

6. Chen R. T., Markowitz L. E., Albrecht P. et al. Measles antibody: re-evaluation of protective titers. *J. Infect. Dis.* 1990; 162: 1036—1042.
7. Damien B., Huiss S., Sheider F., Muller C.P. Estimated susceptibility to asymptomatic secondary immune response against measles in late convalescent and vaccinated persons. *J. Med. Virol.* 1998; 56: 85—90.
8. Hickman C.J., Hyde T. B., Sovers S. B. et al. Laboratory characterization of measles virus infection in previously vaccinated and unvaccinated individuals. *J. Infect. Dis.* 2011. 204 (suppl. 1): 549—558.
9. Moss W. J., Strebel P. M. Biological of measles eradication. *J. Infect. Dis.* 2011; 204: 47—53.
10. Muller C. P. Measles elimination: old and new challenges? *Vaccine.* 2001; 19 (17—19): 2258—2261.
11. Onishchenko G., Ezhlova E., Gerasimova A. et al. Progress toward measles elimination in the Russian Federation, 2003-2009. *J. Infect. Dis.* 2011; 20: 366—372.
12. Ratnam S., Tipples G., Head C. et al. Performance of indirect immunoglobulin M (IgM) serology test and IgM capture assays for laboratory diagnosis of measles. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38: 99—104.
13. Rota J. S., Hickman C. J., Sovers S. B. et al. Two case studies of modified measles in vaccinated physicians exposed to primary measles case: high risk of infection but low risk of transmission. *J. Infect. Dis.* 2011; 204: 559—563.
14. Samoilovich E. O., Yermalovich M. A., Semeiko G. V. et al. Outbreak of measles in Belarus, January—June 2006. *Euro Surveill.* 2006; 11 (30): 3011.
15. Shulga S. V., Rota P. A., Kremer J. R. et al. Genetic variability of wild-type measles viruses, circulating in the Russian Federation during the implementation of the National Measles Elimination Program, 2003—2007. *Clin. Microbiol. Infect.* 2009; 15 (6): 528—537.
16. Siedler A., Mankertz A., Feil F. et al. Closer to the goal: Efforts in measles elimination in Germany 2010. *J. Infect. Dis.* 2011; 204: 373—380.
17. Strebel P. M., Cochi S. L., Hoekstra E. et al. A world without measles. *J. Infect. Dis.* 2011; 204: P.1—3.
18. Tikhonova N. T., Bichurina M. A., Gerasimova A. G. et al. Enhanced surveillance for measles in low-incidence territories of the Russian Federation: defining a rate for suspected case investigation. *Epidemiol. Infect.* 2011; 139: 239—246.
19. Velicko I., Muller L. L., Pebody R. et al. Nationwide measles epidemic in Ukraine: the effect of low vaccine effectiveness. *Vaccine.* 2008; 26: 6980-6985.
20. WHO — World Health Organization. Manual for the laboratory diagnosis of measles and rubella virus infection. 2-nd ed. Geneva, Switzerland: WHO; 2006: .22.
21. <http://www.euro.who.int/en/what-we-do/health-topics/disease-prevention/vaccines-and-immunization/publications/who-epidemiological-briefs/who-epidemiological-brief-18-measles-outbreaks,-member-state-responses,-measles-exportation-to-the-americas-region,-afp-surveillance-and-the-polio-outbreak-in-China>

Поступила 30.01.12

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2012

УДК 616.98:578.828.6]-092:612.017.1.064]:577.21.08

**В. Ю. Лага¹, Е. В. Казеннова¹, А. В. Васильев¹, И. А. Лаповок¹, А. Исмаилова², Н. Бейшеева²,
Н. Асыбалиева², М. Р. Бобкова¹**

Молекулярно-генетическая характеристика вариантов ВИЧ-1, распространенных на территории Киргизии

¹ФГБУ НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского Минздравсоцразвития России, Москва; ²Республиканское объединение СПИДа Киргизской Республики, Бишкек

Представлены результаты молекулярно-эпидемиологического анализа вариантов ВИЧ-1, циркулирующих на территории Киргизии. Подобная работа в Киргизии проводилась впервые. Обнаружены вариант IDU-A, доминирующий на территории бывшего СССР, а также рекомбинантная форма ВИЧ-1 CRF02_AG. Предполагается возможность дальнейшего рекомбинационного процесса между этими двумя вариантами ВИЧ-1.

