 10.1038/ncomms9081.
21. Faham M, Carlton V, Moorhead M, Zheng J, Klinger M, Pepin F et al. Discovery of T Cell Receptor β Motifs Specific to HLA-B27-Positive Ankylosing Spondylitis by Deep Repertoire Sequence Analysis. Arthritis Rheumatol. 2017 Apr; 69 (4): 774–84. DOI: 10.1002/art.40028.
22. Komech E, Zvyagin I, Shmidt E, Klimenko A, Shostak N, Mamedov I, Lebedev Y. Shared T-cell clones are found in synovial fluid of patients with ankylosing spondylitis. In: Abstract book of 12th EJI-EFIS Tatra Immunology Conference; 2016 Sep 3–7; Strbske Pleso, Slovakia. p. 39.
23. Guida G, Vallario A, Stella S, Boita M, Circosta P, Mariani S et al. Clonal CD8+ TCR-Vbeta expanded populations with effector memory phenotype in Churg Strauss syndrome. Clin Immunol. 2008 Jul; 128 (1): 94–102. DOI: 10.1016/j.clim.2008.03.505.

ОЦЕНКА ЧИСЛА ВИЧ-СПЕЦИФИЧНЫХ Т-ЛИМФОЦИТОВ У ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ ПО ДАННЫМ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ РЕПЕРТУАРОВ Т-КЛЕТОЧНЫХ РЕЦЕПТОРОВ

А. В. Елисеев, А. Д. Федорова, М. Ю. Лебедин, Д. М. Чудаков, М. А. Шугай ✉

Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

Детальное изучение механизмов формирования иммунного ответа против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) необходимо для лучшего понимания процессов развития иммунодефицита у пациентов с ВИЧ-инфекцией, разработки эффективных методов ее иммунотерапии и новых вакцин против вируса. В исследовании нами были проанализированы данные ранее полученных результатов секвенирования репертуаров Т-клеточных рецепторов для большого числа здоровых индивидуумов (601 донор из американской популяции и 65 доноров из российской популяции) с целью определения частоты наивных Т-лимфоцитов, обладающих специфичностью к ВИЧ, в популяции. Мы обнаружили, что на уровне популяции имеет место значительная вариабельность между различным эпитопами ВИЧ в частотах специфичных Т-клеток (F-statistic = 2007, $p < 10^{-100}$, ANOVA). Несмотря на то, что частота Т-лимфоцитов, специфичных к одному и тому же эпитопу, была достаточно стабильной между индивидуумами, мы обнаружили, что она значительно зависит от таких факторов, как наличие у человека определенных аллелей HLA ($p < 0,01$, пост-хок тест Тьюки), наличие цитомегаловирусной инфекции ($F = 61$, $p = 7 \times 10^{-15}$, ANOVA), а также возраст (коэффициент корреляции Пирсона в диапазоне от –0,53 до –0,14 для разных групп).

Ключевые слова: ВИЧ, Т-клеточный рецептор, HLA, CMV, высокопроизводительное секвенирование

Финансирование: работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант № 17-15-01495.

✉ **Для корреспонденции:** Шугай Михаил Александрович
ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10, Москва, 117997; mikhail.shugay@gmail.com

Статья получена: 23.10.2017 **Статья принята к печати:** 28.10.2017

ESTIMATING THE NUMBER OF HIV-SPECIFIC T-CELLS IN HEALTHY DONORS USING HIGH-THROUGHPUT SEQUENCING PROFILES OF T-CELL RECEPTOR REPERTOIRES

Eliseev AV, Fedorova AD, Lebedin MY, Chudakov DM, Shugay M ✉

Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

In-depth study of mechanisms of immune response to the human immunodeficiency virus (HIV) is critical for better understanding of how immunodeficiency develops in patients with HIV, as well as for designing effective immunotherapy strategies and vaccines against the virus. In this work we analyze sequencing profiles of T-cell receptor repertoires previously obtained from healthy donors (601 Americans and 65 Russians) to estimate the population frequency of HIV-specific naive T-cells. We demonstrate that frequencies of T-cells recognizing different HIV epitopes vary considerably across the population (F-statistic = 2007, $p < 10^{-100}$, ANOVA). Although the frequency of T-lymphocytes recognizing a particular epitope does not change significantly between the individuals, it still largely depends on the presence of certain HLA alleles ($p < 0.01$, post-hoc Tukey's test), cytomegalovirus infection ($F = 61$, $p = 7 \times 10^{-15}$, ANOVA), and age (Pearson correlation coefficient ranging from –0.53 to –0.14 in different groups).

Keywords: HIV, T-cell receptor, HLA, CMV, high-throughput sequencing

Funding: this work was supported by the Russian Science Foundation (Grant No. 17-15-01495).

✉ **Correspondence should be addressed:** Mikhail Shugay
ul. Miklukho-Maklaya, d. 16/10, Moscow, Russia, 117997; mikhail.shugay@gmail.com

Received: 23.10.2017 **Accepted:** 28.10.2017

Высокая мутабильность вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) позволяет ему легко уходить от распознавания иммунной системой [1]. Тем не менее присутствие большого числа иммуногенных эпитопов ВИЧ [2] и протективных аллелей HLA (human leucocyte antigen) [3], а также феномен элитных контроллеров [4] указывают на потенциальную возможность иммунотерапии ВИЧ-инфекции. Хотя разработка протективной вакцины против ВИЧ до сих пор не увенчалась успехом, полученные данные показывают, что Т-клеточная терапия по своему терапевтическому потенциалу близка к антиретровирусной терапии [5].

В данной работе мы исходим из концепции, согласно которой эффективный иммунный ответ индивида против ранее не встречавшегося патогена определяется наличием и количеством специфичных Т-клеток в пуле наивных Т-лимфоцитов [6]. Понимание того, какие эпитопы ВИЧ при определенном наборе аллелей HLA донора наиболее благоприятны для распознавания вируса иммунной

системой, позволит в конечном итоге определить механизмы иммунной протекции против ВИЧ и продвинуться в разработке эффективных вакцин против него.

Способность Т-лимфоцитов распознавать чужеродные антигены закодирована в генах альфа- и бета-цепей Т-клеточного рецептора (T-cell receptor, TCR), обладающих невероятным разнообразием: число уникальных последовательностей (вариантов) только для бета-цепи одного человека может превышать 10^9, а полное число исходно генерируемых тимусом вариантов TCR в человеческой популяции практически не ограничено [7]. Стремительно развивающиеся технологии массированного секвенирования иммунных репертуаров (RepSeq) позволяют одновременно считывать миллионы последовательностей TCR в выбранном образце, например в пробе мононуклеарных клеток периферической крови [8]. Существующие методы сортировки Т-клеток, специфичных к выбранным антигенам, в первую очередь с использованием окрашивания Т-клеток MHC-мультиметрами [9], позволяют накапливать знания об антиген-специфичных TCR. Это открывает возможности для применения RepSeq с целью функционального анализа индивидуальных репертуаров TCR. Так, постоянно пополняемая база данных последовательностей TCR с известной специфичностью (VDJdb, [10]) уже сегодня может быть использована для *in silico* аннотации и оценки числа эпитоп-специфичных Т-клеток в данных RepSeq.

Следует отметить, что практически невозможно точно подсчитать численность антиген-специфичных Т-клеток среди наивных Т-лимфоцитов стандартными методами, такими как проточная цитометрия: ввиду малого размера популяции (зачастую — менее 1 % [11]), специфичной к одному эпитопу, требуется обогащение, которое может потенциально исказить результаты [12]. В то же время технология RepSeq позволяет уверенно фиксировать Т-клетки с частотой порядка 0,001 % [13].

Имея в распоряжении большие данные, содержащие последовательности TCR 65 доноров из российской и 601 донора из американской популяций, а также набор из 1 688 TCR, для которых показано распознавание эпитопов ВИЧ (см. раздел «Материалы и методы»), мы можем

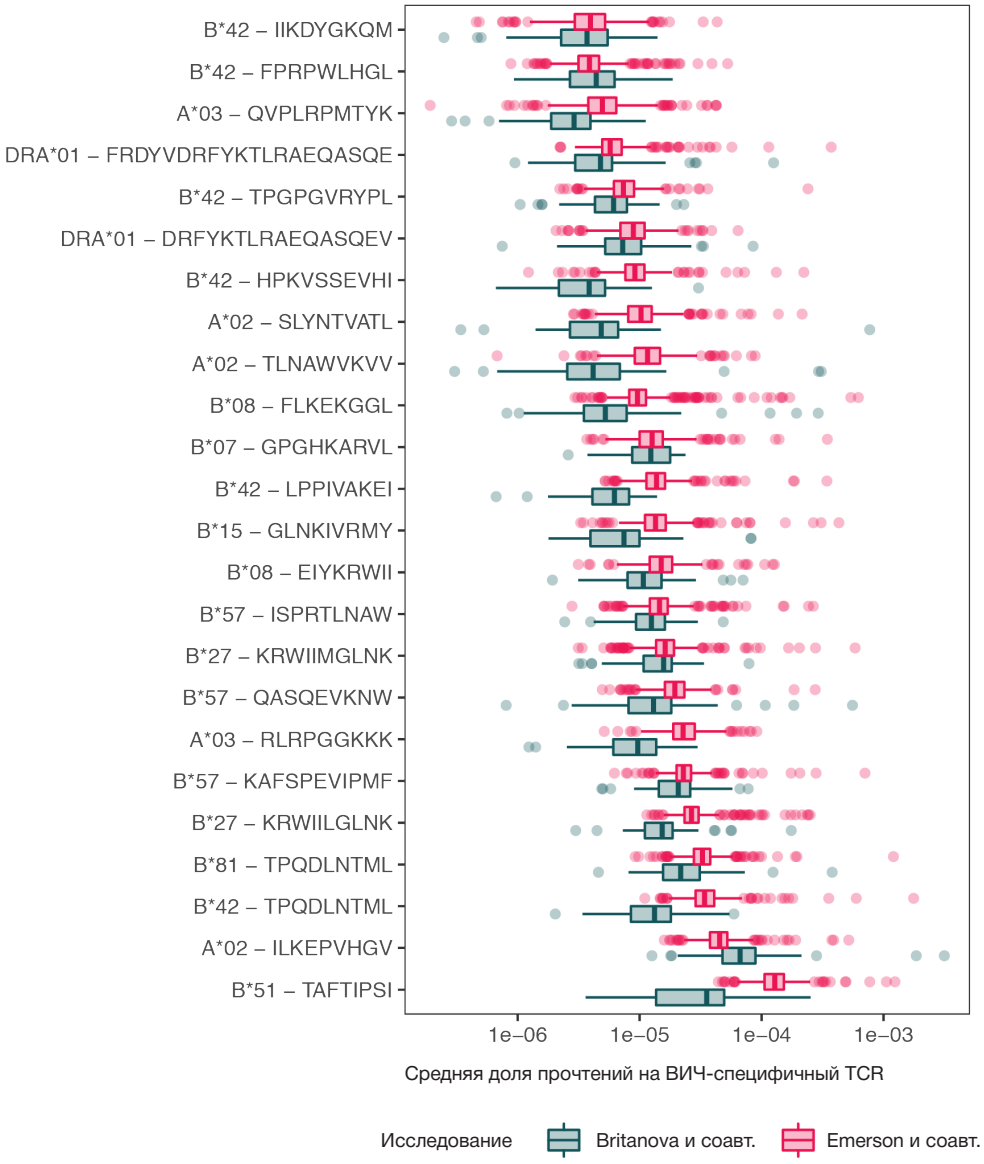


Рис. 1. Сравнение средней представленности Т-клеточных рецепторов (T-cell receptors, TCR), специфичных к определенным эпитопам ВИЧ, для Т-клеточных репертуаров из работ Emerson и соавт. [14] и Britanova и соавт. [15]. По оси X отложено распределение среднего размера клонотипа специфичной Т-клетки (фракции от всех прочтений бета-цепи TCR) в образцах из работ [14] (n = 65) и [15] (n = 601). По оси Y отложены эпитопы, для которых известны последовательности специфичных TCR (по данным VDJdb); формат записи — «аллель HLA : последовательность эпитопа»

изучить частоту ВИЧ-специфичных Т-клеток в популяции. В данной работе мы используем обозначенные данные для проверки следующих гипотез:

1) эпитопы ВИЧ значительно различаются по частоте специфичных Т-клеток в репертуарах TCR здоровых доноров;

2) наличие у донора цитомегаловирусной (cytomegalovirus, CMV) инфекции влияет на количество ВИЧ-специфичных Т-клеток;

3) число ВИЧ-специфичных Т-клеток зависит от присутствия у донора определенных аллелей HLA;

4) число ВИЧ-специфичных Т-клеток зависит от возраста и пола донора.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали данные секвенирования бета-цепи TCR из работ Emerson и соавт. [14] и Britanova и соавт. [15]. Из работы Emerson и соавт. взяли только репертуары TCR доноров, для которых был определен гаплотип HLA и был известен CMV-статус — всего 601 образец. Из данных Britanova и соавт. исключили образцы пуповинной крови, в рассмотрение были взяты 65 образцов от взрослых здоровых доноров. Предобработку и картирование последовательностей TCR для данных из [15] провели с помощью инструментов MIGEC [16] и MiTCR [17]. Для данных из [14] провели дополнительное картирование, уточнение V- и J-генов, а также выполнили коррекцию ошибок секвенирования в последовательностях TCR с использованием инструмента MiXCR [18]. Данные были очищены от нефункциональных, содержащих стоп-кодон или сдвиг рамки считывания, последовательностей с использованием инструмента VDJtools [19].

