

**РОССИЙСКАЯ  
АКАДЕМИЯ  
НАУК**

Журнал "Вопросы вирусологии" представлен в следующих международных информационно-справочных изданиях: Abstract Journals, AIDS & Cancer Research, Biocontrol News and Information, Biological Sciences, Chemical Abstracts, EBSCOhost Biological Abstracts, EBSCOhost Wildlife & Ecology Studies Worldwide, Elsevier BV Scopus, Elsevier BV EMBASE, Index Medicus, Excerpta Medica, Index Veterinarius, MEDLINE, National Library of Medicine PubMed, Parasitology Database, Poultry Abstracts, Review of Medical and Veterinary Entomology, Thomson Reuters Biological Abstracts, Thomson Reuters BIOSIS Previews, Thomson Reuters Science Citation Index Expanded, Thomson Reuters Web of Science, Tropical Diseases Bulletin, Veterinary Science Database, Virology and AIDS Abstracts, Russian Science Citation Index (Web of Science)

ЛР № 010215 от 29.04.97

**Почтовый адрес:**

115088, Москва,  
ул. Новоостاپовская, д. 5, стр. 14,  
ОАО «Издательство "Медицина"»

**Адрес редакции:** 109029, Москва,  
ул. Скотопрогонная, дом 29/1,  
подъезд 15

Зав. редакцией *Т. М. Курушина*  
Тел. +7-495-678-63-95

E-mail: [vopr.virusol@idm.msk.ru](mailto:vopr.virusol@idm.msk.ru)  
[www.medlit.ru](http://www.medlit.ru)

**ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ**

Тел./факс +7-495-678-64-84

E-mail: [info@idm.msk.ru](mailto:info@idm.msk.ru)

[www.medlit.ru](http://www.medlit.ru)

**Ответственность за  
достоверность информации,  
содержащейся  
в рекламных материалах,  
несут рекламодатели.**

Редактор *Е.П. Мороз*

Художественный редактор  
*А. В. Минаичев*

Технический редактор  
*Л. В. Зюкина*

Корректор *М. В. Козлова*

Переводчик *С. К. Чаморовский*

Верстка *Е. М. Архипова*

Сдано в набор 29.06.2016.

Подписано в печать 10.08.2016.

Формат 60 × 88%.

Печать офсетная.

Печ. л. 6,00.

Усл. печ. л. 5,88.

Уч.-изд. л. 6,36.

Заказ 500.

Отпечатано в типографии ООО

«Подольская Периодика»,

142110, г. Подольск, ул. Кирова, 15

ISSN 0507-4088. *Вопр. вирусологии.* 2016.

Т. 61. № 5. 193–240

Все права защищены. Ни одна часть этого издания не может быть занесена в память компьютера либо воспроизведена любым способом без предварительного письменного разрешения издателя.

Свидетельство о регистрации № 1170  
от 11 декабря 1990 г.



**МОСКВА  
«ИЗДАТЕЛЬСТВО  
"МЕДИЦИНА"»**

# ВОПРОСЫ ВИРУСОЛОГИИ

## PROBLEMS OF VIROLOGY

ДВУХМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Основан в 1956 г.

**5**

**Том 61 · 2016**

### Редакционная коллегия

**Главный редактор: ЛЬВОВ Д.К. (д.м.н., проф., акад. РАН)**

Зам. главного редактора: **Дерябин П.Г. (д.м.н., проф.)**

Ответственный секретарь: **Гребенникова Т.В. (д.б.н., проф.)**

Научный редактор: **Забережный А.Д. (д.б.н., проф.)**

#### Члены редколлегии:

Баринский И.Ф. (д.м.н., проф.)

Белоусова Р.В. (д.в.н., проф.)

Галегов Г.А. (д.б.н., проф.)

Гулюкин М.И. (д.в.н., проф., акад. РАН)

Гурцевич В.Э. (д.м.н., проф.)

Ершов Ф.И. (д.м.н., проф., акад. РАН)

Зверев В.В. (д.б.н., проф., акад. РАН)

Зуев В.А. (д.м.н., проф.)

Иванова О.Е. (д.м.н., доцент)

Карганова Г.Г. (д.б.н., доцент)

Клименко С.М. (д.м.н., проф., акад. РАН)

Лашкевич В.А. (д.м.н., проф., акад. РАН)

Онищенко Г.Г. (д.м.н., проф., акад. РАН)

Урываев Л.В. (д.м.н., проф., член-корр. РАН)

Щелканов М.Ю. (д.б.н.)

Юминова Н.В. (д.м.н., доцент)

## РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

**Акимкин В.Г.** (д.м.н., проф., чл.-кор. РАН; Москва, Россия)

**Алипер Т.И.** (д.б.н., проф.; Москва, Россия)

**Ананьев В.Ю.** (к.м.н., рук. ФБУЗ "ЦГЭ в Приморском крае"; Владивосток, Россия)

**Антонов В.А.** (д.м.н., проф.; Волгоград, Россия)

**Баранов А.А.** (д.м.н., проф., акад. РАН; Москва, Россия)

**Борисевич С.В.** (д.м.н., проф.; Сергиев Посад, Россия)

**Брико Н.И.** (д.м.н., проф., акад. РАН; Москва, Россия)

**Бутаев Т.М.** (д.м.н., рук. Упр. Роспотребнадзора по Республике Сев. Осетия-Алания; Владикавказ, Россия)

**Гарбуз Ю.А.** (рук. ФБУЗ "ЦГЭ в Хабаровском крае"; Хабаровск, Россия)

**Глинских Н.П.** (д.м.н., проф.; Екатеринбург, Россия)

**Григорьев С.Н.** (рук. ФБУЗ "ЦГЭ в Магаданской обл."; Магадан, Россия)

**Дроздов С.Г.** (д.м.н., проф., акад. РАН; Москва, Россия)

**Заседателев А.С.** (д.ф.-м.н., проф.; Москва, Россия)

**Злобин В.И.** (д.м.н., проф., акад. РАН; Иркутск, Россия)

**Иванов А.И.** (рук. ФКУЗ "Хабаровская ПЧС"; Хабаровск, Россия)

**Кутырев В.В.** (д.м.н., проф., акад. РАН; Саратов, Россия)

**Лебедев Г.Б.** (зам. рук. ФБУЗ "ЦГЭ в Чукотском АО"; Анадырь, Россия)

**Леонова Г.Н.** (д.м.н., проф.; Владивосток, Россия)

**Лисицин Е.А.** (к.м.н., рук. Упр. Роспотребнадзора по Владимирской обл.; Владимир, Россия)

**Локтев В.Б.** (д.б.н., проф.; Новосибирск, Россия)

**Мальшев Н.А.** (д.м.н., проф.; Москва, Россия)

**Михайлов М.И.** (д.м.н., проф., чл.-кор. РАН; Москва, Россия)

**Мукомолов С.Л.** (д.м.н., проф.; СПб, Россия)

**Нетесов С.В.** (д.б.н., проф., чл.-кор. РАН; Новосибирск, Россия)

**Никифоров В.В.** (д.м.н., проф.; Москва, Россия)

**Огарков П.И.** (д.м.н., проф.; СПб, Россия)

**Покровский В.И.** (д.м.н., проф., акад. РАН; Москва, Россия)

**Резник В.И.** (к.м.н.; Хабаровск, Россия)

**Романенко В.В.** (д.м.н., зам. рук. ФБУЗ "ЦГЭ в Свердловской обл."; Екатеринбург, Россия)

**Сергеев А.Н.** (д.м.н., проф.; Новосибирск, Россия)

**Степанова Т.Ф.** (д.м.н., проф.; Тюмень, Россия)

**Тутельян А.В.** (д.м.н.; Москва, Россия)

**Чучалин А.Г.** (д.м.н., проф., акад. РАН; Москва, Россия)

**Шестопапов А.М.** (д.б.н., проф.; Новосибирск, Россия)

**Янович В.А.** (к.м.н., рук. Упр. Роспотребнадзора по Еврейской АО; Биробиджан, Россия)

**Яшкулов К.Б.** (к.м.н., рук. Упр. Роспотребнадзора по Республике Калмыкия; Элиста, Россия)

## ИНОСТРАННЫЕ ЧЛЕНЫ РЕДАКЦИОННОГО СОВЕТА

**Виноград Н.А.** (д.м.н., проф.; Львов, Республика Украина)

**Владыко А.С.** (д.м.н., проф.; Минск, Республика Беларусь)

**Горбунов В.А.** (к.м.н.; Минск, Республика Беларусь)

**Грибкова Н.В.** (к.м.н.; Минск, Республика Беларусь)

**Петкевич А.С.** (к.м.н.; Минск, Республика Беларусь)

**Титов А.П.** (д.м.н., проф., чл.-кор. НАН Беларуси, акад. РАН; Минск, Республика Беларусь)

**Becker J.** (PhD, MD, Prof.; Jerusalem, Israel)

**Berencsi G.** (PhD, MD, Prof.; Budapest, Hungary)

**Ciampor F.** (PhD, MD, DrSc; Bratislava, Slovak Republic)

**Compans R.W.** (PhD, Prof.; Atlanta, USA)

**De Paiva T.M.** (PhD; San Paulo, Brazil)

**Galabov A.S.** (Prof., acad. of the Bulgarian Academy of Sciences; Sofia, Bulgaria)

**Golovljova I.** (PhD; Tallinn, Estonia)

**Goujgoulova G.** (PhD; Sofia, Bulgaria)

**Hoenen T.** (PhD; Hamilton, USA)

**Kawaoka Y.** (PhD, Prof.; Tokyo, Japan)

**Klenk H.-D.** (PhD, Prof.; Marburg, Germany)

**Kuhn J.H.** (MD, PhD, PhD, MSc; Frederick, USA)

**Mackenzie J.** (PhD, Prof.; Brisbane, Australia)

**Maneekarn N.** (PhD, D.V.M., Prof.; Chiang Mai, Thailand)

**Matrosovich M.N.** (PhD; Marburg, Germany)

**Nymadawa P.** (PhD, MD, DSc, Prof.; Ulan Bator, Mongolia)

**Oxford J.** (DSc; London, UK)

**Petrenkienė V.** (Assoc. Prof.; Kaunas, Lithuania)

**Roggendorf M.** (MD, Essen, Germany)

**Sakoda Y.** (PhD, Assoc. Prof.; Sapporo, Japan)

**Suarez D.L.** (D.V.M., PhD, A.C.V.M.; Athens, USA)

**Tashiro M.** (PhD, MD; Tokyo, Japan)

**Turan K.** (PhD, Assoc. Prof.; Istanbul, Turkey)

**Vaheri A.** (PhD, MD, Prof.; Helsinki, Finland)

**Vainionpää R.** (Docent; Turku, Finland)

**Webster R.** (PhD, DSc, Memphis, USA)

**Webby R.** (PhD, Memphis, USA)

**Yuelong Shu** (PhD, Beijing, P.R. China)

**Zeichardt H.** (PhD, DSc, Prof.; Berlin, Germany)

RUSSIAN ACADEMY OF SCIENCES  
**VOPROSY VIROLOGII**  
(PROBLEMS OF VIROLOGY)

Scientific Theoretical Journal Issued once in two months. Published since 1956

**Volume 61 • 5 • 2016**

EDITORIAL BOARD

**Editor-in-Chief: LVOV D.K.**, MD, PhD, DSc, Professor, Academician of RAS

Assistant editors in chief: **Deryabin P.G.**, MD, PhD, DSc, Professor

Executive secretary: **Grebennikova T.V.**, Doctor of Biological Sciences, Professor

Scientific editor: **Zaberezhnyy A.D.**, Doctor of Biological Sciences, Professor

*Members of editorial board:*

**Barinskiy I.F.** – MD, PhD, DSc, Prof.; **Belousova R.V.** – Doctor of Veterinary Sciences, Prof.; **Galegov G.A.** – Doctor of Biological Sciences, Prof.; **Gulyukin M.I.** – Doctor of Veterinary Sciences, Prof., Academician of RAS; **Gurtsevich V.E.** – MD, PhD, DSc, Prof.; **Ershov F.I.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS; **Zverev V.V.** – Doctor of Biological Sciences, Prof., Academician of RAS; **Zuev V.A.** – MD, PhD, DSc, Prof.; **Ivanova O.E.** – MD, PhD, DSc, docent; **Karganova G.G.** – Doctor of Biological Sciences, docent; **Klimenko S.M.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS; **Lashkevich V.A.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS; **Onishchenko G.G.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS; **Uryvaev L.B.** – MD, PhD, DSc, Prof., corresponding member of RAS; **Shchelkanov M.Yu.** – Sc.D.; **Yuminova N.V.** – MD, PhD, DSc, docent