Ключевые слова: вирус иммунодефицита человека, молекулярно-эпидемиологический анализ, Киргизия

Molecular-Genetic Characterization of the HIV-1 Variants Abundant in Kirghizia

**V. Yu. Laga¹, E. V. Kazennova¹, A. V. Vasil'ev¹, I. A. Lapovok¹, A. Ismailova², N. Beisheeva², N. Asybalieva²,
and M. R. Bobkova¹**

¹ Ivanovsky Institute of Virology, Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation, Moscow, Russia;

² Republican Association AIDS, Bishkek, Kyrgyz Republic

The results of the molecular epidemiological analysis of HIV-1 circulating in Kirghizia were presented. In the area of Kirghizia this type of the work was performed for the first time. Two main genetic variants were discovered: variant IDU-A dominating in the area of the former Soviet Union, as well as recombinant form CRF02_AG. The possibility of further recombination process between these two variants of HIV-1 was suggested.

Key words: HIV, molecular epidemiological analysis, Kirghizia

Проблема ВИЧ-инфекции в странах бывшего СССР с момента своего возникновения по сегодняшний день остается одним из самых острых вопросов здравоохранения данных государств, однако молекулярно-эпидемиологическая ситуация в указанных странах изучена неодинаково.

В странах, где слежение за распространением ВИЧ-1 организовано в достаточной степени (Россия, Украина, Белоруссия, Казахстан, страны Балтии), имеется большое количество данных по распространению различных подтипов вируса и мутаций лекарственной устойчивости [1, 2, 4, 6, 9, 10]. Известно, что на терри-

Контактная информация:

Лага Вита Юрьевна, мл. науч. сотр.; e-mail: vita.laga@mail.ru

Праймеры, адаптированные для варианта IDU-A ВИЧ-1

Праймер	Последовательность	Регион	Координаты полученного фрагмента	Длина, п.н.
EnvF1	5'-GATGCATGAGGATATAATCAGTTTATGGGA-3'			
EnvR1	5'-ATTGATGCTGCGCCCATAGTGT-3'	env	6556—7792	1237
EnvF2	5'-AGTTTATGGGACCAAAGCCTAAAGCCATGT-3'			
EnvR2	5'-ACTGCTCTTTTTTCTCTCTCCACCACTCT-3'			
P0M	5'-CCCTAGGAAAAAGGGCTGTTGGA-3'			
R2726	5'-TGGAGTATTGTATGGATTTTCAGGC-3'	PR	2133—2610	478
F2111	5'-CAAAGGGAGGCCAGGAAATTT-3'			
polR1	5'-TCTTCTGTTAATGGCCATTGTTAA-3'			
F 2491	5'-CCCCTGTCAACATAATTGGA-3'			
RT2A	5'-TCTGTATATCATTGACAGTCCAGC-3'	RT1	2540—3251	712
RT1A	5'-GTTGACTCAGCTTGGTTGTAC-3'			
R 3271	5'-ACTGTCCATTTGTCAGGATG-3'			
P5M	5'-ACAGGGATGGAAGGATCACC-3'			
P13A	5'-AATTGTTTACATCATTAGTGTGAGCA-3'	RT2	3110—3558	449
F3077	5'-GAAATAGTTATCTATCAATACATGGATGACTT-3'			
3RES-A	5'-ACTGTCCATTTGTCAGGATG-3'			
Int1L	5'-AggAgCagAgACTTTCTATgTAgATgg-3'	IN	4230—4991	762
Int1R	5'-TTCTTCTgCCATAggAgATgCCTAAg-3'			
Int2L	5'-gAggAAATgAACAAgTAgAT-3'			
Int2R	5'-gATgTgTACTTCTgAACTTA-3'			

тории большинства этих стран доминирует вариант IDU-A, получивший свое название по основному пути передачи — среди потребителей инъекционных наркотиков (intravenous drug users), а также распространены подтип В и рекомбинантный вариант CRF03_AB [1]. Очевидно, сходная картина эпидемии ВИЧ-инфекции в указанных странах обусловлена тесными социально-экономическими связями между ними. В большинстве стран бывшего СССР вариант подтипа В ВИЧ-1 в основном распространен среди гомосексуалистов. Вариант IDU-A в настоящее время вышел за пределы группы риска и все чаще передается гетеросексуальным путем. В Узбекистане отмечено распространение рекомбинантного варианта CRF02_AG (9,2%) [5].

