Мальцев Д.В.

РЕЗУЛЬТАТИ ВИВЧЕННЯ МІКРОБНОГО СПЕКТРУ У ДІТЕЙ З РОЗЛАДАМИ СПЕКТРУ АУТИЗМУ, АСОЦІЙОВАНИМИ З ГЕНЕТИЧНИМ ДЕФІЦИТОМ ФОЛАТНОГО ЦИКЛУ

*Інститут експериментальної і клінічної медицини Національного медичного університету
імені О.О. Богомольця*

Maltsev D.

THE RESULTS OF THE STUDY OF THE MICROBIAL SPECTRUM IN CHILDREN WITH AUTISM SPECTRUM DISORDERS ASSOCIATED WITH GENETIC DEFICIENCY OF THE FOLATE CYCLE

Institute of Experimental and Clinical Medicine at the O. Bogomolets National Medical University

Резюме

Обґрунтування. Результати п'яти мета-аналізів рандомізованих контрольованих клінічних досліджень свідчать про асоціацію генетичного дефіциту фолатного циклу (ГДФЦ) і розладів спектру аутизму (РАС) у дітей. В таких випадках формується імунodefіцит та імунна дисрегуляція, що знижує резистентність до деяких мікроорганізмів.

Мета дослідження: вивчити структуру мікробного спектру у дітей з РАС, пов'язаними з ГДФЦ, згідно з накопиченою дотепер доказовою базою і вивчити асоціацію виявлених мікроорганізмів з показниками імунного статусу для покращення розуміння патогенезу енцефалопатії та удосконалення алгоритмів діагностики, моніторингу і лікування.

Матеріали і методи. Ретроспективно проаналізовано медичні дані 225 дітей віком від 2 до 9 років з ГДФЦ, у яких відзначалися клінічні прояви за типом РАС (досліджувана група; ДГ; 183 хлопчиків і 42 дівчинки). До контрольної групи (КГ) віднесли 51 клінічно здорову дитину (37 хлопчиків та 14 дівчаток) аналогічного вікового розподілу, які не страждали на ГДФЦ. Спеціальне лабораторне обстеження дітей груп спостереження проводили з урахуванням сучасних уявлень щодо мікробного спектру у пацієнтів з РАС згідно з публікаціями в PubMed і Embase. Для вивчення асоціацій між досліджуваними показниками застосовували показник відношення шансів (odds ratio, OR) та 95% довірчий інтервал (95% CI). Дослідження виконувалося як фрагмент науково-дослідної роботи на замовлення МОЗ України (№ держреєстрації 0121U107940).

Результати та їх обговорення. TTV відзначався в 87%, HHV-7 – 79%, HHV-6 – 68%, EBV – 59%, *Streptococcus pyogenes* – 46%, *Candida albicans* – 41%, *Borrelia* – 34%, *Mycoplasma pneumoniae* – 27%, *Chlamydia pneumoniae* – 26%, *Yersinia enterocolitica* – 23%, *Toxoplasma gondii* – 19%, перенесена природжена CMV-нейроінфекція – 7%, наслідки HSV-1/2-нейроінфекції – 5% випадків в ДГ ($p < 0,05$; $Z < Z_{0,05}$). HHV-6, HHV-7 та EBV були асоційовані з дефіцитами NK-, NKT- та CD8+ цитотоксичних Т-лімфоцитів. TTV також був асоційований з дефіцитами NK- та NKT-лімфоцитів, однак не з дефіцитом CD8+ цитотоксичних Т-клітин. Стрептококова інфекція була пов'язана з гіпо- і дисімуноглобулінемією, а також – дефіцитом мієлопероксидази. Кандидоз був асоційований тільки з дефіцитом мієлопероксидази. Токсоплазмоз відзначався при дефіциті CD4+ Т-хелперів та комбінованих порушеннях імунітету. Наслідки природженої CMV-нейроінфекції мали місце тільки при комбінованих порушеннях імунітету.

Висновки. Для дітей з РАС, асоційованими з ГДФЦ, характерним є специфічний мікробний спектр з переважанням інтрацелюлярних опортуністичних та умовно патогенних мікроорганізмів, який визначається особливостями порушень в імунному статусі, спровокованих ГДФЦ, що має визначати алгоритм раціонального мікробіологічного пошуку, оцінки імунного статусу, проведення антимікробного та імуотропного лікування.

Ключові слова: імунодефіцит, імунодіагностика, антимікробна терапія, імуотерапія, вісь мікробіота-кишківник-мозок.

Обґрунтування. Результати п'яти мета-аналізів рандомізованих контрольованих клінічних досліджень свідчать про асоціацію генетичного дефіциту фолатного циклу (ГДФЦ) і розладів спектру аутизму (РАС) у дітей [23, 30, 38, 39, 40]. Результати мета-аналізу рандомізованих контрольованих клінічних досліджень Guo B.Q. зі спів. 2020 року, що охоплював 31 випробування за участю 3304 дітей, включаючи 1641 пацієнтів з РАС, без генетичного уточнення діагнозу, продемонстрували, що гіпергомоцистемія, феномен специфічний саме для ГДФЦ, асоційована з РАС і є класовою ознакою таких дітей (Hedges's $g = 0,56$; 95% CI = 0,36-0,76, $P < 0,001$) [12]. Mohammad N.S. зі спів., використовуючи модель ANN (artificial neural network) у контрольованому клінічному дослідженні з участю 138 дітей з РАС та 138 здорових осіб показали, що визначення патогенних поліморфних варіантів генів GCP11 C1561T, SHMT1 C1420T, MTHFR C677T, MTR A2756G, та MTRR A66G з діагностичною метою дозволяє встановити ризик розвитку РАС у носія з точністю в 63,8% [30]. Ці дані дозволяють вважати ГДФЦ основним чинником генетичної predisпозиції до розвитку РАС у дітей.

Наразі відкриті шляхи ураження нервової системи у дітей з ГДФЦ, які імплементують у патогенез енцефалопатії при РАС. Показано, що біохімічні порушення, викликані ГДФЦ, призводять до ураження імунної системи з індукцією імунодефіциту і пов'язаної з цим імунної дисрегуляції [28]. Як зазначають Hughes H.K. зі спів. у систематичному огляді, присвяченому феномену порушення роботи імунної системи у дітей з РАС, в таких випадках відзначається абберантний цитокіновий профіль, відхилення у абсолютній і

відносній кількості імунокомпетентних клітин та їх субпопуляцій, ознаки нейрозапалення, порушення роботи системи адаптивного та природженого імунітету, дисбаланс імуноглобулінів різних класів та ознаки аутоімунітету [16].

Наявність імунної дисфункції передбачає зниження резистентності організму до мікробних чинників. Справді, дотепер накопичено чимало повідомлень про аномальний розвиток опортуністичних та умовно патогенних інфекцій у дітей з РАС, який можна пояснити ураженням імунної системи, індукованим ГДФЦ. Binstock T. вперше вказав на вибірково чиним знижену імунорезистентність у дітей з РАС, виділивши субгрупу пацієнтів з так званими інтрамоноситарними патогенами – вірусом кори, цитомегаловірусом, вірусом герпеса 6 типу та *Yersinia enterocolitica* [3]. Для таких дітей було характерно пригнічення гемопоєзу, порушення периферичного імунітету, підвищення проникності гематоенцефалічного бар'єру та прояви демієлінізації в білій речовині півкуль великого мозку – ознаки, як стало тепер відомо, типові для ГДФЦ [26]. Nicolson G.L. зі спів. у контрольованому клінічному дослідженні за допомогою ПЛР крові показали аномально часто виявлення мікоплазми пневмонії, хламідії пневмонії та вірусу герпеса 6 типу у дітей з РАС порівняно зі здоровими людьми [35]. Sakamoto A. зі спів. в спеціально спланованому дослідженні виявили, що природжена CMV-інфекція з ураженням ЦНС у дітей з РАС зустрічається вірогідно частіше (7,4%), ніж у загальній популяції (0,31% випадків) ($p=0,004$). CMV ідентифікували за допомогою real-time ПЛР сухих зразків крові новонародженого і зразків пуповинної крові, отриманих відразу ж після пологів

