

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017  
УДК 578.832.1.083.33

*Мукашева Е.А., Николаева Л.И., Махновский П.И., Кириллова Е.С., Колобухина Л.В., Меркулова Л.Н., Кружкова И.С., Малышев Н.А., Бурцева Е.И.*

## ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ К ПАНДЕМИЧЕСКОМУ ВИРУСУ ГРИППА А(H1N1)pdm09

Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва

Серологическим исследованиям отведено значимое место в диагностике гриппа. В статье представлен анализ разработанного экспериментального варианта иммуноферментной тест-системы для обнаружения специфических антител к вирусу гриппа А(H1N1)pdm09, их динамики на разных сроках инфекции в сравнении с данными традиционного метода — реакции торможения гемагглютинирующей активности (РТГА). В исследование были включены 20 парных проб сывороток от пациентов, госпитализированных на разных сроках заболевания, этиологически связанного с вирусом гриппа А(H1N1)pdm09. На основании данных РТГА были сформированы 2 группы в зависимости от наличия или отсутствия достоверного прироста специфических антител к вирусу гриппа А(H1N1)pdm09. Контрольная группа состояла из 20 сывороток от лиц без гриппа, но больных хроническим гепатитом С. Для изучения вирусспецифических антител методом ИФА были использованы 2 типа тест-систем. Первая предназначалась для определения IgM к вирусу гриппа А(H1N1)pdm09, вторая — IgG. Показаны достоверность и специфичность определяемых IgM и IgG к вирусу гриппа А(H1N1)pdm09. Динамика специфических IgG в 15 из 20 пар сывороток была достоверной, прирост титров был более выражен, чем в РТГА. IgM к вирусу гриппа удалось обнаруживать до 10-го дня, хотя достоверной динамики данных антител в парных образцах не было. Итак, сконструированная тест-система была специфичной для определения как IgG, так и IgM к вирусу гриппа А(H1N1)pdm09 и достоверно чувствительнее, чем РТГА. С помощью данной иммуноферментной тест-системы возможен мониторинг динамики IgG к данному вирусу даже в случае отсутствия диагностических приростов титров антител в РТГА.

**Ключевые слова:** вирус гриппа А(H1N1)pdm09; серодиагностика; реакция торможения гемагглютинирующей активности; иммуноферментный анализ; IgM; IgG.

**Для цитирования:** Мукашева Е.А., Николаева Л.И., Махновский П.И., Кириллова Е.С., Колобухина Л.В., Меркулова Л.Н., Кружкова И.С., Малышев Н.А., Бурцева Е.И. Диагностические возможности определения специфических антител к пандемическому вирусу гриппа А(H1N1)pdm09. *Вопросы вирусологии*. 2017; 62(3): 109-114. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-3-109-114>

*Mukasheva E.A., Nikolaeva L.I., Makhnovsky P.I., Kirillova E.S., Kolobukhina L.V., Merkulova L.N., Kruzhkova I.S., Malyshev N.A., Burtseva E.I.*

## DIAGNOSTIC CAPACITY OF DETECTION OF SPECIFIC ANTIBODIES TO PANDEMIC INFLUENZA A(H1N1)pdm09 VIRUS

D.I. Ivanovsky Institute of Virology, Federal State Budgetary Institution «Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation

Serologic studies occupy a significant place in influenza diagnosis. The article presents an analysis of the developed experimental version of ELISA test-systems for the detection of specific antibodies to the virus influenza A(H1N1)pdm09, and their dynamics at different stages of infection as compared with those of the traditional HAI method. The study included 20 paired samples of serum from patients hospitalized at different stages of the disease with etiology associated with the influenza virus A(H1N1)pdm09. Two groups were formed on the basis of HAI data, which showed the presence or absence of significant growth of specific antibodies to the influenza virus A(H1N1)pdm09. The control group consisted of 20 serum samples from individuals without influenza but with chronic hepatitis C. To examine the virus specific antibody two types of ELISA test systems were used. The first system was intended for the detection of IgM to the influenza virus A(H1N1)pdm09; the second was used for revealing specific IgG. The study showed the accuracy and specificity of detectable IgM and IgG to the virus influenza A(H1N1)pdm09. The dynamics of specific IgG titers in 15 of the 20 pairs of sera was reliable. The increase in titers was more pronounced than in the HAI. IgM against influenza virus could be detected up to 10 days, although reliable dynamics of these antibodies was not detected in paired samples. The test system was specific for the determination of both IgG and IgM antibodies to the influenza virus A(H1N1)pdm09 and significantly more sensitive than HAI. Using this ELISA test system, it is possible to monitor the dynamics of IgG to this virus even in the absence of diagnostic increases in antibody titers in HAI.