Молекулярная картина эпидемии ВИЧ-инфекции в Киргизии до сих пор практически не изучена. Известно, что к началу 2010 г. число зарегистрированных случаев ВИЧ-инфекции в стране составило 2561. Изначально вирус распространялся среди потребителей инъекционных наркотиков, причем число зараженных мужчин втрое превышало число зараженных женщин. В дальнейшем увеличилась роль гетеросексуального пути передачи и возросла доля зараженных женщин, кроме того, стали регистрироваться случаи заражения вертикальным путем [3].

Целью настоящего исследования был молекулярно-генетический анализ вариантов ВИЧ-1, циркулирующих на территории Киргизии. Подобное исследование в данной стране было проведено впервые.

Материалы и методы

В работе было использовано 22 образца от ВИЧ-инфицированных пациентов из разных регионов Киргизии, зарегистрированных с диагнозом ВИЧ-инфекции в период с 2003 по 2009 г. и давших информированное согласие на участие в исследовании. Возраст пациентов варьировал от 24 до 49 лет, соотношение полов 1:1. Выявление факторов риска, возможных мест заражения, а также эпидемиологических связей с другими ВИЧ-инфицированными лицами проводили путем опроса пациентов при сборе эпидемиологического анамнеза. Кроме того, регистрировали возраст, пол пациента, дату забора клинического материала, дату и регион постановки диагноза ВИЧ-инфекции.

Выделение ДНК из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) проводили с помощью автоматической системы DNA/RNA Extractor Quicube («QIAGEN», Германия) в соответствии с инструкцией производителя.

Для амплификации фрагментов гена gag с координатами 1576—2040 (координаты здесь и далее даны для варианта ВИЧ-1 HXB2, регистрационный номер GenBank K03455) использовали праймеры HIG777/HIP202 и H1Gag1584/g17 [7] для первого и второго раундов соответственно.

Для анализа области гена env и области pol был подобран и использован специфический для варианта IDU-A набор праймеров, позволяющих амплифицировать отдельные участки данного гена, кодирующие протеазу (PR), обратную транскриптазу (RT) и интегразу (IN) (табл. 1).

Секвенирование полученных ампликонов выполняли с использованием автоматического секвенатора (ABI Prism 3130, «Applied Biosystems», США). Полученные нуклеотидные последовательности обрабатывали с помощью программы BioEdit.

Работу по определению подтипа вируса по исследуемой области генома проводили с применением on-line программ COMET v.0.1 (<http://comet.retrovirology.lu/>), REGA v.2.0 (<http://dbpartners>).

Таблица 2

Результаты молекулярно-эпидемиологического анализа вариантов ВИЧ-1, выделенных от пациентов в Киргизии

Пол	Потребление инъекционных наркотиков		Гетеросексуальный путь	
	подтип A1	рекомбинант AG	подтип A1	рекомбинант AG
М.	8	2	0	1
Ж.	0	0	8	3

