

## ИММУНОЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ ОСТРОГО КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

Ильинских Е.Н.<sup>1</sup>, Замятина Е.В.<sup>1</sup>, Ильинских Н.Н.<sup>1</sup>, Полежаев В.С.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения России», Томск, e-mail: infconf2009@mail.ru

Целью работы было выявить прогностические критерии и создать регрессионную модель, позволяющие дифференцировать очаговую (ОФ) и менингеальную (МФ) формы клещевого энцефалита (КЭ), а также острую антигемиемию (ОА) и лихорадочную форму (ЛФ) этой инфекции на основе оценки некоторых иммунологических, цитогенетических показателей и определения концентрации малонового диальдегида (МДА). В исследование было включено 27 лиц с субклинической ОА, 22 пациентов с ЛФ, 23 больных с МФ, 15 больных ОФ КЭ, а также 22 здоровых лица. Проанализировали концентрацию МДА в сыворотке крови, частоту Т-лимфоцитов периферической крови и клеток буккального эпителия (БЭ) с микроядрами (МЯ), а также спонтанные уровни продукции интерферонов-альфа и -гамма (ИФ- $\alpha$ , ИФ- $\gamma$ ), фактора некроза опухоли-альфа (ФНО- $\alpha$ ), интерлейкинов-4 и -10 (ИЛ-4 и ИЛ-10) в супернатантах культур мононуклеарных клеток. Установлено, что высокую прогностическую силу для диагноза ОФ КЭ показали значения следующих показателей: МДА выше 6,0 мкмоль/л, ИФ- $\alpha$  ниже 20,0 пг/мл, ИФ- $\gamma$  ниже 15,0 пг/мл, ИЛ-10 выше 28,0 пг/мл, ФНО- $\alpha$  выше 43,0 пг/мл, соотношения ФНО- $\alpha$ /ИЛ-4 больше 11,0, частоты клеток БЭ с МЯ более 6% и частоты лимфоцитов с МЯ более 9%. Кроме того, ранними предикторами ЛФ КЭ после укуса клеща и дифференцирования ЛФ и ОА имели значения показателей ИФ- $\alpha$  выше 23 пг/мл, ИФ- $\gamma$  выше 12,6 пг/мл и ИЛ-4 ниже 3,9 пг/мл. С помощью логистического регрессионного анализа разработана модель, которая имеет «отличное» качество прогноза развития ОФ (AUC = 0,95). Таким образом, показана тесная взаимосвязь между активацией окислительного стресса, продукцией провоспалительных цитокинов и индукцией цитогенетических нарушений у больных КЭ. Кроме того, показана возможность прогнозирования риска развития ОФ у больных КЭ, а также риска ЛФ в первые дни после присасывания клеща благодаря использованию иммуноцитогенетических критериев и регрессионной модели.

Ключевые слова: клещевой энцефалит, интерфероны, интерлейкины, малоновый диальдегид, микроядра, буккальные клетки, бинуклеарные лимфоциты, логистическая регрессия.

## IMMUNOLOGIC AND CYTOLOGIC PREDICTIONAL CRITERIA OF ACUTE TICK-BORNE ENCEPHALITIS

Ilyinskikh E.N.<sup>1</sup>, Zamyatina E.V.<sup>1</sup>, Ilyinskikh N.N.<sup>1</sup>, Polezhaev V.S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Siberian State Medical University, Tomsk, e-mail: infconf2009@mail.ru