**Key words:** influenza A(H1N1)pdm09 virus; serodiagnostic; HI; ELISA; IgM; IgG.

**For citation:** Mukasheva E.A., Nikolaeva L.I., Makhnovsky P.I., Kirillova E.S., Kolobukhina L.V., Merkulova L.N., Kruzhkova I.S., Malyshev N.A., Burtseva E.I. Diagnostic capacity of detection of specific antibodies to pandemic influenza A(H1N1)pdm09 virus. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2017; 62(3): 109-114. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-3-109-114>

**Для корреспонденции:** Мукашева Евгения Андреевна, научный сотрудник лаборатории этиологии и эпидемиологии гриппа Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва. E-mail: [mukasheva\\_evgeniya@mail.ru](mailto:mukasheva_evgeniya@mail.ru)

**For correspondence:** Evgeniya A. Mukasheva, researcher at the Laboratory of influenza etiology and epidemiology, D.I. Ivanovsky Institute of Virology, Federal State Budgetary Institution «Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation.  
E-mail: [mukasheva\\_evgeniya@mail.ru](mailto:mukasheva_evgeniya@mail.ru)

**Information about authors:**

Nikolaeva L.I., <http://orcid.org/0000-0002-1323-5563>; Kolobukhina L.V., <http://orcid.org/0000-0001-5775-3343>;  
Malyshev N.A., <http://orcid.org/0000-0002-1714-3337>; Burtseva E. I., <http://orcid.org/0000-0003-2518-6801>

**Acknowledgments.** This work was financially supported within the framework of the Global Influenza Hospital Surveillance Network Program, Sanofi Pasteur, Lyon, France, 2012-2016.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 01 July 2016

Accepted 13 December 2016

## Введение

Несмотря на успехи в вакцинопрофилактике, грипп остается одной из актуальных медицинских проблем. Современный эпидемический процесс определяют 4 вируса гриппа — А(Н1N1)pdm09, А(Н3N2), В/Ямагата-подобный и В/Виктория-подобный, — свойства, активность и доленое участие которых различаются. Периоды эпидемической активности вирусов гриппа, приходящиеся на зимне-весенние месяцы, характеризуются ростом заболеваемости ОРВИ, частоты тяжелых форм течения инфекции, риска развития осложнений, а также случаев с летальными исходами [1]. По данным ВОЗ, во время эпидемии ежегодно гриппом и ОРВИ в мире переболевает около 20% населения, экономический ущерб от эпидемий достигает 75% [2]. Необходимо также отметить, что, несмотря на восприимчивость всех возрастных групп населения к вирусам гриппа, известны особенности доли ущерба от каждого из циркулирующих вирусов в отношении детей, взрослых и пожилых [3].

С появлением в 2009 г. нового антигенного варианта вируса гриппа А — А(Н1N1)pdm09 эпидемии, в период которых он доминировал в структуре циркулирующих вирусов (2009—2010, 2010—2011, 2012—2013, 2015—2016), характеризовались большей интенсивностью и тяжестью по сравнению с периодами активности вирусов гриппа А(Н3N2) и В [1, 3].

Вирус гриппа А(Н1N1)pdm09 относится к семейству Orthomyxoviridae, роду *Influenzavirus A*. Вирусные частицы имеют оболочку, в состав которой входят 2 мажорных трансмембранных гликопротеина гемагглютинин (НА) и нейраминидаза (НА). С оболочкой вируса ассоциированы еще 2 гидрофобных матричных белка М1 и М2. Белок М1 локализован под оболочкой, протеин М2 является трансмембранным и имеет экспонированную над оболочкой часть, но содержание его ниже, чем НА и NA. Геном вируса гриппа сегментирован и представлен молекулами РНК отрицательной полярности, которая упакована в нуклеокапсид, сформированный нуклеокапсидным белком (NP).

Все указанные белки вируса гриппа обладают высокой иммуногенностью. В различных этапах жизненного цикла вируса участвуют минорные неструктурные белки (компоненты репликативного комплекса и NS-протеины), но их вклад в формирование гуморального иммунного ответа еще недостаточно изучен. Ранее было показано, что в сыворотках лиц, перенесших гриппозную инфекцию, определяются антитела как к структурным поверхностным белкам, так и к внутренним протеинам вируса [4].

В диагностике гриппозной инфекции применяют широкий спектр методов, направленных на определение генома вируса (РНК) или его антигенов в клинических

материалах (метод флуоресцирующих антител, полимерная цепная реакция (ПЦР)) и специфических антител в сыворотках крови (реакция торможения гемагглютинирующей активности (РТГА), реакция связывания компонента (РСК) и реакция микронейтрализации (РМН)) [5].

