На правах рукописи

ЗОЛОТОВ МАКСИМ ОЛЕГОВИЧ

ОПТИМИЗАЦИЯ ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКИ ПНЕВМОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ У БОЛЬНЫХ С ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ

3.1.29. Пульмонология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва - 2021

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:
заслуженный деятель науки Российской Федерации, доктор медицинских наук, профессор ***Жестков Александр Викторович***
Научный консультант:
доктор медицинских наук, доцент ***Борисова Ольга Вячеславовна***

Официальные оппоненты:
Игнатова Галина Львовна - доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, институт дополнительного профессионального образования, кафедра терапии, заведующий

Мордык Анна Владимировна – доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России, кафедра фтизиатрии, фтизиохирургии и инфекционных болезней, заведующий

Ведущая организация: ФГБОУ ВО "Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого" Минздрава России, г. Красноярск.

Защита состоится «12» октября 2021 г. в 13.00 часов на заседании диссертационного совета 24.1.264.01, созданного на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Центральный научно-исследовательский институт туберкулёза», по адресу: 107564, г. Москва, ул. Яузская аллея, дом 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулёза» (107564, г.Москва, ул. Яузская аллея, дом 2; www.critub.ru)

Автореферат разослан «__» _____ 2021 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета, д.м.н. Юхименко Наталья Валентиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Эпидемия, вызванная вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), до настоящего времени остается значимой проблемой здравоохранения во всем мире (Vansant G. et al., 2020). Создание антиретровирусных препаратов позволило увеличить продолжительность и качество жизни инфицированных больных (Беляков Н.А. и др., 2020; Краснова Е.И. и др., 2018). Однако данная терапия не способствует полной элиминации патогена, отмена терапии приводит к возобновлению репродукции вируса (Лебедева Н. Н. и др., 2018; Boritz E.A., Douek D.C., 2017).

Распространение ВИЧ на территории Российской Федерации имеет свои особенности. Выявлено, что наиболее частыми путями передачи возбудителя являются половой (преимущественно гетеросексуальный) и гемоконтактный (Беляков Н.А. и др., 2016; Беляков Н.А. и др., 2018). Кроме того, в литературных источниках отмечается увеличение возраста ВИЧ-инфицированных, что приводит к возникновению у больных сопутствующих соматических заболеваний (Дворак С.И. и др., 2012).

Вирус вызывает нарушения в работе многих органов и систем организма человека, однако отдельно стоит отметить поражения органов дыхания у ВИЧ-инфицированных больных. Более 60% пациентов с ВИЧ-инфекцией, находящихся на стационарном лечении, имеют заболевания респираторного тракта (Пузырёва Л.В. и др., 2016).

Согласно данным литературы, возбудителями внебольничной пневмонии у лиц, живущих с ВИЧ (ЛЖВ), являются условно-патогенные представители грамположительной и грамотрицательной флоры. К первой группе относятся, например, *Streptococcus pneumoniae* и *Staphylococcus aureus*; ко второй группе – *Haemophilus influenzae, Pseudomonas aeruginosa,* представители порядка *Enterobacterales* и другие (Зимина В.Н., Астафьев А.В., 2016; Дворак С.И. и др., 2019; Madedu G. et al., 2010).

ВИЧ-инфицированные пациенты относятся к группе повышенного риска по возникновению пневмококковой инфекции (Пахомов Д.В. и др., 2018). Летальность при развитии пневмококковой пневмонии с бактериемией у больных с ВИЧ достигает 57% (Glesby M.G. et al., 2015).

Эффективным и безопасным средством профилактики заболеваний, вызванных *S.pneumoniae*, является иммунизация. В настоящее время разработаны и активно используются в клинической практике полисахаридная и конъюгированная вакцины против возбудителя.

Степень разработанности темы

При анализе литературных источников нами были обнаружены противоречивые данные по эффективности полисахаридной пневмококковой вакцины у ВИЧ-

инфицированных пациентов (Николаенко В.В. и др., 2013; Hung C.C. et al., 2009; Pedersen R.H. et al., 2011). При этом проведено сравнительно небольшое количество клинических испытаний по эффективности применения 13-валентной конъюгированной вакцины (ПКВ13) у взрослых лиц, живущих с ВИЧ. В них была продемонстрирована эффективность применения препарата (Bhorat A.E. et. al., 2015; Glesby M.G. et al., 2015). К недостаткам этих исследований можно отнести отсутствие информации о влиянии вакцинопрофилактики против *S.pneumoniae* на носительство возбудителя. Также не было обнаружено данных о формировании клеток иммунологической памяти в ответ на введение препарата у пациентов с ВИЧ-инфекцией.

Таким образом, проблема иммунопрофилактики болезней органов дыхания у ВИЧ-инфицированных пациентов сохраняет свою актуальность. Нарушения в работе иммунной системы увеличивают риск возникновения пневмонии у ВИЧ-инфицированных пациентов.

Цель исследования

На основании результатов клинических, микробиологических и иммунологических исследований повысить эффективность проведения вакцинопрофилактики пневмококковой инфекции, а также разработать эффективный способ подбора схемы вакцинации против пневмококка у ВИЧ-инфицированных взрослых.

Задачи исследования:

1. Представить клинико-диагностическую характеристику ВИЧ-инфицированных больных на территории Самарской области. Оценить клиническую эффективность применения 13-валетной конъюгированной пневмококковой вакцины у взрослых лиц, живущих с ВИЧ.

2. Проанализировать показатели клеточных факторов иммунной системы, а также поствакцинальный иммунный ответ у больных с ВИЧ-инфекцией после введения 13-валетной конъюгированной вакцины через 3 месяца и 1 год.

3. Оценить особенности микробиологического пейзажа верхних дыхательных путей у взрослых ВИЧ-инфицированных пациентов.

4. Провести анализ влияния иммунизации против пневмококковой инфекции с использованием конъюгированной вакцины на микробный пейзаж верхних дыхательных путей у больных с ВИЧ-инфекцией в течение 1 года.

5. Разработать способ подбора схемы вакцинопрофилактики против пневмококковой инфекции у ВИЧ-инфицированных пациентов.

Научная новизна

В диссертации проведена оценка влияния введения конъюгированной пневмококковой вакцины на показатели иммунной системы у лиц, живущих с ВИЧ. Обнаружено, что введение препарата стимулирует образование клеток, участвующих в формировании иммунологической памяти, у ВИЧ-инфицированных взрослых, а также приводит к активации Т-клеточного звена иммунитета у больных с дефицитом Т-хелперов.

Проанализирована структура микробиологического пейзажа верхних дыхательных путей у больных с ВИЧ-инфекцией. Определено изменение состава микрофлоры задней стенки глотки после введения 13-валентной конъюгированной вакцины.

Впервые в РФ выявлена взаимосвязь между снижением количества В-лимфоцитов в периферической крови и носительством пневмококка на слизистой оболочке верхних дыхательных путей.

На основании полученных данных разработан новый способ подбора схемы вакцинопрофилактики против пневмококковой инфекции у ВИЧ-положительных пациентов.

Теоретическая и практическая значимость

В исследовании представлены данные о потенциальных возбудителях пневмонии (*S.pneumoniae* представители порядка *Enterobacterales*), показана чувствительность этих микроорганизмов к антибактериальным лекарственным средствам, что будет способствовать повышению эффективности эмпирической антибиотикотерапии.