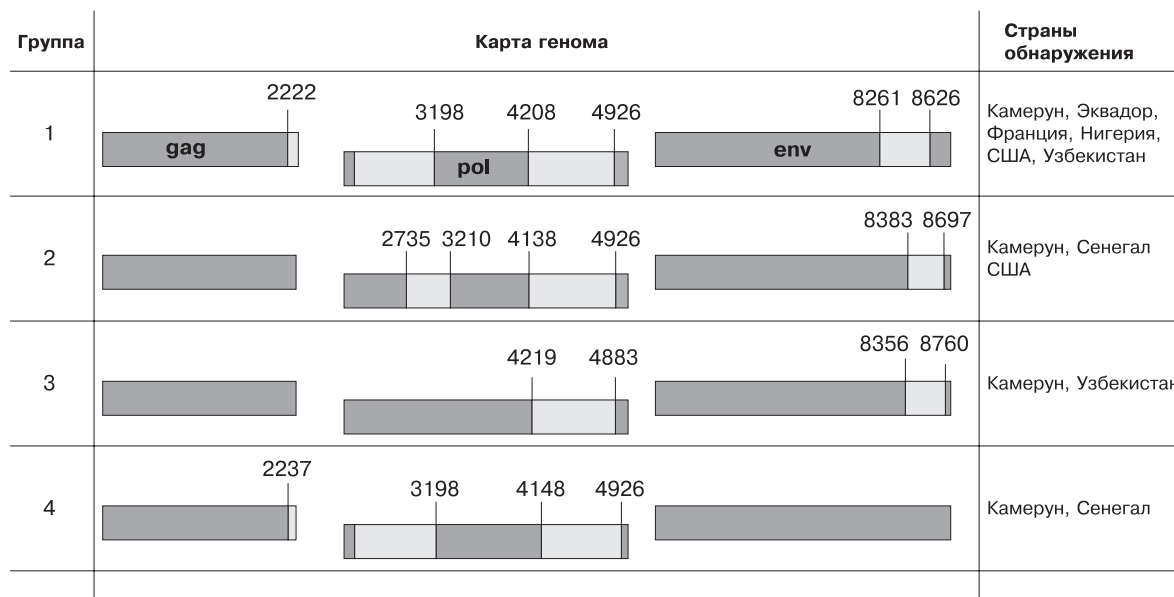


Рис. 1. Структура генома вариантов CRF02_AG. Цифрами обозначены точки рекомбинации.

stanford.edu/RegaSubtyping/) и HIVdb Program (http://hivdb.stanford.edu/pages/algs/sierra_sequence.html) базы данных Стэнфордского университета. В работе также была использована программа для определения точек рекомбинации Recombinant Identification Program (RIP, <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/RIP/RIP.html>).

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей выполняли методом «ближайших соседей» с использованием пакета программ MEGA 4.0.

Результаты и обсуждение

Результаты молекулярно-эпидемиологического анализа образцов, собранных на территории Киргизии от 22 лиц, представлены в табл. 2. Как следует из этих данных, в 16 образцах выявлен вариант вируса подтипа A1 и в 6 — рекомбинантный вариант CRF02_AG. Стоит отметить, что для женщин в данной выборке характерен только гетеросексуальный путь передачи, в то время как мужчины в основном относятся к группе потребителей инъекционных наркотиков. Примечательно, что распределение подтипов ВИЧ-1 не зависело от пути передачи инфекции.

Особый интерес представлял циркулирующий рекомбинантный вариант CRF02_AG. Из данных литературы известно по меньшей мере о 4 формах AG-рекомбинанта [8], различающихся по локализации точек рекомбинации в генах gag, env и pol (рис. 1). Перед исследователями стояла задача определить, принадлежат ли выявленные в Киргизии рекомбинанты к каким-либо уже известным формам. На основании полученных в данной работе последовательностей можно было сделать лишь предварительные выводы по этому вопросу.

Чтобы определить принадлежность вариантов ВИЧ-1, циркулирующих на территории Киргизии, к одной из форм/подгрупп рекомбинантов, для филогенетического анализа были выбраны 3 области ге-

нома — область гена pol, кодирующая IN (данная область во всех вариантах рекомбинантной формы AG относится к подтипу G), а также области генов gag и env.

Первой была проанализирована область IN. На рис. 2 показано, что образцы KYR1, KYR4, KYR17, KYR19 образуют один общий кластер с образцами подтипа G ВИЧ-1 и рекомбинанта AG из разных стран (Африка, Европа), а также субкластер с образцами рекомбинанта AG из Узбекистана. Для остальных полученных последовательностей данной области характерно расположение на одной ветви с образцами подтипа A из стран СНГ.

Для определения подтиповой принадлежности гена gag было построено второе филогенетическое дерево (рис. 3).

Как видно из рисунка, образцы KYR4, KYR7, KYR19, KYR23 кластеризуются на одной ветви с AG-рекомбинантными формами ВИЧ-1, выделенными в Узбекистане, и входят в общий кластер образцов, принадлежащих рекомбинанту AG. Образец KYR17, по результатам анализа IN относящийся к подтипу AG, вместе с прочими образцами из Киргизии расположен на одной ветви с последовательностями, полученными в СНГ и относящимися к подтипу A. При побуквенном сравнении с другими использованными последовательностями этот образец также продемонстрировал принадлежность к подтипу A. Только в одной позиции (1726) образец соответствовал рекомбинанту AG (рис. 4, а). С учетом того что подобная последовательность не имеет аналогов среди исследуемых образцов, вариант контаминации исключен. Это означало, что образец KYR17 по гену gag действительно принадлежит к подтипу A.