К сожалению, клинико-лабораторная диагностика с применением отмеченных выше серологических методов может рассматриваться как ретроспективная, так как подтверждением недавно перенесенной инфекции может служить наличие диагностических приростов титров антител (не менее чем в 4 раза) в парных сыворотках крови, взятых на различных сроках заболевания или реконвалесценции. Это вызвано тем, что человек неоднократно на протяжении всей жизни встречается с вирусами гриппа, и в сыворотках крови каждого человека всегда находят анамнестические антитела к широкому спектру штаммов за исключением новых антигенных вариантов [5, 6].

В последние годы актуальность в научных и прикладных исследованиях, особенно при выборе вакцинных штаммов, приобрели результаты, полученные с применением реакции микронейтрализации (РМН), позволяющей определить спектр вируснейтрализующих антител как к эталонным/диагностическим штаммам вирусов гриппа, так и к их дрейфовым вариантам [4, 7]. Этот метод трудоемкий, длительный и требует наличия живых вирусов гриппа и клеточных культур.

Реакцию торможения гемагглютинирующей активности (РТГА) и реакцию связывания компонента (РСК) относят к традиционным серологическим методам. Большее практическое применение в исследованиях специфических антител к вирусам гриппа приобрела РТГА, так как РСК — менее чувствительный метод и трудоемкий при стандартизации реагентов [5]. Достоверный прирост титров антител, определяемых методом РТГА, может быть выявлен в отдельных случаях не ранее 7-го дня от начала заболевания. К сожалению, эти сроки не всегда выдерживаются при госпитализации пациентов, что безусловно влияет на эффективность диагностики и снижает ценность этого метода.

В литературе описано применение метода радиального гемолиза (РРГ) для диагностики иммунного ответа у лиц, переболевших пандемическим вирусом гриппа А(Н1N1)pdm09 [8]. По данным Е.М. Войцеховской и соавт. установлено, что РРГ — более чувствительный метод, чем РТГА, особенно для сывороток с низкими титрами анти-НА. Для изучения динамики прироста и спектрального состава антител, вырабатываемых в организме людей в ответ на гриппозную инфекцию, применяется также метод иммуноблота (ИБ), но в основном в научных исследованиях. Несмотря на высокую чув-

ствительность, специфичность и простоту выполнения, иммуноферментный анализ (ИФА) не приобрел широкого практического применения при серодиагностике гриппа, хотя его используют при определении антигенов вируса гриппа и анализе антигенного дрейфа [9—12]. Наибольшее значение ИФА имеет в решении научно-исследовательских задач.

Учитывая возможности метода и определенный интерес к ранней диагностике гриппа в период пребывания пациента в условиях стационара, был проведен анализ возможностей экспериментального варианта иммуноферментной тест-системы (ИФТС) для выявления специфических антител, их динамики на разных сроках инфекции и сравнение результатов с традиционно используемым методом РТГА.

### Материал и методы

*Сыворотки* 20 парных проб крови были получены от пациентов, госпитализированных с симптомами ОРВИ в ИКБ №1 г. Москвы в период 2011—2015 гг. В качестве контроля использовали 20 сывороток крови от больных хроническим гепатитом С без гриппозной инфекции на момент взятия пробы. Забор крови выполнен с информированного согласия пациентов.

*Детекцию специфической РНК вируса гриппа А(H1N1)pdm09* проводили методом ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в режиме реального времени в носоглоточных смывах от пациентов с применением коммерческих тест-систем АмплиСенс® РИБО-преп, АмплиСенс® РЕВЕРТА-L, АмплиСенс® Influenza virus A/B-FL, АмплиСенс® Influenza virus A/H1-swine-FL (ФБУН «ЦНИИ Эпидемиологии» Роспотребнадзора, г. Москва) согласно рекомендациям производителя.

*Титры специфических антител к НА (анти-НА)* определяли в РТГА с использованием эталонного штамма вируса гриппа А/Калифорния/07/2009 (H1N1)pdm09 микрометодом по общепринятой методике<sup>1</sup>.

Для удаления неспецифических ингибиторов исследуемые сыворотки обрабатывали ферментом нейраминидазой холерного вибриона («Denka Seiken Co., Ltd.», Япония) с последующим прогреванием при 56 °С в течение 30 мин. В реакции применяли 0,75% взвесь эритроцитов человека группы крови 0 (I). За диагностически значимую динамику содержания специфических антител был принят 4-кратный и больший прирост титров между первой и второй сыворотками крови, взятыми у одного пациента.