Аннотация данных, т. е. предсказание TCR, специфичных к ВИЧ, проводилась с использованием инструмента VDJtools/VDJdb-standalone [10]. Из VDJdb выбрали TCR, специфичные к эпитопам ВИЧ, причем рассматривали только те эпитопы, которые представлены в базе данных более чем 10 вариантами TCR. TCR из данных RepSeq считали специфичным к определенному эпитопу ВИЧ, если аминокислотная последовательность его гипервариабельного региона CDR3 отличалась не более чем на одну замену от соответствующего варианта TCR в базе данных VDJdb. Подобный метод позволяет значительно увеличить число аннотированных TCR при небольшой доле ошибочных аннотаций, как показано в [10].

Статистический анализ результатов проводили с использованием языка программирования R. В работе применили статистические тесты ANOVA, пост-хок тест Тьюки, а также корреляционный анализ. В разделе «Результаты исследования» для каждого теста приведены значения

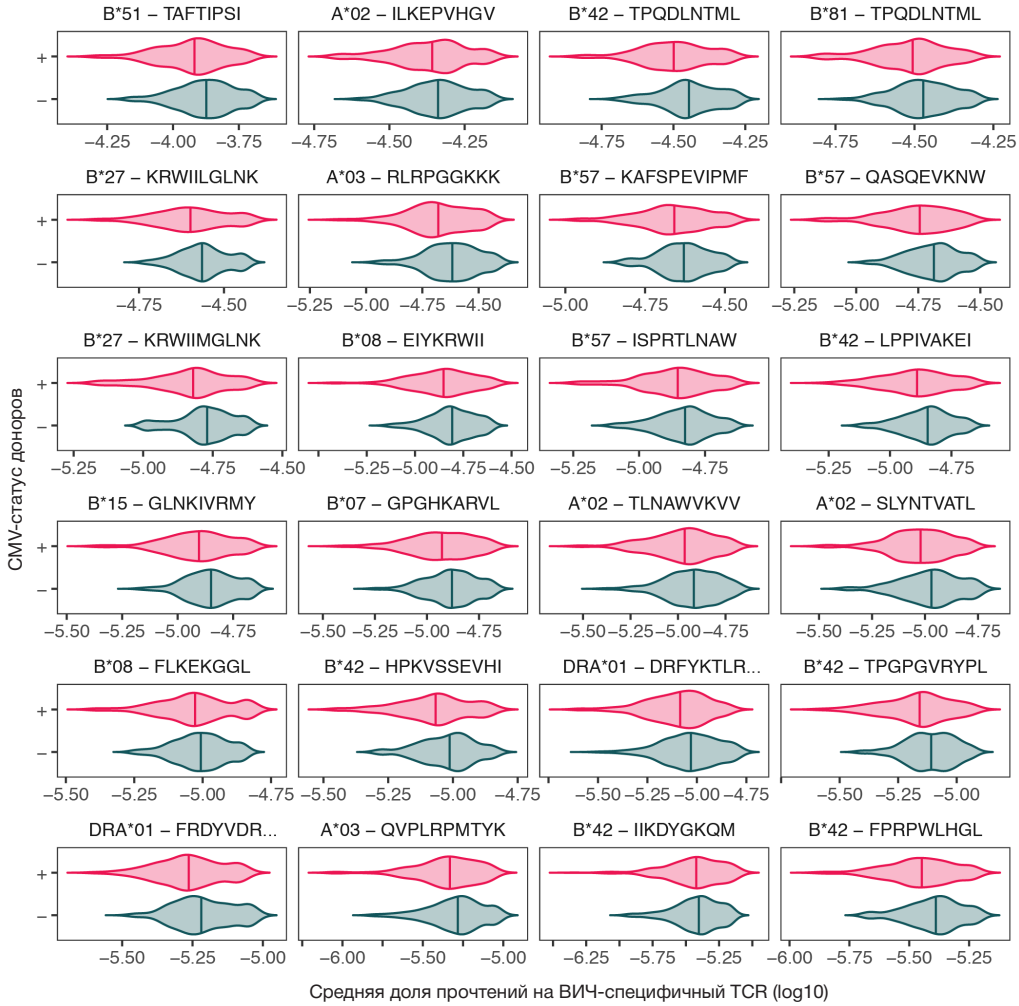


Рис. 2. Представленность ВИЧ-специфичных TCR в образцах от доноров с известным статусом по цитомегаловирусу. Результаты сравнительного анализа между CMV-положительными (+) и CMV-отрицательными донорами (–) приведены отдельно для каждого эпитопа. По оси X отложен десятичный логарифм среднего размера клонотипа специфичной Т-клетки (фракция от всех прочтений бета-цепи TCR). Данные винсоризованы для лучшей визуализации: показаны только образцы со значениями, лежащими между 5 % и 95 % процентилями распределения

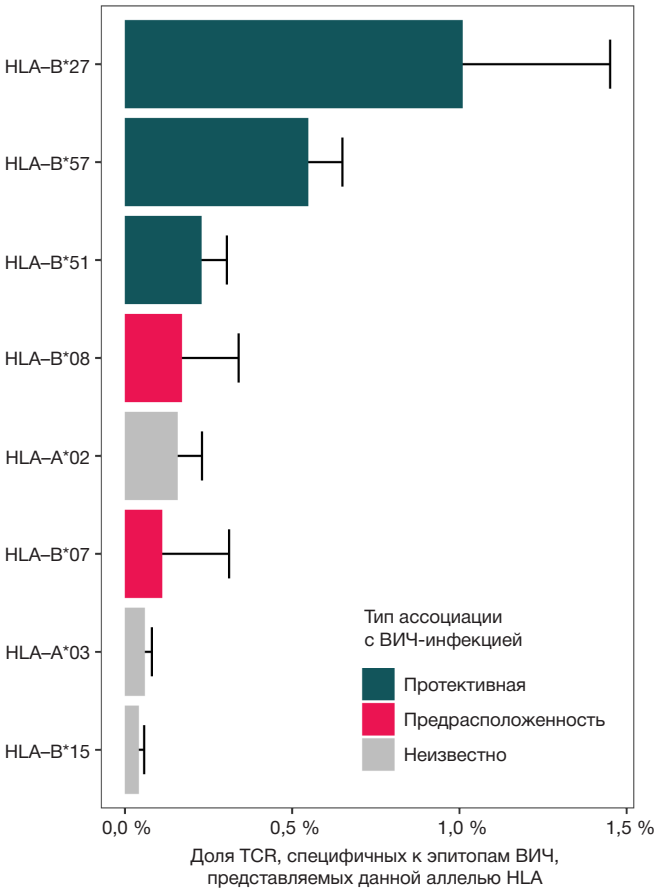


Рис. 3. Суммарная частота TCR, специфичных к эпитопам ВИЧ, которые могут быть представлены набором аллелей HLA донора (по данным Emerson и соавт.). По оси X отложен средний (по группам доноров, имеющих данный аллель HLA) процент от общего числа прочтений для последовательностей TCR, специфичных к эпитопам ВИЧ, представленных определенной аллелью HLA. Для каждого из значений также отображено стандартное отклонение. Список аллелей получен пересечением аллелей в базе VDJdb и аннотаций данных Emerson и соавт., аллель HLA-B*42 исключен, т. к. представлен только одним образцом, остальные аллели присутствуют у более чем 35 доноров из 601. Протективные аллели и аллели, связанные с предрасположенностью к ВИЧ-инфекции, взяты из обзора Goulder и Walker [3]

тестовой статистики (F-статистики для ANOVA и коэффициента корреляции Спирмена R) и статистической значимости (p-value).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценки частот TCR, специфичных к различным эпитопам, полученные методом проточной цитометрии, убедительно показывают, что доля специфичных Т-клеток в наивном (интактном) репертуаре сильно варьирует и может различаться на 1–2 порядка между эпитопами, при этом она достаточно стабильна между различными донорами [12]. Наши результаты для данных высокопроизводительного секвенирования TCR (рис. 1) подтверждают эти наблюдения: мы видим сильную зависимость частоты специфичных TCR от эпитопа ($F = 2007$, $p < 10^{-100}$, ANOVA), что, однако, не связано с презентирующим аллелем HLA ($F = 0{,}03$, $p = 0{,}86$, ANOVA). При этом для данных из работ Emerson и соавт. и Britanova и соавт. наблюдается сильный сдвиг между оценками частот специфичных TCR ($F = 1690$, $p < 10^{-100}$, в среднем частота выше для данных Emerson и соавт.), что может быть объяснено различиями в методике получения и структуре библиотек TCR. Так, в работе Emerson и соавт. использовали ДНК доноров и мультиплексную ПЦР, в то время как Britanova и соавт. использовали РНК, метод 5'RACE и молекулярное баркодирование [20]. Не вдаваясь в детальное описание различий приведенных выше методов, следует отметить, что молекулярное баркодирование позволяет значительно улучшить точность определения количества определенного TCR в образце [15].

Структура исследования Emerson и соавт. включала разделение доноров на две когорты по серологическому статусу — наличию или отсутствию цитомегаловирусной инфекции. Воспользовавшись этим, мы оценили влияние CMV-инфекции на частоту ВИЧ-специфичных TCR в репертуарах доноров. Как видно из рис. 2, частота ВИЧ-специфичных TCR выше для CMV-отрицательных доноров независимо от эпитопа ВИЧ, и отмеченное различие имеет высокий уровень статистической значимости ($F = 495$, $p < 10^{-100}$, ANOVA). Следует отметить, что вариант анализа, при котором не учитывается разница в частоте ВИЧ-специфичных TCR между эпитопами, т. е. сравнение проводится для всех TCR без группировки по эпитопу, дает результат с намного меньшим уровнем статистической значимости ($F = 61$, $p = 7 \times 10^{-15}$, ANOVA).

Наличие информации о HLA-гаплотипе доноров в работе Emerson и соавт. позволило оценить число ВИЧ-специфичных TCR, учитывая совпадение аллелей HLA, способных представлять распознаваемый эпитоп ВИЧ, и аллелей HLA донора. Как видно из рис. 3, наибольшая доля ВИЧ-специфичных TCR наблюдается для аллелей HLA B27, B57 и B51, считающихся протективными [3]. Для этих 3 аллелей характерно статистически значимое увеличение числа ВИЧ-специфичных TCR по сравнению с 5 остальными ($p < 0{,}01$, пост-хок тест Тьюки), кроме различий между B51 и B08. Следует отметить, что достаточно малое количество анализируемых аллелей HLA обусловлено отсутствием для других аллелей известных эпитопов ВИЧ в базе VDJdb.

Возрастные изменения в структуре Т-клеточного репертуара были описаны в ряде ранее опубликованных работ [21], результаты которых можно свести к наблюдаемому падению разнообразия репертуара из-за клональных экспансий, вызванных хроническими инфекциями. Подобное падение разнообразия приводит к уменьшению числа Т-клеток, специфичных к ранее не встречавшимся патогенам, что также наблюдается для ВИЧ-специфичных Т-клеток (рис. 4): $R = -0{,}35$ ($p = 0{,}003$, здесь и далее — коэффициент корреляции Спирмена) для данных из работы Britanova и соавт. и $R = -0{,}20$ ($p = 0{,}001$) для CMV-отрицательных доноров из работы Emerson и соавт. В то же время для CMV-положительных доноров наблюдается менее выраженное падение числа ВИЧ-специфичных Т-клеток ($R = -0{,}14$, $p = 0{,}03$). Крупные клональные экспансии (> 5 % прочтений TCR), наблюдаемые у CMV+-доноров из работы Emerson и соавт., могут быть объяснены кросс-реактивностью ВИЧ-специфичных клонотипов к эпитопам CMV. Данные Britanova и соавт. показывают падение числа специфичных Т-клеток для мужчин ($R = -0{,}53$, $p = 0{,}002$), но не для женщин ($p = 0{,}22$), в основном обусловленное наличием среди них долгожительниц (возраст 80–100 лет), обладающих специфическими свойствами репертуара [15].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Как показывают наши результаты, медианная частота ВИЧ-специфичных Т-клеток в популяции здоровых доноров может различаться на 1–2 порядка в зависимости от