Анализ последовательностей, кодирующих PR, в образцах, отнесенных к рекомбинантам AG, также показал отличие образца KYR17 в исследуемой области от прочих. При побуквенном сравнении оказалось, что большая часть этой области генома (1—228 п. н.) принадлежала подтипу G, при этом начиная с позиции 229 последовательность соответствовала

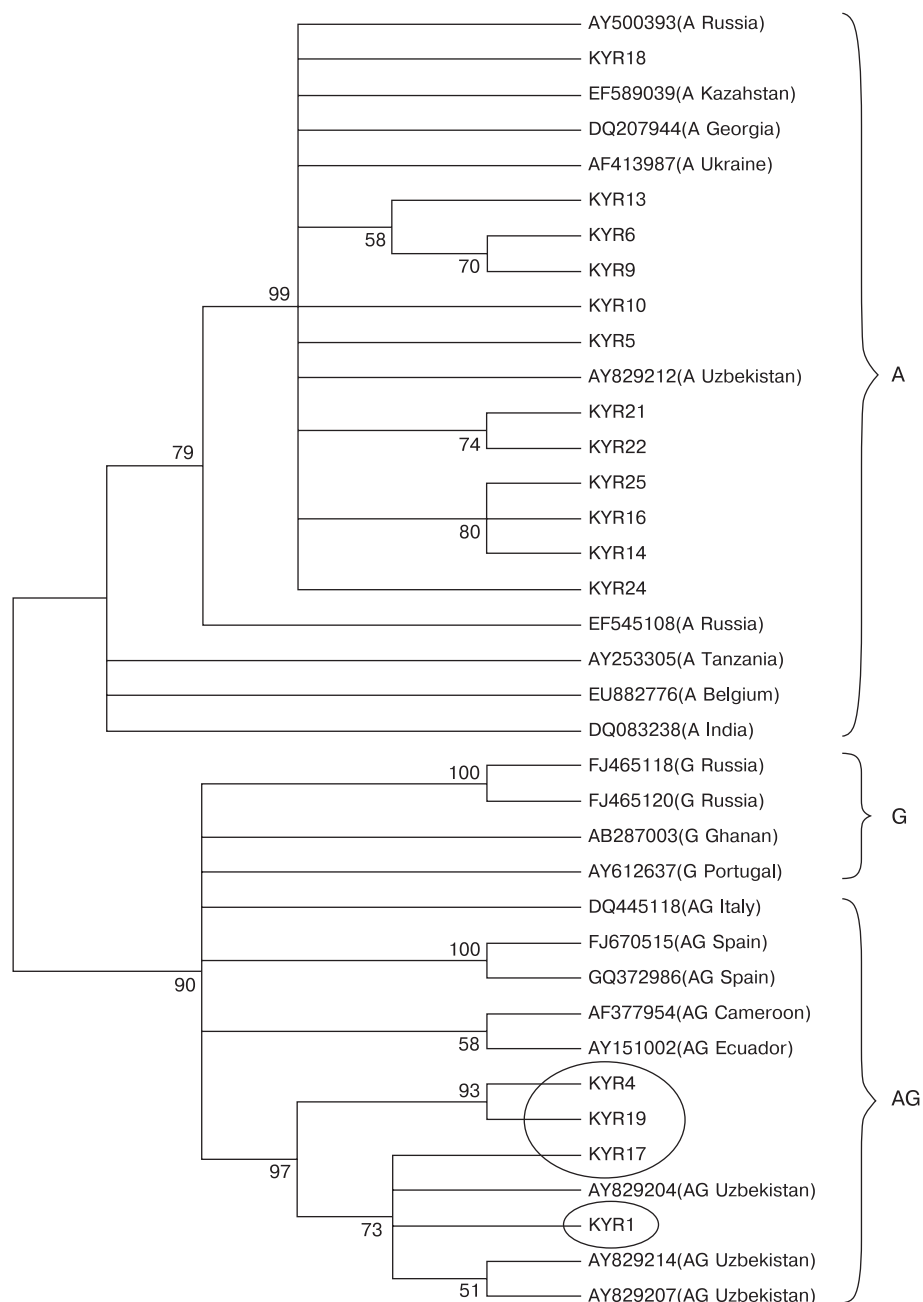


Рис.2. Результаты филогенетического анализа области гена *pol* ВИЧ-1, кодирующего IN. Здесь и на рис. 3 образцы из Киргизии обозначены аббревиатурой KYR, обозначение остальных образцов соответствует коду GeneBank, в скобках указаны подтип ВИЧ-1 и страна получения образца.