*Конструирование экспериментальной ИФТС.* Для получения антигенов вируса использован штамм вируса гриппа А/Ю.Каролина/02/2010 (H1N1)pdm09, подобный эталонному А/Калифорния/07/2009 (H1N1)pdm09. Вирус был накоплен в культуре клеток MDCK, концентрирован методом дифференциального центрифугирования и инактивирован многократным размораживанием/замораживанием с последующим контролем его инфекционной активности в культуре клеток MDCK, как описано ранее [13].

Сорбцию антигенов в концентрации 2 мкг/100 мкл в 0,05 М карбонатно-бикарбонатном буфере pH 9,25 проводили в планшетах PolySorp («Nunc», Нидерланды) в

течение 16 ч при 4 °С. После однократной промывки стандартным раствором 0,02 М фосфатно-солевого буфера (ФСБ) с 0,1% раствором твина-20 свободные зоны лунок блокировали 0,1% человеческим сывороточным альбумином («Serva», Германия) в ФСБ при 37 °С в течение 1 ч. После однократной промывки стандартным ФСБ с твином планшеты были готовы к работе. Все использованные химические реагенты имели марку чистоты ч. д. а.

*Концентрацию белка (антигенов)* определяли методом Лоури, адаптированным для плохо растворимых белков [14]. В качестве стандартного белкового раствора использовали раствор бычьего сывороточного альбумина (V фракция, «Sigma-Aldrich», США).

*При определении антител в экспериментальной ИФТС* сыворотки людей разводили 10 раз в ФСБ, содержащем 0,1% человеческого сывороточного альбумина, и инкубировали 30 мин при 37 °С. После 5-кратной промывки ФСБ с твином вносили конъюгат пероксидазы хрена, конъюгированный с кроличьими иммуноглобулинами к Fc-фрагменту человеческих IgG или IgM («Имтек», Россия) в разведении 1:2000 и инкубировали 30 мин при 37 °С. После 5-кратной промывки ФСБ с твином в каждую лунку вносили 100 мкл раствора 0,4% тетраметилбензидина в 0,05 М цитратно-фосфатном буфере pH 5,0 с раствором перекиси водорода (0,015%). Через 20 мин реакцию останавливали, добавляя 100 мкл 1 М серной кислоты. Оптическую плотность (ОП) учитывали при длине волны 450 нм против 630 нм на спектрофотометре StatFax 3200 («Awareness Technology Inc.», США). Расчет критической величины ОП, выше которой сыворотка расценивалась как положительная, выполняли по 10 отрицательным сывороткам. Величина ОП критическая была рассчитана как сумма среднего арифметического ОП отрицательных сывороток и тройного стандартного отклонения средней величины. При определении титра антител сыворотки последовательно разводили 2 раза.

*Антитела к вирусу гепатита С (ВГС)* определяли с помощью сертифицированных коммерческих ИФТС РекомбиБест анти-ВГС-IgM и РекомбиБест анти-ВГС («Вектор-Бест», Россия).

*Количественные показатели* рассчитывали с применением пакета программ Statistica 10 («StatSoft», Талса, США).

### Результаты

В исследование были включены парные образцы сывороток крови от 20 госпитализированных пациентов с наличием РНК вируса гриппа А(H1N1)pdm09 в носоглоточных смывах, что было установлено методом ОТ-ПЦР. Сыворотки брали при госпитализации и выписке пациентов (по возможности в максимально отдаленные сроки). На основании данных РТГА были сформированы 2 группы пациентов — с отсутствием или наличием достоверной динамики специфических антител к вирусу гриппа А(H1N1)pdm09. Сведения о датах забора крови и величинах титров антител в сыворотках представлены в табл. 1 и 2.

Для группы пациентов с достоверной динамикой титров антител среднее число дней пребывания в стационаре было несколько больше (6—7 с разбросом от 3 до 13 дней) по сравнению с группой без достоверной динамики (5 с разбросом от 2 до 7 дней).

Для изучения вирусспецифических антител методом ИФА были использованы 2 типа ИФТС: первая предна-

<sup>1</sup> МУ 3.3.2.1758—03. Методы определения показателей качества иммунобиологических препаратов для профилактики и диагностики гриппа.



Таблица 1

Данные об образцах и результаты определения специфических антител к вирусу гриппа А(H1N1)pdm09 в сыворотках пациентов без диагностического прироста титра антител по данным РТГА

Номер пациента	Дни забора парных проб крови/интервал между ними	Динамика титров специфических антител к А(H1N1)pdm09, определяемая в парных сыворотках разными методами			
		РТГА	ИФА (IgM)	ИФА (IgG)	
				IgG	кратность приростов
1	3/4—1	< 5/< 5	40/20	1280/1280	1
2	3/5—2	< 5/< 5	10/10	160/160	1
3	2/6—4	< 5/< 5	40/40	640/2560	4
4	2/6—4	< 5/< 5	0/0	1280/5120	4
5	3/7—4	< 5/< 5	0/0	320/2560	8
6	4/7—3	< 5/< 5	40/40	640/640	1
7	3/8—5	< 5/< 5	0/0	640/1280	2
8	3/8—5	< 5/< 5	0/0	640/5120	8
9	3/9—6	< 5/< 5	20/20	160/10240	64
10	4/10—6	< 5/< 5	0/0	320/320	1

значена для определения только специфических IgM, вторая — только для выявления специфических IgG к вирусу гриппа А(H1N1)pdm09.