The aim of this study was to identify predictors and develop a regression model to differentiate between focal encephalitis (EF) and meningeal forms (MF) of tick-borne encephalitis (TBE), as well as between acute antigenemia (AA) and febrile form (FF) of this infection using assessment of some immunological, cytogenetic parameters and concentration of malonic dialdehyde (MDA). The study was involved 27 persons with subclinical AA, 22 patients with FF, 23 patients with MF, 15 patients with EF, and 22 healthy persons. We assessed the concentration of MDA in serum, the frequency of both peripheral blood T-lymphocytes and buccal epithelium (BE) cells with micronuclei (MN), as well as the levels of spontaneous production of interferon-alpha and -gamma (IF- $\alpha$ , IF- $\gamma$ ), tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukins-4 and -10 (IL-4 and IL-10) in supernatants of mononuclear cell cultures. It was found that the significant predictive power for diagnosis of EF of TBE demonstrated the following parameters: MDA values above 6.0  $\mu$ mol/L, IF- $\alpha$  level below 20.0 pg/ml, IF- $\gamma$  level below 15.0 pg/ml, IL -10 level above 28.0 pg /ml, TNF- $\gamma$  level above 43.0 pg/ml, the ratio of TNF- $\alpha$  / IL-4 above 11.0, the frequency of BE cells with MN above 6% and the frequency of lymphocytes with MN above 9%. In addition, early predictors of FF of TBE after a tick bite as well as for differentiating between FF and OA included parameters of IF- $\alpha$  above 23 pg/ml, IF- $\gamma$  above 12.6 pg/ml, and IL-4 below 3.9 pg/ml. We developed a model using logistic regression analysis that showed the significant predictive power for diagnosis of EF of TBE (AUC = 0.95). Thus, we showed significant associations between activation of oxidative stress, the production of proinflammatory cytokines and the induction of cytogenetic aberrations in patients with TBE. In addition, we demonstrated the possibility of the risk prediction of EF in patients with TBE, as well as the risk of FF in the first days after tick sucking using predictive immunologic and cytogenetic criteria and regression model.

Keywords: tick-borne encephalitis, interferons, interleukins, malonic dialdehyde, micronuclei, buccal cells, binuclear

lymphocytes, logistic regression.

Известно, что клещевой энцефалит (КЭ) является одной из наиболее распространенных природно-очаговых инфекций, сопровождающихся развитием как бессимптомных (инаппарантных) и относительно благоприятно протекающих лихорадочных форм (ЛФ), так и более тяжелых – менингеальных (МФ) и в особенности очаговых форм (ОФ). Установлено, что многие вирусные и бактериальные инфекционные заболевания, включая КЭ, сопровождаются индукцией повреждений ДНК и цитогенетическими нарушениями в различных типах соматических клеток [1]. Одним из основных механизмов, приводящих к интенсификации мутационных изменений ДНК при инфекционном процессе, считается окислительный стресс, инициируемый провоспалительными цитокинами [2]. Установлено, что тяжесть течения КЭ и развитие наиболее тяжелой ОФ болезни тесно связаны с активностью иммунопатологических и окислительных процессов [3]. Известно, что КЭ у большинства инфицированных людей протекает в бессимптомной инаппарантной форме болезни, однако в настоящее время отсутствуют какие-либо критерии, позволяющие прогнозировать риск манифестного течения заболевания у лиц с острой антигенемией (ОА) в инкубационный период после присасывания клеща. К числу наиболее трудных проблем диагностики КЭ относится раннее распознавание ОФ, которую в начале заболевания сложно дифференцировать от МФ. Потенциально для этих целей можно использовать показатели оценки активности окислительного стресса (ОС), продукции цитокинов лимфоцитами крови и микроядерного теста, как одного из наиболее технически простых методов изучения частоты клеток с цитогенетическими нарушениями [4]. Одним из современных направлений диагностики некоторых тяжело протекающих инфекционных заболеваний является разработка компьютерных диагностических алгоритмов и шкал, которые могли бы использоваться для определения тяжести и прогнозирования исходов заболевания [5]. Целью данной работы было выявить прогностические критерии и составить диагностические алгоритмы, позволяющие дифференцировать ОФ и МФ КЭ, а также ОА и ЛФ этого заболевания на основе оценки некоторых иммунологических (продукции цитокинов лимфоцитами), цитопатологических показателей (частоты выявления микроядер (МЯ) в различных типах клеток) и одного из основных параметров активности процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) – определения концентрации малонового диальдегида (МДА).