Editorial council

**Akimkin V.G.** – MD, PhD, DSc, Prof., corr. member of RAS (Moscow)

**Aliper T.I.** – Sc.D., Prof. (Moscow)

**Anan'ev V.Yu.** – MD, PhD (Vladivostok)

**Antonov V.A.** – MD, PhD, DSc, Prof. (Volgograd)

**Baranov A.A.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS (Moscow)

**Borisevich S.V.** – MD, PhD, DSc, Prof. (Sergiev Posad)

**Briko N.I.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS (Moscow)

**Butaev T.M.** – MD, PhD, DSc (Vladikavkaz)

**Garbuz Yu.A.** – MD (Khabarovsk)

**Glinskikh N.P.** – MD, PhD, DSc, Prof. (Ekaterinburg)

**Grigor'ev S.N.** – MD (Magadan)

**Drozdov S.G.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS (Moscow)

**Zasedatelev A.S.** – Doctor of physical, Prof. (Moscow)

**Zlobin V.I.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS (Irkutsk)

**Ivanov L.I.** – MD (Khabarovsk)

**Kutyrev V.V.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS (Saratov)

**Lebedev G.B.** – MD (Anadyr')

**Leonova G.N.** – MD, PhD, DSc, Prof. (Vladivostok)

**Lisitsin E.A.** – MD, PhD (Vladimir)

**Loktev V.B.** – Sc.D., Prof. (Novosibirsk)

**Malyshev N.A.** – MD, PhD, DSc, Prof. (Moscow)

**Mikhaylov M.I.** – MD, PhD, DSc, Prof., corr. member of RAS (Moscow)

**Mukomolov S.L.** – MD, PhD, DSc, Prof. (Saint-Petersburg)

**Netesov S.V.** – Sc.D., Prof., corr. member of RAS (Novosibirsk)

**Nikiforov V.V.** – MD, PhD, DSc, Prof. (Moscow)

**Ogarkov P.I.** – MD, PhD, DSc, Prof. (Saint-Petersburg)

**Pokrovskiy V.I.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS (Moscow)

**Reznik V.I.** – MD, PhD (Khabarovsk)

**Romanenko V.V.** – MD, PhD, DSc (Ekaterinburg)

**Sergeev A.N.** – MD, PhD, DSc, Prof. (Novosibirsk)

**Stepanova T.F.** – MD, PhD, DSc, Prof. (Tyumen')

**Tutel'yan A.V.** – MD, PhD, DSc (Moscow)

**Chuchalin A.G.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS (Moscow)

**Shestopalov A.M.** – Sc.D., Prof. (Novosibirsk)

**Yanovich V.A.** – MD, PhD (Birobidzhan)

**Yashkulov K.B.** – MD, PhD (Elista)

Advisory Board

**Vinograd N.A.** – MD, PhD, DSc, Prof. (Lvov, Ukraina)

**Vladyko A.S.** – MD, PhD, DSc, Prof. (Minsk, Republic of Belarus)

**Gorbunov V.A.** – MD, PhD (Minsk, Republic of Belarus)

**Gribkova N.V.** – MD, PhD (Minsk, Republic of Belarus)

**Petkevich A.S.** – MD, PhD (Minsk, Republic of Belarus)

**Titov L.P.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS (Minsk, Republic of Belarus)

**Becker J.** – PhD, DM, Prof. (Jerusalem, Israel)

**Berenci G.** – PhD, MD, Prof. (Budapest, Hungary)

**Ciampor F.** – PhD, MD, Dr.Sc. (Bratislava, Slovak Republic)

**Compans R.W.** – PhD, Prof. (Atlanta, USA)

**De Paiva T.M.** – PhD (San Paulo, Brazil)

**Galabov A.S.** – Prof., acad. of the Bulgarian Academy of Sciences (Sofia, Bulgaria)

**Golovljova I.** – PhD (Tallinn, Estonia)

**Goujgoulova G.** – PhD (Sofia, Bulgaria)

**Hoenen T.** – PhD (Hamilton, USA)

**Kawaoka Y.** – PhD, Prof. (Tokyo, Japan)

**Klenk H.-D.** – PhD, Prof. (Marburg, Germany)

**Kuhn J.H.** – MD, PhD, PhD, MSc (Frederick, USA)

**Mackenzie J.** – PhD, Prof. (Brisbane, Australia)

**Maneekarn N.** – PhD, D.V.M., Prof. (Chiang Mai, Thailand)

**Matrosovich M.N.** – PhD (Marburg, Germany)

**Nymadawa P.** – PhD, MD, DSc., Prof. (Ulan Bator, Mongolia)

**Oxford J.** – DSc (London, UK)

**Petrenkiene V.** – Assoc. Prof. (Kaunas, Lithuania)

**Roggendorf M.** – MD (Essen, Germany)

**Sakoda Y.** – PhD, Assoc. Prof. (Sapporo, Japan)

**Suarez D.L.** – D.V.M., PhD, A.C.V.M. (Athens, USA)

**Tashiro M.** – PhD, MD (Tokyo, Japan)

**Turan K.** – PhD, Assoc. Prof. (Istanbul, Turkey)

**Vaheri A.** – PhD, MD, Prof. (Helsinki, Finland)

**Vainionpää R.** – Docent (Turku, Finland)

**Webster R.** – PhD, DSc. (Memphis, USA)

**Webby R.** – PhD (Memphis, USA)

**Yuelong Shu** – PhD (Beijing, P.R. China)

**Zeichardt H.** – PhD, DSc, Prof. (Berlin, Germany)



Izdatel'stvo Meditsina

## СОДЕРЖАНИЕ

**Дмитрий Константинович Львов** (к 85-летию со дня рождения) . . . . . 197

### ОБЗОРЫ

**Борисевич С.В., Маренникова С.С., Стовба Л.Ф., Петров А.А., Кротков В.Т., Махлай А.А.** Оспа буйволов . . . . . 200

### ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Гурцевич В.Э., Сенюта Н.Б., Ломая М.В., Игнатова А.В., Душенькина Т.Е., Репкина И.А., Павловская А.И., Мудунов А.М.** Серологические маркеры вируса Эпштейна-Барр у больных раком носоглотки в случаях невыявленного первичного очага . . . . . 205

**Масабаева М.Р., Аукунов Н.Е., Мусажанова Ж.Б., Саенко В.А., Рогунувич Т.И., Шаймарданов Н.К., Курманова Б.Р., Баркибаева Н.Р., Yamashita Shunichi, Рахыпбеков Т.К.** Генетический полиморфизм в районе гена *IL17A*: связь с хроническим вирусным гепатитом и прогрессированием к циррозу печени в казахской популяции . . . . . 212

**Глуховец Б.И., Глуховец Н.Г., Белитченко Н.В., Сосунова О.А.** Иммунофлуоресцентная диагностика герпесвирусной инфекции у мертворожденных . . . . . 219

**Лебедев А.В., Казеннова Е.В., Зверев С.Я., Нистратова Ю.И., Лага В.Ю., Туманов А.С., Глущенко Н.В., Ярыгина Е.И., Бобкова М.Р.** Анализ изменчивости гена *env* варианта IDU-A ВИЧ-1 в ходе развития эпидемии ВИЧ-инфекции на территории Пермского края России (1996—2011). . . . . 222

**Мельникова О.В., Адельшин Р.В., Корзун В.М., Трушина Ю.Н., Андаев Е.И.** Характеристика изолятов вируса клещевого энцефалита из природных очагов в Иркутской области и уточнение генотипического пейзажа . . . . . 229

### В ПОМОЩЬ ВИРУСОЛОГУ

**Дедков В.Г., Десяткин А.А., Поляшук Е.М., Сафонова М.В., Маркелов М.Л., Шипулин Г.А.** Разработка и апробация набора реагентов для определения РНК классического вируса бешенства методом ОТ-ПЦР в реальном времени . . . . . 235

## CONTENTS

**Dmitriy Konstantinovich L'vov** (to the 85th anniversary) . . . . . 197

### REVIEWS

**Borisevich S.V., Marennikova S.S., Stovba L.F., Petrov A.A., Krotkov V.T., Makhlai A.A.** Buffalopox . . . . . 200

### ORIGINAL RESEARCH

**Gurtsevitch V.E., Senyuta N.B., Lomaya M.V., Ignatova A.V., Dushenkina T.E., Repkina I.A., Pavlovskaya A.I., Mudunov A.M.** Diagnostic value of the Epstein-Barr virus serological markers in patients with nasopharyngeal carcinoma in cases of undetectable primary tumor location . . . . . 205

**Massabayeva M.R., Aukenov N.E., Mussazhanova Zh.B., Saenko V.A., Rogounovitch T.I., Shaimardanov N.K., Kurmanova B.R., Barkibaeva N.R., Shunichi Yamashita, Rakhypbekov T.K.** *IL17A* gene polymorphisms: relationship to predisposition for chronic viral hepatitis and progression to liver cirrhosis in kazakh population . . . . . 212

**Glukhovets B.I., Glukhovets N.G., Belitchenko N.V., Sosunova O.A.** Immunofluorescence diagnosis of the herpesvirus stillborn infection . . . . . 219

**Lebedev A.V., Kazennova E.V., Zverev S.Ya., Nistratova Yu.I., Laga V.Yu., Tumanov A.S., Glushchenko N.V., Yarygina E.I., Bobkova M.R.** Analysis of the *env* gene variability of the IDU-A HIV-1 variant in the outbreak of the HIV infection epidemic in Perm region of Russia (1996–2011) . . . . . 222

**Mel'nikova O.V., Adel'shin R.V., Korzun V.M., Trushina Yu.N., Andaev E.I.** Tick-borne encephalitis virus isolates from natural foci of the Irkutsk region: clarification of the genotype landscape . . . . . 229

### TO VIROLOGIST'S AID

**Dedkov V.G., Deviatkin A.A., Poleschuk E.M., Safonova M.V., Markelov M.L., Shipulin G.A.** Development and evaluation of the RT-PCR kit for the rabies virus diagnosis . . . . . 235

Журнал «Вопросы вирусологии» входит в Перечень ведущих научных журналов и изданий ВАК, в которых должны быть опубликованы значимые результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук

---

## ДМИТРИЙ КОНСТАНТИНОВИЧ ЛЬВОВ

(к 85-летию со дня рождения)



26 июня 2016 г. исполнилось 85 лет со дня рождения Дмитрия Константиновича Львова, крупнейшего вирусолога, академика РАН, профессора, доктора медицинских наук, главного научного сотрудника, руководителя Научно-практического центра по экологии и эпидемиологии гриппа, руководителя отдела экологии вирусов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

С именем Д.К. Львова связаны создание и развитие нового научного направления – экологии вирусов и популяционной генетики арбовирусов, молекулярной экологии вирусов, исследования, направленные на изучение роли рекомбинационных процессов в механизме формирования генофонда вирусных популяций. Д.К. Львов использовал эволюционный подход и математические методы многофакторного анализа в создании научно обоснованной концепции о закономерностях циркуляции арбовирусов в различных климатогеографических поясах мира. Им разработан уникальный метод экологического зондирования территории России и стран бывшего Советского Союза с целью изучения циркуляции возбудителей особо опасных и малоизученных вирусных инфекций на территории Северной Евразии. Под его руководством и при непосредственном участии в результате широкомасштабных полевых и экспериментальных исследований были изолированы из природы более 60 вирусов различных семейств, в том числе и арбовирусы, многие из которых были зарегистрированы в Международном каталоге арбовирусов в качестве новых для науки. Неоценим вклад Д.К. Львова в становление и пополнение государственной коллекции вирусов, действующей на базе Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «ФНИЦЭМ им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России новыми возбудителями вирусных инфекций человека и животных, циркулирующих на территории Российской Федерации и сопредельных стран.

Д.К. Львов – признанный ведущий специалист в области биологической безопасности государства, он внес огромный вклад в изучение экологии и молекулярной эпидемиологии гриппа. Под его руководством проводятся исследования, направленные на прогнозирование и выявление эпидемических штаммов вируса гриппа, расшифровка вспышек эпизоотий, вызванных высокопатогенными вариантами вируса гриппа А (H5N1), пандемического гриппа (H1N1)pdm09 на территории Российской Федерации. Он вне-

---

дрин методы молекулярной эпидемиологии для изучения арбовирусов, вирусов гриппа и гепатита С, организовал и провел в кратчайшие сроки важные в фундаментальном и практическом плане исследования по распространению вируса гепатита С и его генотипов на территории Северной Евразии. Д.К. Львов проводит актуальные для науки и здравоохранения исследования в стране, целеустремленно и плодотворно изучая проблемы emerging и re-emerging инфекций (новых и вновь возникающих инфекций, способных вызывать чрезвычайные эпидемические ситуации), а также инфекций, вызываемых вирусами, обладающими высокой степенью изменчивости генома. Проведенные под его руководством в последние годы исследования с использованием метагеномного анализа многих новых для науки арбовирусов, изолированных на территории Северной Евразии, позволили определить генетическое разнообразие зоонозных вирусов, их филогению и внести существенные дополнения в таксономию возбудителей новых и возвращающихся инфекций.