Разработанный способ подбора схемы вакцинопрофилактики у ВИЧ-инфицированных взрослых позволяет увеличить эффективность проводимой иммунизации против пневмококковой инфекции у лиц, живущих с ВИЧ.

Методология и методы исследования

Методологический принцип работы основан на изучении работ российских и зарубежных авторов по теме исследования, проведении патентного поиска, комплексном анализе современного состояния проблемы иммунизации взрослых ВИЧ-инфицированных пациентов. Были определены цель и задачи исследования, выдвинута научная гипотеза. Для реализации поставленной цели были разработаны критерии включения пациентов в исследование и их исключения, определено надлежащее количество участников исследования, осуществлен подбор подходящих методов исследования.

Всего было включено 200 пациентов, 100 из которых получили дозу 13-валентной пневмококковой вакцины, 100 обследованных составили контрольную группу. Для оценки эффективности иммунизации каждая группа была разделена на 4 подгруппы в

зависимости от исходного уровня Т-хелперов (менее 200 клеток в мкл крови, 200-349 кл/мкл, 350-499 кл/мкл, 500 и > кл/мкл).

Период наблюдения за участниками составил 1 год. За это время было совершено 3 визита, на каждом из которых проводился сбор жалоб и анамнеза, физикальное обследование, иммунологическое и микробиологическое исследования. Для участников иммунизированной группы был проведен дополнительный визит для введения вакцины.

На этапе получения промежуточных результатов было выявлено различие в частоте обнаружения пневмококка на слизистой оболочке верхних дыхательных путей у обследованных с различным уровнем В-лимфоцитов. На основании полученных данных был разработан новый способ подбора схемы вакцинопрофилактики. Для оценки его эффективности был проведен дополнительный набор пациентов в исследование.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. У ВИЧ-инфицированных пациентов в Самарской области выявлены высокая распространенность курения табака, частые эпизоды ОРВИ и внебольничной пневмонии. Иммунизация ПКВ13 приводит к статистически значимому снижению частоты ОРВИ и внебольничной пневмонии у лиц, живущих с ВИЧ.

2. Введение 13-валентной конъюгированной пневмококковой вакцины приводит к увеличению количества клеток, участвующих в формировании иммунологической памяти у взрослых больных с ВИЧ-инфекцией. Отмечается стимуляция Т-клеточных факторов иммунитета у обследованных с исходным значением CD3+CD4+ лимфоцитов менее 500 кл/мкл крови. При этом иммунизация не вызывает статистически значимого увеличения количества В-лимфоцитов в периферической крови у данной группы пациентов.

3. У ВИЧ-инфицированных пациентов наблюдается высокий уровень носительства пневмококка и колонизации энтеробактериями слизистой оболочки задней стенки глотки. У больных с ВИЧ-инфекцией с количеством В-лимфоцитов менее 100 кл/мкл крови выявлено увеличение частоты носительства *Streptococcus pneumoniae*. Введение ПКВ13 способствуют статистически значимому снижению носительства пневмококка, однако через 3 месяца после иммунизации у обследованных отмечалось увеличение частоты высева энтеробактерий со слизистой оболочки верхних дыхательных путей.

4. Выделенные у носителей штаммы пневмококка имели низкий уровень резистентности к антибиотикам. Выявленные представители порядка *Enterobacterales* были наиболее чувствительны к защищённым пенициллинам, цефалоспоринам, аминогликозидам, карбапенемам и глицилциклинам.

5. Предложенный способ подбора схемы вакцинопрофилактики пневмококковых инфекций способствует уменьшению антигенной нагрузки на ВИЧ-инфицированных пациентов без снижения эффективности проводимой иммунизации.

Степень достоверности полученных результатов

Обоснованность полученных результатов определяется достаточным количеством участников исследования, применением современных методов лабораторной диагностики. Для оценки достоверности полученных данных использовались надлежащие методы статистического анализа.

Апробация результатов

Результаты исследования были доложены на всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 100-летию Самарского государственного медицинского университета Аспирантские чтения – 2019 «Молодые ученые: научные исследования и инновации» (Самара, 2019); научно-практической конференции «Аллергология и иммунология сегодня: новые вопросы и ответы» в рамках 40-й образовательной недели (Самара, 2020); всероссийской научно-практической конференции с международным участием Аспирантские чтения – 2020 «Молодые ученые: научные исследования и инновации» (Самара, 2020); XXX Национальном конгрессе по болезням органов дыхания (Москва, 2020).

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты исследования используются при проведении практических занятий у обучающихся на кафедрах общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии, инфекционных болезней с эпидемиологией, детских инфекций ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, а также в практической работе ГБУЗ СО «Тольяттинская городская клиническая поликлиника №3», ГБУЗ СО «Самарская городская больница №4».

Личное участие автора в получении научных результатов

Совместно с научными руководителями А.В. Жестковым и О.В. Борисовой был разработан дизайн исследования, была сформулирована цель и поставлены задачи для ее достижения. Анализ научной литературы по теме диссертации, выполнение экспериментальной части исследования, проведение статистической обработки, написание текста диссертации было проведено лично автором.

Публикации по теме диссертации

Всего по теме диссертации было опубликовано 9 печатных работ, из которых 4 в журналах, рецензируемых ВАК при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации (в том числе 2 входит в международную базу цитирования Scopus). Получен 1 патент на изобретение РФ № 2732214.

Объем и структура диссертационной работы

Диссертация состоит из следующих глав: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, 4 главы собственных исследований, заключение, выводы и практические рекомендации. Текст исследования изложен на 152 страницах машинописного текста, иллюстрирован 33 таблицами и 18 рисунками. Список литературы состоит из 183 литературных источников, из которых 108 – отечественных и 75 – зарубежных авторов.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы и методы исследования.

Исследование было проведено в период с декабря 2018 г. по сентябрь 2020 г. Рекрутирование пациентов, сбор жалоб, анамнеза, общий и биохимический анализ крови, определение маркеров вирусных гепатитов и иммунограммы проводились на базе амбулаторно-поликлинического отделения №1 ГБУЗ «Самарский областной клинический центр профилактики и борьбы со СПИД» (глав. врач – к.м.н., О.Э. Чернова).

Идентификация микроорганизмов методом MALDI-ToF масс-спектрометрии, определение чувствительности к антибиотикам были выполнены на базе кафедры общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России (зав. каф. – з.д.н. РФ, д.м.н., проф. А.В. Жестков).

Критерии включения:

1. Наличие подписанного информированного согласия на участие в исследовании.
2. Лица мужского и женского пола в возрасте от 18 до 75 лет.
3. Подтвержденный методом иммунноблоттинга диагноз ВИЧ-инфекции.
4. Положительный ВИЧ-статус не менее 6 месяцев и более.
5. Пациенты с уровнем CD3+CD4+ лимфоцитов периферической крови более 50 клеток в 1 мкл крови.
6. Длительность приема антиретровирусной терапии − 6 месяцев и более.
7. Уровень РНК ВИЧ в крови менее 50 000 копий в 1 мл крови.
8. Отсутствие у обследуемого острого респираторного заболевания на момент осмотра перед вакцинацией.
9. Отсутствие обострений хронических заболеваний сердечно-сосудистой, бронхолегочной и центральной нервной систем, ЛОР-органов, печени, почек.
10. Отказ от использования других вакцинных препаратов на весь период исследования.