В табл. 1 представлены сравнительные данные определения антител к вирусу гриппа разными методами в группе пациентов без прироста антител по данным РТГА. В 5 парных образцах специфические IgM не обнаружены (пациенты № 4, 5, 7, 8, 10). В образцах, где эти антитела были выявлены, титры имели невысокие величины (не более 1:40) без отрицательной динамики во вторых образцах.

В 5 из 10 парных образцов сывороток крови выявлены достоверные приросты титров специфических IgG, несмотря на высокие показатели в первых образцах крови (1:320—1:1280). Разница между датами забора этих парных образцов сывороток составила 4—6 дней. Увеличение титра IgG к вирусу гриппа не было ассоциировано с наличием или отсутствием специфических IgM. Полученные данные представляли бы большую значимость, если бы удалось зарегистрировать и подтвердить точную дату заболевания пациентов. В данной группе пациентов чувствительность обнаружения прироста специфических IgG при использовании ИФТС выше, чем в РТГА ( $p < 0,0325$ ).

В следующей группе пациентов, у которых, по данным РТГА, были выявлены достоверные (диагностические) приросты титров антител, специфические IgM обнаруживали во всех образцах (см. табл. 2). Однако титры этих антител были также невысокими (не более 1:40) и не имели отрицательной динамики (в наблюдении — до 12-го дня).

В то же время результаты определения IgG к вирусу гриппа А(H1N1)pdm09 в этой группе пациентов указывали на их достоверную динамику во всех парных образцах. Необходимо отметить несколько большую разницу в днях между заборами парных проб в этой группе пациентов по сравнению с первой группой, более отдаленные сроки забора вторых проб и высокие титры в последних образцах крови ( $p > 0,05$ ). Тем не менее данные о положи-

тельной динамике специфических антител, полученные в РТГА, были подтверждены для всех образцов результатами ИФА при анализе вирусспецифических IgG.

Для подтверждения специфичности и достоверности результатов обнаружения IgM и IgG к вирусу гриппа А(H1N1)pdm09 исследовали сыворотки лиц, не инфицированных данным вирусом, но имеющих хроническую вирусную инфекцию, вызванную ВГС. У всех пациентов этой группы были обнаружены IgM и IgG к ВГС. Средние титры по группам больных гриппом (но без гепатита С) и пациентов без гриппозной инфекции (но с хроническим гепатитом С) представлены в табл. 3.

Полученные результаты подтвердили высокую специфичность ИФТС для определения IgM к вирусу гриппа А(H1N1)pdm09. Величина ОП при анализе IgM к вирусу гриппа у больных хроническим гепатитом С составила 0,062, что сопоставимо с ОП сывороток больных гриппом лиц, не имеющих специфических IgM, — 0,05. С учетом этих данных достоверный уровень ОП для подтверждения IgM к вирусу гриппа составляет 0,155. Аналогичный уровень ОП для IgG к вирусу гриппа А(H1N1)pdm09, установленный в исследовании, равен 0,1.

Отмечен хорошо выраженный прирост специфических IgG к вирусу гриппа в повторных образцах в группе лиц, перенесших гриппозную инфекцию. У пациентов, инфицированных ВГС, но не вирусом гриппа, выявлены IgG к вирусу гриппа А(H1N1)pdm09 по ряду причин. С одной стороны, определяются антитела на общетиповые эпитопы [15], с другой стороны, возможно, эти пациенты ранее перенесли гриппозную инфекцию, так как вирус А(H1N1)pdm09 участвует в эпидемическом процессе с 2009 г. [1].