[42]. Valayi S. зі спів. в контрольованому клінічному дослідженні продемонстрували, що специфічні IgM до EBV в сироватці крові дітей з PAC зустрічаються вірогідно частіше, ніж у здорових осіб ($P < 0,05$) [46]. Juonouchi H. зі спів. у спеціально спланованому дослідженні показали зв'язок PAC з первинним дефіцитом специфічних антиполісахаридних антитіл, що може пояснити відому схильність до розвитку хронічної стрептококової інфекції у таких дітей [17]. Hughes H.K., Ashwood P. в контрольованому клінічному дослідженні встановили, що серопозитивність до *Candida albicans* у дітей з PAC зустрічається в 36,5% випадків, тоді як у здорових дітей – лише в 14,3% випадків ($OR = 3,45$; $95\% CI = 1,0409 - 11,4650$; $p = 0,041$). Була показана асоціація серопозитивності до кандиди з проявами гастроінтестинальної дисфункції [15]. Nayeri T. зі спів. провели мета-аналіз рандомізованих контрольованих клінічних досліджень, в якому продемонстрували асоціацію PAC з токсоплазмозом, а також те, що наявність токсоплазмової інфекції збільшує ризик розвитку PAC у дитини в 1,93 рази ($95\% CI = 1,01 - 3,66$) [33]. Kuhn M. зі спів. повідомили про серію клінічних випадків поєднання борреліозу та PAC у дітей та про суттєве зменшення проявів PAC внаслідок тривалої терапії ампіциліном та азитроміцином з приводу борреліозу [21].

Як видно з вище наведених даних, спектр мікроорганізмів, які атипово часто зустрічаються у дітей з PAC порівняно зі здоровими людьми, набагато розширився з моменту публікації Binstock T., однак принцип, виділений автором, досі залишається незмінним, оскільки переважають саме інтрацелюлярні/інтрамоноцитарні патогени. Kong X. зі спів. обґрунтовують виділяти субтипи дітей з PAC залежно від уражень ротової та кишкової мікробіоти, зважаючи на важливу роль опортуністичних та умовно патогенних мікроорганізмів у патогенезі психічної хвороби [20].

Наразі встановлено, що інфекційні агенти є активними компонентами патогенезу енцефалопатії у дітей з PAC, асоційованими з ГДФЦ. Мікроорганізми здатні чинити

як прямі пошкоджуючі впливи на паренхіму головного мозку, так і бути залученими до непрямих імуніопосередкованих механізмів церебрального ураження шляхом індукції системного запалення на антимозкового автоімунітету. Прямий пошкоджуючий вплив інфекційних агентів може полягати як в індукції енцефалітів, так і нейродегенеративних процесів. Так, описана низка випадків розвитку симптомів аутизму після перенесеного скроневого часткового некротично-геморагічного енцефаліту HSV-1-етіології [7, 9, 10]. Це один з прикладів прямого пошкоджуючого впливу інфекційних агентів на тканину ЦНС у пацієнтів з PAC. Паралельно встановлено, що HHV-6 здійснює трансольфакторну міграцію до головного мозку [13] і уражає завдяки цьому структури мезолімбічної системи скроневої частки, індуючи нейродегенеративний процес, що отримав назву скроневого медіанного склерозу (temporal mesial sclerosis) [29], клініко-радіологічні ознаки якого відзначаються у багатьох дітей з PAC [31]. Асоціація HHV-6 і скроневого медіанного склерозу у людей підтверджена результатами останнього мета-аналізу рандомізованих контрольованих клінічних досліджень, виконаних на тканинах біопатів головного мозку, отриманих із зон нейродегенеративного ураження [50]. Це друга, нейродегенеративна, форма прямого ураження ЦНС мікроорганізмами, яка може бути важливим компонентом патогенезу енцефалопатії у дітей з PAC, асоційованими з ГДФЦ.

Якщо говорити про непрямі впливи інфекційних агентів на тканину ЦНС у дітей з PAC, то слід виділити, принаймні, два шляхи такого ураження. По-перше, мікроорганізми можуть бути тригерами антимозкового автоімунітету до мієліну [44] та нейронів [4] головного мозку. Так, описані випадки розвитку симптомів аутизму у дітей з автоімунними лімбічними енцефалітами [11, 18] з позитивною відповіддю на імунотропну терапію [34], а віруси родини герпесу [47], так само як токсоплазма [24] і мікоплазма [47], можуть провокувати зрив імунної толерантності до автоантигенів нейронів

гіпокампів в таких випадках. Роль бета-гемолітичного стрептококу групи А, що часто виявляється у дітей з РАС, в індукції автоімунного субкортикального енцефаліту, деякі симптоми якого можуть нагадувати РАС, наразі добре відома і охарактеризована [2, 8]. З іншого боку, інфекційні агенти в умовах імунної дисрегуляції, зумовленої ГДФЦ, можуть викликати стан системного запалення з індукцією гіперцитокінемії з нейротоксичним впливом. Феномен системної гіперцитокінемії з прозапальним профілем у дітей з РАС підтверджується результатами двох останніх мета-аналізів рандомізованих контрольованих клінічних досліджень [27, 41]. Показано, що вірус герпесу 6 типу, що часто перебуває в реактивованому стані при аутистичних розладах, може викликати стан гіперактивації мікрофагів з розвитком гіперцитокінемії, подібної за характером до тієї, що спостерігається у дітей з РАС [22]. Крім того, якщо говорити про запальний механізм мікроб-індукованого церебрального пошкодження, слід згадати про можливість залучення функціональної вісі мікробіота-кишківник-мозок [1, 2]. Посилюючи запалення в кишківнику, інфекційні агенти здатні індукувати подальше інтрацеребральне запалення у дітей з РАС шляхом аномального поширення запального процесу з інтестинального компартменту через кров і патологічно проникний гематоенцефалічний бар'єр до паренхіми головного мозку [43]. Роль функціональної вісі мікробіота-кишківник-мозок в патогенезі енцефалопатії у дітей з РАС наразі обговорюється в ряді систематичних оглядів [1, 2] і результатах клінічних досліджень [43].

Наразі бракує систематизації знань з мікробного спектру у пацієнтів з РАС, який, як видається, є доволі специфічним і різко відрізняється від такого у здорових дітей. Потребує значного уточнення зв'язок мікробного навантаження зі станом імунної системи, а також залишається недостатньо вивченою роль мікроорганізмів в індукції церебрального пошкодження та інших ускладнень у дітей з РАС. Тому проведення спеціально спланованих досліджень в ок-

ресленому напрямку є актуальним завданням сучасної нейроімунології та імунопсихіатрії.

Мета дослідження: вивчити структуру мікробного спектру у дітей з РАС, пов'язаними з ГДФЦ, згідно з накопиченою дотепер доказовою базою і вивчити асоціацію виявлених мікроорганізмів з показниками імунного статусу для покращення розуміння патогенезу енцефалопатії та удосконалення алгоритмів діагностики, моніторингу і лікування.

Матеріали і методи. Для досягнення поставленої мети ретроспективно проаналізовано медичні дані 225 дітей віком від 2 до 9 років з ГДФЦ, у яких відзначалися клінічні появи РАС (183 хлопчиків і 42 дівчинки). Усі вони були пацієнтами спеціалізованої нейроімунологічної клініки Vivere (реєстраційне дос'є від 22.12.2018 №10/2212-M). Отримання даних для дослідження та обробка матеріалу проводилася згідно договору № 150221 від 15.02.2021р., та висновку комісії біоетичної експертизи (протокол № 140 від 21.12.2020 р. НМУ імені О.О. Богомольця). Клінічний діагноз РАС був виставлений дитячими психіатрами за критеріями DSM-IV-TR (Diagnostic and Statistical Manual of mental disorders) та ICD-10 (The International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems).