### **Материал и методы**

Работа выполнена на базах клиники инфекционных заболеваний Сибирского государственного медицинского университета (СибГМУ) и инфекционного отделения

ОГАУЗ 3-й Городской больницы г. Томска в период эпидсезонов КЭ 2009-2016 годов. В исследование было включено 27 лиц с ОА после присасывания клеща, у которых в дальнейшем не развилась манифестная форма заболевания, 22 пациентов с диагнозом ЛФ, 23 больных с МФ и 15 больных ОФ острого КЭ, а также 22 здоровых лица в качестве контроля. Все группы были сопоставимы по полу и возрасту, который варьировал от 18 до 62 лет. Среди больных ОФ преобладали больные менингоэнцефалитическим вариантом.

Диагноз был верифицирован обнаружением IgM и IgG к вирусу КЭ методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с применением тест-систем ЗАО «Вектор-Бест» (г. Кольцово, Россия). Исследование было одобрено Этическим комитетом СибГМУ Минздрава РФ (протокол № 4308 от 19.10.2015 г.) и проводилось только после получения информированного согласия на участие в соответствии с правилами «О порядке проведения биомедицинских исследований у человека» (2002) и «Правилами клинической практики» (Приказ МЗ РФ № 266 от 19.06.03).

Оценку активности реакций ПОЛ проводили по содержанию МДА в сыворотке крови в реакции с тиобарбитуровой кислотой [6]. У всех обследованных лиц был проведен анализ частоты клеток буккального эпителия (БЭ) с МЯ в цитологических мазках, фиксированных в абсолютном этаноле [4]. Для изучения частоты бинуклеарных цитокинез-блокированных Т-лимфоцитов периферической крови с МЯ получали культуры этих клеток в соответствии со стандартной методикой [4]. Использовали питательную среду RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, США) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Sigma-Aldrich, США) и фитогемагглютинина (ФГА) как стимулятора деления (10 мкг/мл) («ПанЭко», Россия). После 44 ч культивирования при 37 °С в культуру клеток добавляли цитокинез-блокирующий агент – цитохалазин В (Sigma-Aldrich, США) до конечной концентрации 6 мкг/мл. Фиксацию клеток в смеси метанола и ледяной уксусной кислоты (3:1) и приготовление препаратов начинали через 72 ч после начала инкубации. Препараты БЭ и лимфоцитов окрашивали по методу Романовского-Гимзе и анализировали не менее 1000 клеток у каждого человека.

Кроме того, мы оценили спонтанные уровни продукции интерферонов-альфа и -гамма (ИФ- $\alpha$ , ИФ- $\gamma$ ), фактора некроза опухоли-альфа (ФНО- $\alpha$ ) и интерлейкинов-4 и -10 (ИЛ-4 и ИЛ-10) в супернатантах 24-х часовых культур моноклеарных клеток с помощью твердофазного ИФА в соответствии с инструкциями, предлагаемыми производителем тест-систем (ООО «Протеиновый контур», Россия).

Различия качественных данных между группами были проанализированы с помощью определения показателя отношения шансов (ОШ), критерия значимости гипотезы  $\chi^2$  или точного критерия Фишера. Зависимости между переменными определяли с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Для обработки данных и статистического

анализа применялись модули приложения Scorecard программного обеспечения STATISTICA 12.0 (StatSoft, США) [7], предназначенные для разработки и оценки моделей оценочных алгоритмов. Вначале с помощью модуля, определяющего информационную ценность каждого показателя, была дана оценка их прогностической силы, затем был использован бинарный логистический регрессионный анализ и сгенерирована шкала в баллах для каждой модели [7]. Прогностическая оценка диагностической модели проведена с помощью ROC-анализа (receiver operating characteristic) в координатах графиков «чувствительность–специфичность» с вычислением AUC (area under ROC curve) – площади под ROC-кривой и COV (cut-off value) – значения оптимального порога отсечения переменной [8]. При проверке статистических гипотез значения  $P < 0,05$  считались как статистически значимые. Данные были представлены как медиана (*Me*) и квартили [ $Q_{25}$  ;  $Q_{75}$ ].