### Обсуждение

Многoletний опыт оценки результатов РТГА, традиционно используемой для выявления специфических антител к вирусам гриппа, показал, что достоверное увеличение титров антител может быть определено в отдельных случаях не ранее 7-го дня от начала заболевания. К сожалению, эти

Таблица 2

Данные об образцах и результаты определения специфических антител к вирусу гриппа А(H1N1)pdm09 в сыворотках пациентов с диагностическим приростом титров антител по данным РТГА

Номер пациента	Дни забора парных проб крови/интервал между ними	Динамика титров специфических антител к А(H1N1)pdm09, определяемая в парных сыворотках разными методами			
		РТГА	ИФА (IgM)	ИФА (IgG)	кратность приростов РТГА/ИФА
11	2/7—5	< 5/20	20/20	160/640	4/4
12	3/7—4	< 5/20	20/20	640/2560	4/4
13	4/8—4	< 5/40	20/20	320/2560	4/8
14	2/9—7	< 5/20	40/40	2560/40 960	4/8
15	4/9—5	< 5/160	20/20	640/20 480	5/16
16	6/9—3	< 5/160	10/10	5120/20 480	5/4
17	8/10—2	< 5/40	20/20	1280/20 480	8/16
18	2/10—8	< 5/160	20/20	1280/5120	32/4
19	5/12—7	< 5/80	40/40	320/20 480	16/64
20	5/17—12	< 5/40	10/10	40/1280	8/32

Таблица 3

Результаты определения антител методом ИФА к вирусу гриппа А(H1N1)pdm09 и ВГС в сыворотках больных гриппом и у пациентов с хроническим гепатитом С без гриппа

Группа пациентов	Титр* IgM к вирусу гриппа	Титр* IgG к вирусу гриппа	Титр* IgM к ВГС	Титр* IgG к ВГС
С гриппозной инфекцией	1:23	I — 1:538 II — 1:3072	Антитела не обнаружены	Антитела не обнаружены
Без гриппа, но с гепатитом С	Антитела не обнаружены	1:1856	1:20	1:6349

Примечание. \* Указан средний геометрический титр антител. Для парных сывороток титр антител к вирусу гриппа рассчитан отдельно (I и II).

сроки не всегда выдерживаются при госпитализации пациентов, что, безусловно, влияет на эффективность диагностики и снижает ценность этого метода. При использовании РТГА выявляют антитела только к НА, в то время как ИФТС способны определить IgM и IgG ко всем структурным поверхностным (НА, NA, M2) и внутренним белкам (NP и M1), а также к неструктурным протеинам вируса.

Полученные в настоящем исследовании результаты полностью согласуются с ранее известными данными как по срокам выявления специфических IgM и IgG, так и по чувствительности методов их детекции. По данным И.В. Рогановой и соавт., первыми образуются специфические IgM (3—5-й дни), позже (7—10-й дни) появляются специфические IgG, которые достигают максимума к 18-му дню [16]. Содержание специфических IgM в сыворотках крови больных незначительно, основную долю составляют специфические IgG — до 70—80%. Как установлено ранее, первыми в крови переболевших гриппом людей появляются анти-НА, затем анти-NP. Антитела к внутреннему белку M1 активно обнаруживаются с 6—7-го дня от начала заболевания. Таким образом, сконструированная в исследовании ИФТС теоретически должна позволять получать большую информацию, чем РТГА, особенно после 5-го дня инфекции, если учитывать только специфические IgG. Между тем IgM считаются самым ранним антительным маркером инфекции, опережая появление специфических IgG на 5—7 дней.

В настоящей работе IgM к вирусу гриппа определяли в некоторых сыворотках до 10-го дня. Часть образцов не содержали вирусспецифических IgM. Возможно, это связано с тем, что из-за структурных особенностей этих иммуноглобулинов при каждом размораживании происходит постепенное снижение их титра. Поэтому, если содержание IgM к вирусу гриппа в образцах изначально было низким, после размораживания их содержание могло опуститься ниже уровня детекции. Несмотря на более ранние (2—4-й дни) или поздние (6—8-й дни) сроки забора первых образцов, четкой разницы в величинах титров IgM не обнаружено. Поэтому анализ динамики IgM к вирусу гриппа в парных образцах был малоинформативен. Однако применение ИФА для определения специфических IgM как маркера реинфекции новым антигенным вариантом вируса гриппа может представлять определенную ценность при диагностике по первой пробе, взятой при поступлении пациента в стационар.

### Заключение

Таким образом, сконструированная ИФТС была специфичной для определения как IgG, так и IgM к вирусу гриппа А(H1N1)pdm09 и достоверно чувствительнее, чем РТГА. Большая частота выявления достоверных

приростов титров IgG при отрицательной результативности РТГА расширяет возможности применения ИФА при серодиагностике гриппа у госпитализированных пациентов даже на ранних сроках инфекции. Тест-система может быть успешно использована практичными врачами-лаборантами лечебных учреждений, особенно в условиях недоступности ПЦР-диагностики. Факторы гуморального иммунитета играют важную роль в ответе организма на гриппозную инфекцию, поэтому очень важно совершенствование иммунологических тестов для детекции специфических антител, особенно в ранних стадиях заболевания.