Патогенні поліморфні варіанти генів фолатного циклу визначали методом ПЛР з рестрикцією на підставі виявлення заміни нуклеотидів MTHFR C677T у моноформі (68 пацієнтів), а також – у поєднанні з іншими замінами нуклеотидів – MTHFR A1298C, MTRR A66G і/або MTR A2756G (157 осіб). Ці особи склали досліджувану групу (ДГ).

До контрольної групи (КГ) віднесли 51 клінічно здорову дитину (37 хлопчиків та 14 дівчаток) аналогічного вікового розподілу, які не страждали на ГДФЦ.

Спеціальне лабораторне параклінічне обстеження дітей груп спостереження проводили з урахуванням сучасних уявлень щодо мікробного спектру у пацієнтів з РАС. Так, діагностику реактивованих герпесвірусних інфекцій та TTV-інфекції здійснювали

методом ПЛР лейкоцитів крові (відділ нейробіохімії Інституту нейрохірургії НАМН України) відповідно до даних дослідження Nicolson G.L. зі спів. [35]. Виявлення бета-гемолітичного стрептококу групи А проводили шляхом бактеріологічного посіву зі слизової оболонки ротоглотки на селективному поживному середовищі або за специфічним антитоксичним імунітетом в сироватці крові (антистрептолізин-О, антистрептодорназа, антигіалуронідаза) (ELISA; MDI Limbach Berlin GmbH, Німеччина), як йдеться в систематичному огляді Dor D. зі спів. [8]. Інфекцію, викликану *Candida albicans*, діагностували на підставі специфічних IgM в сироватці крові (ELISA; MDI Limbach Berlin GmbH, Німеччина) згідно з результатами дослідження Hughes H.K., Ashwood P. [15]. Інфекції, зумовлені мікоплазмою та хламідією пневмонії виявляли на підставі специфічних IgM в сироватці крові (ІФА, Сінево, Україна) [47]. Борреліоз та ієрсиніоз ідентифікували за даними аналізу вестерн блот з симультантним виявленням IgM та IgG до ряду поверхневих та глибоких антигенів зазначених збудників (Сінево, Україна) згідно з даними Kuhn M. зі спів. [21] та Binstock T. [3]. Токсоплазмоз діагностували на підставі специфічних IgA в сироватці крові (ІФА, Сінево, Україна), як показали Nayeri T. зі спів. у відповідному мета-аналізі рандомізованих контрольованих клінічних досліджень [33]. Перенесену природжену CMV-нейроінфекцію ідентифікували за даними анамнестичних досліджень сироватки крові новонародженого (ПЛР, відділ нейробіохімії Інституту нейрохірургії НАМН України та інші лабораторні центри) згідно з даними Sakamoto A. зі спів. [42] та специфічною нейровізуалізаційною картиною, яка інтерпретувалася за результатами 18-річного лонгітудінального клінічного дослідження Pinillos-Pisón R. зі спів. [37].

Таким чином, пацієнтам ДГ проводили комплексну оцінку мікробного спектру згідно з накопиченими дотепер доказами, однак специфічність підходу полягала саме в одночасному пошуку всіх мікробних агентів, що могла дати цілісну картину поточного інфікування дитини, оскільки в опублікованих

дотепер наукових статтях зазвичай йшлося про діагностику тільки деяких патогенів з відомого переліку, що не дозволяє зробити сукупний аналіз мікробного навантаження і адекватно оцінити імунно-мікробіологічні зв'язки і визначити їх місце у патогенезі хвороби.

Усім пацієнтам проводилося комплексне імунологічне обстеження в Інституті імунології та алергології НМУ імені О. О. Богомольця і/або лабораторії Сінево, яке крім загального аналізу крові, включало вивчення субпопуляційного складу лімфоцитів з використанням лазерної проточної цитофлуориметрії (цитофлуориметр Epics XL, США) і методу непрямой імуофлуоресценції з моноклональними антитілами до CD-маркерів з двома або трьома мітками (CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD3–CD19+, CD3–CD16+CD56+, CD3+CD16+CD56+) (реактиви Beckman Coulter, США). Фагоцитоз оцінювали за даними латекс-тесту з визначенням показника фагоцитозу, фагоцитарного індексу, кількості активних фагоцитів і фагоцитарної ємності крові, а також за активністю ферментів мієлопероксидази (проточна цитофлуориметрія) і НАДФ-оксидази (НСТ-тест). Сироваткові концентрації імуноглобулінів основних класів (M, G, A) визначали за результатами простої радіальної імунодифузії за Манчіні та твердофазного ІФА. Концентрацію класів IgE, IgD та субкласів IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) у сироватці крові вимірювали за допомогою твердофазного імуоферментного аналізу (ВекторБЕСТ, РФ; MDI Limbach Berlin GmbH, Німеччина).

Таким чином, аналіз мікробного спектру було здійснено з урахуванням можливих зв'язків з імунним статусом дитини, що є специфічною рисою підходу до аналізу даних, що не застосовувався раніше у дітей з РАС згідно з даними доступних публікацій в PubMed і Embase. Такий підхід може дозволити не тільки вивчити мікробне навантаження у дітей ДГ, однак і пояснити причини формування специфічного патерну мікробного навантаження і дослідити клінічну значимість інфекційних агентів з виявленням потенційних механізмів залучення мікроор-

ганізмів до патогенезу енцефалопатії у дітей з РАС, асоційованих з ГДФЦ.

Статистичну обробку матеріалу проводили шляхом порівняльного і структурного аналізів. Для визначення вірогідності відмінностей між показниками у групах спостереження використовували параметричний Т-критерій Ст'юдента з показником довірчої ймовірності p та непараметричний критерій – число знаків Z за Урбахом Ю.В. Вірогідними вважали відмінності при $p < 0,05$ і $Z < Z_{0,05}$. Для вивчення асоціацій між досліджуваними показниками застосовували показник відношення шансів (odds ratio, OR) та 95% довірчий інтервал (95% CI).

Для проведення статистичних розрахунків користувалися програмою Microsoft Excel.

Дослідження виконувалося як фрагмент науково-дослідної роботи на замовлення МОЗ України (№ держреєстрації 0121U107940).

Результати та їх обговорення. Результати застосованих лабораторних тестів з комплексної ідентифікації опортуністичних та умовно патогенних мікроорганізмів у дітей ДГ в цілому узгоджуються з даними попередніх розрізнених клінічних досліджень в даному напрямку. Отримано позитивні результати тестування щодо всіх потенційних

мікробів, що, як вважають, є залученими у патогенез енцефалопатії при РАС. Результати вивчення мікробного спектру у дітей ДГ вірогідно відрізняються від даних у КГ за всіма досліджуваними патогенами. Отже, отримані дані узгоджуються зі сформованими протягом останніх років уявленнями про специфічний мікробний спектр у дітей з РАС, який не відповідає такому у здорових осіб. Хоча у дітей з РАС, асоційованими з ГДФЦ, відзначаються всі інфекційні агенти, що наразі охарактеризовані як асоційовані патогени при аутистичних розладах, однак питома вага позитивних випадків різко відрізняється у різних мікроорганізмів, що дозволяє говорити про неоднорідність їх поширення в досліджуваній когорті пацієнтів, і, як наслідок, неоднакову значимість у розвитку енцефалопатії у всій групі. Ці відмінності мають бути враховані як при плануванні проведення лабораторних тестів щодо вивчення мікробного навантаження у пацієнтів з РАС, асоційованими з ГДФЦ, так і при проведенні клініко-лабораторного моніторингу та визначенні прерогативи тих чи інших терапевтичних втручань.

Дані щодо структури ДГ у порівнянні з КГ за виявленими опортуністичними та умовно патогенними мікроорганізмами наведені на рис. 1.