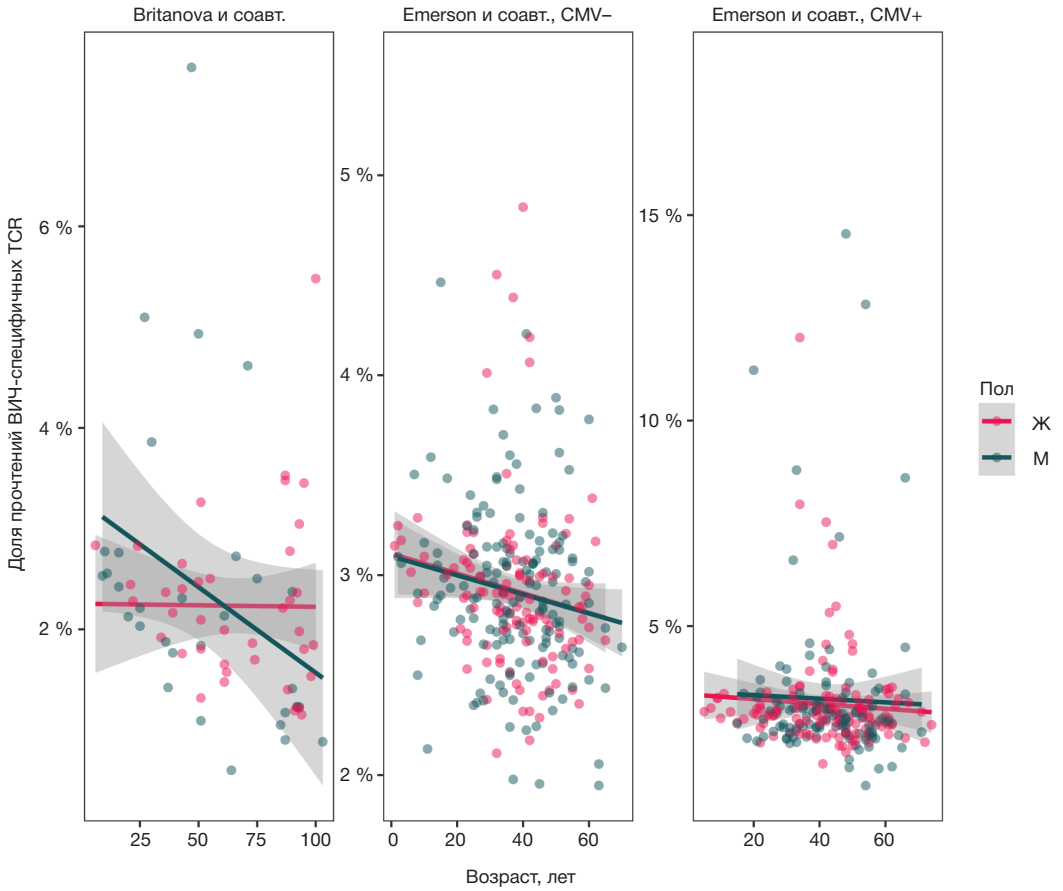


Рис. 4. Изменение суммарной частоты ВИЧ-специфичных TCR у доноров разного пола в зависимости от возраста. Данные из исследования Emerson и соавт. распределены по группам в соответствии с CMV-статусом доноров. На графике также приведены результаты линейного моделирования зависимости частоты ВИЧ-специфичных TCR от возраста для мужчин и женщин

рассматриваемых эпитопов ВИЧ, что хорошо согласуется с оценками, ранее полученными другими методами [11, 12, 22]. При этом частота Т-клеток, специфичных к определенному эпитопу, отличается для разных доноров в значительно меньшей степени.

Следует отметить, что одним из основных факторов, определяющих частоту той или иной последовательности TCR в популяции, является вероятность сборки данной последовательности в ходе V(D)J-рекомбинации [7]. Этот процесс хорошо описывается существующими статистическими моделями [23], которые показывают, что параметры данного процесса достаточно стабильны между индивидами, и это согласуется с нашими результатами. Эти наблюдения говорят в пользу того, что оценка частоты ВИЧ-специфичных Т-клеток, полученная *in silico*, является важной и надежной характеристикой потенциала иммунного ответа против определенных эпитопов на популяционном уровне.

Таким образом, наши результаты предполагают, что для разработки эффективной стратегии вакцинации следует учитывать как пул эпитопов, которые могут быть представлены в контексте аллелей HLA конкретного индивида, так и наличие в иммунной системе достаточного числа наивных Т-клеток, распознающих эти эпитопы.

При анализе частот Т-клеток, способных распознавать эпитопы ВИЧ в контексте известных HLA донора, нами были обнаружены значительные различия по ним для разных HLA. При этом обнаруженные нами аллели HLA с наибольшей частотой ВИЧ-специфичных TCR соответствуют перечню протективных аллелей, приведенному в [23].

Кроме того, нами было обнаружено значительное снижение частоты ВИЧ-специфичных Т-клеток с возрастом и у доноров с CMV-инфекцией. Эти результаты согласуются с более общими наблюдениями уменьшения разнообразия Т-клеточного репертуара, вызванного старением и хроническими инфекциями, такими как CMV [24–26]. Следует отметить, что сравнение групп разного пола дает противоречивые результаты между исследованиями Emerson и соавт. и Britanova и соавт., обусловленное наличием когорты женщин-долгожителей во второй работе.

ВЫВОДЫ

Наше исследование показывает, что технология секвенирования иммунных репертуаров и соответствующий биоинформатический анализ позволяют детально изучить антиген-специфичные Т-клетки в репертуарах. Использование технологии RepSeq позволяет оценить частоту ВИЧ-специфичных Т-клеток в репертуарах здоровых доноров и определить факторы, которые влияют на этот показатель. С ростом базы данных аннотированных последовательностей TCR VDJdb данное исследование может быть дополнено результатами для новых эпитопов ВИЧ и аллелей HLA. В будущем изучение репертуаров TCR ВИЧ-инфицированных доноров с различными аллелями HLA, в том числе доноров-контроллеров, позволит определить, какие из ВИЧ-специфичных TCR, наблюдаемых в репертуаре наивных Т-лимфоцитов, имеют повышенную частоту и ассоциированы с контролем ВИЧ-инфекции.

Литература

1. Barton JP, Goonetilleke N, Butler TC, Walker BD, McMichael AJ, Chakraborty AK. Relative rate and location of intra-host HIV evolution to evade cellular immunity are predictable. Nat Commun. 2016 May 23; 7: 11660. DOI: 10.1038/ncomms11660.
2. Blanco-Heredia J, Lecanda A, Valenzuela-Ponce H, Brander C, Ávila-Ríos S, Reyes-Terán G. Identification of Immunogenic Cytotoxic T Lymphocyte Epitopes Containing Drug Resistance Mutations in Antiretroviral Treatment-Naive HIV-Infected Individuals. PLoS One. 2016 Jan 25; 11 (1): e0147571. DOI: 10.1371/journal.pone.0147571.
3. Goulder PJ, Walker BD. HIV and HLA class I: an evolving relationship. Immunity. 2012 Sep 21; 37 (3): 426–40. DOI: 10.1016/j.immuni.2012.09.005.
4. Genovese L, Nebuloni M, Alfano M. Cell-Mediated Immunity in Elite Controllers Naturally Controlling HIV Viral Load. Front Immunol. 2013 Apr 9; 4: 86. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00086.
5. Lam S, Bollard C. T-cell therapies for HIV. Immunotherapy. 2013 Apr; 5 (4): 407–14. DOI: 10.2217/imt.13.23.
6. Jenkins MK, Moon JJ. The role of naive T cell precursor frequency and recruitment in dictating immune response magnitude. J Immunol. 2012 May 1; 188 (9): 4135–40. DOI: 10.4049/jimmunol.1102661.
7. Mora T, Walczak A. Quantifying lymphocyte receptor diversity. ArXiv e-prints Abstract Service [Интернет]. 2016 Apr [дата обращения: 2 октября 2017 г.]; eprint arXiv:1604.00487. Доступно по: http://adsabs.harvard.edu/abs/2016arXiv160400487M.
8. Heather JM, Ismail M, Oakes T, Chain B. High-throughput sequencing of the T-cell receptor repertoire: pitfalls and opportunities. Brief Bioinform. 2017 Jan 10. pii: bbw138. DOI: 10.1093/bib/bbw138.
9. Sims S, Willberg C, Klenerman P. MHC-peptide tetramers for the analysis of antigen-specific T cells. Expert Rev Vaccines. 2010 Jul; 9 (7): 765–74. DOI: 10.1586/erv.10.66.
10. Shugay M, Bagaev DV, Zvyagin IV, Vroomans RM, Crawford JC, Dolton G, et al. VDJdb: a curated database of T-cell receptor sequences with known antigen specificity. Nucleic Acids Res. 2017 Sep 1. DOI: 10.1093/nar/gkx760.
11. Bacher P, Scheffold A. Flow-cytometric analysis of rare antigen-specific T cells. Cytometry A. 2013 Aug; 83 (8): 692–701. DOI: 10.1002/cyto.a.22317.
12. Neller MA, Ladell K, McLaren JE, Matthews KK, Gostick E, Pentier JM, et al. Naive CD8+ T-cell precursors display structured TCR repertoires and composite antigen-driven selection dynamics. Immunol Cell Biol. 2015 Aug; 93 (7): 625–33. DOI: 10.1038/icb.2015.17.
13. Kotrova M, Muzikova K, Mejstrikova E, Novakova M, Bakardjieva-Mihaylova V, Fiser K, et al. The predictive strength of next-generation sequencing MRD detection for relapse compared with current methods in childhood ALL. Blood. 2015 Aug 20; 126 (8): 1045–7. DOI: 10.1182/blood-2015-07-655159.
14. Emerson RO, DeWitt WS, Vignali M, Gravley J, Hu JK, Osborne EJ, et al. Immunosequencing identifies signatures of cytomegalovirus exposure history and HLA-mediated effects on the T cell repertoire. Nat Genet. 2017 May; 49 (5): 659–65. DOI: 10.1038/ng.3822.
15. Britanova OV, Shugay M, Merzlyak EM, Staroverov DB, Putintseva EV, Turchaninova MA, et al. Dynamics of Individual T Cell Repertoires: From Cord Blood to Centenarians. J Immunol. 2016 Jun 15; 196 (12): 5005–13. DOI: 10.4049/jimmunol.1600005.
16. Shugay M, Britanova OV, Merzlyak EM, Turchaninova MA, Mamedov IZ, Tuganbaev TR, et al. Towards error-free profiling of immune repertoires. Nat Methods. 2014 Jun; 11 (6): 653–5. DOI: 10.1038/nmeth.2960.
17. Bolotin DA, Shugay M, Mamedov IZ, Putintseva EV, Turchaninova MA, Zvyagin IV, et al. MiTCR: software for T-cell receptor sequencing data analysis. Nat Methods. 2013 Sep; 10 (9): 813–4. DOI: 10.1038/nmeth.2555.
18. Bolotin DA, Poslavsky S, Mitrophanov I, Shugay M, Mamedov IZ, Putintseva EV, et al. MiXCR: software for comprehensive adaptive immunity profiling. Nat Methods. 2015 May; 12 (5): 380–1. DOI: 10.1038/nmeth.3364.
19. Shugay M, Bagaev DV, Turchaninova MA, Bolotin DA, Britanova OV, Putintseva EV, et al. VDJtools: Unifying Post-analysis of T Cell Receptor Repertoires. PLoS Comput Biol. 2015 Nov 25; 11 (11): e1004503. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1004503.
20. Friedensohn S, Khan TA, Reddy ST. Advanced Methodologies in High-Throughput Sequencing of Immune Repertoires. Trends Biotechnol. 2017 Mar; 35 (3): 203–14. DOI: 10.1016/j.tibtech.2016.09.010.
21. Goronzy JJ, Qi Q, Olshen RA, Weyand CM. High-throughput sequencing insights into T-cell receptor repertoire diversity in aging. Genome Med. 2015 Nov 19; 7 (1): 117. DOI: 10.1186/s13073-015-0242-3.
22. Obar JJ, Khanna KM, Lefrançois L. Endogenous naive CD8+ T cell precursor frequency regulates primary and memory responses to infection. Immunity. 2008 Jun; 28 (6): 859–69. DOI: 10.1016/j.immuni.2008.04.010.
23. Murugan A, Mora T, Walczak AM, Callan CG Jr. Statistical inference of the generation probability of T-cell receptors from sequence repertoires. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Oct 2; 109 (40): 16161–6. DOI: 10.1073/pnas.1212755109.
24. Aiello AE, Chiu YL, Frasca D. How does cytomegalovirus factor into diseases of aging and vaccine responses, and by what mechanisms? Geroscience. 2017 Jun; 39 (3): 261–71. DOI: 10.1007/s11357-017-9983-9.
25. Merani S, Pawelec G, Kuchel GA, McElhaney JE. Impact of Aging and Cytomegalovirus on Immunological Response to Influenza Vaccination and Infection. Front Immunol. 2017 Jul 17; 8: 784. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00784.
26. Tu W, Rao S. Mechanisms Underlying T Cell Immunosenescence: Aging and Cytomegalovirus Infection. Front Microbiol. 2016 Dec 27; 7: 2111. DOI: 10.3389/fmicb.2016.02111.

References

1. Barton JP, Goonetilleke N, Butler TC, Walker BD, McMichael AJ, Chakraborty AK. Relative rate and location of intra-host HIV evolution to evade cellular immunity are predictable. Nat Commun. 2016 May 23; 7: 11660. DOI: 10.1038/ncomms11660.
2. Blanco-Heredia J, Lecanda A, Valenzuela-Ponce H, Brander C, Ávila-Ríos S, Reyes-Terán G. Identification of Immunogenic Cytotoxic T Lymphocyte Epitopes Containing Drug Resistance Mutations in Antiretroviral Treatment-Naive HIV-Infected Individuals. PLoS One. 2016 Jan 25; 11 (1): e0147571. DOI: 10.1371/journal.pone.0147571.
3. Goulder PJ, Walker BD. HIV and HLA class I: an evolving relationship. Immunity. 2012 Sep 21; 37 (3): 426–40. DOI: 10.1016/j.immuni.2012.09.005.
4. Genovese L, Nebuloni M, Alfano M. Cell-Mediated Immunity in Elite Controllers Naturally Controlling HIV Viral Load. Front Immunol. 2013 Apr 9; 4: 86. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00086.
5. Lam S, Bollard C. T-cell therapies for HIV. Immunotherapy. 2013 Apr; 5 (4): 407–14. DOI: 10.2217/imt.13.23.
6. Jenkins MK, Moon JJ. The role of naive T cell precursor frequency and recruitment in dictating immune response magnitude. J Immunol. 2012 May 1; 188 (9): 4135–40. DOI: 10.4049/jimmunol.1102661.
7. Mora T, Walczak A. Quantifying lymphocyte receptor diversity. ArXiv e-prints Abstract Service [Internet]. 2016 Apr [cited 2017 Oct 2]; eprint arXiv:1604.00487. Available from: http://adsabs.harvard.edu/abs/2016arXiv160400487M.
8. Heather JM, Ismail M, Oakes T, Chain B. High-throughput sequencing of the T-cell receptor repertoire: pitfalls and opportunities. Brief Bioinform. 2017 Jan 10. pii: bbw138. DOI: 10.1093/bib/bbw138.