Д.К. Львов родился в Москве в семье профессора-психолога. В 1949 г. поступил в 1-й Московский медицинский институт, а после II курса в 1951 г. был переведен на III курс Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова (Ленинград), которую окончил с отличием в 1955 г. Учителями Д.К. Львова были Е.Н. Павловский, Ш.Д. Мошковский, М.П. Чумаков. До 1957 г. Д.К. Львов работал младшим научным сотрудником в Институте санитарии Минобороны СССР, а после демобилизации прошел по конкурсу на должность младшего научного сотрудника в Институте медицинской паразитологии и тропической медицины Минздрава СССР, где работал до декабря 1960 г. Затем он был переведен в Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов АМН СССР, где последовательно прошел стадии научного роста – от младшего научного сотрудника до руководителя лаборатории. С октября 1967 г. Д.К. Львов работает в Институте вирусологии им. Д.И. Ивановского АМН СССР, до 1969 г. – руководителем лаборатории, а затем – заместителем директора по науке.

С 1987 г. по июнь 2014 г. Д.К. Львов являлся директором НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского, осуществляя руководство научно-исследовательской и научно-организационной деятельностью коллектива института. В течение многих лет Д.К. Львов возглавляет крупнейший в институте отдел экологии вирусов с Научно-практическим центром по экологии и эпидемиологии гриппа, одновременно являясь бессменным руководителем лаборатории экологии вирусов.

В 1960 г. Д.К. Львов защитил кандидатскую диссертацию, а в 1965 г. – докторскую. В 1969 г. он утвержден в звании профессора, в 1975 г. избран членом-корреспондентом, а в 1984 г. – академиком АМН СССР по специальности «вирусология». В настоящее время Д.К. Львов является действительным членом РАН.

Ученый широкой эрудиции в области вирусологии, экологии вирусов, микробиологии, эпидемиологии, инфекционной патологии, он внес существенный вклад в успешное выполнение научных программ и их практическую реализацию. Им создана школа вирусологов, специалистов в области арбовирусологии, экологии вирусов. Д.К. Львов является автором и соавтором более 800 широко цитируемых в стране и в мире научных трудов (по данным РИНЦ, по состоянию на 2016 г. индекс Хирша опубликованных работ Д.К. Львова составляет 29 и по данным Web of Science – 23).

Д.К. Львов – автор 12 монографий и руководств по общей и частной вирусологии, уникального атласа, отражающего распространение возбудителей особо опасных и малоизученных вирусных инфекций на территории России. Недавно опубликованная международным издательством Elsevier Academic press монография Д.К. Львова и соавт. «Zoonotic viruses of Northern Eurasia: Taxonomy and Ecology» (2015 г.) содержит новейшие уникальные данные по таксономии, распространению, экологии, эпидемиологии, эпизоотологии, клинике зоонозных вирусов в экосистемах Северной Евразии в пределах различных ландшафтных поясов от Арктики до субтропиков.

Д.К. Львов подготовил 50 кандидатов и докторов наук.

Многогранна научно-общественная деятельность Д.К. Львова: он является председателем специализированного Совета по защите докторских диссертаций по вирусологии, эпидемиологии и инфекционным болезням, председателем межведомственного Научного совета по вирусологии РАН, главным редактором журнала «Вопросы вирусологии», членом межведомственного научного совета отделения медицинских наук РАН и Всероссийской службы медицины катастроф, экспертом РАН. Многие годы Д.К. Львов был руководителем кафедры вирусологии последипломного профессионального образования ММА им. И.М. Сеченова Минздрава России, заместителем председателя координационного Совета по проблемам птиц при биологическом отделении РАН.

---

На протяжении многих лет Д.К. Львов активно проводит широкую научно-координационную работу по вирусологии. Являясь руководителем Центра экологии возбудителей особо опасных и малоизученных инфекционных заболеваний вирусной природы, он проводил ежегодные региональные совещания, научные конференции и семинары вирусологов, эпидемиологов, инфекционистов практического здравоохранения страны и стран СНГ по проблемам «Арбовирусы и арбовирусные инфекции». Он был организатором и председателем президиума международных симпозиумов «Арбовирусы», «Вирусные гепатиты» и «100-летие вирусологии».

Д.К. Львов пользуется высоким научным авторитетом в мире. Об этом свидетельствует его избрание международным советником Американского национального комитета по арбовирусам, членом международного комитета по изучению вирусов в высоких широтах, членом таксономических групп по буньявирусам и тогавирусам Международного комитета по таксономии вирусов. Он являлся куратором с российской стороны исследований по экологии гриппа в рамках советско-американского сотрудничества по проблеме гриппа, экспертом ВОЗ по гриппу, председателем комитета по медицинским наукам и здравоохранению Тихоокеанской научной ассоциации, членом редколлегии двух международных журналов и научных тематических сборников.

Многолетняя научная, научно-организационная деятельность Д.К. Львова, его неоценимый вклад в становление и развитие вирусологической науки в стране были высоко оценены президиумом РАМН, Правительством и Президентом Российской Федерации. В 1976 г. он был награжден орденом «Знак Почета», в 1991 г. – орденом Ленина, в 2012 г. – орденом Почета. В 1999 г. Д.К. Львов стал лауреатом государственной премии в области науки. Он является лауреатом премии «Призвание» (2012 г.), награжден медалью «За заслуги перед отечественным здравоохранением» (2014 г.), является трижды лауреатом премии имени Д.И. Ивановского, лауреатом премии имени Н.Ф. Гамалеи и других наград АМН и Министерства здравоохранения Российской Федерации.

*Коллектив Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, коллектив ФГБУ «ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России и члены редколлегии журнала «Вопросы вирусологии» поздравляют Дмитрия Константиновича с юбилеем и желают ему здоровья и успешной научной и творческой деятельности.*



## ОБЗОРЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016  
УДК 616.98:578.821]:619

**Борисевич С.В.<sup>1</sup>, Маренникова С.С.<sup>2</sup>, Стовба Л.Ф.<sup>1</sup>, Петров А.А.<sup>1</sup>, Кротков В.Т.<sup>1</sup>, Махлай А.А.<sup>1</sup>**

### ОСПА БУЙВОЛОВ

<sup>1</sup> ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Минобороны России, 141306, г. Сергиев Посад;

<sup>2</sup> ФГБУ «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, 630559, пос. Кольцово Новосибирской области

Оспа буйволов — контагиозное вирусное заболевание, поражающее буйволов (*Bubalus bubalis*), реже коров. Заболевание имеет зооантропонозный характер, поскольку люди, в основном доильщики, заражаются при вспышках болезни от животных. Во время вспышек заболевают до 80% буйволов. Клинические проявления заболевания включают оспенные поражения на вымени, сосках, веках, в паховой области, околушных железах, тяжелые формы сопровождаются генерализованной сыпью. Хотя болезнь не вызывает высокой летальности, она приводит к снижению продуктивности и надоев молока, вызывая значительный экономический ущерб. Вспышки регистрируются в различных странах (Индии, Пакистане, Бангладеш, Непале, Иране, Египте и Индонезии), где буйволов разводят как молочный скот. Вирус оспы буйволов тесно связан с другими ортопоксвирусами, ближе всего с вирусом вакцины. Высказывается предположение, что вирус оспы буйволов может происходить от вируса вакцины и стал патогенным для животных и человека вследствие приобретения генов вирулентности при адаптивной эволюции. Отмечено, что для дифференциации вируса оспы буйволов от других ортопоксвирусов разработана полимеразная цепная реакция с праймерами на ген *C18L*, который кодирует анкириновый белок, определяющий круг хозяев вируса. При этом открытая рамка считывания для этого белка у вируса оспы буйволов содержит только 150 нуклеотидов (кодирует 50 аминокислот) в отличие от вируса вакцины, у которого она содержит 453 нуклеотида, у вируса оспы верблюдов — 756 и у вируса оспы коров 759 нуклеотидов. Сделан вывод, что систематическое изучение, основанное на эпидемиологии вируса, существующих резервуарах, биологической трансмиссии и молекулярной организации вируса оспы буйволов, выделенных от буйволов, коров и человека, может открыть путь к лучшему пониманию циркуляции вируса и внести вклад в контроль за заболеванием с использованием современных диагностических и профилактических мероприятий.

Ключевые слова: ортопоксвирусная инфекция; оспа буйволов.

Для цитирования: Борисевич С.В., Маренникова С.С., Стовба Л.Ф., Петров А.А., Кротков В.Т., Махлай А.А. Оспа буйволов. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61(5): 200-204.

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-5-200-204

**Borisevich S.V.<sup>1</sup>, Marennikova S.S.<sup>2</sup>, Stovba L.F.<sup>1</sup>, Petrov A.A.<sup>1</sup>, Krotkov V.T.<sup>1</sup>, Makhlai A.A.<sup>1</sup>**

### BUFFALOPOX

<sup>1</sup> 48th Central Scientific Research Institute, Sergiev Posad, 141306, Russian Federation;

<sup>2</sup> State Research Center for Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk region, 630559, Russian Federation

Buffalopox is a contagious viral disease affecting milch buffaloes (*Bubalus Bubalis*) and, rarely, cows. The disease has zoonotic implications, as outbreaks are frequently associated with human infections, particularly in the milkers. Buffalopox is associated with high morbidity (80%). The clinical symptoms of the disease are characterized by wartlike lesions on the udder, teats, inguinal region, base of the ears, and over the parotid. In the severe form, generalized rash is observed. Although the disease does not lead to high mortality, it has an adverse effect on the productivity and working capacity of the animals resulting in large economic losses. The outbreaks of buffalopox occurred frequently in India, Pakistan, Bangladesh, Nepal, Iran, Egypt, and Indonesia, where buffaloes are reared as milch animals.

The buffalopox is closely related with other Orthopoxviruses. In particular, it is close to the vaccinia virus. There is a view that the buffalopox virus might be derived from the vaccinia virus. It is possible that it became pathogenic to humans and animals through adaptive evolution of the genome by obtaining the virulence genes.

PCR is performed for the *C18L* gene for the purpose of specific detection and differentiation of the buffalopox virus from other orthopoxviruses. The *C18L* gene encodes the ankyrin repeat protein, which determines the virus host range. The open reading frame of this gene is only 150-nucleotide long as against 453 nucleotide in the vaccinia virus, 756 – in the camelpox virus, and 759 – in the cowpox virus.

It can be concluded that a systematic study based on the epidemiology of the virus, existence of reservoirs, biological transmission, and the molecular organization of the buffalopox virus from buffalo, cow, and humans may pave the way to a better understanding of the circulating virus and contribute to the control of the disease using the suitable diagnostic and prophylactic measures.

Key words: orthopoxvirus infections; buffalopox.

For citation: Borisevich S.V., Marennikova S.S., Stovba L.F., Petrov A.A., Krotkov V.T., Makhlai A.A. Buffalopox. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2016; 61(5): 200-204. (In Russ.).

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-5-200-204

Для корреспонденции: Борисевич Сергей Владимирович, д-р биол. наук, проф., нач. ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны РФ, 141306, г. Сергиев Посад. E-mail: sp\_borisevich@mail.ru

**For correspondence:** Sergey V. Borisevich, Doctor of Biological, professor, Head, 48th Central Scientific Research Institute, Sergiev Posad, 141306, Russian Federation. E-mail: sp\_borisevich@mail.ru

**Funding.** The study had no sponsorship.

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

Received 15 July 2014  
Accepted 22 January 2015

В отечественной литературе информация о распространении, этиологии, клинике и диагностике оспы буйволов, источниках и путях передачи ее возбудителя практически отсутствует. Учитывая все возрастающее количество посещений гражданами Российской Федерации эндемичных по оспе буйволов территорий Индии и Пакистана, полагаем необходимым изложить для отечественных специалистов-вирусологов имеющуюся в открытой литературе информацию о данной инфекционной патологии.

Оспа буйволов — зооантропонозная вирусная инфекция, вызывающая кожные поражения у людей, буйволов и коров различной интенсивности, а также снижение надоев молока у буйволиц и коров. В настоящее время возбудитель оспы буйволов отнесен к подвиду вируса вакцины рода ортопоксвирусов семейства поксвирусов [1].