**Финансирование.** Финансирование в рамках Договора «Глобальная госпитальная сеть эпидемиологического надзора за гриппом», Санофи Пастер, Леон, Франция, Фонд Франции, 2012—2016.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1—4, 7, 10—15 см. REFERENCES)

- Львов Д.К., ред. *Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных*. М.: Медицинское информационное агентство; 2013.
- Кузнецов О.К., Степанова Л.А. Продолжительность защиты от гриппа после инфицирования и вакцинации. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2009; (4): 29—38.
- Войцеховская Е.М., Вакин В.С., Васильева А.А., Кузнецова Е.В., Кривицкая В.З., Соминина А.А. Применение метода радиального гемолиза для выявления антител к вирусам гриппа птиц А(H5N1) и пандемическому вирусу А(H1N1)pdm09. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2012; (12): 28—31.
- Роганова И.В., Суздальцев А.А. *Групп: монография*. Самара: Ас Гард; 2013.

### REFERENCES

- Sominina A., Burtseva E., Eropkin M., Karpova L., Zarubaev V., Smorodintseva E. et al. Influenza surveillance in Russia based on epidemiological and laboratory data for the period from 2005 to 2012. *Am. J. Infect. Dis.* 2013; 9(3): 77—93.
- Molinari N.A., Ortega-Sanchez I.R., Messonnier M.I., Thompson W.W., Wortley P.M., Wientraub E. et al. The annual impact of season influenza in the US: measuring disease burden and costs. *Vaccine*. 2007; 25(27): 5086—96.
- World Health Organization. Flu News Europe. Available at: <http://flunews.euro.who.org>
- Harmon M.W., Rota P.A., Walls H.H., Kendal A.P. Antibody response in humans to influenza virus type B host cell-derived variants after vaccination with standard (egg-derived) vaccine or natural infection. *J. Clin. Microbiol.* 1988; 26(2): 333—7.
- L'vov D.K., ed. *Guide to Virology. Viruses and Viral Infections of Humans and Animals [Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных]*. Moscow: Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo; 2013. (in Russian)
- Kuznetsov O.K., Stepanova L.A. Duration of protection against influenza after natural infection and vaccination. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika*. 2009; (4): 29—38. (in Russian)
- Rowe T., Abernathy R.A., Hu-Primmer J., Thompson W.W., Lu X., Lim W. et al. Detection of antibody to avian influenza A(H5N1) virus in human serum by using a combination of serologic assays. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37(4): 937—43.
- Voytsekhovskaya E.M., Vakin V.S., Vasil'eva A.A., Kuznetsova E.V., Krivitskaya V.Z., Sominina A.A. The application of radial hemolysis technique in detection of antibodies to avian influenza virus 28 A (H5N1) and pandemic virus A (H1N1) pdm09. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2012; (12): 28—31. (in Russian)
- Cui S., Tong G.A. A chromatographic strip test for rapid detection of one lineage of the H5 subtype of highly pathogenic avian influenza. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2008; 20(5): 567—71.

10. Prabakaran M., Ho H.T., Prabhu N., Velumani S., Szyport M., He F. et al. Development of epitope-blocking ELISA for universal detection of antibodies to human H5N1 influenza viruses. *PLoS One*. 2009; 4(2): e4566.
11. He F., Prabakaran M., Tan Y., Indira K., Kumar S.R., Kwang J. Development of dual-function ELISA for effective antigen and antibody detection against H7 avian influenza virus. *BMC Microbiol*. 2013; 13: 219–27.
12. van Baalen C.A., Els L., Sprong R., van der Vries E., van Beek R., Osterhaus A.D. et al. Detection of nonhemagglutinating influenza A(H3) viruses by enzyme-linked immunosorbent assay in quantitative influenza virus culture. *J. Clin. Microbiol*. 2014; 52(5): 1672–7.
13. Davies H.W., Appleyard G., Cunnighan P., Pereira M.S. The use of continuous cell line for the isolation of influenza virus. *Bull. World Health Organ*. 1978; 56(6): 991–3.
14. Markwell M.A., Haas S.M., Bieber L.L., Tolbert N.E. Modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem*. 1978; 87(1): 206–11.
15. Julkunen I., Pyhala R., Hovi T. Enzyme immunoassay, complement fixation and hemagglutination inhibition tests in the diagnosis of influenza A and B virus infections. Purified hemagglutinin in subtype-specific diagnosis. *J. Virol. Methods*. 1985; 10(1): 75–84.
16. Roganova I.V., Suzdal'tsev A.A. *Influenza: Monograph [Gripp: monografiya]*. Samara: As Gard; 2013. (in Russian)

Поступила 01.07.16  
Принята в печать 13.12.16

© ОЛЕЙНИК А.Ф., ФАЗЫЛОВ В.Х., 2017

УДК 616.98:578.828.6]-092:612.017.1.064]-085.37.036.8

Олейник А.Ф., Фазылов В.Х.