### **Результаты и обсуждение**

Установлено, что секреция ИФ- $\alpha$  и ИФ- $\gamma$  в супернатантах культур лимфоцитов больных ЛФ (35,3[32,0;44,8] и 19,3[12,3;33,4] пг/мл), МФ (25,3 [14,4;32,8] и 16,2 [12,4;25,6] пг/мл) и ОФ (15,3[13,4;25,3] и 14,2[10,8;16,0] пг/мл) была существенно выше, чем в контрольной группе (3,1[2,2;5,7] и 6,9[5,5;8,4] пг/мл,  $P < 0,001$  во всех случаях). Аналогичные достоверные изменения были выявлены в отношении продукции ФНО- $\alpha$  и соотношения ФНО- $\alpha$ /ИЛ-4 у больных ЛФ (18,3[13,9;22,2] пг/мл и 6,1[2,7;9,5]), МФ (39,1[15,9;48,3] пг/мл и 7,9[6,8;13,5]) и в особенности у пациентов с ОФ (56,5 [45,9;58,8] пг/мл и 14,2[2,9;11,2]), по сравнению с контролем (5,0 [3,8;6,9] пг/мл и 2,4[1,4;3,3],  $P < 0,001$  во всех случаях), что свидетельствовало о поляризации иммунного ответа по пути Т-хелперов (Th) типа 1 и совпадало с данными других авторов [9]. Известно, что ФНО- $\alpha$  активирует ОС и, так же как и МДА, может характеризовать степень эндогенной интоксикации [2], о чем также свидетельствует прямая корреляционная связь между продукцией ФНО- $\alpha$  и/или соотношением ФНО- $\alpha$ /ИЛ-4 и содержанием МДА в сыворотке крови больных КЭ ( $r=0,45$  и  $r=0,56$ ,  $P=0,005$  и  $P < 0,001$ ). Более того, у больных с МФ и ОФ концентрация МДА в сыворотке крови (4,3[3,5;6,6] и 7,3[6,1;8,5] мкмоль/л), а также частота выявления клеток БЭ с МЯ (4,7[3,2;6,6] и 10,6[7,8;12,4] %) и частота лимфоцитов с МЯ (5,6[4,7;7,5] и 11,5[10,9;21,8] %) были значительно выше не только, чем в контроле (1,0[0,5;1,7] мкмоль/л, 0,3[0,2;0,4] % и 0,4[0,2;0,6] %, при  $P < 0,001$  во всех случаях), но и по сравнению с пациентами с ЛФ (2,6[2,2;4,1] мкмоль/л, 2,67[2,3;3,3] % и 3,2[2,3;4,5] %,  $P < 0,001$ ,  $P < 0,001$  и  $P = 0,021$  соответственно). У больных КЭ также выявлена прямая корреляционная зависимость между частотой клеток БЭ с МЯ, лимфоцитов с МЯ и концентрацией МДА в сыворотке и/или продукцией ФНО- $\alpha$  ( $r=0,69$ ,  $r=0,62$  и  $r=0,58$ ,  $r=0,49$ ,  $P < 0,001$ ), что свидетельствовало о

тесной взаимосвязи ОС и повреждения ДНК.