9. Sims S, Willberg C, Klenerman P. MHC-peptide tetramers for the analysis of antigen-specific T cells. Expert Rev Vaccines. 2010 Jul; 9 (7): 765–74. DOI: 10.1586/erv.10.66.
10. Shugay M, Bagaev DV, Zvyagin IV, Vroomans RM, Crawford JC, Dolton G, et al. VDJdb: a curated database of T-cell receptor sequences with known antigen specificity. Nucleic Acids Res. 2017 Sep 1. DOI: 10.1093/nar/gkx760.
11. Bacher P, Scheffold A. Flow-cytometric analysis of rare antigen-specific T cells. Cytometry A. 2013 Aug; 83 (8): 692–701. DOI: 10.1002/cyto.a.22317.
12. Neller MA, Ladell K, McLaren JE, Matthews KK, Gostick E, Pentier JM, et al. Naive CD8+ T-cell precursors display structured TCR repertoires and composite antigen-driven selection dynamics. Immunol Cell Biol. 2015 Aug; 93 (7): 625–33. DOI: 10.1038/icb.2015.17.
13. Kotrova M, Muzikova K, Mejstrikova E, Novakova M, Bakardjieva-Mihaylova V, Fiser K, et al. The predictive strength of next-generation sequencing MRD detection for relapse compared with current methods in childhood ALL. Blood. 2015 Aug 20; 126 (8): 1045–7. DOI: 10.1182/blood-2015-07-655159.
14. Emerson RO, DeWitt WS, Vignali M, Gravley J, Hu JK, Osborne EJ, et al. Immunosequencing identifies signatures of cytomegalovirus exposure history and HLA-mediated effects on the T cell repertoire. Nat Genet. 2017 May; 49 (5): 659–65. DOI: 10.1038/ng.3822.
15. Britanova OV, Shugay M, Merzlyak EM, Staroverov DB, Putintseva EV, Turchaninova MA, et al. Dynamics of Individual T Cell Repertoires: From Cord Blood to Centenarians. J Immunol. 2016 Jun 15; 196 (12): 5005–13. DOI: 10.4049/jimmunol.1600005.
16. Shugay M, Britanova OV, Merzlyak EM, Turchaninova MA, Mamedov IZ, Tuganbaev TR, et al. Towards error-free profiling of immune repertoires. Nat Methods. 2014 Jun; 11 (6): 653–5. DOI: 10.1038/nmeth.2960.
17. Bolotin DA, Shugay M, Mamedov IZ, Putintseva EV, Turchaninova MA, Zvyagin IV, et al. MiTCR: software for T-cell receptor sequencing data analysis. Nat Methods. 2013 Sep; 10 (9): 813–4. DOI: 10.1038/nmeth.2555.
18. Bolotin DA, Poslavsky S, Mitrophanov I, Shugay M, Mamedov IZ, Putintseva EV, et al. MiXCR: software for comprehensive adaptive immunity profiling. Nat Methods. 2015 May; 12 (5): 380–1. DOI: 10.1038/nmeth.3364.
19. Shugay M, Bagaev DV, Turchaninova MA, Bolotin DA, Britanova OV, Putintseva EV, et al. VDJtools: Unifying Post-analysis of T Cell Receptor Repertoires. PLoS Comput Biol. 2015 Nov 25; 11 (11): e1004503. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1004503.
20. Friedensohn S, Khan TA, Reddy ST. Advanced Methodologies in High-Throughput Sequencing of Immune Repertoires. Trends Biotechnol. 2017 Mar; 35 (3): 203–14. DOI: 10.1016/j.tibtech.2016.09.010.
21. Goronzy JJ, Qi Q, Olshen RA, Weyand CM. High-throughput sequencing insights into T-cell receptor repertoire diversity in aging. Genome Med. 2015 Nov 19; 7 (1): 117. DOI: 10.1186/s13073-015-0242-3.
22. Obar JJ, Khanna KM, Lefrançois L. Endogenous naive CD8+ T cell precursor frequency regulates primary and memory responses to infection. Immunity. 2008 Jun; 28 (6): 859–69. DOI: 10.1016/j.immuni.2008.04.010.
23. Murugan A, Mora T, Walczak AM, Callan CG Jr. Statistical inference of the generation probability of T-cell receptors from sequence repertoires. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Oct 2; 109 (40): 16161–6. DOI: 10.1073/pnas.1212755109.
24. Aiello AE, Chiu YL, Frasca D. How does cytomegalovirus factor into diseases of aging and vaccine responses, and by what mechanisms? Geroscience. 2017 Jun; 39 (3): 261–71. DOI: 10.1007/s11357-017-9983-9.
25. Merani S, Pawelec G, Kuchel GA, McElhaney JE. Impact of Aging and Cytomegalovirus on Immunological Response to Influenza Vaccination and Infection. Front Immunol. 2017 Jul 17; 8: 784. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00784.
26. Tu W, Rao S. Mechanisms Underlying T Cell Immunosenescence: Aging and Cytomegalovirus Infection. Front Microbiol. 2016 Dec 27; 7: 2111. DOI: 10.3389/fmicb.2016.02111.

КЛИНИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ БОЛЕВЫХ СИМПТОМОВ ПРИ ПРЕДМЕНСТРУАЛЬНОМ СИНДРОМЕ

Ю. Э. Доброхотова[1], В. Г. Фрипту[2], И. И. Гришин[1], Л. В.Сапрыкина[1], И. А. Мазур[1,2,3] ✉

[1] Кафедра акушерства и гинекологии, лечебный факультет,
Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

[2] Кафедра акушерства и гинекологии,
Государственный университет медицины и фармации имени Н. Тестемицану, Кишенев, Молодова

[3] ГК «Медси», Москва

Предменструальный синдром (ПМС) — патология, которая может значительно ухудшать качество жизни женщины, влияя на ее физическое и эмоциональное состояние. Целью исследования являлось определение особенностей болевых проявлений при ПМС у женщин репродуктивного возраста (18–45 лет). В основную группу включили 136 женщин с ПМС средней/тяжелой степени, в контрольную — 136 здоровых женщин с единичными предменструальными симптомами. Для оценки болевых проявлений использовали Менструальный дистресс-опросник Рудольфа Муса, менструальный дневник (в течение 3 последовательных циклов) и визуальную аналоговую шкалу (позволяет оценить интенсивность болей). Средняя общая оценка по дистресс-опроснику в основной группе составила 47,14 ± 3,67 балла (ПМС средней тяжести), а в контрольной — 10,28 ± 1,94 балла (ПМС легкой степени) ($p < 0,05$). Среди болевых предменструальных симптомов встречались: головные боли — в 66,17 % случаев в основной группе и в 22,79 % случаев в контрольной группе ($p < 0,001$); тяжесть/боль в молочных железах — в 83,08 % и 49,26 % случаев ($p < 0,001$); тазовые боли — в 70,58 % и 35,29 % случаев ($p < 0,001$); вздутие/боли в животе — в 64,7 % и 25,73 % случаев ($p < 0,001$); боли в мышцах и суставах — в 51,47 % и 21,32 % случаев соответственно ($p < 0,001$). В среднем в основной группе у пациенток отмечали 5,62 ± 0,92 предменструальных симптома, из них 2,47 ± 0,68 были болевыми выраженной интенсивности, определяя степень тяжести ПМС. Полученные результаты указывают на то, что симмптомы ПМС следует подтверждать проспективными ежедневными оценками в течение не менее 2 последовательных циклов, т. к. ретроспективный анамнез не является достаточно надежным.

Ключевые слова: менструация, предменструальный синдром, предменструальный симптом, боль, болевой симптом, менструальный дистресс-опросник, менструальный дневник

✉ **Для корреспонденции:** Мазур Инна Александровна
ул. Южная, д. 14, кв. 181, д. Дрожжино, Ленинский р-н, Московская область, 142718; mazur_ina@mail.ru

Статья получена: 22.09.2017 **Статья принята к печати:** 15.10.2017

CLINICAL CHARACTERISTICS OF PREMENSTRUAL PAINS

Dobrokhotova YuE[1], Friptu VG[2], Grishin II[1], Saprykina LV[1], Mazur IA[1,2,3] ✉

[1] Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of General Medicine,
Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

[2] Department of Obstetrics and Gynecology,
Nicolae Testemiţanu State University of Medicine and Pharmacy, Chisinau, Republic of Moldova

[3] Medsi Group, Moscow, Russia

Premenstrual syndrome (PMS) profoundly affects a woman's quality of life, causing physical and emotional distress. This study aimed to describe premenstrual pains in reproductive-age women (18–45 years). The main group included 136 women with moderate and severe PMS; the control group consisted of 136 healthy females with only sporadic premenstrual symptoms. We encouraged the participants to rate their symptoms using the menstrual distress questionnaire by Rudolf H. Moos and to keep a symptom diary over the course of 3 menstrual cycles. We also used the visual analogue scale, which allows estimating pain intensity. In the main groups the participants scored an average of 47.14 ± 3.67 total points on the distress questionnaire (moderate PMS), whereas the controls scored 10.28 ± 1.94 points (mild PMS) ($p < 0.05$). Among the most typical premenstrual symptoms observed in the main group and the controls were: headaches (66.17 % vs. 22.79 %, respectively; $p < 0.001$); breast tenderness/pain (83.08 % vs. 49.26 %, respectively; $p < 0.001$); pelvic pain (70.58 % vs. 35.29 %, respectively; $p < 0.001$); bloatedness/stomach ache (64.7 % vs. 25.73 %, respectively; $p < 0.001$), and muscle/joint pain (51.47 % vs. 21.32 %, respectively; $p < 0.001$). The average number of premenstrual symptoms observed in the main group was 5.62 ± 0.92, of which 2.47 ± 0.68 represented intense pains determining PMS severity. The results of our study suggest that premenstrual symptoms should be monitored prospectively over at least 2 consecutive menstrual cycles using a diary, because retrospective data are unreliable.

Keywords: menses, premenstrual syndrome, premenstrual symptom, pain, pain symptome, menstrual distress questionnaire, symptom diary

✉ **Correspondence should be addressed:** Inna Mazur
ul. Yuzhnaya 14, kv.181, Drozhzhino, Leninsky district, Moscow region, 142718; mazur_ina@mail.ru

Received: 22.09.2017 **Accepted:** 15.10.2017

Предменструальный синдром (ПМС) — это патология, связанная с менструальным циклом, оказывающая отрицательное влияние на физическое и эмоциональное состояние женщин репродуктивного возраста и характеризующаяся разнообразием соматических и психоэмоциональных симптомов, которые возникают во время лютеиновой фазы менструального цикла и заканчиваются после начала менструации [1].

По данным отечественных авторов, определяются четыре формы ПМС: нейропсихическая, цефалгическая, отечная и кризовая. *Нейропсихическая форма* проявляется раздражительностью, депрессией, слабостью, агрессией; *отечная форма* — тяжестью и болью в молочных железах, отеками верхних и нижних конечностей, лица, метеоризмом, болью в животе, потливостью; *цефалгическая форма* характеризуется выраженной головной болью, тошнотой, рвотой, депрессией, болью в груди, потливостью; *кризовая форма* проявляется симпатическими кризами (гипертония, боль в груди, тахикардия): приступы начинаются вечером или ночью, могут быть вызваны стрессом, переутомлением. Помимо этого есть атипичные формы ПМС: вегетативно-яичниковая кардиомиопатия, гипертермия, офтальмоплегия, циклические аллергические реакции [2].

Одной из широко распространенных в Европе классификаций является классификация, предложенная Королевским колледжем акушеров и гинекологов (Великобритания). Согласно ей, ПМС является совокупностью нейропсихических и соматических симптомов, на основе доминации некоторых из которых различают нейропсихическую, соматическую и смешанную формы предменструального синдрома [3].

Многие исследователи считают, что болевой синдром обязательно присутствует при различных формах ПМС, при этом боль имеет как клиническое, так и социальное значение: болевые симптомы определяют тяжесть синдрома, психоэмоциональное и общее состояние женщины, влияя на ее поведение в семье и трудовом коллективе, снижая ее работоспособность [4]. Среди болевых предменструальных симптомов наиболее распространенными являются: головная боль (мигрень) — 50–86 % случаев, масталгия — 85–96 %, тазовые боли и боли в животе — 63–80 %, боли в суставах и в области сердца — 15–17 % [5].

Помимо клинических форм ПМС различают 3 степени тяжести синдрома: легкую, среднюю/тяжелую. При легкой степени ПМС отмечаются 1–4 симптома незначительной интенсивности, не требующие назначение лечения, а при средней/тяжелой — несколько болевых симптомов, сопровождающихся вегетативными и аффективными симптомами (5–12 симптомов), достаточно выраженными, значительно ухудшающими состояние женщины и требующими назначения лечения [6].

Цель исследования — определение клинических особенностей болевых проявлений при ПМС у женщин репродуктивного возраста.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Исследование провели в 2010–2013 гг. В нем приняли участие 272 женщины: 136 женщин с ПМС средней/тяжелой степени (основная группа) и 136 женщин с единичными предменструальным симптомами (контрольная группа). В исследование были включены женщины репродуктивного возраста (18–45 лет) с регулярным менструальным циклом (25–35 дней, 3–7 дней менструации), которые не используют комбинированные оральные контрацептивы, не беременны и не кормят, не страдают органическими патологиями со стороны репродуктивной и нервной систем, а также психическими заболеваниями.