## ВЛИЯНИЕ ДЛИТЕЛЬНОСТИ ИНФИЦИРОВАНИЯ ВИЧ ДО НАЧАЛА АНТИРЕТРОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ НА РАЗВИТИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ НЕЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ

ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России, 420012, г. Казань

**Введение.** У части пациентов с ВИЧ-инфекцией, получающих вирусологически эффективную антиретровирусную терапию (АРВТ), отсутствует прирост лимфоцитов CD4 на фоне лечения. Несмотря на длительное лечение, у пациентов сохраняется иммунодефицитное состояние. **Методы.** В обсервационном когортном ретро/проспективном исследовании мы изучали влияние длительности инфицирования ВИЧ до начала АРВТ на развитие иммунологической неэффективности терапии. **Результаты.** В группе из 140 ВИЧ-инфицированных пациентов установлено наличие обратной корреляционной зависимости умеренной силы между длительностью инфицирования ВИЧ и приростом лимфоцитов CD4 через 6 мес, 1, 2 и 3 года АРВТ ( $r = -0,33, p < 0,01$ ;  $r = -0,3, p < 0,01$ ;  $r = -0,3, p < 0,01$ ;  $r = -0,29, p < 0,01$  соответственно). При старте АРВТ с уровня CD4 200–350 кл/мкл выявлены статистически значимые различия по уровню относительного количества лимфоцитов CD4 через 6 мес, 1, 2 и 3 года АРВТ в подгруппах с длительностью инфицирования ВИЧ до начала терапии 1–8 лет и более 8 лет ( $p = 0,035$ ;  $p = 0,015$ ;  $p = 0,05$ ;  $p = 0,05$  соответственно). У пациентов, начавших АРВТ с уровня CD4 > 200 кл/мкл после 8 лет инфицирования ВИЧ, риск развития иммунологической неэффективности терапии в 4 раза выше по сравнению с пациентами с таким же уровнем CD4, но меньшим сроком инфицирования ВИЧ. **Выводы.** Чем меньше длительность инфицирования ВИЧ, тем выше прирост CD4-лимфоцитов. При старте АРВТ с уровня CD4 200–350 кл/мкл восстановление лимфоцитов CD4 происходит интенсивнее в группе с менее продолжительным периодом инфицирования ВИЧ. Установлено негативное влияние длительности инфицирования ВИЧ более 8 лет до начала АРВТ на развитие иммунологической неэффективности терапии в подгруппе со стартовым уровнем CD4 > 200 кл/мкл.

**Ключевые слова:** ВИЧ-инфекция; восстановление CD4; иммунологическая эффективность/неэффективность АРВТ; длительность инфицирования ВИЧ.

**Для цитирования:** Олейник А.Ф., Фазылов В.Х. Влияние длительности инфицирования ВИЧ до начала антиретровирусной терапии на развитие иммунологической неэффективности лечения. *Вопросы вирусологии*. 2017; 62(3): 114–119.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-3-114-119>

Oleynik A.F., Fazylov V.Kh.

### THE INFLUENCE OF HIV INFECTION DURATION BEFORE ANTIRETROVIRAL THERAPY ON IMMUNOLOGICAL TREATMENT FAILURE

Kazan State Medical University, Kazan, 420012, Russian Federation

**Introduction.** Some patients with HIV infection receiving virologically effective antiretroviral therapy (ART) did not show any growth in CD4 cell count during treatment. Despite the long-term treatment of patients, immunodeficiency persisted.

**Methods.** In the observational cohort retro/prospective study we investigated the effect of the duration of HIV infection before starting the antiretroviral therapy on the development of immunological treatment failure.

**Results.** In a group of 140 HIV-infected patients a moderate inverse correlation was found between the duration of HIV infection and CD4 cell gain after 6 months, 1, 2 and 3 years of ART ( $r = -0.33, p < 0.01$ ;  $r = -0.3, p < 0.01$ ;  $r = -0.3, p < 0.01$ ;  $r = -0.29, p < 0.01$ , respectively). In the case of ART starting at CD4 count of 200–350 cells/mcl statistically significant differences were revealed in the levels of relative CD4 count at 6 months, 1, 2 and 3 years

**Для корреспонденции:** Олейник Альфия Фаридовна, аспирант кафедры инфекционных болезней ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет», 420012, г. Казань. E-mail: [aalfons@yandex.ru](mailto:aalfons@yandex.ru)