Однако в супернатантах больных МФ и в особенности ОФ продукция ИФ- $\alpha$  и ИФ- $\gamma$  оказалась значительно ниже, чем у больных ЛФ ( $P=0,001$  и  $P<0,001$  для ИФ- $\alpha$  и  $P=0,038$  и  $P=0,011$  для ИФ- $\gamma$ ), что может быть связано со снижением функциональной активности Т-клеток. Кроме того, у больных ОФ продукция ИЛ-10 в супернатантах культур (33,6[25,0;37,1]) была существенно выше, чем у больных ЛФ (17,0[12,4;29,3],  $P=0,039$ ), что, по-видимому, отражает направленность этого цитокина на ограничение воспалительной реакции у пациентов ОФ КЭ [9].

В таблице 1 проанализированы результаты изучения показателя отношения шансов (ОШ) для различных параметров ОС, цитокинового статуса и микроядерного анализа, которые показывают во сколько раз шанс иметь изучаемый признак в группе больных ОФ больше, чем в группе с МФ КЭ.

Таблица 1

Малоновый диальдегид в сыворотке крови, а также некоторые иммунологические и цитогенетические показатели как предикторы очаговой формы клещевого энцефалита

Предикторы	Частота (%) в группах больных		ОШ (95% ДИ)	$\chi^2$ или ТКФ	P
	ОФ КЭ n=15	МФ КЭ n=23			
Малоновый диальдегид, мкмоль/л > 6	66,7	13,0	13,3 (2,6-67,3)	9,3	0,001
<b>Цитокины</b>					
ИФ- $\alpha$ , пг/мл < 20	73,3	30,4	6,3 (1,5-26,8)	6,7	0,011
ИФ- $\gamma$ , пг/мл < 15	66,7	21,7	7,2 (1,7-31,0)	7,7	0,006
ИЛ-10, пг/мл > 28	66,7	21,7	7,2 (1,5-31,0)	7,7	0,006
ФНО- $\alpha$ , пг/мл > 43	80,0	13,0	26,7 (4,6-153,9)	14,3	<0,001
ФНО- $\alpha$ /ИЛ-4 > 11	66,7	26,1	5,7 (1,4-23,5)	6,1	0,013
<b>Цитогенетические тесты</b>					
Частота клеток буккального эпителия с МЯ, % > 6,0	73,3	30,4	6,3 (1,5-26,8)	6,7	0,011
Частота бинуклеарных лимфоцитов с МЯ, % > 9,0	73,3	13,0	18,3 (3,5-97,2)	11,7	<0,001

Примечание: КЭ – клещевой энцефалит; МФ – менингеальная форма; ОФ – очаговая форма; ИФ – интерферон; ИЛ – интерлейкин; ФНО – фактор некроза опухоли; МЯ – микроядро; ОШ – отношение шансов; 95% ДИ – 95% доверительный интервал;  $\chi^2$  – критерий значимости гипотезы; ТКФ – точный критерий Фишера; P – значимость различий.

Установлено, что высокое прогностическое значение для диагноза ОФ КЭ продемонстрировали значения показателей МДА выше 6,0 мкмоль/л, ИФ- $\alpha$  ниже 20,0 пг/мл, ИФ- $\gamma$  ниже 15,0 пг/мл, ИЛ-10 выше 28,0 пг/мл, ФНО- $\alpha$  выше 43,0 пг/мл, соотношения ФНО- $\alpha$ /ИЛ-4 больше 11,0, частоты клеток БЭ с МЯ более 6% и частоты лимфоцитов с МЯ более 9%.

В таблице 2 приведены результаты ROC-анализа и определения AUC и COV с оценкой чувствительности и специфичности изученных показателей в качестве предикторов ОФ или МФ КЭ, а также ЛФ или ОА. Установлено, что «очень хорошее» качество прогноза высокого риска развития ОФ имели концентрация МДА в сыворотке крови, продукция ИЛ-10, ФНО- $\alpha$ , соотношение ФНО- $\alpha$ /ИЛ-4, частота клеток БЭ с МЯ и частота лимфоцитов с МЯ.