Критерии исключения:

1. Лица младше 18 и старше 75 лет.

2. Отказ от подписания информированного согласия участником исследования.

3. Беременные женщины или женщины, планирующие беременность на весь период исследования (1 год) и в течение полугода после его окончания.

4. Повышенная чувствительность к дифтерийному анатоксину и другим компонентам препарата.

5. Острые реакции на введение вакцин в анамнезе.

6. Предшествующая иммунизация пневмококковыми вакцинами.

Дизайн исследования: экспериментальное открытое проспективное нерандомизированное сравнительное.

На весь период исследования для больных было запланировано 4 визита. Все процедуры, которые были выполнены участникам исследования, представлены в таблице 1.

Всего участие в исследовании было предложено 769 ВИЧ-инфицированным. Однако по причинам несоответствия критериям включения или исключения или при нежелании ЛЖВ принимать участие в исследовании, в итоге было рекрутировано 200 ВИЧ-инфицированных пациентов. Участники были разделены на две группы:

I. Группа пациентов, иммунизированных конъюгированной пневмококковой вакциной (n=100).

II. Группа контроля, не подвергшаяся вакцинации (n=100).

При отсутствии клинически значимых отклонений в результатах лабораторных исследований, которые были получены на визите 1, обследованным, включенным в иммунизированную группу, осуществлялось введение пневмококковой полисахаридной конъюгированной абсорбированной, тринадцативалентной вакцины (ПКВ13) (Превенар® 13, регистрационное удостоверение № ЛП-000798) в дельтовидную мышцу.

При получении первичных результатов через 3 месяца после начала исследования было выявлено, что у пациентов со сниженным количеством В-лимфоцитов носительство пневмококка выявляется чаще, чем у ЛЖВ с нормальным содержанием CD19+ клеток. В связи с этим было принято решение провести дополнительную иммунизацию 23-валентной полисахаридной пневмококковой вакциной (ППВ23) (вакцина пневмококковая, поливалентная; регистрационный номер ЛП-003441; торговое название – Пневмовакс® 23) для изучения возможности изменения схемы вакцинопрофилактики у ВИЧ-инфицированных пациентов.

Таблица 1 – Дизайн исследования

Исследуемые параметры	Визит 1	Визит 2 (5±2 дня)*	Визит 3 (3 мес.)	Визит 4 (12 мес.)
Подписание информированного согласия на участие в исследовании	+	–	–	–
Сбор жалоб, анамнеза, физикальный осмотр	+	+	+	+
Микробиологическое исследование мазка с задней стенки глотки	+	–	+	+
Общий анализ крови с лейкоцитарной формулой	+	–	+	+
Биохимический анализ крови	+	–	–	–
Определение HBs-антигена, анти-HCV	+	–	–	–
Иммунологическое обследование (определение CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD19+, CD45RO+ лимфоцитов периферической крови)	+	–	+	+
Определение уровня РНК ВИЧ в периферической крови методом полимеразной цепной реакции	+	–	+	+
Проведение цифровой флюорографии	+**	–	–	+**
Подписание согласия на иммунизацию	–	+	–	–
Вакцинация	–	+	–	–

* визит проводился только для участников иммунизированной группы.
** обследованию подвергались пациенты, у которых результаты последнего рентгенологического исследования были получены более 6 месяцев на момент проведения визита.

Для подтверждения выдвинутой гипотезы было произведено увеличение количества участников исследования. Учитывая, что наблюдение за пациентами, получившими дозу конъюгированной вакцины и с исходным снижением CD19+ клеток, согласно дизайну исследования, продолжалось в течение года, их включение было невозможно. Был осуществлен дополнительный набор пациентов. Из 87 больных, которые подписали информированное согласие и были дополнительно рекрутированы в

исследование, после проведения иммунологического (определение уровней CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+ и CD19+ лимфоцитов в периферической крови) и микробиологического обследований (выявление носительства пневмококка) был выявлен 31 участник с дефицитом В-лимфоцитов. ПКВ13 для этой группы вводилась после подписания согласия на вакцинацию через 5±2 дня после получения результатов обследований, а ППВ23 через 8 недель с момента введения конъюгированной вакцины. Иммунологическое и микробиологическое исследования им повторяли через год после применения ППВ23.

Участникам исследования, у которых количество В-лимфоцитов на момент начала исследования было выше 100 кл/мкл, полисахаридная вакцина вводилась через 1 год после иммунизации ПКВ13. Через 8 недель, прошедших с момента вакцинации ППВ23, больным проводилось определение CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+ и CD19+ лимфоцитов, а также выполнялось микробиологическое исследование для обнаружения носителей пневмококка.

Иммунологическое исследование. Исследование периферической венозной крови после проведения пробоподготовки было выполнено методом проточной цитофлуориметрии на приборе Navios (Beckman Coulter, Inc, США). Определялись популяций и субпопуляций лимфоцитов: CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD19+, CD45RO+ в периферической крови с помощью реактивов Beckman Coulter, Inc, США.

Анализ иммунограммы у ВИЧ-инфицированных больных проводился на основе выраженности иммунодефицита. В зависимости от количества Т-хелперов было сформировано 4 подгруппы пациентов: 1. Уровень CD3+CD4+ лимфоцитов от 50 до 199 кл/мкл крови; 2. Уровень CD3+CD4+ лимфоцитов 200-349 кл/мкл; 3. Уровень CD3+CD4+ лимфоцитов 350-499 кл/мкл; 4. Уровень CD3+CD4+ лимфоцитов 500 и более кл/мкл.

Микробиологическое исследование. У всех больных, принимавших участие в исследовании, проводили взятие мазка с задней стенки глотки. Посев биоматериала проводили на следующие питательные среды: 5% кровяной агар (HiMedia, Индия), шоколадный агар (HiMedia, Индия), среда Сабуро (HiMedia, Индия), универсальные хромогенные среды (HiMedia, Индия). Идентификация выделенных штаммов осуществлялась методом матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации времяпролетной (MALDI-ToF) масс-спектрометрии на приборе Microflex LT (Bruker Daltonik GmbH, Германия). Полученные результаты оценивали с помощью программного обеспечения MALDI Biotyper RTC согласно рекомендациям фирмы-производителя.

При выявлении в биоматериале представителей порядка *Enterobacterales* или *S.pneumoniae* определялась чувствительность выделенных штаммов к антибиотикам

диско-диффузионным методом в соответствии с клиническими рекомендациями (Клинические рекомендации Министерства здравоохранения РФ «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам», версия 2015-02). В исследовании использовались коммерческие диски (Bio-Rad Laboratories, Inc., США). Для идентификации пневмококка дополнительно применялись тесты с оптохином и желчью.

Статистические методы. Сбор и обработка полученных данных проводились на персональном компьютере с процессором Intel Atom Z3735F (операционная система Windows 8) в программе Microsoft Office Excel 2015 (Microsoft Corporation, США), с использованием программы Statistica 13.0 (STATSOFT, США; лицензия 2883). Все исследуемые выборки были распределены ненормально, поэтому к их исследованию применялись методы непараметрической статистики. Были рассчитаны медиана, 25-ый и 75-ый процентиль. При сравнении выборок результаты считались статистически значимыми при значении уровня значимости (p) менее 0,05.

Результаты исследования.