Рис. Структура ДГ (n=225) і КГ (n=51) за виявленими мікроорганізмами досліджуваного спектру

Дані рис. 1. демонструють неоднакову поширеність різних досліджуваних мікроорганізмів у пацієнтів ДГ і вірогідну відмінність у ДГ і КГ за питомою вагою виявлення всіх досліджуваних інфекційних агентів ($p < 0,05$; $Z < Z_{0,05}$). Отримані результати вказують на переважання вірусних агентів над бактеріальними, грибовими і протозойними. Отже, саме опортуністичні вірусні інфекції в стані реактивації є найчастішою знахідкою при оцінці мікробного навантаження у дітей з РАС, асоційованими з ГДФЦ. Вірусні агенти в таких випадках виявляються щонайменше втричі частіше, ніж всі досліджені бактеріальні, грибові та протозойні агенти разом узяті. Отже, дослідженню саме вірусних опортуністичних агентів має приділятися максимальна увага при плануванні діагностичних алгоритмів з оцінки мікробного спектру у дітей з РАС, асоційованими з ГДФЦ, а патогенетичні шляхи вірус-індукованого ураження ЦНС мають бути потенційним першочерговим об'єктом клінічних досліджень в цій царині.

3-поміж вірусних агентів найчастіше у дітей з РАС, асоційованими з ГДФЦ, виявляється ТТV – майже у 9 із 10 обстежених дітей, що принаймні в чотири рази більше, ніж у здорових дітей КГ ($p < 0,05$; $Z < Z_{0,05}$). HHV-7 і HHV-6 зустрічаються у 7 і 6 із 10 обстежених пацієнтів ДГ відповідно, що в 3 і 6 разів рідше, ніж в КГ ($p < 0,05$; $Z < Z_{0,05}$). Як показують результати даного дослідження, ТТV, HHV-7 і HHV-6 є найчастішими патогенами у дітей з РАС, асоційованими з ГДФЦ. Якщо про реактивацію герпесвірусів в таких випадках вже повідомляли раніше [35], то щодо ТТV ми не знайшли відповідних повідомлень у доступній науковій літературі, тому вважаємо, що виявили зазначену асоціацію вперше в світі.

EBV, *Streptococcus pyogenes*, *Candida albicans* та *Borrelia* зустрічалися у дітей з РАС, асоційованими з ГДФЦ, з середньою частотою. Питома вага випадків ідентифікації таких патогенів в активному стані в ДГ коливалася від 59% до 34%, тоді як в КГ – від 17% до 8% ($p < 0,05$; $Z < Z_{0,05}$).

Mycoplasma pneumoniae, *Chlamydia pneumoniae* *Yersinia enterocolitica* виявляли-

ся серед 27-23% дітей ДГ і серед 11-8% пацієнтів КГ ($p < 0,05$; $Z < Z_{0,05}$). Ми пропонуємо позначати ці мікроорганізми як патогени з низькою частотою поширення у дітей з РАС, асоційованими з ГДФЦ.

Природжена CMV-інфекція і реактивована HSV-1/2-інфекція виявились патогенами з вкрай низькою питомою вагою в ДГ (7-5% проти 1 % в КГ; ($p < 0,05$; $Z < Z_{0,05}$).

Розподіл виявлених мікроорганізмів на чотири групи за питомою вагою поширення може бути корисним для раціонального планування і організації діагностичних досліджень і терапевтичних втручань із врахуванням економічних і технічних аспектів проблеми. Ми пропонуємо ступінчастий підхід до оцінки мікробного спектру та етапний підхід до призначення протимікробних ліків із врахуванням виявлених чотирьох груп мікроорганізмів з різною питомою вагою поширення. Спочатку видається доцільним ідентифікація мікробів з великою питомою вагою, а на наступних етапах – із послідовно нижчою питомою вагою поширення. Відповідним чином, як нам видається, має проводитися і протимікробна терапія.

Особливу увагу заслуговує ідентифікація асоціації EBV, *Streptococcus pyogenes* та *Candida albicans*, що одночасно виявлялися у одного й того самого пацієнта щонайменше в 80% випадків ідентифікації таких мікроорганізмів. Зв'язок між EBV і *Streptococcus pyogenes* наразі добре відомий. Інфекційний мононуклеоз, первинна форма EBV-інфекції, часто розпочинається саме зі стрептококової ангіни. Асоціація EBV і ревматогенного стрептококу має декілька аспектів. Відомий зв'язок на рівні міжмікробної взаємодії та на рівні особливостей порушень імунного статусу людини. Якщо говорити про міжмікробну взаємодію, то встановлено, що пептидоглікани стрептококу через вплив на TLR-2 активують EBV з латентного стану в інфікованих клітинах лімфобластоїдної лінії мигдаликів, а EBV, порушуючи антитілогенез та індукуючи нейтропенію, сприяє росту стрептококу [45]. Імунологічний аспект взаємодії між цими мікробами полягає у типових асоці-

аціях генетичних розладів антитілоутворення у людини. Виявили, що первинний тотальний дефіцит IgG3 (G3(g) allotype), що сприяє реактивації EBV, асоційований з первинним вибірконим дефіцитом специфічних IgG2 до полісахаридів стрептококів зі збереженням загального пулу IgG2 (G2(n) negative allotype) [25]. Кoinфекція EBV і Streptococcus pyogenes завдяки синергічній дії сприяє пришвидшеному розвитку асоційованих автоімунних ускладнень, як показали Watanabe T. зі спів. на прикладі гострого гломерулонефриту [48]. Поєднання з кандидозом, на нашу думку, можна пояснити не тільки особливостями імунного статусу, але й застосуванням антибіотиків з приводу стрептококової інфекції, що, як відомо, сприяє росту кандид.

Важливо встановити, чому саме формується специфічний мікробний спектр у дітей

з PAC, асоційованими з ГДФЦ, який передбачає аномально високу сприйнятливість до одних мікроорганізмів і нормальну резистентність до інших. Одне з пояснень може стосуватися особливостей імунного статусу у цих пацієнтів, оскільки в структурі зазначеного мікробного спектру переважають саме опортуністичні та умовно патогенні мікроорганізми з низькою вірулентністю, реактивація яких зазвичай відбувається в умовах імуносупресії. Як зазначалося вище, у пацієнтів з PAC описані різні лабораторні прояви імунодефіциту і пов'язаної з цим імунної дисрегуляції [16, 28], тому доцільним видається дослідження асоціацій певних порушень імунного статусу та тих чи інших мікроорганізмів, що зазнали активації в організмі пацієнта. Результати вивчення таких імунно-мікробіологічних асоціацій у дітей ДГ наведені у табл. 1.

Таблиця 1

Результати дослідження асоціацій (OR; 95% CI) імунних порушень та виявлених мікроорганізмів у дітей з PAC, асоційованими з ГДФЦ (n=225)