Таблица 2

Чувствительность и специфичность иммунологических и цитогенетических предикторов для дифференциальной диагностики очаговой и менингеальной форм, а также острой антигенемии и лихорадочной формы клещевого энцефалита

Предикторы	AUC / Качество прогноза	COV	Клиническая форма КЭ	Вероятность при значениях выше COV, %
Малоновый диальдегид, мкмоль/л	0,87 / очень хорошее	6,0	ОФ	98,4
ИФ- $\alpha$ , пг/мл	0,70 / хорошее	20,0	МФ	88,9
	0,94 / отличное	23,0	ЛФ	98,3
ИФ- $\gamma$ , пг/мл	0,64 / среднее	15,0	МФ	75,2
	0,83 / очень хорошее	12,6	ЛФ	93,7
ИЛ-4, пг/мл	0,65 / среднее	3,9	ОА	82,8
ИЛ-10, пг/мл	0,72 / хорошее	28,0	ОФ	90,8
ФНО- $\alpha$ , пг/мл	0,83 / очень хорошее	43,0	ОФ	95,1
ФНО/ИЛ-4	0,88 / очень хорошее	11,0	ОФ	98,9
Частота клеток буккального эпителия с МЯ, %	0,86 / очень хорошее	6,0	ОФ	98,0
Частота бинуклеарных лимфоцитов с МЯ, %	0,89 / очень хорошее	9,0	ОФ	99,0

Примечание: ОА – острая антигенемия вируса клещевого энцефалита; ЛФ – лихорадочная форма; ROC-анализ (receiver operating characteristic) – приемная характеристика приемника; AUC (area under ROC curve) – площадь под ROC-кривой; COV (cut-off value) – значение оптимального порога отсечения.

Цитокиновый статус лиц с ОА отличался от контроля умеренным увеличением концентраций ИЛ-4 (3,6[2,6;5,1] против 2,5[1,7;2,9] пг/мл,  $P<0,001$ ) и ИЛ-10 (15,7 [11,3;23,2] против 9,4 [7,1;15,0] пг/мл,  $P=0,017$ ). Продукция ИФ- $\alpha$  (14,9[13,1;20,4]) и ИФ- $\gamma$  (9,2[6,2;15,1]) у лиц с ОА оказалась статистически значимо выше, чем в контрольной группе (3,1[2,1;5,7] пг/мл,  $P<0,001$  и 6,9 [5,5;8,4] пг/мл,  $P=0,039$ ), но существенно ниже по сравнению с больными ЛФ ( $P<0,001$ ), что соответствовало данным других авторов [10]. К числу предикторов высокого риска ЛФ КЭ после укуса клеща и дифференцирования ЛФ и ОА

(табл. 2) можно отнести значения показателей ИФ- $\alpha$  выше 23 пг/мл ( $\chi^2 = 17,4, P < 0,001$ ), ИФ- $\gamma$  выше 12,6 пг/мл ( $\chi^2 = 8,5, P = 0,003$ ) и ИЛ-4 ниже 3,9 пг/мл ( $\chi^2 = 4,1, P = 0,044$ ).

В таблице 3 приведены результаты логистического регрессионного анализа параметров у больных МФ и ОФ КЭ. Установлено, что модель имеет «отличное» качество прогноза диагноза ОФ (AUC = 0,95, при стандартной ошибке среднего ( $S$ )  $\pm 0,04$ ). Для каждого показателя в таблице приведены коэффициенты регрессии ( $B$ ) и указана условная шкала, которая позволяет рассчитать сумму баллов для каждого пациента. При сумме баллов 454 вероятность развития ОФ 78,0%, а вероятность МФ только 4,4%. В случае суммы баллов 388 и ниже вероятность МФ равна нулю, а ОФ – 55,6%, а при сумме баллов 558 и выше вероятность ОФ равна нулю, а МФ – 52,2%.