Первое упоминание о заболевании буйволов датировано 1934 г., когда в Лахоре индийские исследователи описали клиническую картину оспы буйволов [2]. В последующем до середины 60-х годов прошлого столетия поступали сообщения о периодических вспышках инфекции в различных штатах Индии, однако источник инфекции не был выявлен [3]. Лишь в 1967 г. был впервые выделен и охарактеризован индийскими учеными этиологический агент, вызывающий оспу буйволов, — штамм ВР-4 [3]. По мнению английских [4] и индийских исследователей [5], именно он является референс-штаммом возбудителя оспы буйволов.

В последующем было показано, что ряд штаммов вируса, выделенных при спорадических случаях оспы буйволов, по ряду биологических свойств отличается от оригинального штамма ВР-4 вируса оспы буйволов. Авторы полагали, что эти штаммы являются промежуточным вариантом между вирусами оспы буйволов и вакцины [6].

По логике вещей, если этиологическим агентом оспы буйволов во всех случаях являлся вирус вакцины, это заболевание должно было исчезнуть после прекращения обязательной иммунизации населения против натуральной оспы. Однако после прекращения вакцинации населения против натуральной оспы вспышки оспы буйволов продолжались и регистрируются на территории Пакистана [7] и Индии [8—12].

В настоящее время установлено, что в естественных условиях инфицирование доярок происходит вследствие контакта с больными буйволицами (коровами) [13—16, 17]. Инкубационный период заболевания у людей составляет от 3 до 19 сут. Обычно оспа буйволов проявляется развитием везикуло-пустулезной сыпи на руках, предплечье, ногах, лице и может сопровождаться увеличением регионарных лимфатических узлов и лихорадочной реакцией. Следует отметить, что заболевшие доярки являются основным источником инфекции для здоровых животных [18, 19].

За последнее десятилетие практически ежегодно в Индии регистрируются случаи заболевания среди людей, а также буйволов и коров, что свидетельствует об установившейся на ряде территорий эндемичности по оспе

буйволов [8]. Особенно часто эпидемии (эпизоотии) оспы буйволов регистрируются в штате Махараштра. О широте распространения возбудителя оспы буйволов в этом штате свидетельствует крупнейшая вспышка инфекции среди людей и буйволов в декабре 2008 — марте 2009 г. В течение 4 мес в 22 деревнях заболел 351 человек. Только в одной деревне эпидемия охватила 6,6% населения. Регистрировалось заболевание детей, не контактировавших с больными животными. Этот факт свидетельствует о контактной передаче возбудителя от человека к человеку. Кожные образования на руках, предплечье, губах и лице больных людей присутствовали в 74,1; 10,2; 10,2 и 4,8% случаев соответственно. В этот же период в 22 пострадавших деревнях эпизоотия охватила 41,9% всего поголовья буйволов (мастит развился у 30,3% животных, а снижение надоев молока отмечено у 50—70%) [20].

Установлено, что не всегда источником инфекции для людей являлись зараженные буйволицы. Так, в январе 2005 г. в 5 ожоговых центрах г. Карачи (Пакистан) возникла вспышка внутрибольничной инфекции продолжительностью 5 мес, обусловленная контаминированным вирусом оспы буйволов перевязочным материалом. Он использовался после нанесения на ожоговую рану мази, полученной из жировой ткани больных или находившихся в инкубационном периоде буйволов. Вследствие контаминации перевязочного материала инфицированной мазью заболели 19 человек в разных лечебных учреждениях столицы Пакистана. Причиной вспышки явилось свободное перемещение больных, нуждающихся в перевязке. У всех заболевших инфекция протекала с легкой или средней степенью тяжести [7].

Оспой буйволов болеют буйволы всех возрастов, но чаще до 3 лет. Инкубационный период зависит от возраста животных, их резистентности, степени вирулентности вируса, путей заражения и колеблется от 5 до 11 сут. В продромальный период перед появлением оспенных поражений у больных животных наблюдается повышение температуры тела до 39,5 °С, гиперемия конъюнктивы и серозные выделения из глаз. Клинически заболевание обычно сопровождается высыпанием на сосках и вымени буйволиц (в этом случае надои снижаются до 50—80%), реже на других частях тела — ушах, веках, передних и/или задних конечностях. Изредка наблюдается генерализованная сыпь по всей поверхности тела. Зарегистрированы случаи передачи заболевания подсосным буйволятам (телятам), у которых процесс локализовался в ротовой полости, на губах и в носовой раковине. Все поражения проходят типичную стадию оспенного формирования [2, 12, 20, 21]. У многих животных в зависимости от тяжести инфекции наблюдается мастит и/или болезненные язвы на сосках и других участках туловища [22]. В ходе изучения кожных поражений у домашних буйволов в Индии (штат Пенджаб) установлено, что возбудитель оспы буйволов циркулировал среди животных, вызвав у них заболевание в 5,67% случаев [23]. В ноябре 2003 г. заболевание охватило 45% буйволиц на ферме в штате Махараштра, у которых развился

**Регистрация выделения штаммов вируса оспы буйволов в мире**

Название штамма/ изолята ВРХV	Регион (штат) выделения	Год выделения	Источник литературы
BP-4	Хисар, Сельскохозяйственный университет штата Харьяна	1967	[3]
Giza 72	Гиза	1972	
BRH-80	Хисар, Сельскохозяйственный университет штата Харьяна	1980	[2]
BRBV	Бхилаи, Мадхья-Прадеш	1995	
BRVN	Бхилаи, Мадхья-Прадеш	1995	
Vij96	Виджаявада, Андхра-Прадеш	1996	
Vij97	То же	1997	
Bly	Барейли, Уттар-Прадеш	1999	[36]
1999	То же	1999	
Bareilly/00	— « —	2000	[32]
Hyd	Хайдерабад, Андхра-Прадеш	2003	
Aur03	Аурангабад, Махараштра	2003	
Pune	Пуна, Махараштра	2003	[20]
Bang	Бангалор, Карнатака	2004	
Hyd 17/04	Хайдерабад, Андхра-Прадеш	2004	
Pune2/04	Пуна, Махараштра	2004	[32]
2495	Аундх в Пуне, Махараштра	2004	
2	Ахмедабад, Гуджарат	2005	
1(Cow)	Бангалор, Карнатака	2005	[33, 37]
1027	Аундх в Пуне, Махараштра	2005	
BT-102	Хайдерабад, Андхра-Прадеш	2006	
1(Cow)	Бидар, Карнатака	2006	
82/06	То же	2006	
64/06	Барейли, Уттар-Прадеш	2006	[25]
Nellore	Неллор, Андхра-Прадеш	2006	[20]
Pune/07	Пуна, Махараштра	2007	[32]
Krishna/07	Нет данных	2007	
Hu Aur	Аурангабад, Махараштра	2008	[20]
Hyderabad 69/08	Хайдерабад, Андхра-Прадеш	2008	
Izatnagar/56A/08	Нет данных	2008	[32]
Gujarat/08	То же	2008	
Hu Pune	Пуна, Махараштра	2009	[20]
Pune	То же	2009	
Bang09	Бангалор, Карнатака	2009	[25]
Pune09	Пуна, Махараштра	2009	
Buffalo/Jalgaon/10	Нет данных	2010	
Human/Jalgaon/10	То же	2010	
Cow2/Baatnor/11	" "	2011	[32]
Buffalo2/Baatnor/11	" "	2011	
Human/lab/11	" "	2011	

мастит, и регистрировалось снижение надоев молока на 40% [12].

Вспышки оспы буйволов среди молочного скота неоднократно наблюдались в Южной Азии (Индии, Пакистане, Бангладеш, Непале, Шри-Ланке), на Ближнем Востоке (Иране), в Африке (Египте), Юго-Восточной Азии (Индонезии) [5, 19]. За последние 10 лет значительно расширился ареал распространения инфекции на тер-

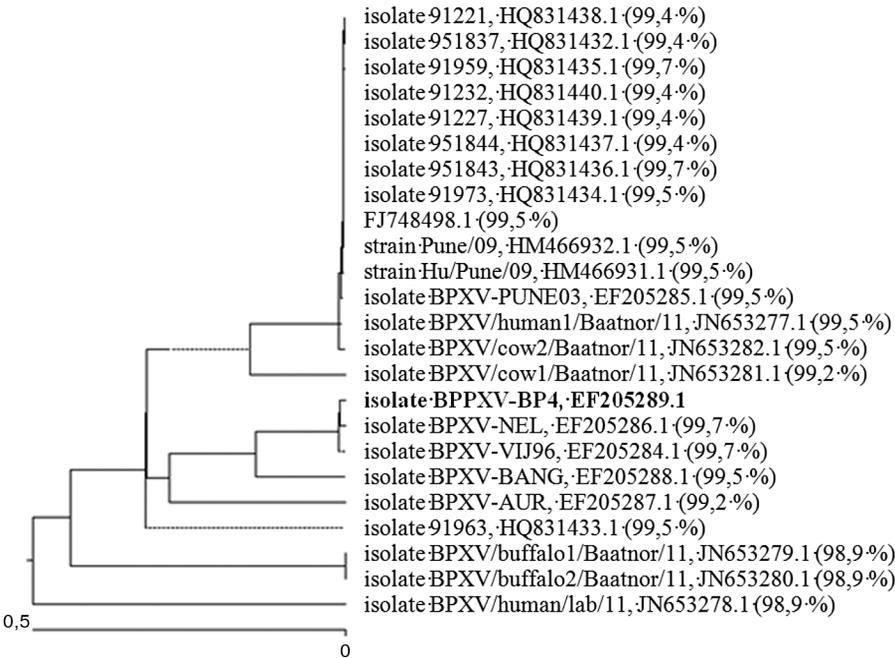
ритории Индии (штаты Уттар-Прадеш, Раджастан, Харьяна, Андхра-Прадеш, Мадхья-Прадеш, Гуджарат, Карнатака, Махараштра) (см. таблицу) [12].

В отечественной литературе приведено описание эпизоотий оспы буйволов в конце 50-х — начале 60-х годов XX века на территории Азербайджанской ССР [13, 14]. Однако ретроспективно было выяснено, что эти вспышки обусловлены заражением буйволиц и коров от недавно вакцинированных вирусом вакцины против натуральной оспы доярок и их детей.

Ранее большинство исследователей считали, что инфекция от больных оспой буйволов не передается коровам [18]. Некоторые авторы [3], не приводя фактических данных, отмечали, что коровы очень редко заболевают при эпизоотиях оспы буйволов. Однако как эти [3], так и другие исследователи [24] во время изученных ими эпизоотий оспы среди буйволов в Индии не зарегистрировали случаев заболевания коров, которые, по данным последних авторов, находились в тесном контакте с буйволами, имеющими генерализованную сыпь, хотя эпизоотии, возникшие за последние 10—15 лет, свидетельствуют о том, что коровы наравне с буйволами болеют оспой буйволов [2, 12, 20]. Этот факт подтвержден генетической характеристикой вирусов, выделенных от заболевших буйволов и коров в Индии. Секвенирование и филогенетический анализ изолятов, основанные на амплифицированных генах гемагглютинина (НА) и А-типа включений (АТИ), показали, что они тесно связаны с другими ортопоксвирусами, особенно с вирусом вакцины. При этом авторами даже высказывается предположение, что вирус оспы буйволов происходит от вируса вакцины вследствие приобретения генов вирулентности при адаптивной эволюции, став вирулентным не только для буйволов, но и для человека [25].

Первоначальные исследования, касающиеся дифференциации вируса оспы буйволов и вируса вакцины, базировались на изучении их биологических свойств: способности репродуцироваться на хорион-аллантоисной оболочке развивающихся куриных эмбрионов при различных температурах, реакция ингибирования связывания комплемента и нейтрализации, а также морфологии и цвету оспин (белые или с геморрагиями) [26]. Однако в тот период дифференцировать многие штаммы вируса оспы буйволов было весьма затруднительно. Первые попытки классифицировать представителей рода *Orthopoxvirus* с использованием молекулярно-биологических подходов предприняты в конце 1970-х годов после освоения метода расщепления высокоочищенной ДНК рестриктазами. Были построены физические карты ортопоксвирусных ДНК для многих рестриктаз. Именно сравнение Hind III рестриктных картин послужило очередным доказательством того, что не всегда возбудителем, вызывающим оспенные поражения у буйволов, служит вирус оспы буйволов [9].

Достижения в области молекулярной биологии, а именно внедрение полимеразной цепной реакции (ПЦР) и секвенирование ДНК, вывели идентификацию возбудителей ортопоксвирусных инфекций на новый, более точный и экспрессный уровень. Благодаря расшифровке последовательностей генов НА и АТИ стало возможным проведение ПЦР-анализа с праймерами, специфичными в отношении данных генов, для точной дифференциров-



Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей специфического для вируса оспы буйволов гена *C18L*, представленных в базе данных GenBank (в скобках указан процент идентичности относительно изолята BPPXV-BP4).