Диагноз «предменструальный синдром» был поставлен на основании принятых в международном врачебном сообществе диагностических критериев [3, 6, 7]. Для оценки клинических характеристик болевых симптомов и медико-социальных особенностей участниц исследования были использованы медицинские амбулаторные карты, индивидуальные анкеты (возраст, социальный статус, анамнез, характер менструальной функции и показатели репродуктивной функции) и специальные опросники.

Исследователями широко применяется Менструальный дистресс-опросник Рудольфа Муса (Menstrual Distress Questionnaire, MDQ, R. Moos) [8], состоящий из 8 компонентов, которые объединяют 47 симптомов. Симптомы, перечисленные в данном опроснике, раскрывают клиническую картину и позволяют определить доминирующие предменструальные симптомы (вегетативные, эндокринные и эмоциональные). Опросник был заполнен участницами в лютеиновой фазе цикла при максимальном проявлении симптомов.

Менструальный дневник участницы вели в течение 3 последовательных менструальных циклов, на основании записе оценивали клинический характер и время появления симптомов.

Интенсивность болевых симптомов оценивали по визуальной аналоговой шкале (ВАШ) [9]: 0 баллов — отсутствие боли, 1–3 — боль легкой степени, 4–6 — боль умеренной степени, 7–9 — боль выраженной интенсивности, 10 баллов — очень сильная боль.

Клиническое обследование включало общее и гинекологическое обследование и ультразвуковое исследование органов малого таза и молочных желез. Дополнительно провели онкоцитологическое исследование шейки матки и микроскопическое исследование отделяемого влагалища. Вышеупомянутые исследования были выполнены для определения состояния органов репродуктивной системы и выявления органической патологии репродуктивной системы, которая могла бы провоцировать развитие или ухудшение предменструальных симптомов.

Статистическую обработку результатов выполнили с использованием программного обеспечения Statistica 7.0 (StatSoft, США). Для изучаемых показателей были рассчитаны средние значения. Достоверность различий по группам определеяли с помощью t-критерия Стьюдента ($p < 0,05$)

Исследование было одобрено Комитетом по этике исследований Государственного университета медицины и фармации имени Н. Тестемицану (30.03.2009). Все участницы исследования дали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Пациентки в группах исследования были сопоставимы по возрасту, физическим данным, параметрам менструального цикла.

При проведении онкоцитологического исследования шейки матки, микроскопии влагалищного содержимого и ультразвукового исследования органов малого таза и молочных желез у участниц исследования не выявили

Таблица 1. Показатели Менструального дистресс-опросника Рудольфа Мосса (MDQ)

Показатель опросника	Основная группа (n = 136)	Контрольная группа (n = 136)	p-value
Болевые проявления, баллы	8,66 ± 1,43	2,12 ± 1,08	< 0,001
Расстройства внимания, баллы	6,25 ± 1,17	1,03 ± 0,65	< 0,001
Расстройства поведения, баллы	5,6 ± 1,32	0,78 ± 0,47	< 0,001
Вегетативные реакции, баллы	4,39 ± 1,47	0,83 ± 0,48	< 0,05
Задержка жидкости, баллы	4,14 ± 1,11	0,96 ± 0,48	< 0,01
Аффективные реакции, баллы	9,11 ± 1,71	1,59 ± 1,03	< 0,001
Волнение и возбудимость, баллы	3,87 ± 1,13	2,22 ± 0,98	> 0,05
Способность контроля, баллы	6,08 ± 1,64	1,0 ± 0,64	< 0,01
Итого, баллы	47,14 ± 3,67	10,28 ± 1,94	< 0,001

патологий, которые могли бы вызывать развитие или усиление предменструальных симптомов.

Проанализировав данные анамнеза пациенток, участвовавших в исследовании, мы выявили у них ряд гинекологических заболеваний, частота которых не отличалась статистически значимо между группами исследованиями ($p > 0,05$). Воспалительные заболевания органов малого таза (воспалительные процессы, пролеченные ранее) встречались в 36,02 ± 4,11 % случаев в основной группе и 27,94 ± 3,84 % случаев — в контрольной. Кисты яичников, выявленные ранее и пролеченные консервативно или оперативно, в 5,14 ± 1,89 и 8,08 ± 2,33 % случаев соответственно, миома матки — в 6,61 ± 2,13 и 4,41 ± 1,76 % случаев. Гинекологические операции (цистэктомии, внематочная беременность, консервативная миомэктомия) когда-либо были выполнены 7,35 ± 2,23 и 5,88 ± 2,01 % пациентов в основной и контрольной группах соответственно. Частота нарушений менструального цикла (меноррагия, олигоменорея) не превысила 5 % в обеих группах.

Анализ результатов, полученных с помощью Менструального дистресс-опросника Рудольфа Мосса, показал, что у пациенток в основной группе значения показателей по всем компонентам опросника, кроме компонента «Волнение и возбудимость», были достоверно выше, чем у женщин в контрольной группе (табл. 1). Средняя общая оценка по опроснику в основной группе составила 47,14 ± 3,67 балла, что соответствует критерию ПМС средней тяжести (22–51 баллов), а в контрольной группе — 10,28 ± 1,94 балла, что соответствует критерию ПМС легкой степени (4–21 балла).

Среди болевых предменструальных симптомов встречались: головные боли — в 66,17 % случаев в основной группе и в 22,79 % случаев в контрольной группе ($p < 0,001$); тяжесть/боль в молочных железах — в 83,08 % и 49,26 % случаев ($p < 0,001$); тазовые боли — в 70,58 % и 35,29 % случаев ($p < 0,001$); вздутие/боли в животе — в 64,7 % и 25,73 % случаев ($p < 0,001$); боли в мышцах и суставах — в 51,47 % и 21,32 % случаев соответственно ($p < 0,001$) (рис. 1).

Важно отметить, что вышеперечисленные болевые предменструальные симптомы встречаются в комплексе с эмоциональными и вегетативными симптомами. В контрольной группе отмечались единичные незначительные по интенсивности проявления симптомы. В основной группе у пациенток отмечали в среднем 5,62 ± 0,92 предменструальных симптома различной интенсивности, среди которых 2,47 ± 0,68 были болевыми выраженной интенсивности, поэтому оказывали отрицательное влияние на общее состояние и поведение женщин (межличностные отношения и трудоспособность) (табл. 2).

Длительность клинического проявления симптомов составила 7,14 ± 1,0 дней в месяц у пациенток основной группы (5–7 дней — 61,03 %, > 7 дней — 38,97 %) и 2,3 ± 1,28 дня в месяц у женщин в контрольной группе (1–4 дня — 88,24 %, отсутствие предменструальных симптомов — 10,29 %) ($p < 0,01$) (рис. 2).

Болевые симптомы оценивались в комплексе, включая частоту, длительность клинических проявлений, интенсивность болевых ощущений. Ниже представлены данные о клинических особенностях болевых предменструальных симптомов у пациенток, участвовавших в исследовании (табл. 3).

Головная боль относится к симптомам, определяющим тяжесть ПМС, является причиной снижения трудоспособности и ухудшает качество жизни женщины. У участниц исследования в основной группе продолжительность и интенсивность головных болей по шкале ВАШ была достоверно выше, чем в контрольной группе ($p < 0,01$) (табл. 3). При этом у 36,03 % (n = 49) из них приступы головной

Рис. 1. Частота болевых предменструальных симптомов у участниц исследования, %

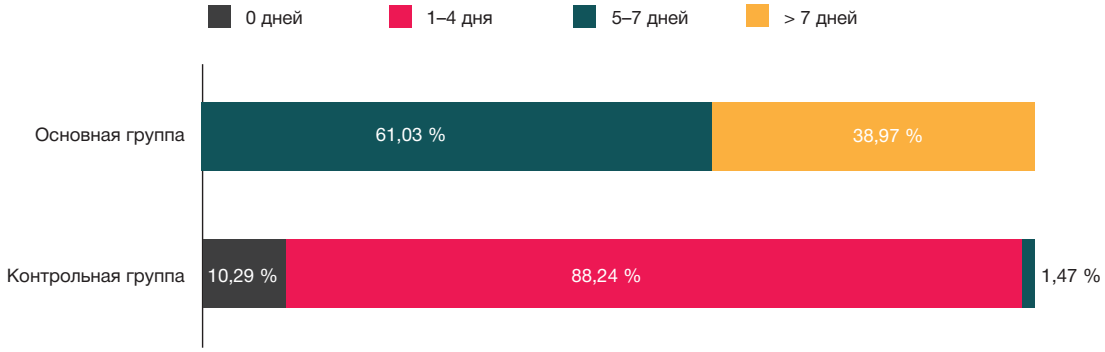


Рис. 2. Длительность клинического проявления предменструальных симптомов, дней в месяц

боли характеризовались односторонней локализацией, у 41,11 % (n = 37) — пульсирующим типом боли; у 31,11 % (n = 28) пациенток головные боли сопровождались тошнотой/рвотой, 14,44 % (n = 13) — слезотечением, 54,44 % (n = 49) — фоно- и фотофобией, 31,11 % (n = 28) — беспокойством, 37,78 % (n = 34) — сонливостью, 38,89 % (n = 35) — трудностями с концентрацией внимания, 32,22 % (n = 29) — ухудшением состояния при физической нагрузке, 42,22 % (n = 38) — снижением работоспособности. Головные боли не носили мигренозный характер и не соответствовали критериям приступа мигренозной ауры [10].

Тяжесть и боль в молочных железах отмечалась в основной группе в 83,08 ± 3,21 % случаев (n = 113). Их продолжительность и интенсивность проявления по шкале ВАШ была достоверно выше, чем в контрольной группе ($p < 0,01$). Тазовая боль отмечалась в основной группе в 70,58 ± 3,9 % случаев (n = 96). Длительность и интенсивность болей были достоверно выше, чем в контрольной группе ($p < 0,01$). Тазовая боль также часто сопровождалась висцеральными болями, но их продолжительность и степень были значительно меньше. Кроме того, отмечались боли в мышцах и суставах, которые чаще всего присутствовали в комплексе с другими болевыми симптомами (табл. 3).

Пациентки в основной группе отмечали отрицательное влияние болевых предменструальных симптомов на эмоциональное и общее состояние и качество жизни. В контрольной группе отмечались единичные симптомы слабой интенсивности, не оказывавшие отрицательного влияния на эмоциональное и общее состояние женщин.

При оценке компонентов болевого синдрома с помощью ВАШ был составлен «профиль боли» (рис. 3), который включал наиболее часто встречающиеся болевые предменструальные симптомы и эмоциональную составляющую. Болевые симптомы не превышали уровня умеренной интенсивности.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В связи с многообразием клинических проявлений и преобладанием определенных симптомов очень часто пациентки с ПМС обращаются за медицинской помощью к различным специалистам (терапевту, неврологу, эндокринологу), и назначенное лечение оказываается недостаточно эффективным. Поскольку ПМС является гормонально зависимым состоянием, ведение пациенток должно осуществляться врачом-гинекологом. При ПМС тяжелой степени приветствуется совместное консультативное ведение, в которое вовлечены врачи различных специальностей в зависимости от доминантных симптомов (гинеколог, эндокринолог, невролог, терапевт и др.) [11, 12]. Наше исследование было направлено на изучение особенностей

Таблица 2. Предменструальные симптомы

Показатель	Основная группа (n = 136)	Контрольная группа (n = 136)	p-value
Количество циклических симптомов	5,62 ± 0,92	2,43 ± 1,15	< 0,05
Количество болевых циклических симптомов	2,55 ± 0,67	0,9 ± 0,49	< 0,05

Таблица 3. Характеристика болевых проявлений

Показатель опросника	Основная группа (n = 136)	Контрольная группа (n = 136)	p-value
Головная боль (мигрень) длительность, дней в месяц интенсивность, по шкале ВАШ	 5,95 ± 1,36 6,0 ± 1,2	 2,05 ± 0,36 2,1 ± 0,31	 < 0,01 < 0,01
Тяжесть и боль в молочных железах длительность, дней в месяц интенсивность, по шкале ВАШ	 7,77 ± 1,22 5,03 ± 1,03	 3,25 ± 0,97 1,96 ± 0,48	 < 0,01 < 0,01
Тазовая боль длительность, дней в месяц интенсивность, по шкале ВАШ	 4,67 ± 0,94 4,87 ± 0,65	 1,98 ± 0,56 1,86 ± 0,67	 < 0,05 < 0,001
Боли в животе длительность, дней в месяц интенсивность, по шкале ВАШ	 3,91 ± 0,98 3,19 ± 0,58	 1,17 ± 0,17 1,28 ± 0,21	 < 0,01 < 0,01
Боли в мышцах и суставах длительность, дней в месяц интенсивность, по шкале ВАШ	 4,38 ± 0,93 3,73 ± 0,65	 1,34 ± 0,37 1,48 ± 0,45	 < 0,01 < 0,01

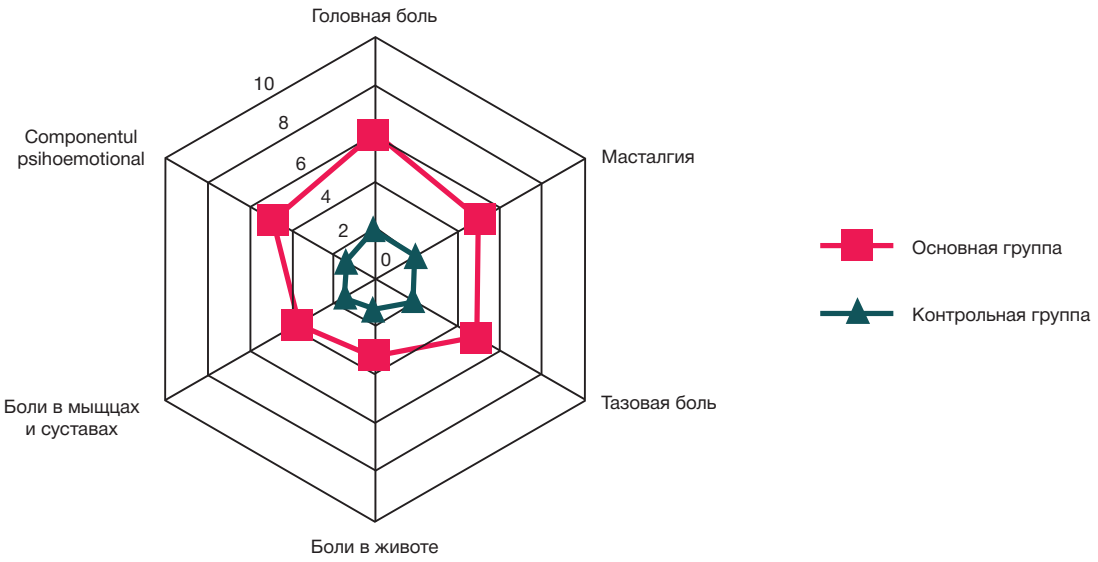


Рис. 3. «Профиль боли» участниц исследования

болевых предменструальных проявлений с целью улучшения диагностики данного состояния и оптимизации ведения пациенток с ПМС. Полученные результаты подтверждают предположение о том, что болевой синдром сопровождается психоэмоциональными и вегетососудистыми расстройствами и является одним из основных факторов, определяющих тяжесть клинических проявлений ПМС.