Таблица 3

Иммунопатологические алгоритмы прогноза очаговой формы клещевого энцефалита

Предикторы	Баллы	$B$ (95% ДИ)	Log-вероятность	$\chi^2$	$P$
<b>Модель</b>		5,79 (1,74-9,86)	-19,01		0,005
ФНО-альфа/ИЛ-4		0,030 (0,0017-0,026)	-15,2	7,62	0,005
< 5,5	218				
5,5-8,4	218				
8,5-11	197				
>11	75				
ИЛ-10, пг/мл		0,038 (0,001-0,076)	-10,4	9,59	0,002
< 10	218				
11-19	200				
20-28	227				
>28	114				
Частота буккальных клеток с МЯ, %		0,020 (0,001-0,039)	-7,19	6,42	0,011
< 2,5	218				
2,5-5,0	218				
5,1-10,4	98				
10,5-13,9	122				
> 13,9	122				

Примечание:  $B$  – коэффициент регрессии; 95% ДИ – 95% доверительный интервал;  $\chi^2$  – критерий «хи-квадрат»;  $P$  – значимость различий.

### Заклучение

Таким образом, показана тесная взаимосвязь между активацией ОС, продукцией провоспалительных цитокинов и индукцией цитогенетических нарушений у больных КЭ. Кроме того, продемонстрирована возможность прогнозирования риска развития ОФ у больных КЭ, а также риска манифестного течения ЛФ в первые дни после присасывания клеща благодаря использованию иммуноцитогенетических критериев и регрессионной модели.

### Список литературы

1. Ryan E.L., Hollingworth R., Grand R.J. Activation of the DNA damage response by RNA viruses. *Biomolecules*, 2016, vol. 6, no. 1, p. 2 [Электронный ресурс]. URL: <http://www.mdpi.com/2218-273X/6/1/2> (дата обращения: 02.02.2018).
2. Tawadrous G.A., Aziz A.A., Amin D.G. et al. RANTES, TNF- $\alpha$ , oxidative stress, and hematological abnormalities in hepatitis C virus infection. *Investig. Med.*, 2012, vol. 60, no. 6, p. 878-882.
3. Оксидативный стресс у больных клещевым энцефалитом на Дальнем Востоке Российской Федерации / Т.А. Захарычева [и др.] // *Дальневосточный журнал инфекционной патологии*. – 2012. – № 20. – С. 41–45.
4. Bolognesi C., Fenech M. Micronucleus assay in human cells: lymphocytes and buccal cells. *Methods Mol. Biol.*, 2013, vol. 1044, p. 191-207.
5. Tuan N.M., Nhan H.T., Chau N.V. et al. Sensitivity and specificity of a novel classifier for the early diagnosis of dengue. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2015, vol. 9, no. 4, e0003638 [Электронный ресурс]. URL: <http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0003638> (дата обращения: 02.02.2018).
6. Гаврилов В.Б., Гаврилова А.Р., Мажуль Л.М. Анализ методов определения продуктов перекисного окисления липидов в сыворотке крови по тесту с тиобарбитуровой кислотой // *Вопр. мед. химии*. – 1987. – № 1. – С. 118–122.
7. Siddiqi N. *Intelligent credit scoring: building and implementing better credit risk scorecards*. – NJ: John Wiley & Sons, 2017. – 438 p.
8. Kumar R., Indrayan A. Receiver operating characteristic (ROC) curve for medical researchers // *Indian Pediatr.* – 2011. – vol. 48, no. 4. – P. 277-287.
9. Комплексная оценка состояния иммунной системы при различных формах клещевого энцефалита в остром периоде / Н.В. Крылова [и др.] // *Медицинская иммунология*. – 2012. – Т. 14, № 4-5. – С. 313-320.
10. Сравнительное изучение гуморальных факторов иммунитета у инфицированных вирусом клещевого энцефалита лиц, не вакцинированных и вакцинированных против клещевого энцефалита / Н.В. Крылова [и др.] // *Медицинская иммунология*. – 2009. – Т. 11, № 2-3. – С. 197-204.