Показник	NK	NKT	CD8+ Т-лімфоцити	CD4+ Т-лімфоцити	ДІГ	ГІГ	МПО	Комбіновані порушення
TTV	2,3767; 1,1772 - 4,7983*	2,2713; 1,1259 - 4,5818*	1,8452; 0,9231 - 3,6885	1,7642; 0,8831 - 3,5246	0,3950; 0,1865 - 0,8366	0,4493; 0,2147 - 0,9403	0,3152; 0,1485 - 0,6690	0,6483; 0,3201 - 1,3131
HHV-6	3,7316; 1,8118 - 7,6856*	2,1711; 1,077 - 4,3767*	3,9184; 1,8989 - 8,0857*	0,7756; 0,3835 - 1,5684	0,6957; 0,3465 - 1,3967	0,4487; 0,2197 - 0,9165	0,5269; 0,2605 - 1,0659	0,3374; 0,1601 - 0,7111
HHV-7	3,8864; 1,8758 - 8,052*	2,8095; 1,3893 - 5,6814*	3,5561; 1,7296 - 7,3116*	0,6625; 0,3293 - 1,3327	0,5546; 0,2749 - 1,1190	0,7018; 0,3455 - 1,4256	0,6754; 0,3375 - 1,3514	0,8546; 0,4242 - 1,7218
EBV	3,7059; 1,7914 - 7,6663*	2,4879; 1,2311 - 5,0276*	2,8607; 1,4103 - 5,8026*	0,8144; 0,4035 - 1,6437	0,9214; 0,4627 - 1,8348	0,8526; 0,4288 - 1,6951	0,7381; 0,3642 - 1,4958	0,7300; 0,3643 - 1,4630
Str.	0,5068; 0,2445 - 1,0504	0,8922; 0,4491 - 1,7723	0,5833; 0,2898 - 1,1741	0,6130; 0,3052 - 1,2312	6,6667; 3,0563 - 14,5419*	4,5588; 2,1939 - 9,4728*	5,0679; 2,4247 - 10,5927*	0,7018; 0,3455 - 1,4256
Candida	0,8024; 0,4016 - 1,6032	0,5997; 0,2927 - 1,2288	0,2936; 0,1373 - 0,6280	0,6483; 0,3201 - 1,3131	0,5404; 0,2659 - 1,0981	0,5844; 0,2869 - 1,1902	3,9184; 1,8989 - 8,0857*	0,9263; 0,4580 - 1,8732
Toxoplasma	0,5678; 0,2761 - 1,1675	0,8802; 0,4416 - 1,7545	0,7083; 0,3546 - 1,4150	9,4286; 4,2272 - 21,0303*	0,4242; 0,2069 - 0,8698	0,3837; 0,1843 - 0,7990	0,6327; 0,3098 - 1,2924	7,4582; 3,4436 - 16,153*
CMV-інфекція	0,7655; 0,3826 - 1,5317	0,9333; 0,4702 - 1,8527	0,4242; 0,2069 - 0,8690	0,5678; 0,2761 - 1,1670	0,3122; 0,1484 - 0,6570	0,3775; 0,1825 - 0,7809	0,1970; 0,0884 - 0,4392	9,7101; 4,3616 - 21,6175*

Примітка. * - $\alpha=0,05$

Слід зазначити, що *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Borrelia*, *Yersinia enterocolitica* не були асоційованими з жодним із виявлених порушень в імунному статусі пацієнтів ДГ, тому ці дані не були включені до табл. 1. Відсутність асоціацій в цих випадках можна пояснити властивостями зазначених мікроорганізмів, які мають вищу вірулентність, ніж інші досліджувані мікроби, і зазвичай можуть уражати організм імунокомпетентної людини. Натомість інші мікроби, що продемонстрували певні асоціації з імунними порушеннями, володіють виразними опортуністичними або умовно патогенними властивостями, зазвичай характеризуються низькою вірулентністю і зазнають реактивації із латентного або персистуючого стану здебільшого в імуноскомпрометованому організмі. Аналіз асоціацій щодо HSV-1/2 не проводився через малу кількість спостережень.

Як показують результати табл. 1, вірусні інфекції були асоційовані з порушеннями в ефекторній ланці адаптивного та природженого клітинного імунітету, що відповідає класичним постулатам клінічної імунології про прерогативу клітинних механізмів імунного нагляду при реактивації вірусних агентів в організмі людини [14]. HHV-6, HHV-7 та EBV були асоційовані з дефіцитами NK-, NKT- та CD8+ цитотоксичних Т-лімфоцитів, які, згідно з накопиченими дотепер доказами, відіграють важливу роль в реалізації імунної відповіді до вірусних патогенів [14, 52]. Зокрема, NK- та NKT-лімфоцити, використовуючи різні механізми розпізнавання вірус-інфікованих клітин, беруть участь у реакціях спонтанної і антитілозалежної клітинно-опосередкованої цитотоксичності та здійснюють ряд регуляторних впливів, спрямованих здебільшого на потенціацію ефекторних механізмів клітинного імунітету [36, 52]. Натомість CD8+ цитотоксичні Т-лімфоцити елімінують вірус *in situ* завдяки реалізації реакції специфічної імунної цитотоксичності [14]. Слід зазначити, що TTV також був асоційований з дефіцитами NK- та NKT-лімфоцитів, однак не з дефіцитом CD8+ цитотоксичних Т-клітин. Отримані дані пов-

ністю узгоджуються з результатами систематичного огляду Orange J.S. щодо клінічних проявів первинного дефіциту NK-клітин в організмі людини [36].

На відміну від вірусних агентів, стрептококова інфекція розвивалася переважно при порушеннях гуморальної ланки адаптивного імунітету – гіпо- та дисімуноглобулінеміях, що відповідає класичним уявленням про превалюючу роль імуноглобулінів у захисті від стрептококів та відомій клінічній картині гуморальних імунодефіцитів, наприклад, хвороби Брутона або загального варіабельного імунодефіциту, в якій переважають саме ураження, викликані піогенними умовно патогенними коками [5, 49]. Антитіла здійснюють як прямі, так і непрямі протимікробні впливи при стрептококовій інфекції у людей. До прямих впливів можна віднести ефекти аглютинації, преципітації і нейтралізації [2]. Непрямим способом антитіла допомагають руйнувати клітини стрептококів за рахунок опсонізації та індукції за рахунок цього імунного фагоцитозу, активації системи комплементу за класичним шляхом, а також – сприяючи реалізації реакцій антитілозалежної клітинно-опосередкованої цитотоксичності, при яких роль ефекторної клітини відіграють макрофаги [8]. Раніше про зв'язок стрептококової інфекції з гуморальним імунодефіцитом у дітей з РАС повідомляли Juonouchi H. зі спів. [17]. Також стрептокок був асоційований з дефіцитом мієлопероксидази фагоцитів. Роль фагоцитозу у знешкодженні бактеріальних агентів в організмі людини наразі добре відома [19]. Про вибіркиму аномальну чутливість до стрептококової інфекції при первинному дефіциті мієлопероксидази нейтрофілів вперше повідомили Cocchi P. зі спів. ще в 1973 році [6].

Натомість *Candida albicans* була асоційована тільки з дефіцитом мієлопероксидази нейтрофілів, що узгоджується з сучасними уявленнями щодо ключової ролі мікробіцидної системи фагоцитів, опосередкованої мієлопероксидазою, у контролі над кандидозною інфекцією в організмі людини [19] і результатами систематичного огляду

Nauseef W.M. з проблеми первинного дефіциту мієлопероксидази фагоцитів у людей, в якому зазначається кандидоз як провідний клінічний прояв цього імунodefіциту [32].

Токсоплазмоз був асоційований з дефіцитом CD4+ Т-лімфоцитів та комбінованими порушеннями імунітету, при яких відзначалося одночасне залученням як клітинної, так і гуморальної ланки імунітету. Принципово важлива роль CD4+ Т-лімфоцитів у контроль над токсоплазменною інфекцією добре відома завдяки чисельним спостереженням щодо випадків важкої реактивації токсоплазми при СНІДі ВІЛ-етіології та ідіопатичній CD4+ Т-клітинній лімфопенії [51].

Природжена CMV-нейроінфекція виявилася пов'язаною тільки з комбінованими порушеннями імунітету, що відповідає класичним уявленням щодо потреби глибокої імуносупресії для реактивації цього опортуністичного агенту в організмі людини [14].

Таким чином, встановлено, що різні мікроорганізми пов'язані з неоднаковими порушеннями в імунному статусі у пацієнтів з PAC, асоційованими з ГДФЦ. Можна говорити про специфічні імунно-мікробіологічні зв'язки, що відповідають класичним уявленням щодо відмінностей у механізмах імунного нагляду за опортуністичними та умовно патогенними мікробними агентами різної природи в організмі людини. Ці дані дозволяють вважати, що саме імунodefіцит, викликаний ГДФЦ, є причиною формування

специфічного мікробного спектру у дітей з PAC, асоційованими з ГДФЦ. Виявлені зв'язки дозволяють за рахунок оцінки імунного статусу прогнозувати те, які саме мікроби з найбільшою ймовірністю наразі розмножуються в організмі дитини, коригуючи належним чином напрямок діагностичного мікробіологічного пошуку і програму подальшого антимікробного лікування. І, навпаки, превалювання певних мікроорганізмів може вказувати на конкретні порушення в роботі імунної системи, що має бути враховано при плануванні імунологічного обстеження пацієнта і підбору імунотерапії для корекції порушень імунного статусу. Можна виділити підгрупи дітей з PAC, асоційованими з ГДФЦ, за превалюючими мікроорганізмами – вірусними, бактеріальними, грибовими або протозойними – з огляду на очевидні відмінності в раціональних алгоритмах діагностичного пошуку і програмах антимікробного та імуотропного лікування з таких пацієнтів.