подтипу А, в частности обнаруживалась мутация V77I, характерная для варианта IDU-A, в составе которого она встречается с частотой 70% (для сравнения: у рекомбинантов AG — 2,1%). Это позволяло заподозрить в образце KYR17 новый рекомбинант, сформированный вариантом IDU-A и рекомбинантной формой AG.

Что касается остальных 5 рекомбинантов из Киргизии, они по результатам побуквенного сравнения той же области полностью совпадали с последовательностями из Узбекистана (рис. 4, б).

Для области *env* также было построено филогенетическое дерево (данные не приводятся). Как выяснилось, анализируемый участок области гена *env* у всех форм AG-рекомбинанта принадлежит к под-

типу А, что и подтвердилось на филограмме. Выделяется субкластер, образованный образцами KYR1, KYR7, KYR17, KYR19 и образцами из Узбекистана.

Для дальнейшего анализа использовали программу анализа рекомбинантных форм ВИЧ-1 RIP. Проверенные с ее помощью анализируемые последовательности области гена *gag* не содержали точек рекомбинации. Исследованные в данной работе последовательности IN не включали области рекомбинации, описанные в литературе, поэтому пока не представляется возможным подтвердить ее принадлежность к одной из рекомбинантных форм. Область PR данная программа проанализировать не смогла.

По полученным результатам можно предположить, что на территории Киргизии встречается не