В исследование было включено 200 ВИЧ-инфицированных участников. Среди иммунизированных обследованных значение величины возраста варьировало в диапазоне от 24 до 73 лет (медиана – 36,5 лет; 25-й процентиль – 32,0; 75-й процентиль – 44,2). В данной группе распределение по полу было равномерным: 50% мужчин и 50% женщин.

В контрольную группу были включены пациенты в возрасте от 21 до 68 лет, медиана составила 39,0 лет (25-й процентиль – 36,0; 75-й процентиль – 43,0). В данной группе 53% участников исследования были мужского пола, 47% – женского.

1. Факторы риска возникновения заболеваний органов дыхания у ВИЧ-инфицированных пациентов.

На визите 1 проводился сбор информации о табакокурении у участников исследования. Среди всех обследованных было выявлено 100 курильщиков (53 - в иммунизированной группе, 47 - в контрольной), 4 бывших курильщика (по 2 в каждой из групп), 96 пациентов не курили.

Значение индекса курящего человека более 160 выявлено у 79% курящих пациентов иммунизированной группы и 70% потребителей табака из контрольной группы. Среди курильщиков у 74% участников иммунизированной и 68% контрольной групп величина индекса «пачка-лет» была свыше 10.

Кроме того, среди участников исследования 4 добровольца работали на производствах, способствующих развитию профессиональных болезней легких (2 работника косметической промышленности, 1 электросварщик и 1 трудящийся на производстве цемента).

На момент включения в исследование не было выявлено статистически значимых различий в частоте эпизодов острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ) между группами. Через год после проведения исследования определено статистически значимое снижение количества эпизодов ОРВИ (p=0,0002) в группе иммунизированных пациентов. У пациентов контрольной группы отличия не имели статистической значимости (p=0,746).

Одним из самых частых заболеваний у ВИЧ-положительных пациентов является внебольничная пневмония. Из 200 участников исследования 14% имели один или несколько эпизодов воспаления в легочной ткани в анамнезе. В течение 1 года после введения ПКВ13 у пациентов иммунизированной группы было выявлено статистически значимо меньшее число внебольничных пневмоний по сравнению с контрольной группой (p=0,035).

2. Иммунологическое обследование участников исследования.

Результаты иммунологического обследования выявили, что у ВИЧ-инфицированных больных с выраженным дефицитом Т-хелперов (менее 350 кл/мкл) наблюдается снижение общего количества Т-лимфоцитов.

При этом в целом для популяции ЛЖВ свойственно повышение абсолютного количества CD3+CD8+ клеток. Однако среди пациентов, у которых уровень Т-хелперов менее 200 кл/мкл периферической крови, повышенные значение CD3+CD8+ лимфоцитов встречаются реже (10,3%), чем у ВИЧ-инфицированных с количеством CD3+CD4+ в диапазоне 200-349 кл/мкл (21,4%), 350-499 кл/мкл (20,0%) и нормальным уровнем CD3+CD4+ лимфоцитов (27,4%).

На визите 1 было зарегистрировано снижение количества В-лимфоцитов у 33,0% ВИЧ-инфицированных. При этом нами не обнаружено взаимосвязи между значениями уровня CD19+ клеток ниже нормы и изменениями количества других исследованных популяций и субполяций лимфоцитов.

Анализ результатов иммунограммы у ЛЖВ после проведенной иммунизации выявил, что введение ПКВ13 приводит к стимуляции Т-клеточного звена иммунитета у обследованных. На момент начала исследования было обнаружено 19 участников иммунизированной группы со сниженным количеством CD3+ клеток. Однако через 3 месяца после введения препарата недостаток данной популяции лимфоцитов зарегистрирован у 10 обследованных, а через год после введения не обнаружено лиц с дефицитом CD3+ лимфоцитов. В контрольной группе выраженной динамики изменений данного показателя не отмечено. На визите 1 обнаружено 22 участника со сниженным значением общего количества Т-лимфоцитов, на визите 3 дефицит был выявлен у 18 обследованных, на визите 4 – у 17 пациентов.

Также обнаружена тенденция уменьшения количества больных с выраженным дефицитом Т-хелперов после вакцинации. До введения препарата количество CD3+CD4+ клеток менее 200 кл/мкл крови в иммунизированной группе отмечалось у 19 обследованных, через 3 месяца после использования ПКВ13 было выявлено 14 таких пациентов, а через год их количество сократилось до 9. В контрольной группе на визитах 1 и 3 было обнаружено по 25 таких участников, а на визите 4 их число увеличилось до 26.

Больных с начальным уровнем CD3+CD4+ лимфоцитов в диапазоне 200-349 кл/мкл в иммунизированной группе было 20, через 3 месяца после введения вакцины их количество сократилось до 17, а через год возросло до 18 пациентов. В контрольной группе было зарегистрировано снижение количества пациентов с количеством CD3+CD4+ клеток 200-349 кл/мкл с 14 на визите 1 до 9 и 8 на визитах 3 и 4, соответственно.

Введение ПКВ13 приводит к снижению количества пациентов с дефицитом субпопуляции Т-хелперов среди ВИЧ-инфицированных. Через 1 год после использования препарата число пациентов с выраженным дефицитом CD3+CD4+ клеток (менее 350 кл/мкл) сократилось с 39 на момент начала исследования до 31. В контрольной группе на визите 1 было также выявлено 39 таких больных, а на визите 4 их количество составило 34.

Всего на визите 1 обнаружено 17 участников иммунизированной группы с уровнем CD3+CD4+ клеток от 350 до 499 кл/мкл. Через 3 месяца после введения препарата отмечалось увеличение количества больных до 21, через год – до 22. На момент начала исследования в контрольной группе был 21 такой участник, на визите 3 их число увеличилось до 22, а на визите 4 – до 25 лиц.

При этом наибольший прирост выявлен в иммунизированной группе среди пациентов с нормальным уровнем Т-хелперов. Если перед введением препарата было обнаружено 44 обследованных, то через 3 месяца их число возросло до 47, а через год – до 51. В то время как в контрольной группе изначально таких больных было 40, к визиту 3 их число увеличилось до 44, а на 4 визите зарегистрирован 41 участник с нормальным уровнем CD3+CD4+ клеток.

Снижение количества субпопуляции цитотоксических Т-лимфоцитов было обнаружено у 2 ЛЖВ, получивших дозу ПКВ13, и у 1 обследованного из контрольной группы на момент начала исследования. При этом через 3 месяца их количество в обеих группах сократилось до 0 и не повышалось до конца периода наблюдения.

Введение ПКВ13 не вызывает выраженной стимуляции В-клеточного звена иммунной системы. На момент начала исследования дефицит популяции CD19+ клеток был выявлен у 31 обследованного иммунизированной группы. Через 3 месяца количество

таких пациентов возросло до 35, а через год их число уменьшилось до 30. Среди участников контрольной группы на визите 1 зарегистрировано снижение ниже нормальных значений CD19+ клеток у 35 больных, на визите 3 – у 34, а на визите 4 – у 33 ЛЖВ.

При этом воспалительный процесс, вызванный введением препарата, не носит гиперергического характера. До начала исследования повышение популяции CD3+ клеток наблюдалось у 9 обследованных, через 3 месяца также у 9 пациентов, а через год – у 8 больных. Значение Т-хелперов выше нормы было обнаружено только у одного ВИЧ-инфицированного на визите 3. Участников с количеством субпопуляции CD3+CD8+ лимфоцитов, превышающим референсные, до вакцинации и на визите 3 было выявлено по 24, а на визите 4 – 26 обследованных. Уровень CD19+ клеток более 500 кл/мкл на момент начала исследования был зарегистрирован у 3 больных, через 3 месяца их число сократилось до 2 и больше не изменялось.