При оценке состояния женщин с ПМС симптомы следует регистрировать проспективно, в течение 2–3 последующих циклов с использованием дневника симптомов. Опросники и дневники, использованные в данном исследовании, позволили выявить ключевые особенности предменструальных симптомов, в том числе цикличность проявления исключительно в предменструальном периоде, а также выявить доминирующие симптомы и оценить степень их тяжести.

Результаты проведенного исследования в определенной степени объединяют мнения различных авторов относительно клинических проявлений ПМС. По данным М. Н. Кузнецовой, почти все формы ПМС — цефалгическая, отечная, кризовая — характеризуются одним или несколькими болевыми симптомами [2]. С другой стороны, в соответствии с классификацией Королевского колледжа акушеров и гинекологов, ПМС проявляется нейропсихическими, соматическими и смешанными симптомами [3], при этом соматический комплекс симптомов ПМС включает нейровегетативные и эндокринно-метаболические проявления, среди которых боль различной локализации является одним из важнейших симптомов. Эту классификацию можно рассматривать как более удобную для использования в клинической практике, т. к. методы лечения ПМС при преобладании нейропсихических симптомов кардинально отличаются от методов для ведения пациенток с преобладанием соматических проявлений.

ВЫВОДЫ

В целом предменструальные симптомы проявлялись в виде комплекса эмоциональных и соматических симптомов (в среднем — 5,62 ± 0,92 циклических симптома). Чаще всего они были представлены болями различной локализации (2,47 ± 0,68 симптома от их общего количества). Продолжительность и интенсивность болей у участниц исследования соответствовала средней степени по визуальной аналоговой шкале. Болевые симптомы являлись доминантными и определяли степень тяжести ПМС, оказывая отрицательное влияние на общее состояние женщин.

Результаты исследования позволяют заключить, что симптомы ПМС должны быть подтверждены проспективными ежедневными оценками в течение не менее 2 последовательных циклов, поскольку ретроспективный анамнез не является достаточно надежным.

Литература

1. Доброхотова Ю. Э., Дюкова Г. М., Логинова К. Б.. Современная оценка предменструального синдрома и предменструальных дисфорических расстройств. Вестник РГМУ. 2010; (6): 40–4.
2. Сметник В. П., Тумилович Л. Г. Неоперативная гинекология. Т. 1. СПб: СОТИС; 1995. С. 129–38.
3. Green LJ, O'Brien PMS, Panay N, Craig M on behalf of the Royal College of Obstetricians and Gynaecologists. Management of Premenstrual Syndrome. BJOG 2017; 124: e73–e105.
4. Steiner M, Peer M, Macdougall M, Haskett R. The premenstrual tension syndrome rating scales: an updated version. J Affect Disord. 2011 Dec; 135 (1–3): 82–8. DOI: 10.1016/j.jad.2011.06.058.
5. Potter J, Bouyer J, Trussell J, Moreau C. Premenstrual Syndrome Prevalence and Fluctuation over Time: Results from a French Population-Based Survey. J Womens Health (Larchmt). 2009 Jan; 18 (1): 31–9.
6. Endicott J, Halbreich U, Schacht S, Nee J. Premenstrual changes and affective disorders. Psychosom Med. 1981; 43: 519–29.
7. Halbreich U, Backstrom T, Eriksson E, O'Brien S, Calil H, Ceskova E et al. Clinical diagnostic criteria for premenstrual syndrome and guidelines for their quantification for research studies. Gynecol Endocrin. 2007 Mar; 23 (3): 123–30. DOI: 10.1080/09513590601167969.
8. Moos RH. The development of the menstrual distress questionnaire. Psychosom Med. 1968 Nov-Dec; 30 (6): 853–67.

9. Crichton N. Information point: Visual Analogue Scale (VAS). J Clin Nurs. 2001; 10: 697–706.
10. Moldovanu I, Dodick D, Odobescu S. Cefaleele, durerile faciale şi cervicale. Diagnostic şi tratament. Chişinău, „Tipografia Centrală"; 2007. P. 334–55.
11. Хашукоева А. З., Доброхотова Ю. Э., Ильина И. Ю., Дугиева М. З., Нариманова М. Р., Сухова Т. Н. и др. Мастодиния и предменструальный синдром: есть ли взаимосвязь? Лечащий врач. 2015; (12): 15–9.
12. O'Brien PM, Backstrom T, Brown C, Dennerstein L, Endocott J, Epperson CN et al. Towards a consensus on diagnostic criteria, measurement and trial design of the premenstrual disorders: the ISPMD Montreal Consensus. Arch Womens Ment Health. 2011 Feb; 14 (1): 13–21. DOI: 10.1007/s00737-010-0201-3.

References

1. Dobrohotova YuE, Dyukova GM, Loginova KB. [Modern estimates of premenstrual syndrome and premenstrual dysphoric disorder]. Vestnik RGMU. 2010; (6): 40–4. Russian.
2. Smetnik VP, Tumilovich LG. Neoperativnaja ginekologija. Vol. 1. Saint-Petersburg: SOTIS; 1995. P. 129–38. Russian.
3. Green LJ, O'Brien PMS, Panay N, Craig M on behalf of the Royal College of Obstetricians and Gynaecologists. Management of Premenstrual Syndrome. BJOG 2017; 124: e73–e105.
4. Steiner M, Peer M, Macdougall M, Haskett R. The premenstrual tension syndrome rating scales: an updated version. J Affect Disord. 2011 Dec; 135 (1–3): 82–8. DOI: 10.1016/j.jad.2011.06.058.
5. Potter J, Bouyer J, Trussell J, Moreau C. Premenstrual Syndrome Prevalence and Fluctuation over Time: Results from a French Population-Based Survey. J Womens Health (Larchmt). 2009 Jan; 18 (1): 31–9.
6. Endicott J, Halbreich U, Schacht S, Nee J. Premenstrual changes and affective disorders. Psychosom Med. 1981; 43: 519–29.
7. Halbreich U, Backstrom T, Eriksson E, O'Brien S, Calil H, Ceskova E et al. Clinical diagnostic criteria for premenstrual syndrome and guidelines for their quantification for research studies. Gynecol Endocrin. 2007 Mar; 23 (3): 123–30. DOI: 10.1080/09513590601167969.
8. Moos RH. The development of the menstrual distress questionnaire. Psychosom Med. 1968 Nov-Dec; 30 (6): 853–67.
9. Crichton N. Information point: Visual Analogue Scale (VAS). J Clin Nurs. 2001; 10: 697–706.
10. Moldovanu I, Dodick D, Odobescu S. Cefaleele, durerile faciale şi cervicale. Diagnostic şi tratament. Chişinău, „Tipografia Centrală"; 2007. P. 334–55.
11. Hashukoeva AZ, Dobrokhotova YuE, Il'ina IYu, Dugieva MZ, Narimanova MR, Suhova TN et al. [Mastodynia and pre-menstrual syndrome: is there a correlation?] Lechashhij vrach. 2015; (12): 15–9. Russian.
12. O'Brien PM, Backstrom T, Brown C, Dennerstein L, Endocott J, Epperson CN et al. Towards a consensus on diagnostic criteria, measurement and trial design of the premenstrual disorders: the ISPMD Montreal Consensus. Arch Womens Ment Health. 2011 Feb; 14 (1): 13–21. DOI: 10.1007/s00737-010-0201-3.

СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ МУЛЬТИМОДАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ИДИОПАТИЧЕСКОЙ ЭПИРЕТИНАЛЬНОЙ МЕМБРАНЫ

Х. П. Тахчиди[1], Г. Ф. Качалина[1], Т. А. Касмынина[1], Е. П. Тебина[2] ✉

[1] Научно-исследовательский центр офтальмологии,
Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

[2] Кафедра офтальмологии, педиатрический факультет,
Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

Идиопатическая эпиретинальная мембрана (иЭРМ) — наиболее распространенная патология витреоретинального интерфейса. Для этой патологии характерно бессимптомное течение на протяжении достаточно длительного времени. «Золотым стандартом» ее диагностики является исследование с помощью спектральной оптической когерентной томографии (СОКТ) и офтальмобиомикроскопия. Однако к настоящему времени разработаны и другие подходы к выявлению патологий глазного дна, обладающие важными достоинствами: мультиспектральное исследование в режиме MultiColor (оценка распространенности пролиферативного процесса), ОКТ-ангиография в режиме En Face (точная локализация повреждений ретинальных слоев), компьютерная микропериметрия (оценка качества зрения и влияния на него пролиферативного процесса). В исследовании оценивалась эффективность мультимодального подхода в диагностике иЭРМ. Обследовали 46 пациентов (46 глаз; средний возраст — 65,3 ± 11,2 года) с иЭРМ различных стадий, артифакией и начальной катарактой. По результатам обследования у 15 пациентов установили иЭРМ стадии 0, у 19 — стадии 1, у 12 — стадии 2. Применение мультимодального подхода позволило точнее дифференцировать стадии заболевания, а в группе пациентов с иЭРМ стадии 2 также в 2 случаях — разработать карту витреоретинального интерфейса для выбора тактики лечения и плана малотравматичного для сетчатки хирургического вмешательства. Основываясь на собственном клиническом опыте и результатах исследования, мы полагаем, что мультимодальный подход перспективен для более широкого распространения в клинической практике офтальмологов.

Ключевые слова: мультимодальная диагностика, эпиретинальная мембрана, оптическая когерентная томография, En Face OKTA, микропериметрия, MultiColor

✉ **Для корреспонденции:** Тебина Екатерина Павловна
Волоколамское шоссе, д. 30, корп. 2, г. Москва, 125310; ekaterinatebina@mail.ru

Статья получена: 23.10.2017 **Статья принята к печати:** 26.10.2017

MODERN ASPECTS OF MULTIMODALITY APPROACH TO THE DIAGNOSIS OF IDIOPATHIC EPIRETINAL MEMBRANE

Takhchidi KhP[1], Kachalina GF[1], Kasmynina TA[1], Tebina EP[2] ✉

[1] Research Center for Ophthalmology,
Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

[2] Department of Ophthalmology, Faculty of Pediatrics,
Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Idiopathic epiretinal membrane (iERM) is the most common abnormality of the vitreoretinal interface. This condition often stays asymptomatic for a long time. At present, the diagnostic “gold standard” for iERM is spectral-domain optical coherence tomography (SDOCT) and biomicroscopy. However, other diagnostic approaches to ocular fundus pathologies have emerged recently, including multispectral imaging in the MultiColor mode used to estimate tissue proliferation, En Face OCT-angiography that can precisely locate retinal lesions, and microperimetry instrumental in assessing retinal sensitivity and the impact of tissue proliferation. In this work we evaluate the effectiveness of the multimodal approach to iERM diagnosis. We examined 46 patients (46 eyes; mean age was 65.3 ± 11.2 years) with different stages of iERM, pseudophakia and incipient cataract. The multimodal approach allowed us to better discriminate between disease stages and to identify 15 patients with stage 0 iERM, 19 patients with stage 1, and 12 — with stage 2. We were also able to generate a map of the vitreoretinal interface for 2 patients with stage 2 iERM that facilitated the choice of treatment and allowed planning a sparing surgical intervention. Based on our clinical experience and study findings, we conclude that the multimodality approach should be promoted in the clinical setting.