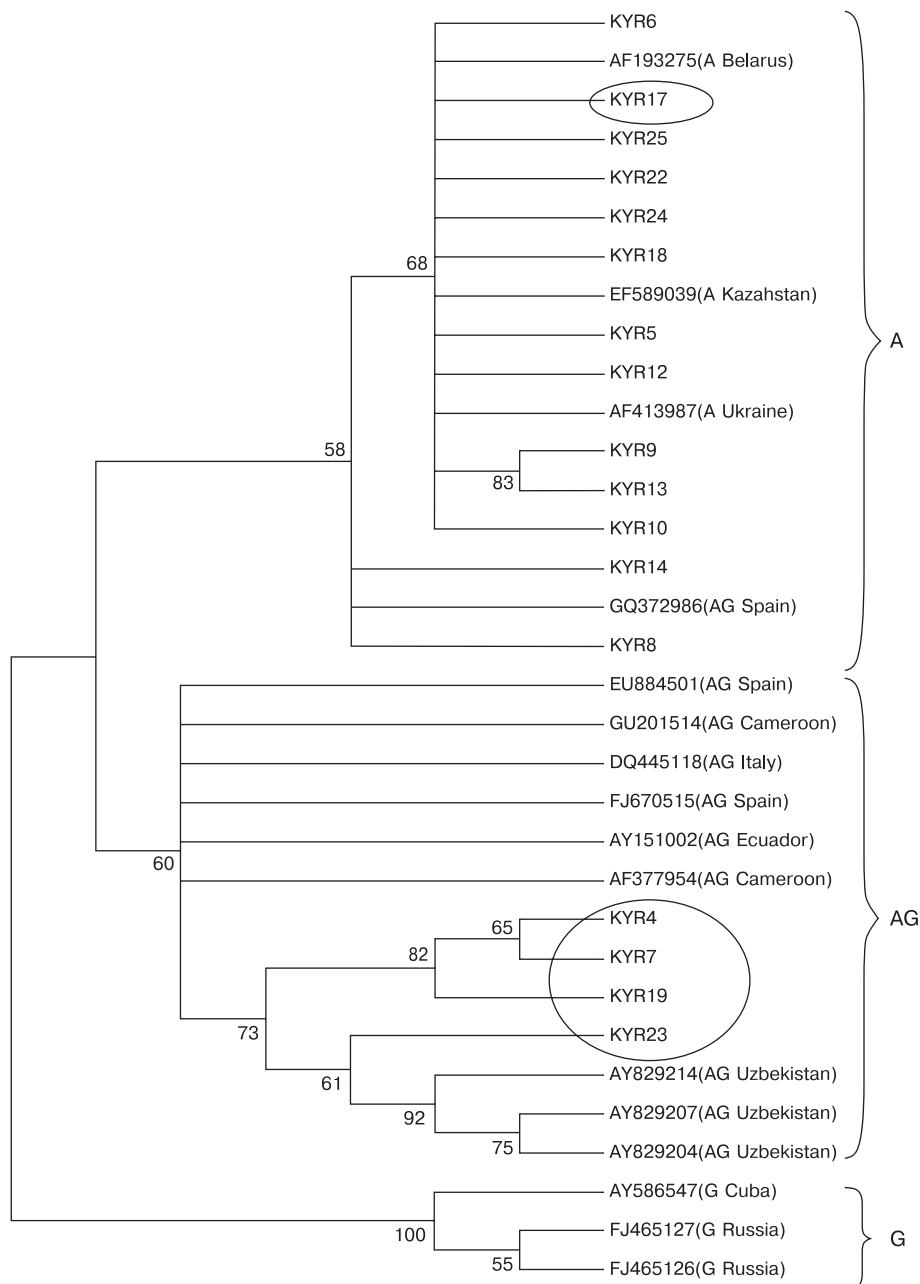


Рис.3. Результаты филогенетического анализа области гена gag ВИЧ-1.

меньше 2 вариантов CRF02_AG ВИЧ-1, различающихся по гену gag и по области протеазы гена pol. Один из них полностью идентичен узбекскому варианту, что подтверждается филогенетическим анализом (KYR1, KYR4, KYR7, KYR19, KYR23). Второй вариант, представителем которого является KYR17, возможно, появился в процессе рекомбинации между узбекским вариантом и вариантом IDU-A. Дальнейшая работа будет направлена на точное выяснение структуры и происхождения данного варианта.

Анализ мутаций лекарственной устойчивости ВИЧ-1 проводили с использованием Интернет-ресурса. Первичные мутации к антиретровирусным препаратам не выявлены, однако в некоторых образцах обнаружены вторичные мутации, ассоциированные с лекарственной устойчивостью. Так, в области протеазы была найдена одна мутация — L10I — в одном образце KYR19. Для области RT список со-

ставил 6 мутаций: A62V в образцах KYR5, KYR9, KYR10; V108G — в KYR5; E138A — в KYR21; Y181F — в KYR10; M184I — в KYR17; L210M — в KYR9. В области IN также была обнаружена одна вторичная мутация в одном образце — L74M в KYR18. Таким образом, частота встречаемости вторичных мутаций в исследованных образцах невысока.

Стоит упомянуть о мутации в INL74I. Она присутствует у всех исследованных образцов, относящихся к подтипу A (варианту IDU-A). Очевидно, для данного подтипа мутация L74I является естественным полиморфизмом.

Заключение

Проведен молекулярно-генетический анализ образцов ВИЧ-1, полученных из Киргизии. В результате анализа было установлено наличие на территории Киргизии различных генетических вариантов

ЛИТЕРАТУРА

1. Бобков А. Ф., Казеннова Е. В., Селимова Л. М. и др. Молекулярно-вирусологические особенности эпидемии ВИЧ-инфекции в России и других странах СНГ. Вестн. РАМН. М.: Медицина; 2003.
2. Лукашов В. В., Лазовская Н. В., Карамов Э. В. и др. Молекулярная эпидемиология ВИЧ-1 в Беларуси, 1996—2004 гг.: доминирование вариантов субтипа А и циркуляции вариантов субтипа В. Вopr. вирусол. 2006; 51 (6): 22—26.
3. Мамаев Т. М. Эпидемиологическая характеристика ВИЧ-инфекции на территории Ошской области Кыргызской республики. ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2010; 2 (4): 75—78.
4. Balode D., Ferdats A., Dieberna I. et al. Rapid epidemic spread of HIV type 1 subtype A1 among intravenous drug users in Latvia and slower spread of subtype B among other risk groups. AIDS Res. Hum. Retroviruses. 2004. 20 (2): 245—249.
5. Carr J. K., Nadai Y., Eyzaguirre L. et al. Outbreak of a West African recombinant of HIV-1 in Tashkent, Uzbekistan. J. Acquir. Immune Defic. Syndr. 2005; 39 (5): 570—575.
6. Eyzaguirre L. M., Erasiloja I. B., Nadai Y. et al. Genetic characterization of HIV-1 strains circulating in Kazakhstan. J. Acquir. Immune Defic. Syndr. 2007; 46 (1): 19—23.
7. Heyndrickx L., Janssens W., Zekeng L. et al. Simplified strategy for detection of recombinant human immunodeficiency virus type 1 group M isolates by gag/env heteroduplex mobility assay. J. Virol. 2000; 74: 363—370.
8. Ming Zhang, Brian Foley, Anne-Kathrin Schultz et al. The role of recombination in the emergence of a complex and dynamic HIV epidemic. Retrovirology. 2010; 7: 25—40.
9. Saad M. D., Shcherbinskaya A. M., Nadai Y. et al. Molecular epidemiology of HIV Type 1 in Ukraine: birthplace of an epidemic. AIDS Res. Hum. Retroviruses. 2006; 22 (8): 709—714.
10. Saad M. D., Aliev Q., Botros B. A. et al. Genetic forms of HIV Type 1 in the former Soviet Union dominate the epidemic in Azerbaijan. AIDS Res. Hum. Retroviruses. 2006; 22 (8): 796—800.