Кроме того, выявлено, что иммунизация ПКВ13 вызывает прирост клеток, участвующих в формировании иммунологической памяти, у ЛЖВ. Через 3 месяца после введения препарата определено статистически значимое увеличение количества CD45RO+ лимфоцитов по сравнению с исходными значениями у пациентов независимо от количества Т-хелперов. Выявленное повышение сохранялось на протяжении года (рисунок 1).

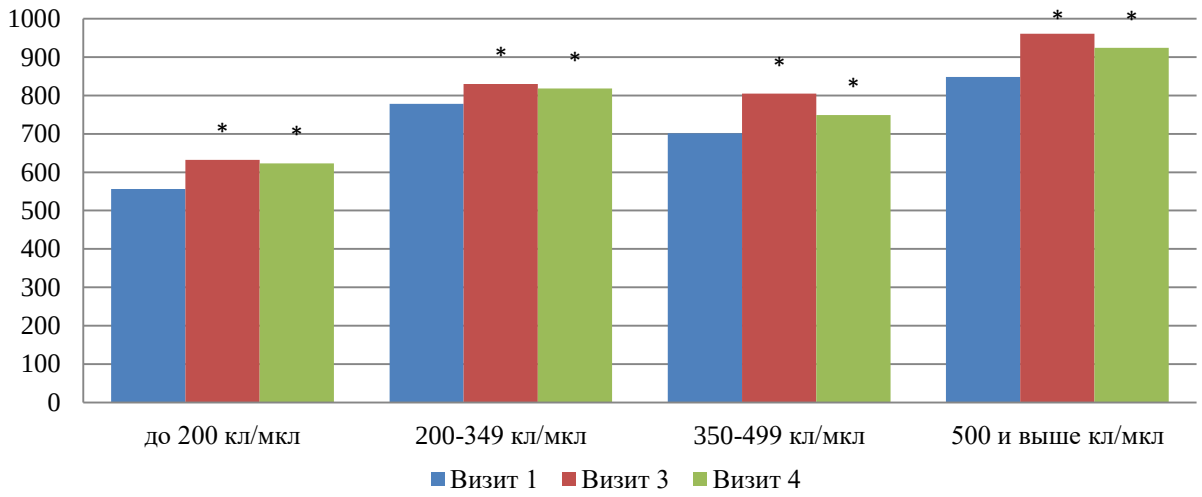

Рисунок 1 – Медиана уровня CD45RO+ клеток у пациентов иммунизированной группы с различным уровнем Т-хелперов (абсолютные значения). * $p<0,05$ по сравнению с визитом 1

Однако у обследованных ЛЖВ из контрольной группы не обнаружено значимых изменений в уровнях клеток иммунологический памяти (рисунок 2).

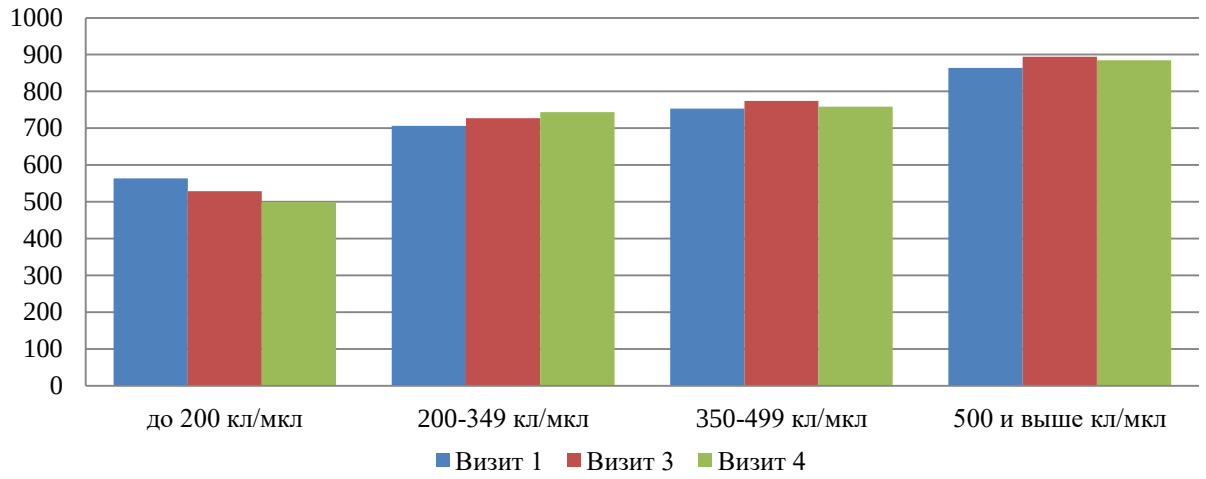

Рисунок 2 – Медиана уровня CD45RO+ клеток у пациентов контрольной группы с различным уровнем Т-хелперов (абсолютные значения)

Увеличение количества данной субпопуляции лимфоцитов может служить критерием эффективности проведенной вакцинопрофилактики.

У лиц старше 65 лет снижается эффективность иммунного ответа, что связано с недостаточной реактивностью организма. В наше исследование были включены 4 пациента данной возрастной группы, которым была введена ПКВ13. У обследованных не было выявлено статистически значимого увеличения количества исследованных популяций и субпопуляций лимфоцитов. Однако, учитывая небольшое количество участников, сложно сделать вывод о репрезентативности полученных результатов.

3. Микробиологическое исследование пациентов.

Всего за время исследования были выделены представители 31 рода микроорганизмов. Учитывая большое разнообразие выделенных и идентифицированных штаммов, они были разделены на группы. Были объединены все стрептококки, за исключением пневмококка. В связи с высокой этиологической значимостью и проведением вакцинопрофилактики против возбудителя штаммы *S.pneumoniae* были выделены отдельно. Также были сформированы следующие группы: стафилококки, грибы рода *Candida*, представители неферметирующих грамотрицательных бактерий (НФГОБ). Кроме того, были выделены микроорганизмы из порядка *Enterobacterales*. В отдельную группу были отнесены представители семейства *Micrococcaceae*. Остальные микроорганизмы, обнаруженные у пациентов, не имели клинической значимости или были выявлены в единичных случаях, поэтому были объединены в группу «другие микроорганизмы». Всего за время исследования было выделено и идентифицировано 2440 штаммов микроорганизмов.

Результаты микробиологического исследования мазка с задней стенки глотки у ВИЧ-инфицированных больных демонстрируют высокий уровень носительства *S.pneumoniae.* Так, у 15,5% участников исследования был выделен и идентифицирован пневмококк. Кроме того, обращает на себя внимание высокая частота колонизации слизистой оболочки верхних дыхательных путей (ВДП) энтеробактериями (21,0%).

Также выявлен высокий уровень колонизации слизистых оболочек ВИЧ-инфицированных больных грибами рода *Candida*. На визите 1 из 200 обследованных кандиды были обнаружены на задней стенке глотки у 35 (17,5%) пациентов. При этом представители *Candida* spp. выявлялись как у пациентов с дефицитом Т-хелперов, так и с их нормальным значением.