ки ортопоксвирусов, происходящих из Старого и Нового Света [27—29]. Так, секвенирование АТГ-амплификатов из ДНК-изолятов от больных оспой буйволов выявило их большую идентичность с вирусом вакцины, штаммом WR и вирусом оспы кроликов [12].

Молекулярно-биологическая оценка выделенных за последние 20 лет от человека и буйволов изолятов показала, что все они относятся к вирусу оспы буйволов. Важно отметить, что все штаммы вируса оспы буйволов, выделенные на территории Индии, практически не различаются, но отличаются от изолированных в других странах, кроме штамма Hyderabad: различия для АТГ-гена составляют 0,3% [30, 31].

Филогенетический анализ, базирующийся на нуклеотидной последовательности всех штаммов, изолятов и клонов вируса оспы буйволов, представленных в базе данных GenBank [32], и проведенный специалистами ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России, показал, что они кластеризуются в одну группу, отличающуюся от вируса вакцины (см. рисунок). В настоящее время в базе данных GenBank представлены 24 нуклеотидные последовательности специфического для вируса оспы буйволов гена анкиринового белка (*C18L*), которые относительно изолята BPPXV-BP4 являются высокоидентичными (процент гомологии колеблется от 98,9 до 99,7).

Если учесть особенности строения гена *C18L*, при амплификации с праймерами, рассчитанными для гомологичного гена вируса вакцины, образуется фрагмент величиной 368 пар оснований, что значительно меньше, чем при амплификации с другими ортопоксвирусами [33]. Необходимо отметить, что в настоящее время амплификация гена анкиринового белка *C18L* и дальнейшее его секвенирование являются одним из наиболее специфичных тестов для идентификации вируса оспы буйволов. Это связано с особенностями строения дан-

ного гена. Ранее было выявлено, что анкириновый белок, определяющий круг хозяев вируса, у вируса оспы буйволов усечен [33]. Его ген картируется в концевой области генома, с которой обычно связана гетерогенность ортопоксвирусных генов [18]. У вируса оспы буйволов открытая рамка считывания данного гена составляет всего 150 нуклеотидов, у вируса вакцины — 453, у вируса оспы верблюдов — 756, у вируса оспы коров — 759. Усеченность этого гена обусловлена наличием преждевременного кодона терминации (ТАА) в позиции 148 — 150 нуклеотидов. Сам анкириновый белок у вируса оспы буйволов состоит из 50 аминокислотных остатков, что значительно меньше даже при сравнении с таким близкородственным вирусом, как вирус вакцины (150 аминокислотных остатков). Секвенирование амплификатов гена *C18L* выявило 71,2—77,3% гомологии с вирусом вакцины (наибольшая для штамма Lister) и всего 35,5—67,1% по аминокислотному составу. Гомология с другими ортопоксвирусами по нуклеотидному составу равня-

лась для вирусов оспы коров 72,3—72,5%, оспы верблюдов 71,8—72,3%, оспы лошадей 73,8%, оспы кроликов 73,4%, по аминокислотному составу для вирусов оспы кроликов, лошадей, коров и верблюдов 36,8; 36,1; 36,1—36,8 и 35,5—36,1% соответственно. По сравнению с различными штаммами вируса вакцины и другими ортопоксвирусами у вируса оспы буйволов в данном гене отмечены многочисленные замены нуклеотидов и делеции [33].

Таким образом, возникновение вспышек оспы буйволов в Центральной Азии среди людей, а также буйволов и коров связано с циркуляцией биовариантов вируса вакцины, закрепившихся в природе после прекращения иммунизации населения против натуральной оспы. За последнее десятилетие возбудитель оспы буйволов активно циркулировал среди чувствительных домашних животных, ежегодно вызывая эпизоотии среди буйволов и коров (см. таблицу), что привело к формированию эндемичной территории в штатах Индии и Пакистана. Однако в отличие от Бразилии, где выявлено носительство вакциноподобных вирусов среди грызунов [34, 35], на эндемичной территории Индии и Пакистана резервуар оспы буйволов неизвестен. По нашему мнению, велика вероятность хронизации эпидемического процесса благодаря наличию чувствительных животных, в том числе коров, являющихся священными (неприкасаемыми) животными. Сведения о попытках выявления источника инфекции на эндемичной по оспе буйволов территории отсутствуют.

Анализ изложенного позволяет заключить, что основной путь передачи инфекции контактный — от больного животного к человеку. Степень вовлечения человека в период возникновения эпизоотий оспы буйволов достаточно устойчивая. Регистрируются отдельные случаи передачи заболевания от человека к животному, очевидно,

связанные с несоблюдением элементарных санитарно-гигиенических мер в ходе дойки больных буйволов и коров (мытьё с мылом рук и дезинфекция сосков дойных животных). Нельзя исключить и наличие контактной передачи инфекции от человека к человеку (видимо, от ребенка к матери и наоборот) в связи с высокой плотностью населения в деревнях Индии и Пакистана. Очевидно, для лиц, ухаживающих за дойными животными, существует определенная эпидемическая опасность, поэтому необходимо выполнять строгие противоэпидемические и противоэпизоотические мероприятия, а также мониторинг необычных вспышек ортопоксвирусных инфекций. Актуальным является наличие молекулярно-диагностических наборов, обеспечивающих эффективность дифференциальную диагностику ортопоксвирусных инфекций, патогенных для человека.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

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

#### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1—12, 16-37 см. REFERENCES)

13. Ахмедов А.М., Микаилов М.Т., Джабаров Д. Эпидемиологическая связь прививочной оспы людей с оспой коров. *Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунологии*. 1960; (5): 90—1.
14. Ганиев М.К., Фарзалиев И.А. Оспа крупного рогатого скота. *Ветеринария*. 1964; (7): 34.
15. Тантави Х.Х. Изучение вируса оспы, выделенного от буйволов в Египте и Индии. *Ветеринария*. 1974; (8): 119—21.

#### REFERENCES

1. King A.M., Adams M.J., Carstens E.B. *Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press; 2011.
2. Singh R.K., Hosamani M., Balamurugan V., Bhanuprakash V., Rasool T.J., Yadav M.P. Buffalopox: an emerging and re-emerging Zoonoses. *Anim. Health Res. Rev.* 2007; 8(1): 105—14.
3. Singh I.P., Singh S.B. Isolation and characterization of the etiologic agent of buffalopox. *J. Res. Ludhiana*. 1967; 4(3): 440—8.
4. Baxby D., Hill B.J. Characteristics of a new poxvirus isolated from Indian buffaloes. *Arch. Gesamte Virusforsch.* 1971; 35(1): 70—9.
5. Kataria R.S., Singh I.P. Serological relationship of buffalopox virus to vaccinia and cowpox viruses. *Acta Virol.* 1970; 14(4): 307—11.
6. Chandra R., Rao W.D., Gang S.K. A note on the characterization of two virus isolates from localized case of pox in buffaloes. *Indian J. Vet. Med.* 1987; 7(1): 68—70.
7. Zafar A., Swanepoel R., Hewson R., Nizam M., Ahmed A., Husain A. et al. Nosocomial buffalopoxvirus infection, Karachi, Pakistan. *Emerg. Infect. Dis.* 2006; 13(6): 902—4.
8. Damle A.S., Gaikwad A.A., Patwardhan N.S., Duthade M.M., Skheikh N.S., Deshmukh D.G. et al. Outbreak of human buffalopox infection. *J. Global Infect. Dis.* 2011; 3(2): 187—8.
9. Dumbell K., Richardson M. Virological investigations of specimens from buffaloes affected by buffalopox in Maharashtra State, India between 1985 and 1987. *Arch. Virol.* 1993; 128(3-4): 257—67.
10. Kolhapure R.M., Deolankar R.P., Tupe C.D., Raut C.G., Basu A., Dama B.M. et al. Investigation of buffalopox outbreaks in Maharashtra state during 1992—1996. *Indian J. Med. Res.* 1997; 106(11): 441—6.
11. Nedunchellian S., Reddy D.S., Venkataraman K.S. Buffalo pox infection in man. *Indian J. Public Health.* 1992; 36(2): 57.
12. Singh R.K., Hosamani M., Balamurugan V., Sathesh C.C., Shingal K.R., Tatwari S.B. et al. An outbreak of buffalopox in buffalo (*Bubalus bubalis*) dairy herds in Aurangabad, India. *Rev. Sci. Tech.* 2006; 25(3): 981—7.
13. Akhmedov A.M., Mikailov M.T., Dzhabarov D. Epidemiological link smallpox vaccination of people with smallpox cows. *Zhurnal mikrobiologii i immunologii*. 1960; (5): 90—1. (in Russian)
14. Ganiev M.K., Farzaliev I.A. Smallpox cattle. *Veterinariya*. 1964; (7): 34. (in Russian)
15. Tantavi Kh.Kh. The study of the smallpox virus, isolated from buffaloes in Egypt and India. *Veterinariya*. 1974; (8): 119—21. (in Russian)
16. Iwad F.I., Saber M.S., Amin M.M. Some epizootiological studies on buffalopox in Egypt. *Acta Vet. Yugoslavia*. 1981; 31(1): 41—7.
17. Lal S.M., Singh I.P. Buffalopox virus (preliminary report). *Arch. Gesamte Virusforsch.* 1973; 40(3-4): 390—1.
18. Fenner F., Wittek R., Dumbell K.R. *The Orthopoxviruses*. San Diego: Academic Press; 1989.
19. Fenner F., Henderson D.A., Arita I., Jezek Z., Ladnyi I.D. *Smallpox and its Eradication*. Geneva: WHO; 1988.
20. Venkatesan G., Balamurugan V., Prabhu M., Yogisharadhya R., Bora D.P., Gandhale P.N. et al. Emerging and re-emerging zoonotic buffalopox infection: a severe outbreak in Kolhapur (Maharashtra), India. *Vet. Ital.* 2010; 46(4): 439—48.
21. Workshop on Economical Important Diseases of Buffaloes. YASH-DA, 25 March 2009. Available at: [http://www.ahd.maharashtra.gov.in/pdf/dis/seminar\\_Buffalo.pdf](http://www.ahd.maharashtra.gov.in/pdf/dis/seminar_Buffalo.pdf).
22. Sharma S., Singh K.B., Bansal B.K., Sharma D.K. Clinical symptomatology and epidemiological observations on teat skin lesions in Buffaloes. *Buffalo Bulletin*. 2005; 24(1): 12—6.
23. Lal S.M., Singh I.P. Serological characterization of buffalopox virus. *Arch. Gesamte Virusforsch.* 1973; 43(4): 393—6.
24. Ramakrishnan M., Ananthapadmanabhan K. An experimental study of virus of buffalo pox. *Indian Vet. J.* 1957; 34(1): 23—30.
25. Yadav S., Hosamani M., Balamurugan V., Bhanuprakash V., Singh R.K. Partial genetic characterization of viruses isolated from pox-like infection in cattle and buffaloes: evidence of buffalo pox virus circulation in Indian cows. *Arch. Virol.* 2010; 155(2): 255—61.
26. Mercer A.M., Schmidt A., Weber O. *Poxviruses*. Basel Birkhauser Verlag; 2007.
27. Meyer H., Damon I.K., Esposito J.J. Orthopoxvirus diagnostics. *Methods Mol. Biol.* 2004; 269: 119—34.
28. Meyer H., Ropp S.L., Esposito J.J. Gene for A-type inclusion body protein is useful for a polymerase chain reaction assay to differentiate orthopoxviruses. *J. Virol. Methods*. 1997; 64(2): 217—21.
29. Ropp S.L., Jin Q., Knight J.C., Massung R.F., Esposito J.J. PCR strategy for identification and differentiation of small pox and other orthopoxviruses. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33: 2069—76.
30. Chandranaiik B.M., Singh R.K., Hosamani M., Krishnappa G., Harish B.R., Chethana C.S. et al. Comparative sequence analysis of B5R gene of zoonotic buffalopox virus isolates with other orthopoxviruses. *Trop. Anim. Health Prod.* 2011; 43(2): 287—90.
31. Gurav Y.K., Raut C.G., Yadav P.D., Tandale B.V., Sivaram A., Pore M.D. et al. Buffalopox outbreak in humans and animals in Western Maharashtra, India. *Prev. Vet. Med.* 2011; 100(3-4): 242—7.
32. National Center for Biotechnology Information. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
33. Singh R.K., Balamurugan V., Hosamani M., Kallesh D.J., Bhanuprakash V. Sequence analysis of C18L gene of buffalopox virus: PCR strategy for specific detection and differentiation of buffalopox from orthopoxviruses. *J. Virol. Methods*. 2008; 154(1-2): 146—53.
34. Souza L.O., Lacerda J.P., Fonseca I.E., Castro D.P., Forattini O.P., Rabello E.X. Cotia virus: a new agent isolated from sentinel mice in Sao Paulo, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1965; 14: 156—7.
35. Trindade G.S., Fonseca F.G., Marques J.T., Diniz S., Leite J.A., Bodt S. et al. Belo Horizonte virus: a vaccinia-like virus lacking the A-type inclusion body gene isolated from infected mice. *J. Gen. Virol.* 2004; 85: 2015—21.
36. Singh R.K., Hosamani M., Balamurugan V., Sathesh C.C., Rasod T.J., Yadav M.P. et al. Comparative sequence analysis of envelope protein genes of Indian buffalopox virus isolates. *Arch. Virol.* 2006; 151(Pt. 7): 1995—2005.
37. Sehgal C.L., Ray S.N., Ghosh T.K., Arora R.R. In investigation of an outbreak of buffalopox in animals and human beings in Dhulia district, Maharashtra. I. Laboratory studies. *J. Commun. Dis.* 1977; 9: 171—6.