Поступила 23.01.12

ВОПРОСЫ ВИРУСОЛОГИИ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2012
УДК 615.281.8.03:578.831.91.015.4

В. В. Зарубаев¹, А. В. Гаршинина¹, Н. А. Калинина¹, С. В. Беляевская¹, А. К. Сироткин¹, В. Е. Небольсин²,
О. И. Киселев¹, Д. В. Рейхарт³

Влияние Ингавирина на ультраструктурные особенности морфогенеза парагриппозной инфекции *in vitro* и *in vivo*

¹ФГБУ НИИ гриппа Минздравсоцразвития России, Санкт-Петербург; ²ОАО «Валента Фармацевтика», Москва;
³Первый Московский ГМУ им. И.М. Сеченова

Вирусы парагриппа человека вызывают поражения верхних дыхательных путей у пациентов всех возрастных групп. Основным противовирусным средством является рибавирин, дающий серьезные побочные эффекты и назначаемый по жизненным показаниям. В настоящей работе при помощи электронной микроскопии показана активность препарата Ингавирин против вируса парагриппа человека в культуре клеток и на модели парагриппозной пневмонии у сирийских хомяков. Показано, что применение Ингавирина снижает количество вирионов потомства и проявления цитодеструктивного действия вируса. Эффект Ингавирина был идентичен действию рибавирина или превосходил его. В опытах *in vivo* продемонстрировано, что Ингавирин нормализует морфологическую картину легких, снижая степень деструкции альвеолоцитов, ограничивая почкование вирионов потомства и уменьшая количество воспалительного инфильтрата. Таким образом, сочетание противовирусных, цитопротекторных и противовоспалительных свойств Ингавирина делает его важной составляющей комплексной терапии парагриппозной инфекции человека.

Ключевые слова: Ингавирин, парагрипп, вирусная пневмония, противовирусные препараты

The Effect of Ingavirin on the Ultrastructural Properties of Morphogenesis of Parainfluenza *in vitro* and *in vivo*

V. V. Zarubaev¹, A. V. Garshinina¹, N. A. Kalinina¹, S. V. Belyaevskaya¹, A. K. Sirotkin¹, V. E. Nebol'sin²,
O. I. Kiselev¹, and D. V. Reikhart³

¹ Research Institute of Influenza, Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation, St. Petersburg, Russia; ² JSC Valenta Pharmaceuticals, Moscow, Russia; ³ Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Human parainfluenza viruses cause damage of upper respiratory tract in patients of all age groups. The main antiviral drug is Ribavirin, which has severe side effects and is prescribed only at life-threatening conditions. The activity of Ingavirin against human parainfluenza virus was demonstrated in this work both in cell culture and in the model of parainfluenza pneumonia in Syrian hamsters using transmission electron microscopy. The application of Ingavirin is shown to reduce the number of progeny virions and cytopathic effect of the virus. The effect of Ingavirin was similar or exceeded that of Ribavirin. In the *in vivo* experiments Ingavirin was shown to normalize the morphological structure of lungs, decreasing thereby the degree of destruction of alveolocytes. It also restricted budding of progeny virions and reduced the amount of inflammatory infiltrate. Thus, the combination of antiviral, cytoprotective, and anti-inflammatory properties makes Ingavirin an important component of comprehensive therapy of human parainfluenza infection.

Key words: Ingavirin, parainfluenza, viral pneumonia, antivirals

Контактная информация:

Зарубаев Владимир Викторович, канд. биол. наук, зав. лаб.; e-mail: zarubaev@influenza.spb.ru