В исследовании продемонстрировано снижение носительства пневмококка после использования ПКВ13 у пациентов с ВИЧ-инфекцией. До начала исследования в иммунизированной группе *S.pneumoniae* был выделен у 16 обследованных. Уже через 3 месяца после введения препарата отмечалось двукратное снижение числа пациентов, у которых был идентифицирован микроорганизм (8 обследованных), однако выявленная тенденция не имела статистической значимости (p=0,153). Через год после вакцинации у 5 участников исследования патоген был высеян со слизистой оболочки задней стенки глотки. Данная разница имеет статистически значимое отличие (p=0,012) по сравнению с результатами, полученными до введения ПКВ13 (рисунок 3).

У участников контрольной группы носительство возбудителя практически не менялось в течение года. На визите 1 пневмококк был выделен у 15 обследованных, на визите 2 – у 16 больных, а на визите 3 – у 17.

Через 3 месяца после начала исследования у участников иммунизированной группы отмечалось увеличение частоты высева энтеробактерий с задней стенки глотки, однако данные различия не имели статистической значимости (p=0,117). Через 12 месяц количество выделенных штаммов представителей порядка *Enterobacterales* было близко к довакцинальным значениям (30 и 25 штаммов, соответственно).

Микробиологический пейзаж микрофлоры ВДП участников контрольной группы не имел статистически значимых отличий на протяжении года (p>0,05). У пациентов сохранялась высокая частота носительства пневмококка в течение всего периода наблюдения (рисунок 4).

Также у обследованных, не получивших дозу вакцины, не выявлено выраженных изменений частоты высева представителей порядка *Enterobacterales*.

Определение чувствительности *S.pneumoniae* к антибиотикам выявило следующие особенности. Выделенные штаммы пневмококка не были резистентны к лекарственным

средствам из групп: пенициллины, гликопептиды, тетрациклины, фторхинолоны и карбапенемы. Определялась устойчивость к макролидам, однако, учитывая относительно небольшое количество исследованных штаммов, сложно сделать вывод об ее распространенности. В нашем исследовании за весь период наблюдения у 3 пациентов контрольной группы и 1 участника, получившего дозу ПКВ13, были выделены штаммы *S.pneumoniae*, резистентные к эритромицину.

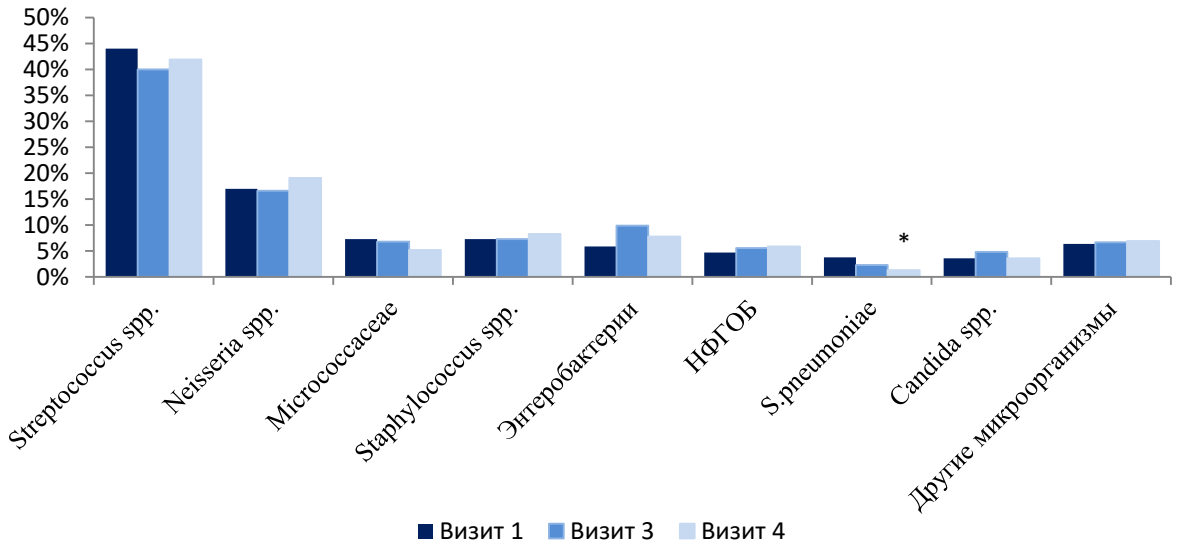

Рисунок 3 – Сравнение микробиологического пейзажа микрофлоры ВДП у пациентов иммунизированной группы на момент начала исследования, через 3 и 12 месяцев. * – значение p<0,05 по сравнению с визитом 1

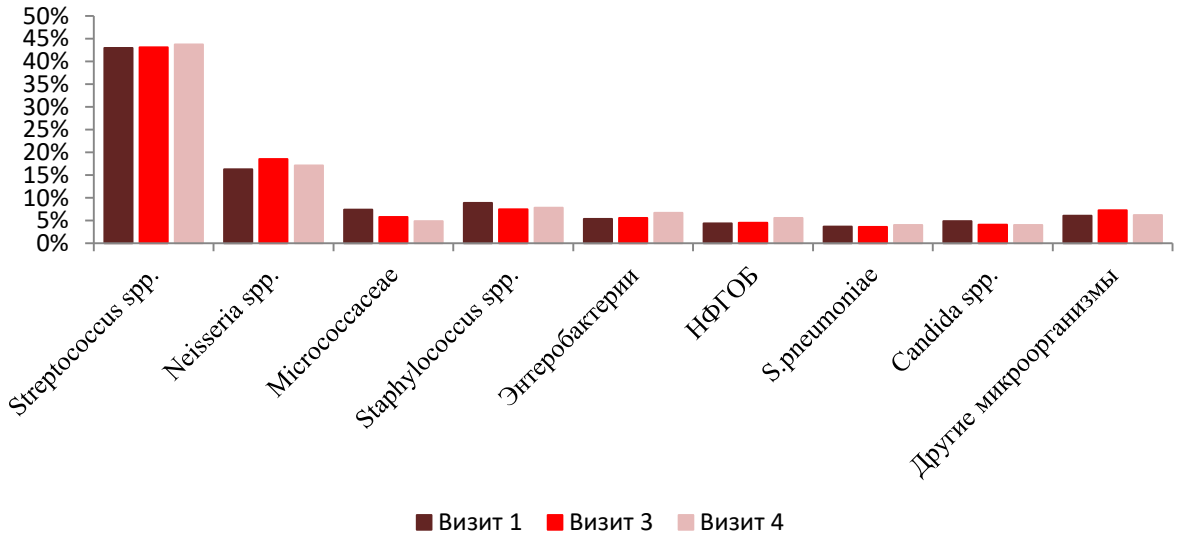

Рисунок 4 – Сравнение микробиологического пейзажа микрофлоры ВДП у пациентов контрольной группы на момент начала исследования, через 3 и 12 месяцев

При изучении резистентности микроорганизмов порядка *Enterobacterales* был выявлен наибольший уровень устойчивости для препаратов из группы пенициллинов (89,4-91,2%) и тетрациклинов (82,1-85,1%). При этом в течение года 44,7-50,9% выделенных микроорганизмов были резистентны к фторхинолонам. Для 3 групп препаратов количество резистентных штаммов имело близкие значения: 22,8-25,7% – для аминогликозидов, 22,8-28,3% – для цефалоспоринов и 25,0-28,1% – для защищенных пенициллинов. Наилучшие показатели чувствительности были выявлены для глицилциклинов (100%) и карбапенемов (93,3-98,2%).