Keywords: multimodality imaging, epiretinal membrane, optical coherence tomography, OCTA En Face, microperimetry, MultiColor

✉ **Correspondence should be addressed:** Ekaterina Tebina
Volokolamskoe shosse, d. 30, korp. 2, Moscow, Russia, 125310; ekaterinatebina@mail.ru

Received: 23.10.2017 **Accepted:** 26.10.2017

Идиопатическая эпиретинальная мембрана (иЭРМ) представляет собой тонкую полупрозрачную фиброзно-клеточную пленку в центральной зоне сетчатки глаза, способную к сокращению, которое приводит к искривлению поверхности ретинального интерфейса [1]. Это медленно прогрессирующая патология: чаще всего иЭРМ длительное время остается анатомически стабильной, характерные для нее симптомы не наблюдаются [2]. По данным Feng и соавт. [3], регресс иЭРМ отмечается в 25,7 % случаев, а стабилизация процесса — в 38,8 % случаев. Однако в работах других исследователей [4, 5] указывается, что почти в трети случаев иЭРМ прогрессирует, наступает

контрактильная фаза течения пролиферативного процесса на поверхности сетчатки и возможно развитие таких осложнений, как отек макулы и макулярный разрыв [6].

Классификацию ЭРМ еще в 1976 г. предложил Gass, которая впоследствии была модифицирована Klein на основе анализа цветных фотографий глазного дна [7]:

– стадия 0: мембрана полупрозрачна и не сопровождается деформацией на поверхности сетчатки («целлофановая макулопатия»);

– стадия 1: формирование неровного сморщивания внутренней поверхности сетчатки («гофрированная целлофановая макулопатия»);

– стадия 2: образование плотной мембраны на поверхности сетчатки, общее сморщивание макулы по всей толщине, которое может сопровождаться макулярным отеком, небольшими кровоизлияниями, появлением ватообразного экссудата («макулярное сморщивание»).

Эта классификация до сих пор используется при диагностике эпиретинального фиброза.

В повседневной практике офтальмологических клиник для выявления патологии глазного дна, в том числе иЭРМ, широко применяют офтальмобиомикроскопию, ультразвуковое исследование (УЗИ) в В-режиме и спектральную оптическую когерентную томографию (СОКТ) [4]. УЗИ в В-режиме является наиболее распространенным неинвазивным методом диагностики заболеваний глазного дна, но его использование при данной патологии нецелесообразно ввиду малой информативности. Наиболее же эффективным подходом является СОКТ, при котором ЭРМ определяется как полоса гиперрефлективности, прилежащая и/или спаянная с внутренней поверхностью сетчатки. В отдельных случаях могут наблюдаться отдельные точечные спайки ЭРМ с поверхностью сетчатки [2]. Помимо этого, важным диагностическим признаком, выявляемым при СОКТ, является фовеолярный профиль. В начале развития патологии профиль обычно не изменен, но в дальнейшем он может деформироваться (сглаживаться) либо вовсе отсутствовать [8]. Неинвазивность, безболезненность и быстрота исследования делают этот метод комфортным для пациента, а простота исследования и высокие технические характеристики — пригодным для скрининга [9]. Тем не менее использование методов «золотого стандарта» не дает полного представления о структурных изменениях витреоретинального интерфейса, динамике патологического процесса — его распространении и локализации, а также о сопутствующих нарушениях зрительных функций.

Появление конфокальных сканирующих систем обеспечило возможность более детального анализа всех слоев сетчатки и витреоретинального интерфейса. Основы офтальмохромоскопии [10] стали базой для возникновения мультиспектрального лазерного сканирования сетчатки (MultiColor), позволяющего прижизненно оценить распространенность пролиферативного процесса на поверхности ретинального интерфейса. Метод подразумевает суммирование 3 изображений с использованием монохроматических фильтров: синего (BR; 488 нм), зеленого (GR; 515 нм) и инфракрасного (IR; 820 нм). При исследовании в режиме MultiColor поверхность исследуемой мембраны и ее складчатость выявляются в желто-зеленом цвете, интенсивность которого зависит от приподнятости ЭРМ по отношению к сетчатке. Детализировать внутреннюю поверхность сетчатки и витреоретинальный интерфейс позволяют синий и зеленый фильтры. Так удается выявить границы мембраны, площадь распространения складчатости и наличие тракционного компонента [11]. Мультиспектральное исследование хорошо дополняет СОКТ. Для повышения эффективности скрининга эти методы могут быть скомбинированы [8].

Еще одна перспективная технология — ОКТ-ангиография (ОКТА) [12], которая позволяет без внутривенного введения контрастных препаратов оценивать состояние ретинальной сосудистой сети и фронтальной поверхности витреомакулярного интерфейса (режим En Face) [13, 14]. Режим En Face ОКТА обеспечивает точную локализацию повреждений в определенных ретинальных слоях за счет их осевого расположения на сканах поперечного сечения СОКТ, а позволяет конвертировать изображения ОКТ в другие модели визуализации глазного дна, при этом сосуды сетчатки служат ориентирами [12].

Технические возможности новых методов позволили усовершенствовать классификацию Gass для режима En Face [8]:

– стадия 0: на поперечном срезе при ОКТ фовеолярный профиль не изменен, центральная толщина сетчатки в норме, в режиме En Face на поверхности сетчатки отмечаются единичные диффузные очаги фиброза;

– стадия 1: на поперечном срезе при ОКТ визуализируется увеличение центральной толщины сетчатки, незначительно изменяется фовеолярный профиль, в режиме En Face заметна «бляшка» с небольшим количеством радиальных складок;

– стадия 2: на поперечном срезе при ОКТ наблюдается увеличение центральной толщины сетчатки, фовеолярный профиль отсутствует, в режиме En Face визуализируется плотная «бляшка» с выделяющимися складками.

Особое внимание при исследовании витреоретинального интерфейса в режиме En Face ОКТА стоит обращать на изменения задней гиалоидной мембраны (ЗГМ) и ЭРМ в динамике патологического процесса. При установке фокуса на ЗГМ возникает «облачный», или «туманный», вид поверхности сетчатки. В случаях отслоения ЗГМ или ЭРМ локальные отслоившиеся участки отображаются как «ретинальные окна», что является диагностически важным критерием для витреоретинального хирурга при удалении ЭРМ. В некоторых случаях происходят локальные отрывы внутренней пограничной мембраны, и тогда в режиме En Face визуализируются обнаженные зоны нервного слоя сетчатки по типу «кратеров» [8].

Для более качественной в сравнении с визометрией оценки изменений зрительных функций при различных патологиях глазного дна используется компьютерная микропериметрия — неинвазивный метод исследования, позволяющий оценить световую чувствительность макулярной области, а также локализацию и устойчивость точки фиксации взора [15].

Анализ достоинств и недостатков существующих методов диагностики иЭРМ указывает на то, что для получения полной картины морфофункциональных изменений при этой патологии следует применять мультимодальный подход. Целью исследования являлась оценка мультимодального подхода, включавшего офтальмобиомикроскопию, мультиспектральное исследование, микропериметрию, СОКТ и En Face ОКТА, для диагностики иЭРМ различных стадий.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследовании приняли участие 46 пациентов (46 глаз) с иЭРМ различных стадий. Критериями включения являлись артифакия и начальная катаракта. Средний возраст

участников составил 65,3 ± 11,2 года (18 женщин и 27 мужчин). Критериями исключения являлись: зрелая катаракта, глаукома, диабетическая ретинопатия, дистрофические заболевания глазного дна различного генеза, окклюзии сосудов сетчатки, травмы глаза в анамнезе, хронические и острые воспалительные заболевания глазного яблока.

Помимо стандартного офтальмологического исследования всем пациентам выполняли СОКТ, мультиспектральное исследование с использованием различных фильтров (режим MultiColor), микропериметрию и ОКТА в режиме En Face. Использовали следующую приборную базу: Spectralis HRA-OCT, модуль Spectralis OCT-2, частота 85 000 Гц с TruTrack Active Eye Tracking (Heidelberg Engineering, Германия); MAIA версии 2.4.0 (CenterVue, Италия). ОКТА выполняли с применением алгоритма SSDA в режиме Angio Retina. Сканирование выполняли в макулярной зоне с центральной фиксацией взгляда, размер макулярного куба составил 10 х 10°, число сканов — 512, с дистанцией в 6 мкм (режим Macular Map). При нарушениях фиксации взгляда осуществляли повторное сканирование до получения корректных изображений без артефактов, вызванных движением глаз.

По данным СОКТ оценивали степень структурных нарушений витреоретинального интерфейса, общую толщину сетчатки в центральной зоне и фовеолярный профиль. На снимках ОКТА в режиме En Face оценивали фронтальный профиль витреоретинального интерфейса, включающего внутреннюю пограничную мембрану и ЭРМ в пределах макулярной зоны.

Микропериметрию использовали для оценки светочувствительности сетчатки центральной зоны. Исследование выполняли в макулярной зоне с центральной фиксацией взгляда в режиме Expert exam [метод 4–2] с сеткой 10° (37 точек). Результаты исследования накладывали на фотографию глазного дна, полученную с помощью встроенной фундус-камеры. В том случае, если доля контрольных точек, замеченных пациентом в области слепого пятна, превышала 30 %, тест считали недостоверным и проводили повторное исследование до получения достоверных данных.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

По результатам мультимодального исследования, опираясь на классификацию Gass и ее модифицированную версию, мы разделили пациентов на 3 группы: первую группу составили 15 пациентов (15 глаз) с начальными проявлениями эпиретинального фиброза (стадия 0), вторую — 19 пациентов (19 глаз) с более выраженными изменениями витреомакулярного интерфейса (стадия 1), третью — 12 пациентов (12 глаз) с выраженными изменениями в макулярной зоне (стадия 2).

В первой группе при мультиспектральном исследовании в режиме MultiColor в центральной зоне выделялись очаговые слабовыраженные желто-зеленые фокусы от поверхности ЭРМ, ее полная площадь и границы не дифференцировались, отсутствовала складчатость сетчатки и тракционный компонент (рис. 1). СОКТ показала, что фовеолярный профиль не изменен, толщина сетчатки центральной зоны находится в пределах нормы, в среднем — 276,8 ± 24,4 нм. По результатами ОКТА в режиме En Face у всех пациентов отмечали единичные диффузные очаги фиброза на поверхности сетчатки. Средняя величина светочувствительности сетчатки в макулярной зоне составила 26,2 ± 1,4 дБ.

Во второй группе при мультиспектральном исследовании в режиме MultiColor в центральной зоне отмечался выраженный желто-зеленый рефлекс от поверхности ЭРМ, выявляющий ее площадь и границы, также наблюдались единичные складки сетчатки с невыраженной тракцией (рис. 2). По данным СОКТ были выявлены незначительные изменения фовеолярного профиля (сглаженность), увеличение толщины сетчатки в среднем до 303,1 ± 42,2 нм. У всех пациентов при ОКТА в режиме En Face визуализировались «ретинальная звездчатость» и «бляшки» с единичными радиальными складками. Средняя величина светочувствительности сетчатки в макулярной зоне составила 25,1 ± 2,4 дБ.

В третьей группе при мультиспектральном исследовании в режиме MultiColor желто-зеленый рефлекс был ярко выражен, прослеживались четкие границы и площадь ЭРМ с диффузной складчатостью и выраженной тракцией (рис. 3). СОКТ выявила грубые структурные изменения сетчатки, фовеолярный профиль отсутствовал, центральная толщина сетчатки была увеличена и составила в среднем 427,0 ± 85,4 нм. При ОКТА в режиме En Face у всех пациентов визуализировалась «диффузная ретинальная складчатость» в центральной зоне. Средняя величина светочувствительности сетчатки в макулярной зоне составила 22,2 ± 2,2 дБ. В 2 случаях из 12 наблюдалась частичная отслойка ЭРМ: при ОКТА в режиме En Face визуализировались «ретинальные окна». Это позволило составить схему топографии витреоретинального интерфейса с учетом зон наибольшего отстояния ЭРМ от сетчатки. В дальнейшем была разработана карта витреоретинального интерфейса, позволяющая запланировать тактику лечения и успешно провести малотравматичное для сетчатки хирургическое удаление ЭРМ.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В течение многих лет «золотым стандартом» диагностики эпиретинального фиброза являлись офтальмобиомикроскопия и СОКТ. Однако появление новых неинвазивных методов диагностики на основе конфокальной микроскопии предоставило офтальмологам возможность получать более детализированную информацию о развитии пролиферативного процесса на различных стадиях заболевания.

Мультиспектральное исследование в комбинации с СОКТ и ОКТА в режиме En Face позволяет диагностировать и оценивать изменения иЭРМ на различных стадиях не только в поперечном срезе, но и по площади распространения. Использование режима En Face при ОКТА дает более глубокое представление о морфофункциональных изменениях витреоретинального интерфейса. Этот метод пока не распротранен в клинической практике, но обладает значительным потенциалом для широкого внедрения в качестве рутинного инструмента диагностики патологий глазного дна.