Поступила 15.07.14

Принята в печать 22.01.15

---

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

---

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.327.2-006.04-078

Гурцевич В.Э., Сениута Н.Б., Ломая М.В., Игнатова А.В., Душенькина Т.Е.,  
Репкина И.А., Павловская А.И., Мудунов А.М.

### СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ВИРУСА ЭПШТЕЙНА-БАРР У БОЛЬНЫХ РАКОМ НОСОГЛОТКИ В СЛУЧАЯХ НЕВЫЯВЛЕННОГО ПЕРВИЧНОГО ОЧАГА

ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478, г. Москва

В работе описан метод диагностики неороговевающего рака носоглотки (нРНГ) в случаях невыявленного первичного очага. Метод базируется на объективной оценке титров IgG- и IgA-антител к вирусному капсидному (ВКА) и раннему (РА) антигенам вируса Эпштейна-Барр (ВЭБ), определяемых у больных с увеличенными шейными лимфатическими узлами или патологическими изменениями неясной природы в носоглотке. Диагноз нРНГ ставили с помощью так называемого решающего правила. Оно было создано на основе математической обработки с помощью многофакторного анализа результатов тестирования на антитела к ВЭБ у 72 больных с клинически и морфологически подтвержденным диагнозом нРНГ и в качестве контрольной группы — у 72 больных с другими опухолями головы и шеи (ДОГШ), не ассоциированными с ВЭБ. Проверка работы решающего правила, проведенная у 77 больных с подтвержденным диагнозом нРНГ (с целью выявления ложнонегативных случаев) и 231 больного ДОГШ и некоторыми инфекционными заболеваниями (с целью обнаружения ложнопозитивных случаев) показала его высокую диагностическую специфичность. Количество ложнонегативных случаев составило 5,2% (4/77), ложнопозитивных случаев — 6,5% (17/231). У больных нРНГ в случае невыявленного первичного очага получены следующие результаты. Из 32 больных с подозрением на РНГ у 11 на основании решающего правила был установлен диагноз нРНГ, подтвержденный впоследствии морфологическими и инструментальными исследованиями. Только в 2 случаях тестирование дало ложнонегативный результат (2/32; 6,3%). Это свидетельствует о том, что серодиагностика нРНГ с помощью решающего правила является высокоспецифичной, хотя и не безошибочной. Таким образом, можно сделать вывод, что оценка гуморального ответа у больных с подозрением на РНГ с применением решающего правила является важным дополнительным методом диагностики этого нового образования.

Ключевые слова: вирус Эпштейна-Барр; неороговевающий рак носоглотки; невыявленный первичный очаг опухоли; решающее правило для диагностики неороговевающего рака носоглотки; серологический ответ на антигены вируса Эпштейна-Барр.

Для цитирования: Гурцевич В.Э., Сениута Н.Б., Ломая М.В., Игнатова А.В., Душенькина Т.Е., Репкина И.А., Павловская А.И., Мудунов А.М. Серологические маркеры вируса Эпштейна-Барр у больных раком носоглотки в случаях невыявленного первичного очага. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61(5):205-212.

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-5-205-212

Gurtsevitch V.E., Senyuta N.B., Lomaya M.V., Ignatova A.V., Dushenkina T.E., Repkina I.A.,  
Pavlovskaya A.I., Mudunov A.M.

### DIAGNOSTIC VALUE OF THE EPSTEIN-BARR VIRUS SEROLOGICAL MARKERS IN PATIENTS WITH NASOPHARYNGEAL CARCINOMA IN CASES OF UNDETECTABLE PRIMARY TUMOR LOCATION

FSBI «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center», Moscow, 115478, Russian Federation

The goal of this work was to describe a method for diagnosis of the non-keratinizing nasopharyngeal carcinoma (nNPC) in cases of the undetectable primary tumor location. The method is based on evaluation of IgG and IgA antibody levels to the capsid (VCA) and early antigens (EA) of the Epstein-Barr virus (EBV). The diagnosis of nNPC is established by a so-called decision rule. The latter was created by mathematical processing of the method of multifactor analysis of the results of anti-EBV antibody testing of 72 patients with clinically and morphologically confirmed nNPC and 72 patients with other head and neck benign tumors (OHNT) not associated with EBV, which were tested as a control group. The diagnostic value of the decision rule which was tested in the group of 77 patients with confirmed nNPC and 231 patients of a control group was high. The numbers of false negative and false positive cases were equal to 5.2% (4/77) and 6.5% (17/231), respectively. Among 32 patients with undetectable primary tumors the decision rule was able to identify 11 cases of nNPC. This diagnosis later was confirmed by morphological and instrumental methods of study. Only in two cases, false negative result was obtained (2/32; 6.3%) indicating that the serological diagnostics of nNPC with the decision rule is highly specific but not exact. Thus, the data obtained allowed us to conclude that the serological testing of EBV specific antibody evaluated by the decision rule can be recommended as an important test supplementing the standard methods of pNPC diagnostics including cases with undetected primary tumor location.

Key words: Epstein-Barr virus (EBV); non-keratinizing carcinoma of nasopharynx (nNPC); undetectable primary tumor location; the decision rule for nNPC diagnostics; serological response to EBV antigens.

Для корреспонденции: Гурцевич Владимир Эдуардович, д-р мед. наук, проф., зав. лаб. вирусного канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478, г. Москва. E-mail: gurvlad532@yahoo.com

**For citation:** Gurtsevitch V.E., Senyuta N.B., Lomaya M.V., Ignatova A.V., Dushenkina T.E., Repkina I.A., Pavlovskaya A.I., Mudunov A.M. Diagnostic value of the Epstein–Barr virus serological markers in patients with nasopharyngeal carcinoma in cases of undetectable primary tumor location. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2016; 61(5): 205-212. (In Russ.).

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-5-205-212

**For correspondence:** Vladimir E. Gurtsevitch, Doctor of medical Sciences, professor, Head, laboratory of viral carcinogenesis, Institute of Carcinogenesis, «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center», Moscow, 115478, Russian Federation. E-mail: gurvlad532@yahoo.com

**Information about authors:** Gurtsevitch V.E., <https://orcid.org/0000-0003-1840-4364>  
Mudunov A.M., <https://orcid.org/0000-0002-0918-3857>.

**Funding.** The study was supported by RFBR grant 13-04-00063.

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

Received 16 February 2016

Accepted 29 March 2016

## Введение

Выраженная связь между вирусом Эпштейна-Барр (ВЭБ) и раком носоглотки (РНГ), обнаруженная у больных в южных провинциях Китая, позволила впервые высказать предположение о принципиальной возможности использовать серологические маркеры вируса для диагностики этой опухоли [1]. В исследованиях, проведенных в 1978 г. Н. Но и соавт. [2], было показано, что для диагностики РНГ могут быть успешно использованы IgA-антитела к вирусному капсидному антигену (ВКА) ВЭБ (ВКА/ВЭБ) в титрах 1:10 и выше. Несколько менее выраженной, но достаточной диагностической ценностью обладали также IgG- и IgA-антитела к раннему антигену (РА) вируса [3, 4].

Антитела к ВКА/ВЭБ, относящиеся к иммуноглобулинам класса А, оказались полезными и для ранней диагностики РНГ. Их высокая диагностическая ценность была продемонстрирована при массовом обследовании населения в одной из южных провинций Китая (Гуанси). Из 148 тыс. лиц в возрасте старше 30 лет указанный маркер вируса был обнаружен у 1267. Анализ биопсийного материала, полученный из ротоглотки 203 из них, позволил установить наличие неороговевающего РНГ (нРНГ) в 46 случаях [5], причем у половины выявленных больных была диагностирована только I или II стадия болезни. Клиническое наблюдение за оставшимися IgA-серопозитивными лицами позволило в течение следующих 18 мес выявить еще 12 случаев РНГ [6]. Дальнейшие исследования показали, что, кроме южных провинций Китая, высокие и промежуточные уровни заболеваемости РНГ зарегистрированы в странах Юго-Восточной Азии, Северной Африки, среди населения инуитов Аляски, Гренландии и Северной Канады, а также мигрантов китайского и филиппинского происхождения [7]. Вне эндемичных районов это новообразование встречается довольно редко. Например, среди населения Колумбии, США, Финляндии, Зимбабве, Индии и Японии показатели заболеваемости РНГ в 1998—2002 гг. были в 30—60 раз ниже, чем среди населения Гонконга, относящегося к регионам высокого риска [8]. РНГ является редким заболеванием и среди населения стран бывшего СССР, включая Россию. В частности, в структуре злокачественных новообразований у больных в России в 2006 г. на долю опухолей носоглотки у мужчин приходилось 0,15%, у женщин — 0,08% [9].

В классификации ВОЗ 2005 г. выделяют 3 гистологических типа РНГ [10]: тип 1 — неороговевающий рак (non-keratinizing carcinoma), нРНГ; тип 2 — ороговева-

ющий плоскоклеточный рак (keratinizing squamous cell carcinoma); тип 3 — базалоидный плоскоклеточный рак (basaloid squamous cell carcinoma). К неороговевающему раку (гистологический тип 1) относятся 2 подтипа: недифференцированный (nondifferentiated non-keratinizing carcinoma) и дифференцированный (differentiated non-keratinizing carcinoma), клинически и прогностически не отличающиеся друг от друга. Распространенность каждого из типов рака зависит от географического региона. Типы РНГ 2 и 3, не ассоциированные с ВЭБ, как правило, преобладают в западной популяции, в то время как тесно ассоциированный с ВЭБ гистологический тип 1 в подавляющем большинстве случаев регистрируют в Южном Китае и странах Юго-Восточной Азии [11].

Поскольку Россия относится к регионам, не эндемичным по РНГ, проведение массовых серологических обследований населения с целью ранней диагностики этого заболевания не представляется целесообразным. В этих регионах выраженный гуморальный ответ на ВЭБ, вероятно, может быть использован достаточно эффективно на ранних этапах обследования больных для дифференцировки нРНГ от его иных гистологических типов, а также других опухолей головы и шеи (ДОГШ), не ассоциированных с ВЭБ. Особую клиническую ценность серологические маркеры ВЭБ, по-видимому, могут приобрести для обнаружения нРНГ в случае невыявленного первичного очага опухоли при ее метастазировании в лимфатические узлы шеи.

С учетом вышесказанного задачи данного исследования состояли в следующем:

— провести математический анализ различных значений титров IgG- и IgA-антител к антигенам ВЭБ, имеющих наибольшее значение для диагностики нРНГ в неэндемичном регионе (России); с помощью многофакторного анализа отобрать такие сочетания ВЭБ-специфических антител, которые в каждом конкретном случае позволят с высокой достоверностью дифференцировать нРНГ от других патологий, ДОГШ в частности;

— проверить диагностическую значимость отобранных для решающего правила серологических маркеров ВЭБ на группах больных с клинически и морфологически установленным диагнозом нРНГ, ДОГШ и некоторых инфекционных заболеваний;

— оценить с помощью решающего правила способность ВЭБ-специфической серологии диагностировать нРНГ при обследовании больных с метастазами в лимфатические узлы шеи при невыявленном первичном очаге.