4. Взаимосвязь между изменениями в иммунограмме и носительством пневмококка у ВИЧ-инфицированных пациентов.

Было обнаружено, что носительство пневмококка выявляется статистически значимо чаще у лиц со сниженным количеством В-лимфоцитов (p=0,003) (рисунок 5).

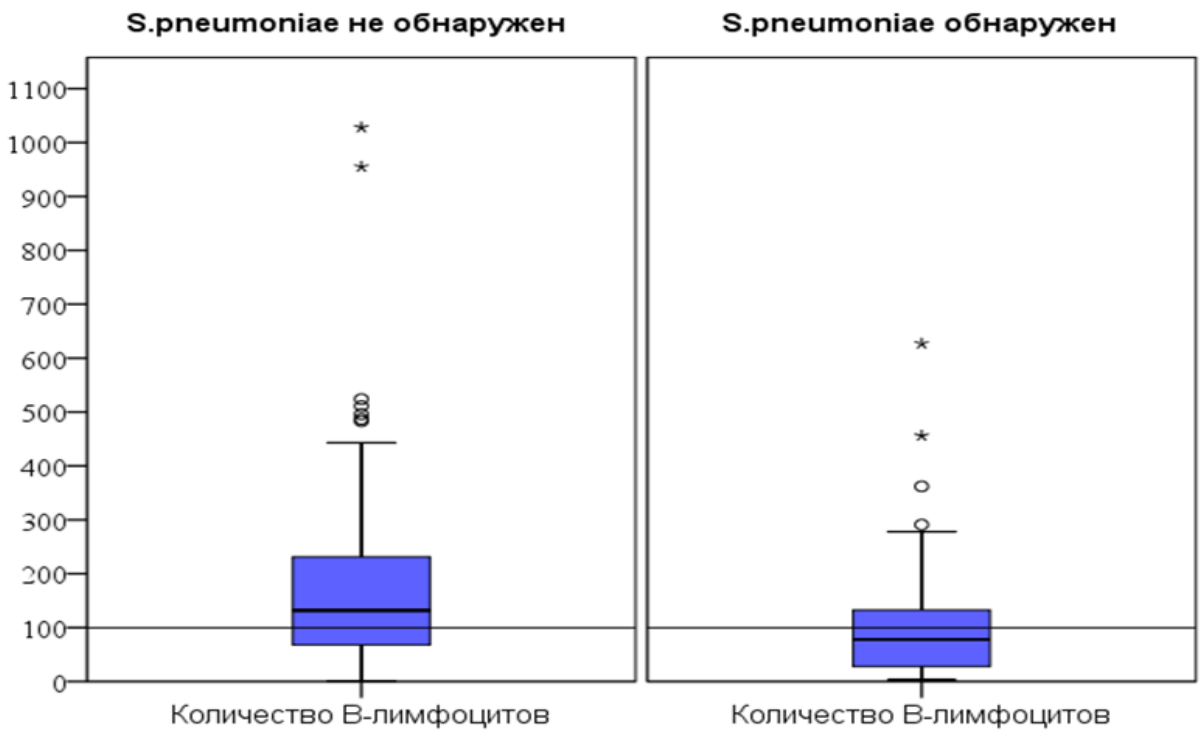

Рисунок 5 – Значение уровня В-лимфоцитов у ЛЖВ-носителей пневмококка (абсолютные значения)

Учитывая полученные данные, нами был предложен новый способ подбора схемы вакцинопрофилактики пневмококковых инфекций у ВИЧ-инфицированных пациентов в зависимости от уровня В-лимфоцитов. При обнаружении снижения количества данной субпопуляции ниже 100 кл/мкл ВИЧ-инфицированным рекомендуется проведение

иммунизации против *S.pneumoniae* по ускоренной схеме: 1 доза ПКВ13, не ранее чем через 8 недель – введение ППВ23. У ЛЖВ с нормальным или повышенным содержанием В-клеток в периферической крови вакцина вводится по обычной схеме: 1 инъекция ПКВ13, через 12 месяцев больной получает 1 дозу ППВ23. На данный способ был получен патент на изобретение РФ № 2732214.

Такое разделение препятствует излишней антигенной нагрузке ВИЧ-инфицированных больных с нормальным содержанием В-лимфоцитов. Кроме того, при сокращении периода между введением вакцин возможно увеличение частоты нежелательных явлений на применяемый препарат.

При сравнении частоты эпизодов внебольничной пневмонии за период наблюдения не было обнаружено статистически значимых различий в группах, иммунизированных по ускоренной и обычной схемам (p=0,690).

Частота возникновения нежелательных реакций у пациентов, иммунизированных по ускоренной схеме, по сравнению с пациентами, у которых вакцинация проводилась с интервалом в 1 год, была сопоставима. При этом побочные реакции носили как местный (покраснение и отек в месте инъекции, болезненность при введении препарата), так и системный характер (повышение температуры тела). Однако системных аллергических реакций (крапивница, анафилаксия, ангионевротический отек) зарегистрировано не было.

Увеличение популяций и субпопуляций лимфоцитов периферической крови у обследованных групп после проведенной иммунизации было статистически значимо. Величина p-критерия в группе, иммунизированной с интервалом в 1 год, для CD3+ клеток составила 0,046, для CD3+CD4+ была 0,003, для CD3+CD8+ и CD19+ клеток – 0,010. У больных, вакцинированных по ускоренной схеме, также наблюдалось статистически значимое увеличение абсолютного количества Т-лимфоцитов (p=0,0003), Т-хелперов (p<0,0001), цитотоксических Т-лимфоцитов (p=0,002), В-лимфоцитов (p<0,0001).

В обеих группах отмечалось снижение носительства пневмококка. У 7 больных, иммунизированных по стандартной схеме, был выделен микроорганизм на визите 1, а на момент окончания исследования – только у 2 обследованных (p=0,099). В группе вакцинированных по ускоренной схеме произошло снижение количества пациентов-носителей *S.pneumoniae* с 8 до 2 ЛЖВ (p=0,047).

Таким образом, введение 13-валентной конъюгированной пневмококковой вакцины у ВИЧ-инфицированных взрослых способствует улучшению клинической симптоматики (снижение частоты эпизодов ОРВИ и пневмонии), приводит к образованию клеток иммунологической памяти независимо от исходного уровня Т-хелперов. Кроме того, введение ПКВ13 снижает носительство *S.pneumoniae* среди ЛЖВ.

ВЫВОДЫ.

1. У пациентов с ВИЧ-инфекцией выявлена высокая частота возникновения ОРВИ (63,5%), внебольничной пневмонии (14,0%) и туберкулеза (19,5%). При этом иммунизация 13-валентной конъюгированной пневмококковой вакциной приводит к статистически значимому снижению количества эпизодов ОРВИ (p=0,0002) и внебольничной пневмонии (p=0,035) у обследованных пациентов в течение года.

2. Введение 13-валентной конъюгированной пневмококковой вакцины стимулирует Т-клеточное звено иммунной системы (CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+ лимфоциты периферической крови) у ЛЖВ с исходным значением Т-хелперов менее 500 клеток в 1 мкл крови. Кроме того, продемонстрировано увеличение количества клеток иммунологической памяти после введения ПКВ13 у ВИЧ-инфицированных взрослых.