Висновки. Для дітей з PAC, асоційованими з ГДФЦ, характерним є специфічний мікробний спектр з переважанням інтрацелюлярних опортуністичних та умовно патогенних мікроорганізмів, який визначається особливостями порушень в імунному статусі, спровокованих ГДФЦ, що має визначати алгоритм раціонального мікробіологічного пошуку, оцінки імунного статусу, проведення антимікробного та імуотропного лікування.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Azhari A., Azizan F., Esposito G. A systematic review of gut-immune-brain mechanisms in Autism Spectrum Disorder // *Dev. Psychobiol.* – 2019. – Vol. 61(5). – P. 752–771. doi: 10.1002/dev.21803.
2. Baj J., Sitarz E., Forma A. et al. Alterations in the Nervous System and Gut Microbiota after beta-Hemolytic Streptococcus Group A Infection-Characteristics and Diagnostic Criteria of PANDAS Recognition // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – Vol. 21(4). – P. 1476. doi: 10.3390/ijms21041476.
3. Binstock T. Intra-monocyte pathogens delineate autism subgroups // *Med. Hypotheses.* – 2001. – Vol. 56(4). – P. 523–531.
4. Cabanlit M., Wills S., Goines P. et al. Brain-specific autoantibodies in the plasma of subjects with autistic spectrum disorder // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2007. – Vol. 107. – P. 92–103. doi: 10.1196/annals.1381.010.
5. Cirillo E., Giardino G., Ricci S. et al. Consensus of the Italian Primary Immunodeficiency Network on transition management from pediatric to adult care in patients affected with childhood-onset inborn errors of immunity // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2020. – Vol. 146(5). – P. 967–983. doi: 10.1016/j.jaci.2020.08.010.
6. Cocchi P., Mori S., Ravina A. Myeloperoxidase-deficient leucocytes in streptococcal infections // *Helv. Paediatr. Acta.* – 1973. – Vol. 28(1). – P. 79–85.

7. DeLong G.R., Bean S.C., Brown F.R. 3rd. Acquired reversible autistic syndrome in acute encephalopathic illness in children // *Arch. Neurol.* 1981. – Vol. 38(3). – P. 191–194. doi: 10.1001/archneur.1981.00510030085013.
8. Dop D., Marcu I.R., Padureanu R. et al. Pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococcal infections // *Exp. Ther. Med.* – 2021. – Vol. 21(1). – P. 94. doi: 10.3892/etm.2020.9526.
9. Ghaziuddin M., Tsai L.Y., Eilers L., Ghaziuddin N. Brief report: autism and herpes simplex encephalitis // *J. Autism. Dev. Disord.* – 1992. – Vol. 22(1). – P. 107–113. doi: 10.1007/BF01046406.
10. Gillberg I.C. Autistic syndrome with onset at age 31 years: herpes encephalitis as a possible model for childhood autism // *Dev. Med. Child. Neurol.* – 1991. – Vol. 33(10). – P. 920–924. doi: 10.1111/j.1469-8749.1991.tb14804.x.
11. González-Toro M.C., Jadraque-Rodríguez R., Sempere-Pérez Á. et al. Anti-NMDA receptor encephalitis: two paediatric cases // *Rev. Neurol.* – 2013. – Vol. 57(11). – P. 504–508.
12. Guo B.Q., Li H.B., Ding S.B. et al. Blood homocysteine levels in children with autism spectrum disorder: An updated systematic review and meta-analysis // *Psychiatry Res.* – 2020. – Vol. 291. – P. 113283. doi: 10.1016/j.psychres.2020.113283.
13. Harberts E., Yao K., Wohler J.E. et al. Human herpesvirus-6 entry into the central nervous system through the olfactory pathway // *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* – 2011. – Vol. 108(33). – P. 13734–13739. doi: 10.1073/pnas.1105143108.
14. Heath J., D Grant M. The Immune Response Against Human Cytomegalovirus Links Cellular to Systemic Senescence // *Cells.* – 2020. – Vol. 9(3). – P. 766. doi: 10.3390/cells9030766.
15. Hughes H.K., Ashwood P. Anti-Candida albicans IgG Antibodies in Children With Autism Spectrum Disorders // *Front. Psychiatry.* – 2018. – Vol. 26(9). – P. 627. doi: 10.3389/fpsy.2018.00627.
16. Hughes H.K., Ko E.M., Rose D., Ashwood P. Immune Dysfunction and Autoimmunity as Pathological Mechanisms in Autism Spectrum Disorders // *Front Cell Neurosci.* – 2018. – Vol. 12. – P. 405. doi: 10.3389/fncel.2018.00405.
17. Jyonouchi H., Geng L., Streck D.L., Toruner G.A. Immunological characterization and transcription profiling of peripheral blood (PB) monocytes in children with autism spectrum disorders (ASD) and specific polysaccharide antibody deficiency (SPAD): case study // *J. Neuroinflammation.* – 2012. – Vol. 9. – P. 4.
18. Kiani R., Lawden M., Eames P. et al. Anti-NMDA-receptor encephalitis presenting with catatonia and neuroleptic malignant syndrome in patients with intellectual disability and autism // *BJPsych. Bull.* – 2015. – Vol. 39(1). – P. 32–35. doi: 10.1192/pb.bp.112.041954.
19. Klebanoff S.J., Kettle A.J., Rosen H. et al. Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms // *J. Leukoc. Biol.* – 2013. – Vol. 93(2). – P. 185–198. doi: 10.1189/jlb.0712349.
20. Kong X., Liu J., Cetinbas M. et al. New and Preliminary Evidence on Altered Oral and Gut Microbiota in Individuals with Autism Spectrum Disorder (ASD): Implications for ASD Diagnosis and Subtyping Based on Microbial Biomarkers // *Nutrients.* – 2019. – Vol. 11(9). – P. 2128. doi: 10.3390/nu11092128.
21. Kuhn M., Grave S., Bransfield R., Harris S. Long term antibiotic therapy may be an effective treatment for children co-morbid with Lyme disease and autism spectrum disorder // *Med Hypotheses.* – 2012. – Vol. 78(5). – P. 606–615. doi: 10.1016/j.mehy.2012.01.037.
22. Lecoine D., Fabre M., Habes D. et al. Macrophage activation syndrome in primary human herpes virus-6 infection: a rare condition after liver transplantation in infants // *Gastroenterol. Clin. Biol.* – 2000. – Vol. 24(12). – P. 1227–1228.
23. Li Y., Qiu S., Shi J. et al. Association between MTHFR C677T/A1298C and susceptibility to autism spectrum disorders: a meta-analysis // *BMC Pediatr.* 2020. – Vol. 20(1). – P. 449. doi: 10.1186/s12887-020-02330-3.
24. Li Ye., Viscidi R.P., Kannan G. et al. Chronic Toxoplasma gondii Infection Induces Anti-N-Methyl-d-Aspartate Receptor Autoantibodies and Associated Behavioral Changes and Neuropathology // *Infect. Immun.* – 2018. – Vol. 86(10). – P. e00398–18. doi: 10.1128/IAI.00398-18.
25. Linde A., Söderström R., Smith C.I. et al. Herpesvirus serology, aberrant specific immunoglobulin G2 and G3 subclass patterns and Gm allotypes in individuals with low levels of IgG3 // *Clin. Exp. Immunol.* – 1992. – Vol. 90(2). – P. 199–203.
26. Marseglia L.M., Nicotera A., Salpietro V. et al. Hyperhomocysteinemia and MTHFR polymorphisms as antenatal risk factors of white matter abnormalities in two cohorts of late preterm and full term newborns // *Oxid. Med. Cell. Longev.* – 2015. – Vol. 2015. – P. 543134. doi: 10.1155/2015/543134.
27. Masi A., Quintana D.S., Glozier N. et al. Cytokine aberrations in autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis // *Mol. Psychiatry.* – 2015. – Vol. 20(4). – P. 440–446. doi: 10.1038/mp.2014.59.