## Материал и методы

**Материалы.** Материалом для исследования служили сыворотки (плазма) крови от 72 больных с клинически и морфологически установленным диагнозом нРНГ и 72 больных с подтвержденным диагнозом ДОГШ. Полученные данные использовали при создании решающего правила, применяемого для диагностики нРНГ. Для проверки специфичности диагностики нРНГ с помощью решающего правила использовали сыворотку (плазму) крови от 77 больных с клинически и морфологически установленным диагнозом нРНГ с целью выявления ложнонегативных случаев этой опухоли. Тестировали также сыворотку (плазму) крови от 171 больного ДОГШ, а также от 32 больных сифилисом и 28 больных туберкулезом с целью выявления ложнопозитивных случаев. После установления диагностической ценности решающего правила для выявления нРНГ исследовали 33 образца сыворотки (плазмы) крови больных с метастазами рака в лимфатических узлах шеи из невыявленного первичного очага или патологическими изменениями в носоглотке или лимфатических узлах в области шеи неясной природы с целью выявления случаев нРНГ. Клинический материал от больных нРНГ, ДОГШ и с невыявленным первичным очагом опухоли был собран в период с 2000 по 2015 г. в отделениях опухолей головы и шеи и опухолей верхних дыхательно-пищеварительных путей ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина». Клинический материал от больных инфекционными заболеваниями (сифилисом и туберкулезом) получен из инфекционной клинической больницы № 1 г. Москвы.

Исследование, в которое больные РНГ и ДОГШ были включены с их согласия в результате случайной выборки, было одобрено Комитетом по этике при ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина».

**Реакция непрямой иммунофлуоресценции.** Для тестирования образцов сывороток (плазмы) крови на наличие ВЭБ-специфических антител использовали клеточную линию P3HR1, продуцирующую вирус и синтезирующую его ВКА, и не продуцирующую вирус клеточную линию Raji, синтезирующую после обработки индукторами РА вируса. Для получения примерно 10% антигенсодержащих клеток клеточную линию Raji обрабатывали ТРА (12-0-тетрадеканол-форбол-13-ацетат) в концентрации 20 нг/мл в сочетании с бутиратом натрия в дозе 3 мкМ/мл в течение 3—5 дней, а клеточную линию P3HR1 обрабатывали только ТРА в течение 3—6 дней в той же дозе. Обработанную таким образом клеточную суспензию каждой линии наносили на предметные стекла в виде изолированных капель, которые после высушивания на воздухе и фиксирования охлажденным ацетоном использовали в качестве антигенных препаратов. При постановке реакции использовали 10-кратные разведения изучаемых образцов сывороток (плазмы) от 1:10 до 1:2560, а в качестве контроля — известные высокопозитивные или негативные сыворотки в разведении 1:20, которые наносили на предметные стекла с приготовленными антигенными препаратами. ВЭБ-специфические антитела обнаруживали с помощью козырь антител к IgG или IgA человека, меченных FITC («Sigma», США; НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Россия). Реакцию оценивали с использованием флуоресцентного микроскопа фирмы «Nikon» (Германия). Присутствие антител к вирусу определяли по ярко-зеленому свечению клеток на фоне негативных

клеток. Титром антител считали последнее разведение сыворотки (плазмы), с которым обнаруживали не менее 5% специфически флуоресцирующих клеток (при четких позитивном и негативном контролях). В каждой группе обследуемых лиц подсчитывали средние геометрические значения (СГЗ) титров антител.

## Результаты

Высокие титры антител к ВЭБ, сопровождающие возникновение и течение РНГ, впервые обнаружены в эндемичных по этому заболеванию регионах: южных провинциях Китая и странах Юго-Восточной Азии. Для дифференцирования этого новообразования от других опухолей авторы многочисленных исследований рекомендовали использовать высокие титры IgA- и/или IgG-антител к различным антигенам вируса. Отбор диагностически значимых титров антител, как правило, проводился эмпирически, а число одновременно оцениваемых серологических маркеров никогда не превышало 2. До настоящего времени не существует объективной комплексной оценки гуморального ответа на ВЭБ, с высокой степенью достоверности позволяющей дифференцировать РНГ от других неоплазий.

Для решения этой проблемы нами на базе предварительных исследований, показавших у больных РНГ в России и странах бывшего СССР высокие показатели гуморального ответа на ВЭБ, было разработано так называемое решающее правило, основанное на информативности различных серологических маркеров вируса для диагностики нРНГ. При этом титры гуморальных IgG- и IgA-антител к набору ВЭБ-ассоциированных антигенов (ВКА и РА) у 72 больных с инструментально и морфологически подтвержденным диагнозом нРНГ сравнивали с аналогичными показателями гуморального ответа на ВЭБ у 72 больных ДОГШ. Исследование проводили до начала лечения больных. Используя алгоритм экстремального разбиения признака на градации в двух сравниваемых группах больных (от 1 до 4), мы получили характерные частоты конечных разведений сывороток (плазмы), в которых обнаруживали антитела различной специфичности (табл. 1). Так, IgG-антитела к ВКА в разведении 1:160 в группе больных нРНГ встречались в 1,4% случаев, тогда как в группе больных ДОГШ — в 58,3%. Наоборот, антитела указанной специфичности в высоких титрах (1:640) значительно чаще выявляли у больных нРНГ (69,4 против 2,8% у больных ДОГШ). Аналогичную закономерность наблюдали в отношении IgA-антител к РА. Наиболее резкое различие в сравниваемых группах больных выявлено при сопоставлении частот обнаружения IgA-антител к ВКА: у больных нРНГ титры 1:10 и выше были обнаружены в 80,6% случаев и полностью отсутствовали у больных ДОГШ. Антитела к РА, относящиеся к иммуноглобулинам класса А, при полном их отсутствии у больных ДОГШ в 58,3% случаев наблюдали у больных нРНГ.

Степень различия гуморального ответа у больных РНГ и ДОГШ оценивали с помощью коэффициента информативности (КИ) по Шеннону [12]. Высокое значение этого коэффициента говорило о том, что титры вирусспецифических антител к данному антигену в двух сравниваемых группах больных существенно различаются, и, наоборот, низкие значения коэффициентов указывали на небольшие различия. Из табл. 1 следует, что больные нРНГ максимально отличались от больных ДОГШ по титрам IgA-антител к ВКА (КИ = 0,60). Раз-

Таблица 1

Титры гуморальных IgG- и IgA-антител к различным антигенам ВЭБ у больных РНГ и ДОГШ и их информативность для дифференциальной диагностики нРНГ

Специфичность антител	Группа №	Титры антител	Частота обнаружения вирусспецифических антител у больных				КИ
			нРНГ (72 случая)		ДОГШ (72 случая)		
			абс.	%	абс.	%	
ВКА/IgG	1	≥160	1	1,4	42	58,3	0,51
	2	320	7	9,7	22	30,6	
	3	640	14	19,4	6	8,3	
	4	>640	50	69,4	2	2,8	
РА/IgG	1	20	10	13,9	63	87,5	0,45
	2	40; 80	26	36,1	9	12,5	
	3	>80	36	50,0	0	0	
ВКА/IgA	1	0	6	8,3	62	86,1	0,60
	2	10	8	11,1	10	13,9	
	3	>10	58	80,6	0	0	
РА/IgA	1	0	30	41,7	72	100	0,34
	2	>0	42	58,3	0	0	

Примечание. Здесь и в табл. 3: нРНГ — низкодифференцированный гистологический вариант рака носоглотки; ДОГШ — другие опухоли головы и шеи; КИ — коэффициент информативности.

личие было несколько меньшим, но достаточно значимым при сопоставлении титров IgG-антител к этому же антигену (КИ = 0,45). Более низкой информативностью обладали IgA-антитела к РА (КИ = 0,34). Это связано с тем, что антитела указанной специфичности, хотя и были характерны только для больных нРНГ, в изучаемой группе их обнаруживали лишь у незначительного числа больных. Таким образом, метод многофакторного анализа, использованный в этой работе, позволил объективно сравнить гуморальный ответ на различные антигены ВЭБ у больных нРНГ и ДОГШ и выделить отдельные серологические маркеры вируса, наиболее характерные для нРНГ.

Таблица 2

Решающее правило для дифференциальной диагностики нРНГ по титрам IgG- и IgA-антител к антигенам ВЭБ

Специфичность антител	Группа №	Разведение сыворотки	Диагностический вес значений титров антител, усл. ед.
IgG-антитела к ВКА	1	1:160	-48
	2	1:320	-51
	3	1:640	42
	4	>1:640	57
IgG-антитела к РА	1	1:20	-60
	2	1:40, 1:80	34
	3	>1:80	26
IgA-антитела к ВКА	1	0	-135
	2	1:10	61
	3	>1:10	74

Для выявления у больных нРНГ наиболее типичных вариантов иммунного ответа на спектр ассоциированных с ВЭБ антигенов был использован метод многофакторной статистики, разработанной Т.Г. Глазковой и В.И. Вапником (РОНЦ им. Н.Н. Блохина). С помощью указанного метода были отобраны такие сочетания титров вирусспецифических антител, которые в каждом конкретном случае позволяли дифференцировать нРНГ от ДОГШ. На основании полученных данных выведено решающее правило (табл. 2). Оно позволяет по сочетанным показателям титров IgG- и IgA-антител к ВКА и IgG-антител к РА вируса объективно осуществлять диагностику нРНГ с высокой достоверностью. Каждому из значений вышеуказанных титров антител соответствуют так называемые диагностические веса, которые следует сложить и сумму трех чисел сравнить с нулем. Любая положительная сумма указывает с достоверностью 90% на наличие у больного нРНГ, а отрицательная с той же достоверностью отрицает наличие этой опухоли и свидетельствует о наличии либо ДОГШ, либо иного заболевания.

Диагностическая значимость серологических маркеров ВЭБ решающего правила была проверена при тестировании больных с клинически и морфологически подтвержденным диагнозом нРНГ, ДОГШ и инфекционной патологией. Результаты анализа представлены в табл. 3. Из этой таблицы следует, что исходя из решающего правила у 73 (94,8%) из 77 больных нРНГ гуморальный ответ на вирус был оценен как характерный для этого заболевания. Лишь в 4 (5,2%) случаях был получен ложнонегативный результат. Количество ложнопозитивных случаев с типичным (по решающему правилу) для нРНГ гуморальным ответом на ВЭБ в группе больных ДОГШ составило 7,6% (13/171), а вместе с инфекционными заболеваниями — 6,5% (2/32). Ни одного позитивного случая не было обнаружено в группах больных туберкулезом ( $n = 28$ ) и доноров крови ( $n = 83$ ).

На основании полученных данных далее представля-

Таблица 3

Ложнонегативные и ложнопозитивные случаи среди больных нРНГ, ДОГШ и некоторыми инфекционными заболеваниями

Изучаемая патология	Число наблюдений	Ложнонегативные случаи, абс. (%)	Ложнопозитивные случаи, абс. (%)
нРНГ	77	4 (5,2)	0
Рак языка	22	—	4 (18,2)
Рак щитовидной железы	21	—	3 (14,3)
Рак миндалин	10	—	1 (10,0)
Рак гортани	33	—	3 (9,1)
Лимфосаркома носоглотки	14	—	0
Рак околоушной слюнной железы	18	—	0
ДОГШ	53	—	2 (3,8)
Сифилис	32	—	2 (6,3)
Туберкулез	28	—	0
Всего РНГ	77	4 (5,2)	—
Всего ДОГШ + инфекционные болезни	231	0	15 (6,5)

лось важным оценить специфичность серологической диагностики нРНГ при невыявленном первичном очаге. Больные с метастазами в шейные лимфатические узлы без выявленного очага опухоли встречаются довольно часто среди онкологических больных (3—9%), поступающих на обследование в специализированные учреждения [13—16]. Локализацию так называемых скрытых опухолей в течение длительного времени не удается выявить ни клинически, ни инструментально. Такие опухоли иногда локализуются в носоглотке и представляют собой недифференцированную форму рака. Однако клиническое проявление болезни в результате ее длительного бессимптомного течения и анатомо-топографических особенностей строения носоглотки, а также несовершенства традиционных, широко применяемых диагностических тестов существенно запаздывает. Об этом свидетельствует и тот факт, что 70—80% больных поступают в стационар для проведения лечения уже с III—IV стадией болезни [17, 18]. В этой ситуации актуальны дополнительные методы исследования, способствующие раннему выявлению опухоли. Результаты проведенных нами исследований свидетельствуют о том, что одним из методов диагностики нРНГ при невыявленном первичном очаге может стать серологический тест на ВЭБ-специфические антитела. Для проверки данного предположения сыворотки (плазма) крови 32 больных с метастазами рака в лимфатические узлы шеи из невыявленного первичного очага или с патологическими изменениями в носоглотке или шейных лимфатических узлах неясной природы изучали на наличие IgG- и IgA-антител к ВКА и РА ВЭБ. Большинство из указанных больных отвечали следующим требованиям [16]: в их анамнезе не было других злокачественных заболеваний или хирургических вмешательств по неясным причинам; в анамнезе отсутствовала симптоматика, связанная с патологией других органов; не было клинических или лабораторных доказательств конкретной локализации опухоли; обнаружен один или несколько вовлеченных в патологический процесс лимфатических узлов. Обследуемые нами больные либо только что поступили на обследование, либо находились под врачебным контролем до проведения им специфической терапии. Оценку гуморального ответа больных на вирусспецифические антитела проводили с помощью решающего правила. При этом получаемые результаты делили на 2 категории: положительные, т. е. с 90% достоверностью указывающие на наличие нРНГ, и отрицательные, т. е. с такой же степенью достоверности указывающие на его отсутствие. При последующем клиническом наблюдении и повторном (в ряде случаев многократном) инструментальном, а также морфологическом исследовании у 24 из 32 больных очаг первичной опухоли или иного патологического процесса был обнаружен и установлен заключительный диагноз. Этот диагноз сопоставляли с предварительным диагнозом, установленным на основании данных серологического исследования. Полученные результаты представлены в табл. 4, из которой следует, что диагноз нРНГ, установленный с помощью решающего правила на основании данных серологического тестирования, был подтвержден данными клинико-морфологических исследований в 11 случаях. В 1 случае (П-6) высокие титры вирусспецифических антител, расцениваемые как характерные для нРНГ, были обнаружены у больного лимфомой Ходжкина (ЛХ). Диагностическая ошибка в данном случае вполне объяснима, так как определенные