3. Отмечается высокий уровень носительства пневмококка (15,5%), а также колонизация представителями порядка *Enterobacterales* (21,0%) слизистой оболочки задней стенки глотки у ВИЧ-инфицированных больных.

4. Через 1 год после вакцинации ПКВ13 происходит статистически значимое снижение носительства *S.pneumoniae* у пациентов с ВИЧ-инфекцией. При этом происходит увеличение колонизации слизистых оболочек энтеробактериями.

5. Выявлена взаимосвязь между снижением количества В-лимфоцитов в периферической крови ниже нормальных значений и обнаружением пневмококка на слизистых оболочках верхних дыхательных путей.

6. На основании полученных результатов предложено изменение схемы вакцинопрофилактики пневмококковых инфекций у ЛЖВ. По ускоренной схеме (1 доза ПКВ13, не ранее, чем через 8 недель ППВ23) иммунизация проводится ВИЧ-инфицированным больным с дефицитом CD19+ клеток. Пациентам с нормальным количеством данной популяции лимфоцитов ППВ23 вводится через 1 год после использования ПКВ13.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Необходимо увеличивать применение вакцинации ПКВ13 среди ВИЧ-инфицированных пациентов. Введение данного препарата снижает частоту распространения пневмококка, а также способствует снижению количества эпизодов пневмонии и ОРВИ у ЛЖВ.

2. Для оценки эффективности вакцинации против пневмококка и формирования групп риска возникновения инфекций, вызванных бактериальными возбудителями среди ЛЖВ, целесообразно определение уровня CD19+ клеток в периферической крови.

3. У ВИЧ-инфицированных пациентов необходимо регулярное микробиологическое исследование мазка с задней стенки глотки с определением чувствительности к антиинфекционным препаратам.

4. Рекомендуется использовать в практической работе врачей пульмонологов и инфекционистов предложенный способ подбора схемы иммунизации против *S.pneumoniae* – это повышает эффективность проведения профилактики пневмококковой инфекции у взрослых ВИЧ-инфицированных за счет уменьшения антигенной нагрузки на больных, а также снижает возможность развития нежелательных явлений, вызванных сокращением периода между введениями ПКВ13 и ППВ23.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Дальнейшее изучение клинических, гематологических, иммунологических и микробиологических показателей у пациентов с ВИЧ-инфекцией будет способствовать выявлению пациентов с факторами рисками возникновения пневмонии.

Разработка способов нормализации микробиологического состава ВДП, после проведенной вакцинопрофилактики пневмококковой инфекции у ВИЧ-инфицированных пациентов, позволит повысить эффективность иммунизации.

Необходимо провести анализ эффективности вакцинации пневмококковыми вакцинами у взрослых ВИЧ-инфицированных больных, которые не получают антиретровирусную терапию, а также у ЛЖВ старше 65 лет.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Новые возбудители заболеваний респираторного тракта у иммунокомпрометированных пациентов (обзор литературы) / Д.Д. Исматуллин, М.О. Золотов, А.В. Лямин [и др.] // Наука и инновации в медицине. – 2018. – Т. 4, № 3 – С. 19–24.

2. Золотов, М.О. Особенности микробиологического пейзажа возбудителей пневмонии у ВИЧ-инфицированных пациентов. Методы профилактики инфекционных поражений легких у иммунокомпрометированных пациентов (обзор литературы) / М.О. Золотов // Аспирантский вестник Поволжья. – 2018. – № 5–6. – С. 109–115.

3. Золотов, М.О. Антибиотикорезистентность штаммов *S.pneumoniae* в г. Самара / М.О. Золотов, Д.Д. Исматуллин // Аспирантские чтения – 2019 «Молодые ученые: научные исследования и инновации». Материалы всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвящённой 100-летию Самарского государственного медицинского университета. – Самара, 2019. – С. 114–116.

4. Динамика резистентности к антибактериальным препаратам штаммов *Streptococcus pneumoniae* за период 2015–2019 гг. в Самаре и возможности ее

преодоления / С.С. Собина, М.О. Золотов, А.В. Лямин [и др.] // Пульмонология. – 2020. – Т. 30, № 2. – С. 219–226.

5. Золотов, М.О. Особенности микрофлоры верхних дыхательных путей у ВИЧ-положительных пациентов / М.О. Золотов // Аспирантские чтения «Молодые ученые: научные исследования и инновации» 2020. Материалы всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – Самара, 2020. – С. 99–101.

6. Золотов, М.О. Изменения микрофлоры верхних дыхательных путей у ВИЧ-инфицированных пациентов через 3 месяца после иммунизации ПКВ13 / М.О. Золотов // XXX национальный конгресс по болезням органов дыхания с международным участием. Сборник трудов конгресса. Москва, 2020. – С. 27.

7. Жестков, А.В. Влияние иммунизации ПКВ13 на клеточные показатели иммунной системы у ВИЧ-инфицированных пациентов / А.В. Жестков, М.О. Золотов // XXX национальный конгресс по болезням органов дыхания с международным участием. Сборник трудов конгресса. Москва, 2020. – С. 27–28.

8. Опыт применения 13-валентной конъюгированной пневмококковой вакцины у ВИЧ-инфицированных пациентов / А.В. Жестков, М.О. Золотов, А.В. Лямин [и др.] // Терапевтический архив. – 2020. – Т. 92, № 11 – С. 38–44.

9. Сравнительный анализ структуры микрофлоры верхних дыхательных путей у ВИЧ-инфицированных пациентов и ВИЧ-отрицательных добровольцев / М.О. Золотов, С.С. Собина, А.В. Лямин [и др.] // Астраханский медицинский журнал. – 2020. – Т. 15, № 4. – С. 39–49.

ПАТЕНТ РФ НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

1. Патент 2732214 Российская Федерация, МПК A61B 10/00 (2006.01), G01N 33/49 (2006.01), A61K 39/09 (2006.01), A61P 31/04 (2006.01). Способ подбора схемы вакцинопрофилактики против пневмококковой инфекции у ВИЧ-положительных пациентов / Золотов М.О., Лямин А.В., Жестков А.В., Борисова О.В., Золотов Н.О., Железнова Е.А., Никитина Т.Р.; патентообладатель: Золотов Максим Олегович. – N 2020113781; приоритет изобретения 03 апреля 2020 г.; опубл. 14.09.2020, Бюл. № 26.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВДП – верхние дыхательные пути

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека

ЛЖВ – лица, живущие с ВИЧ

НФГОБ – неферментирующие грамотрицательные бактерии

ОРВИ – острая респираторная вирусная инфекция

ПКВ13 –13-валентная пневмококковая конъюгированная вакцина

ППВ23 – 23-валентная пневмококковая полисахаридная вакцина

РНК – рибонуклеиновая кислота

CD – cluster of differentiation (англ. дословно – кластер дифференцировки)

MALDI-ToF – Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Fight (англ. дословно – матричноактивированная лазерная десорбция/ионизация с времяпролетным разделением)

На правах рукописи

ЗОЛОТОВ МАКСИМ ОЛЕГОВИЧ

ОПТИМИЗАЦИЯ ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКИ ПНЕВМОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ У БОЛЬНЫХ С ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ

3.1.29 – Пульмонология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва - 2021