-
28. Mead J., Ashwood P. Evidence supporting an altered immune response in ASD // *Immunol. Lett.* – 2015. – Vol. 163(1). – P. 49–55. doi: 10.1016/j.imlet.2014.11.006.
 29. Millichap J.J., Millichap J.G. Role of HHV-6B Infection in Mesial Temporal Lobe Epilepsy // *Pediatr. Neurol. Briefs.* – 2015. – Vol. 29(5). – P. 40. doi: 10.15844/pedneurbriefs-29-5-7.
 30. Mohammad N.S., Shruti P.S., Bharathi V. et al. Clinical utility of folate pathway genetic polymorphisms in the diagnosis of autism spectrum disorders // *Psychiatr. Genet.* – 2016. – Vol. 26(6). – P. 281–286. doi: 10.1097/YPG.000000000000152.
 31. Monge-Galindo L., Pérez-Delgado R., López-Pisón J. et al. Mesial temporal sclerosis in paediatrics: its clinical spectrum. Our experience gained over a 19-year period // *Rev. Neurol.* – 2010. – Vol. 50(6). – P. 341–348.
 32. Nauseef W.M. Diagnostic assays for myeloperoxidase and myeloperoxidase deficiency // *Methods Mol. Biol.* – 2014. – Vol. 1124. – P. 537–546.
 33. Nayeri T., Sarvi S., Moosazadeh M. et al. Relationship between toxoplasmosis and autism: A systematic review and meta-analysis // *Microb. Pathog.* – 2020 – Vol. 147. – P. 104434. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104434.
 34. Nepal G., Shing K.Y., Yadav J.K. et al. Efficacy and safety of rituximab in autoimmune encephalitis: A meta-analysis // *Acta Neurol. Scand.* – 2020. – Vol. 142(5). – P. 449–459. doi: 10.1111/ane.13291.
 35. Nicolson G.L., Gan R., Nicolson N.L., Haier J. Evidence for *Mycoplasma* spp., *Chlamydia pneumoniae*, and human herpes virus-6 coinfections in the blood of patients with autistic spectrum disorders // *J. Neurosci. Res.* – 2007. – Vol. 85(5). – P. 1143–1148. doi: 10.1002/jnr.21203.
 36. Orange J.S. Unraveling human natural killer cell deficiency // *J. Clin. Invest.* – 2012. – Vol. 122(3). – P. 798–801.
 37. Pinillos-Pisón R., Llorente-Cereza M.T., López-Pisón J. Congenital infection by cytomegalovirus. A review of our 18 years' experience of diagnoses // *Rev. Neurol.* – 2009. – Vol. 48(7). – P. 349–353.
 38. Pu D., Shen Y., Wu J. Association between MTHFR gene polymorphisms and the risk of autism spectrum disorders: a meta-analysis // *Autism Res.* – 2013. – Vol. 6(5). – P. 384–392. doi: 10.1002/aur.1300.
 39. Rai V. Association of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene C677T polymorphism with autism: evidence of genetic susceptibility // *Metab. Brain Dis.* – 2016. – Vol. 31(4). – P. 727–735. doi: 10.1007/s11011-016-9815-0.
 40. Sadeghiyeh T., Dastgheib S.A., Mirzaee-Khoramabadi K. et al. Association of MTHFR 677C>T and 1298A>C polymorphisms with susceptibility to autism: A systematic review and meta-analysis // *Asian J Psychiatr.* – 2019. – Vol. 46. – P. 54–61. doi: 10.1016/j.ajp.2019.09.016.
 41. Saghazadeh A., Ataieina B., Keynejad K. et al. A meta-analysis of pro-inflammatory cytokines in autism spectrum disorders: Effects of age, gender, and latitude // *J. Psychiatr. Res.* – 2019. – Vol. 115. – P. 90–102.
 42. Sakamoto A., Moriuchi H., Matsuzaki J. et al. Retrospective diagnosis of congenital cytomegalovirus infection in children with autism spectrum disorder but no other major neurologic deficit // *Brain. Dev.* – 2015. – Vol. 37(2). – P. 200–205. doi: 10.1016/j.braindev.2014.03.016.
 43. Santocchi E., Guiducci L., Fulceri F. et al. Gut to brain interaction in Autism Spectrum Disorders: a randomized controlled trial on the role of probiotics on clinical, biochemical and neurophysiological parameters // *BMC Psychiatry.* – 2016. – Vol. 16. – P. 183. doi: 10.1186/s12888-016-0887-5.
 44. Singh V.K., Warren R.P., Odell J.D. et al. Antibodies to myelin basic protein in children with autistic behavior // *Brain. Behav. Immun.* – 1993 – Vol. 7(1). – P. 97–103.
 45. Ueda S., Uchiyama S., Azzi T. et al. Oropharyngeal group A streptococcal colonization disrupts latent Epstein-Barr virus infection // *J. Infect. Dis.* – 2014. – Vol. 209(2). – P. 255–264. doi: 10.1093/infdis/jit428.
 46. Valayi S., Eftekharian M.M., Taheri M., Alikhani M.Y. Evaluation of antibodies to cytomegalovirus and Epstein-Barr virus in patients with autism spectrum disorder // *Hum. Antibodies.* – 2017. – Vol. 26(3). – P. 165–169. doi: 10.3233/HAB-180335.
 47. Venâncio P., Brito M. J., Pereira G., Vieira J. P. Anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis with positive serum antithyroid antibodies, IgM antibodies against mycoplasma pneumoniae and human herpesvirus 7 PCR in the CSF // *Pediatr. Infect. Dis. J.* – 2014. – Vol. 33 (8). – P. 882 – 883. doi: 10.1097/INF.0000000000000408.
 48. Watanabe T., Sugawara H., Tamura H. et al. Co-infection with group A Streptococci and Epstein-Barr virus presenting with acute glomerulonephritis and acute left ventricular dysfunction // *Intern. Med.* – 2012. – Vol. 51(18). – P. 2639–2643. doi: 10.2169/internalmedicine.51.7761.
 49. Więsik-Szewczyk E., Jahnz-Różyk K. From infections to autoimmunity: Diagnostic challenges in common variable immunodeficiency // *World J. Clin. Cases.* – 2020. – Vol. 8(18). – P. 3942–3955. doi: 10.12998/wjcc.v8.i18.3942.
-

50. Wipfler P., Dunn N., Beiki O. et al. The Viral Hypothesis of Mesial Temporal Lobe Epilepsy - Is Human Herpes Virus-6 the Missing Link? A systematic review and meta-analysis // *Seizure*. – 2018. – Vol. 54. – P. 33–40. doi: 10.1016/j.seizure.2017.11.015.
51. Zhao X.Y., Ewald S.E. The molecular biology and immune control of chronic *Toxoplasma gondii* infection // *J. Clin. Invest.* – 2020. – Vol. 130(7). – P. 3370–3380. doi: 10.1172/JCI1136226.
52. Zuo W., Zhao X. Natural killer cells play an important role in virus infection control: Antiviral mechanism, subset expansion and clinical application // *Clin. Immunol.* – 2021. – Vol. 227. – P. 108727. doi: 10.1016/j.clim.2021.108727.

РЕЗЮМЕ

РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗУЧЕНИЯ МИКРОБНОГО СПЕКТРА У ДЕТЕЙ С РАССТРОЙСТВАМИ СПЕКТРА АУТИЗМА, АССОЦИИРОВАННЫМИ С ГЕНЕТИЧЕСКИМ ДЕФИЦИТОМ ФОЛАТНОГО ЦИКЛА

Мальцев Д.В.