Вид и степень развития симптомов, которые проявляются у пациента, в большой степени зависят от толщины патологической мембраны, от степени деформации сетчатки, которую она вызывает, от ее локализации и от наличия/отсутствия макулярного отека или макулярного разрыва. При отсутствии развитых осложнений острота зрения может оставаться на достаточно высоком уровне, поэтому визометрия не позволяет полностью оценить динамику пролиферативного процесса. В помощь офтальмологу выступает микропериметрия, обеспечивающая контроль порога светочувствительности сетчатки

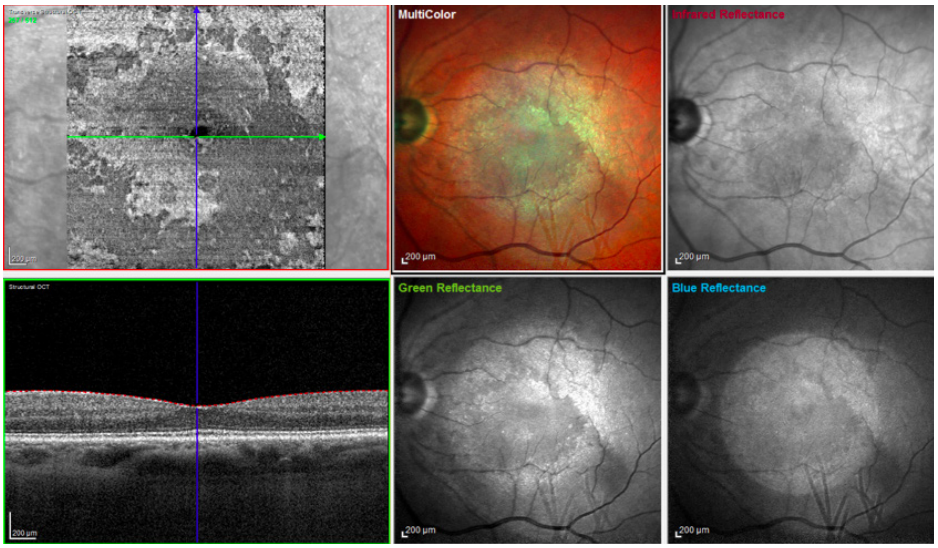


Рис. 1. Пример результатов обследования пациента с идиопатической эпиретинальной мембраной стадии 0 с применением мультимодального подхода к диагностике. Площадь и границы мембраны заметны слабо, сетчатка нескладчатая, без тракционного компонента, заметны единичные диффузные очаги фиброза

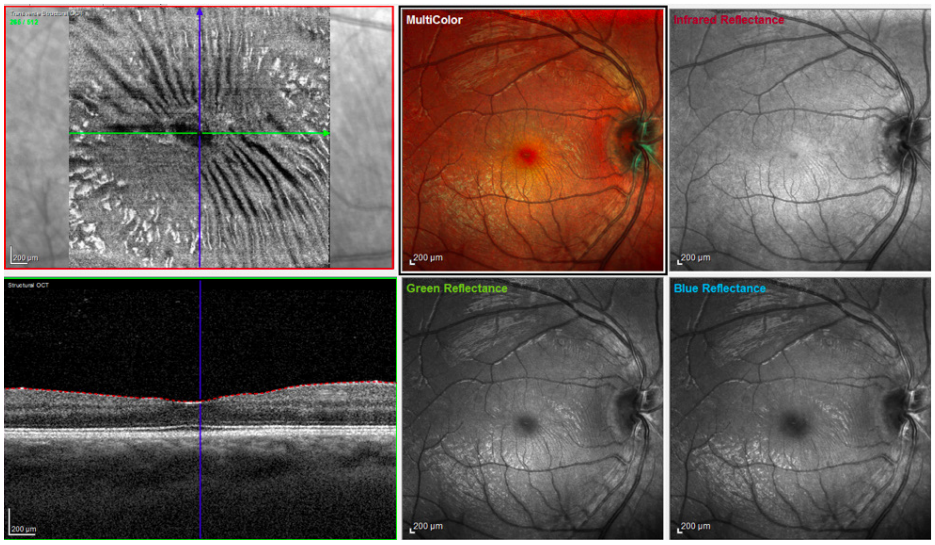


Рис. 2. Пример результатов обследования пациента с идиопатической эпиретинальной мембраной стадии 1 с применением мультимодального подхода к диагностике. Площадь и границы мембраны хорошо заметны, на сетчатке наблюдаются единичные складки, невыраженная тракция, визуализируются «ретинальная звездчатость» и «бляшки»

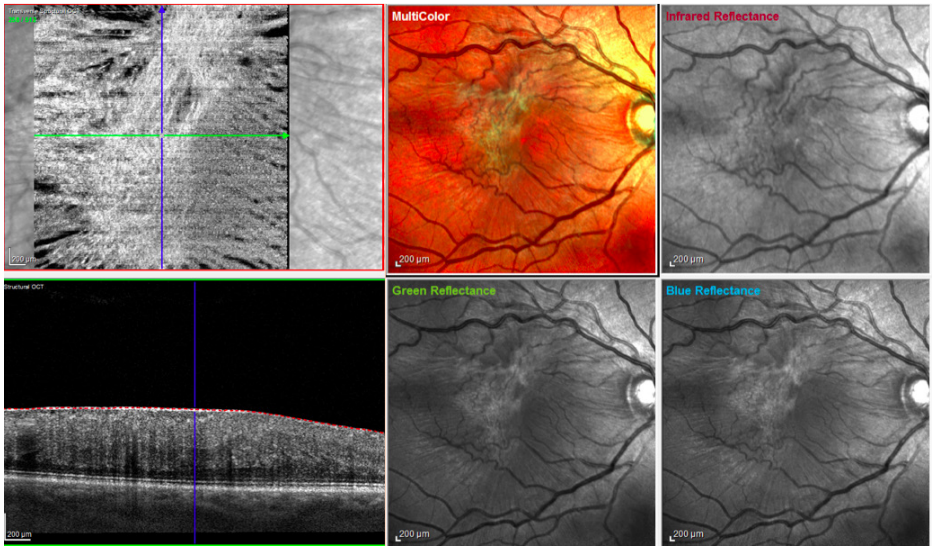


Рис. 3. Пример результатов обследования пациента с идиопатической эпиретинальной мембраной стадии 2 с применением мультимодального подхода к диагностике. Площадь и границы мембраны четкие, сетчатка с диффузной складчатостью и выраженной тракцией, фовеолярный профиль отсутствует, толщина сетчатки увеличена

центральной зоны, а также локализацию и стабильность точки фиксации взора.

Комбинация методов «золотого стандарта» и современных неизвазивных технологий является перспективным подходом для диагностики иЭРМ, выбора тактики лечения и динамического наблюдения пациентов.

ВЫВОДЫ

Основываясь на собственном практическом опыте и полученных в исследовании данных, мы можем отметить, что каждая из технологий диагностики, используемая по отдельности, не позволяет получить полное представление о морфофункциональных изменениях, характерных для эпиретинального фиброза. Применение мультимодального подхода открывает перед врачом новые возможности: он получает более подробные данные о структуре витреоретинального интерфейса при идиопатической эпиретинальной мембране различных стадий; может оценить динамику патологии не только в поперечном срезе по результатам спектральной оптической когерентной томографии, но и по площаи распространения мембраны при мультиспектральном исследовании в режиме MultiColor или OKTA в режиме En Face; может определить влияние пролиферативного процесса на качество зрения, опираясь на данные компьютерной микропериметрии. Такая информация позволит лучше планировать тактику лечения, в том числе объем и характер хирургического вмешательства.

Литература

1. Mitchell P, Smith W, Chey T, Wang JJ, Chang A. Prevalence and assocoations of epiretinal membranes. The Blue Mountains Eye Study, Australia. Ophthalmology. 1997 Jun; 104 (6): 1033–40.
2. Fraser-Bell S, Guzowski M, Rochtchina E, Wang JJ, Mitchell P. Five-year cumulative incidence and progression of epiretinal membranes: the Blue Mountains Eye Study. Ophthalmology. 2003 Jan; 110 (1): 34–40.
3. Feng H, Sharma S, Asrani SG, Stinnett S, Mruthyunjaya P. En Face imaging of retinal pathology usin multicolor confocal scanning laser ophthalmoscopy. IOVS. 2015 Jun; 56 (7): 391.
4. Restori M. Imaging the vitreous: optical coherence tomography and ultrasound imaging. Eye. 2008; 22 (10): 1251–6.
5. Лумбросо Б., Хуанг Д., Чен Ч., Цзя Я., Рисполи М., Романо А. и др. ОКТ-ангиография. Клинический атлас. СПб.: Изд-во Панфилова; 2017. с. 5–6.
6. Нестерова Е. С., Ефремова Т. Г., Хзарджан Ю. Ю., Марухненко А. М. Анализ результатов хирургического лечения эпиретинального фиброза. Современные технологии в офтальмологии. 2016; (1): 156.
7. Gass JDM. Stereoscopic atlas of macular disease. Diagnosis and treatment. Vol. 2. St. Louis, MO, USA: The C. V. Mosby Company; 1987. p. 693–5.
8. Александров А. А., Азнабаев Б. М., Мухамадеев Т. Р., Загидуллина А. Ш., Дибаев Т. И. ОКТ-ангиография: количественная и качественная оценка микрососудистого русла заднего сегмента глаза. Катарактальная и рефракционная хирургия. 2015; 15 (3): 4–9.
9. Горшков И. М., Колесник С. В., Шестопалов В. И., Миридонова А. В. Клинико-морфологические особенности клеточного состава идиопатических эпиретинальных мембран у пациентов с различной остротой зрения. Современные технологии в офтальмологии. 2016; (1): 61.
10. Куранова О. И. Изучение эффективности микроимпульсного лазерного воздействия длиной волны 577 нм при макулярном отеке после хирургического удаления идиопатической эпиретинальной мембраны [диссертация]. М.: МНТК «Микрохирургия глаза» имени академика С. Н. Федорова; 2014. 138 с.
11. Lumbroso B., Huang D., Romano A., Rispoli M., Coscas G., editors. Clinical OCT En Face Atlas. Jaypee Brothers Medical Pub; 2013. p. 355–66.
12. Водовозов А. М. Световые рефлексы глазного дна: Атлас. М.: Медицина; 1980. 224 с.
13. Bu S, Kuijer R, Li X, Hooymans J, Los L. Idiopathic epiretinal membrane. Retina. 2014 Dec; 34 (12): 2317–35. DOI: 10.1097/IAE.0000000000000349.
14. Heiferman M, Simonett J, Fawzi A. En Face OCT Imaging in Retinal Disorders. Retinal Physician. 2015; 12 (Jun 2015): 45–8, 50.
15. Dal Vecchio M, Lavia C, Nassisi M, Grignolo FM. Microperimetric Assesment after Epiretinal Membrane Surgery: 4-Year Follow-Up. J Ophthalmol. 2016 (2016), Article ID 7030791. DOI: 10.1155/2016/7030791.

References

1. Mitchell P, Smith W, Chey T, Wang JJ, Chang A. Prevalence and assocoations of epiretinal membranes. The Blue Mountains Eye Study, Australia. Ophthalmology. 1997 Jun; 104 (6): 1033–40.
2. Fraser-Bell S, Guzowski M, Rochtchina E, Wang JJ, Mitchell P. Five-year cumulative incidence and progression of epiretinal membranes: the Blue Mountains Eye Study. Ophthalmology. 2003 Jan; 110 (1): 34–40.
3. Feng H, Sharma S, Asrani SG, Stinnett S, Mruthyunjaya P. En Face imaging of retinal pathology usin multicolor confocal scanning laser ophthalmoscopy. IOVS. 2015 Jun; 56 (7): 391.
4. Restori M. Imaging the vitreous: optical coherence tomography and ultrasound imaging. Eye. 2008; 22 (10): 1251–6.
5. Lumbroso B, Khuang D, Chen Ch, Tszya Ya, Rispoli M, Romano A et al. OKT-angiografiya. Klinicheskiy atlas. Saint-PetersburgL Izdvo Pamfilova; 2017. p. 5–6. Russian.
6. Nesterova ES, Efremova TG, Khzaradzhan YuYu, Marukhnenko AM. Analiz rezultatov khirurgicheskogo lecheniya epiretinalnogo fibroza. Sovremennye tekhnologii v oftalmologii. 2016; (1): 156. Russian.
7. Gass JDM. Stereoscopic atlas of macular disease. Diagnosis and treatment. Vol. 2. St. Louis, MO, USA: The C. V. Mosby Company; 1987. p. 693–5.
8. Aleksandrov AA, Aznabaev BM, Mukhamadeev TR, Zagidullina ASh, Dibaev TI. [Quantitative and qualitative evaluation of microcirculatory blood vessels of the posterior segment using OCT angiography]. Kataraktalnaya i refraktsionnaya khirurgiya. 2015; 15 (3): 4–9. Russian.
9. Gorshkov IM, Kolesnik SV, Shestopalov VI, Miridonova AV. Kliniko-morfologicheskie osobennosti kletochnogo sostava idiopaticheskikh epiretinalnykh membran u patsientov s razlichnoy ostrotoy zreniya. Sovremennye teknologii v oftalmologii. 2016; (1): 61. Russian.
10. Kuranova OI. Izuchenie effektivnosti mikroimpulsnogo lazernogo vozdeystviya dlinoy volny 577 nm pri makulyarnom oteke posle khirurgicheskogo udaleniya idiopaticheskoy epiretinalnoy membrany [dissertation]. Moscow: MNTK “Mikrokhirurgiya glaza” imeni akademika S. N. Fedorova; 2014. 138 p. Russian.
11. Lumbroso B., Huang D., Romano A., Rispoli M., Coscas G., editors. Clinical OCT En Face Atlas. Jaypee Brothers Medical Pub; 2013. p. 355–66.
12. Vodovozov AM. Svetovye refleksy glaznogo dna: Atlas. Moscow: Meditsina; 1980. 224 p. Russian.
13. Bu S, Kuijer R, Li X, Hooymans J, Los L. Idiopathic epiretinal membrane. Retina. 2014 Dec; 34 (12): 2317–35. DOI: 10.1097/IAE.0000000000000349.
14. Heiferman M, Simonett J, Fawzi A. En Face OCT Imaging in Retinal Disorders. Retinal Physician. 2015; 12 (Jun 2015): 45–8, 50.
15. Dal Vecchio M, Lavia C, Nassisi M, Grignolo FM. Microperimetric Assesment after Epiretinal Membrane Surgery: 4-Year Follow-Up. J Ophthalmol. 2016 (2016), Article ID 7030791. DOI: 10.1155/2016/7030791.