Институт экспериментальной и клинической
медицины Национального медицинского
университета имени А.А. Богомольца

Обоснование. Результаты пяти мета-анализов рандомизированных контролируемых клинических исследований свидетельствуют об ассоциации генетического дефицита фолатного цикла (ГДФЦ) и расстройств спектра аутизма (РАС) у детей. В таких случаях формируется иммунодефицит и иммунная дисрегуляция, что снижает резистентность к некоторым микроорганизмам.

Цель исследования: изучить структуру микробного спектра у детей с РАС, связанными с ГДФЦ, согласно накопленной до сих пор доказательной базой и изучить ассоциации выявленных микроорганизмов и показателей иммунного статуса для улучшения понимания патогенеза энцефалопатии и совершенствования алгоритмов диагностики, мониторинга и лечения.

Материалы и методы. Ретроспективно проанализированы медицинские данные 225 детей в возрасте от 2 до 9 лет ГДФЦ, у которых отмечались клинические проявления РАС (исследуемая группа; ИГ; 183 мальчика и 42 девочки). В контрольную группу (КГ) включили 51 клинически здорового ребенка (37 мальчиков и 14 девочек) аналогичного возрастного и гендерного распределения, у которых не было ГДФЦ. Специальное лабораторное обследование детей групп наблюдения проводили с учетом современных представлений о микробном спектре у пациентов с РАС согласно публикациям в PubMed и Embase. Для изучения ассоциаций между исследуемыми

показателями применяли показатель отношения шансов (odds ratio, OR) и 95% доверительный интервал (95% CI). Исследование выполнялось как фрагмент научно-исследовательской работы по заказу МЗ Украины (№ госрегистрации 0121U107940).

Результаты и их обсуждение. ТТV отмечался в 87%, HHV-7 – 79%, HHV-6 – 68%, EBV – 59%, *Streptococcus pyogenes* – 46%, *Candida albicans* – 41%, *Borrelia* – 34%, *Mycoplasma pneumoniae* – 27%, *Chlamydia pneumoniae* – 26%, *Yersinia enterocolitica* – 23%, *Toxoplasma gondii* – 19%, перенесенная врожденная CMV-нейроинфекция – 7%, последствия HSV-1/2-нейроинфекции – 5% случаев в ИГ ($p < 0,05$; $Z < Z_{0,05}$). HHV-6, HHV-7 и EBV были ассоциированы с дефицитами NK-, NKT- и CD8 + цитотоксических Т-лимфоцитов. ТТV также был ассоциирован с дефицитами NK- и NKT-лимфоцитов, однако не с дефицитом CD8 + цитотоксических Т-клеток. Стрептококковая инфекция была связана с гипо- и дисиммуноглобулинемиями, а также – дефицитом миелопероксидазы. Кандидоз был ассоциирован только с дефицитом миелопероксидазы. Токсоплазмоз отмечался при дефиците CD4+ Т-хелперов и комбинированных нарушениях иммунитета. Последствия врожденной CMV-нейроинфекции имели место только при комбинированных нарушениях иммунитета.

Выводы. Для детей с РАС, ассоциированными с ГДФЦ, характерен специфический микробный спектр с преобладанием интрацеллюлярных оппортунистических и условно патогенных микроорганизмов, который определяется особенностями нарушений в иммунном статусе, спровоцированных ГДФЦ, и должен определять алгоритм рационального микробиологического поиска, оценки иммунного статуса, проведения антимикробного и иммуностроительного лечения.

Ключевые слова: иммунодефицит, иммунодиагностика, антимикробная терапия, иммунотерапия, ось микробиота-кишечник-мозг.

SUMMARY

THE RESULTS OF THE STUDY OF THE MICROBIAL SPECTRUM IN CHILDREN WITH AUTISM SPECTRUM DISORDERS ASSOCIATED WITH GENETIC DEFICIENCY OF THE FOLATE CYCLE

Maltsev D.

Institute of Experimental and Clinical Medicine at the O. Bogomolets National Medical University

Backgrounds. The results of five meta-analyses of randomized controlled clinical trials suggest an association of genetic folate cycle deficiency (GDFC) with autism spectrum disorders (ASD) in children. In such cases, immunodeficiency and immune dysregulation are formed, which reduces resistance to some microorganisms.

The aim of the study: to study the structure of the microbial spectrum in children with ASD associated with GDFC according to the accumulated evidence base and to evaluate the association of detected microorganisms with indicators of immune status to improve understanding of pathogenesis of encephalopathy and algorithms for diagnostics, monitoring and treatment.

Materials and methods. Medical data of 225 children aged 2 to 9 years with GDFC, in which clinical manifestations of ASD were observed (study group; SG; 183 boys and 42 girls) were retrospectively analyzed. The control group (CG) included 51 clinically healthy children (37 boys and 14 girls) of similar age and gender distribution who did not suffer from GDFC. A special laboratory examination of children in the observation groups was performed taking into account current data about the microbial spectrum in patients with ASD according to publications in PubMed and Embase. To study the associations between the indicators, the odds ratio (OR) and the 95% confidence interval

(95% SI) were used. The research was performed as a fragment of research work commissioned by the Ministry of Health of Ukraine (№ state registration 0121U107940).

Results and discussion. TTV was observed in 87%, HHV-7 – 79%, HHV-6 – 68%, EBV – 59%, *Streptococcus pyogenes* – 46%, *Candida albicans* – 41%, *Borrelia* – 34%, *Mycoplasma pneumoniae* – 27%, *Chlamydia pneumoniae* – 26%, *Yersinia enterocolitica* – 23%, *Toxoplasma gondii* – 19%, congenital CMV neuroinfection – 7%, the consequences of HSV-1/2-neuroinfection – 5% of cases in SG ($p < 0.05$; $Z < Z_{0.05}$). HHV-6, HHV-7 and EBV have been associated with NK-, NKT- and CD8+ cytotoxic T-lymphocyte deficiencies. TTV was also associated with NK- and NKT-lymphocyte deficiencies, but not with deficiency of CD8+ cytotoxic T cells. Streptococcal infection has been associated with hypo- and dysimmunoglobulinemia, as well as myeloperoxidase deficiency. Candidiasis was associated only with myeloperoxidase deficiency. Toxoplasmosis has been reported in CD4+ T-helper deficiency and combined immune disorders. The consequences of congenital CMV neuroinfection have occurred only in combined immune disorders.

Conclusions. Children with ASD associated with GDFC are characterized by a specific microbial spectrum with predominance of intracellular opportunistic and conditionally pathogenic pathogens, which is determined by the disorders of immune status provoked by GDFC, which should determine the algorithm of rational antimicrobial, immunological diagnostic search and treatment.

Key words: immunodeficiency, immunodiagnostics, antimicrobial therapy, immunotherapy, microbiota-gut-brain axis.

АВТОРСЬКА ДОВІДКА

- Мальцев Дмитро Валерійович
- Інститут експериментальної і клінічної медицини Національного медичного університету імені О.О. Богомольця, зав. лабораторією імунології і молекулярної біології
- Адреса: 01601, просп. Перемоги, 34, Київ, Україна
- Тел.: (068) 100-85-95
- E-mail: dmaltsev@ukr.net

- Мальцев Дмитрий Валерьевич
- Институт экспериментальной и клинической медицины НМУ имени А.А. Богомольца, зав. лабораторией иммунологии и молекулярной биологии
- Адрес: 01601, просп. Победы, 34, г. Киев, Украина
- Тел.: (068) 100-85-95
- E-mail: dmaltsev@ukr.net

- Maltsev Dmytro
- Experimental and Clinical Medicine Institute at the O.O. Bohomolets National Medical University
- Address: 34 Peremohy ave., Kyiv 01601, Ukraine
- Tel.: (068) 100-85-95
- E-mail: dmaltsev@ukr.net

Стаття надійшла до редакції 01.10.2021 р.

У разі виникнення питань до автора статті, звертайтеся до редакції журналу info@ujmh.net