гистологические варианты ЛХ сопровождаются высокими титрами ВЭБ-специфических антител. У 2 больных (П-5 и П-32) с невыявленной локализацией опухоли результаты серологического тестирования оказались ложнонегативными (2/32), поскольку при морфологическом исследовании лимфатического узла у каждого больного были обнаружены клетки неороговевающего недифференцированного рака, т. е. опухолевые клетки, характерные для нРНГ. Таким образом, диагностическая ошибка при выявлении нРНГ на основании ВЭБ-специфических антител составила 6,25%. Негативные результаты по данным серологического исследования были получены у 5 больных с различными вариантами опухолевого процесса в носоглотке, не относящимися к недифференцированному гистологическому варианту рака (П-2, П-3, П-12, П-14) и не характеризующимися ассоциацией с ВЭБ. Серонегативными оказались также 3 больных лимфоаденопатией (П-17, П-18, П-29), причем в двух случаях с поражением носоглотки (П-17, П-18). У 3 больных с низкими титрами гуморальных антител к ВЭБ (П-1, П-7, П-8) отмечено отдаленное расположение первичной опухоли: в толстой кишке, молочной железе и прямой кишке. У 5 больных (П-9, П-11, П-23, П-24, П-30) локализация опухоли не установлена. При морфологическом исследовании патологически измененных лимфатических узлов в этих случаях выявлены клетки умеренно дифференцированного плоскоклеточного рака с тенденцией к ороговеванию, т. е. клетки, не характерные для нРНГ.

Таким образом, полученные нами данные доказали достаточно высокую надежность серологического теста для диагностики нРНГ, в том числе для случаев без выявленного первичного очага, представляющих значительные трудности для диагностики.

### Обсуждение

Проведенные исследования показали, что развитие нРНГ у больных в России и странах бывшего СССР, как и в эндемичных регионах, сопровождается высокими титрами антител к ВЭБ, что может быть использовано в качестве важного опухолевого маркера для диагностики этого заболевания. По нашим данным, высокую диагностическую ценность имеют сочетанные показатели титров IgG- и IgA-антител к ВКА и РА вируса. Решающее правило, полученное на основе многофакторного анализа трех маркеров серологического ответа на ВЭБ, позволило нам диагностировать нРНГ с достоверностью, приближающейся к 90%. Особую ценность приобретает проведение дифференциальной диагностики между нРНГ и другими опухолями этой же анатомической области. Учитывая клиническую особенность РНГ — раннее метастазирование в лимфатические узлы шеи без визуально и часто инструментально выявляемой патологии в носоглотке, следует отметить, что диагностика этого новообразования часто бывает затруднена или ошибочна.

Выполненные нами исследования подтверждают диагностическую ценность гуморального ответа и для диагностики нРНГ в случаях метастазирования опухоли в лимфатические узлы шеи из невыявленного первичного очага. Полученные данные в то же время показывают, что серологическая диагностика нРНГ не безошибочна, не «абсолютна» и не может заменить собой ни морфологические, ни инструментальные методы исследования. Исходя из сказанного становится очевидным, что

Серологическая диагностика нРНГ в случаях невыявленного первичного очага опухоли

Паци- енты	Исучае- мые больные, возраст, годы	Предварительный клиниче- ский диагноз	Титры антител к ВЭБ при пер- вичном обследовании больных				Диагноз РНГ на основа- нии данных серологиче- ского исследования	Морфологический диагноз на основании исследования ЛУ из НПО
			IgG		IgA			
			ВКА	РА	ВКА	РА		
П-1	М., 54	Mts рака в ЛУ шеи из НПО	80	0	10	0	Отрицательный, не нРНГ	Рак толстой кишки
П-2	В., 45	То же	160	0	0	0	То же	Ангиофибросаркома с пораже- нием носоглотки
П-3	З., 65	" "	160	10	0	0	" "	Злокачественная лимфома носог- лотки гистиоцитарного типа
П-4	М., 41	" "	2560	40	80	0	Положительный, нРНГ	нРНГ
П-5	К., 54	" "	320	0	0	0	Отрицательный, не РНГ	нРНГ
П-6	Г., 61	" "	2560	320	40	0	Положительный, нРНГ	Лимфома Ходжкина
П-7	П., 35	" "	320	10	10	0	Отрицательный, не РНГ	Рак молочной железы
П-8	О., 71	" "	320	10	0	0	То же	Рак прямой кишки
П-9	Б., 56	" "	640	80	0	0	" "	Плоскоклеточный рак? Беспиг- ментная меланома?
П-10	Ц., 41	" "	1280	320	80	40	Положительный, нРНГ	нРНГ
П-11	С., 49	" "	320	0	0	0	Отрицательный, не нРНГ	оРНГ?
П-12	К., 27	Подозрение на РНГ	160	40	0	0	То же	Полипы носоглотки
П-13	К., 60	То же	320	0	0	0	" "	Лимфосаркома носоглотки
П-14	А., 40	" "	160	20	0	0	" "	То же
П-15	Ч., 23	Рак околоушной слюнной железы?	2560	20	40	0	Положительный, нРНГ	нРНГ
П-16	Ч., 47	Mts рака в ЛУ шеи из НПО	1280	80	20	10	То же	нРНГ
П-17	Ж., 26	То же	640	0	0	0	Отрицательный, не нРНГ	Синусовый гистиоцитоз с массивной лимфоаденопатией и поражением носоглотки
П-18	М., 19	Увеличение шейных и подмышечных ЛУ	640	0	0	0	То же	Двусторонний гайморит, реак- тивная лимфоаденопатия
П-19	М., 38	Увеличение шейных ЛУ	640	320	80	80	Положительный нРНГ	нРНГ
П-20	И., 66	Mts рака в ЛУ шеи из НПО	320	160	0	0	То же	нРНГ
П-21	К., 66	То же	640	160	320	80	" "	нРНГ
П-22	Н., 60	" "	160	80	10	10	" "	нРНГ
П-23	А., 77	" "	160	10	0	0	Отрицательный, не нРНГ	оРНГ
П-24	С., 57	" "	20	0	0	0	То же	оРНГ
П-25	С., 53	Рак носоглотки?	10	0	0	0	" "	Элементы злокачественного опу- холевого роста не обнаружены
П-26	М., 54	Опухоль основания черепа	640	160	1280	640	Положительный, нРНГ	нРНГ
П-27	С., 42	Нейроэндокринный рак носоглотки	320	40	160	80	То же	нРНГ
П-28	Ш., 33	Лимфома Беркитта	40	0	0	0	Отрицательный, не нРНГ	Диффузная В-крупноклеточная лимфома GCB-типа
П-29	Б., 56	Лимфоаденопатия неясно- го генеза	40	0	0	0	То же	Лимфоаденопатия с пораже- нием многих групп ЛУ, включая шейные
П-30	Ч., 57	Mts рака в ЛУ шеи из НПО	80	0	0	0	" "	оРНГ
П-31	П., 36	Плоскоклеточный РНГ	320	40	10	10	Положительный, нРНГ	нРНГ
П-32	М., 61	Mts рака в ЛУ шеи из НПО	80	0	0	0	Отрицательный, не нРНГ	нРНГ

Примечание. нРНГ — неороговевающий рак носоглотки; оРНГ — ороговевающий плоскоклеточный рак носоглотки; Mts рака — метастазы рака; ЛУ — лимфатический узел; НПО — невыявленный первичный очаг; ИГХ — иммуногистохимическое исследование.

лишь комплексный подход к обследованию указанных больных с обязательным тестированием их сывороток (плазмы) крови на ВЭБ-специфические антитела может облегчить и ускорить диагностику нетипично протекающих случаев РНГ. К аналогичному выводу склоняются и другие авторы, использующие, как правило, в большинстве проводимых ими исследований ограниченный набор серологических маркеров. В эндемичных же по РНГ регионах чаще всего прибегают к монотестированию на IgA-антитела к ВКА [18—22].

В последнее десятилетие по мере развития молекулярных технологий для диагностики злокачественных опухолей стали применять тесты, основанные на анализе присутствующих в крови внеклеточных, свободно циркулирующих нуклеиновых кислот. Эти молекулы, высвобождающиеся из гибнущих в организме клеток, могут служить маркерами того или иного процесса, в том числе неопластического [23—25].

Ло У.М. и соавт. [26], используя полимеразную цепную реакцию в реальном времени, обнаружили в плазме крови больных РНГ высокую концентрацию копий ДНК ВЭБ при низких фоновых значениях этой ДНК у больных ДОГШ и здоровых лиц. Находка стимулировала появление серии работ, посвященных количественному определению уровней свободной ДНК ВЭБ в плазме крови больных РНГ. Этот тест стал применяться не только для диагностики этой опухоли, но главным образом для оценки эффективности лечения и прогноза [26—29].

Сопоставление данных, касающихся гуморального ответа на ВЭБ и количественного содержания ДНК ВЭБ у больных РНГ, позволило обнаружить между ними корреляцию. Если учесть инерционность иммунного ответа на вирусную инфекцию, клиническая значимость ДНК-тестирования, по мнению ряда авторов, оказалась выше, чем серологического теста [30, 31]. Данные собственных предварительных исследований подтверждают этот вывод и для случаев РНГ в эндемичном регионе (России) [32].

### Заключение

Принимая во внимание простоту серологического теста, его высокую диагностическую ценность, базирующуюся на объективной оценке гуморального ответа с помощью решающего правила, можно утверждать, что этот тест может быть полезным, дополняющим стандартные методы исследования больных с подозрением на РНГ, особенно в случаях метастазирования опухоли в лимфатические узлы шеи без выявленного первичного очага. Кроме того, преимуществом серологического теста является в одинаковой степени пригодность для определения вирусспецифических антител и сыворотки, и плазмы крови, а постановка реакции не требует много времени и высокотехнологичного оборудования, необходимого для определения в плазме крови копий ДНК ВЭБ.

**Финансирование.** Исследование было поддержано грантом РФФИ 13-04-00063.

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

### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1—8, 10, 11, 13—16, 19—31 см. REFERENCES)

9. Давыдов М.И. Аксель Е.М. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ. *Вестник Российского онкологического научного центра имени Н.Н. Блохина РАМН.* 2008; 19 (2 приложение 1).

12. Лидовский В.В. *Теория информации. Учебное пособие.* М.; Компания «Спутник+»; 2004.  
17. Белоусова Н.В., Михайловский А.А., Алексеева Т.Р., Шатская В.А. Эндоскопическая диагностика множественного первичного рака верхних дыхательных путей. *Вестник оториноларингологии.* 1996; (2): 33—5.  
18. Белоусова Н.В., Поддубный Б.К., Унгиадзе Г.В., Кондратьева Т.Т., Азхипов В.В., Пробатова Н.А. и др. Современная диагностика рака носоглотки. *Современная онкология.* 2000; 2(3): 78—82.  
32. Гурцевич В.Э., Сенюта Н.Б., Кондратова В.Н., Гончарова Е.В., Игнатова А.В., Лома М.В. и др. Диагностическая значимость уровней ДНК и антител к капсидному антигену вируса Эпштейна-Барр в плазме крови больных раком носоглотки в эндемичном регионе. *Успехи молекулярной онкологии.* 2015; 2(2): 56—67.

### REFERENCES

- Henle G., Henle W. Epstein-Barr virus-specific IgA serum antibodies as an outstanding feature of nasopharyngeal carcinoma. *Int. J. Cancer.* 1976; 17: 1—7.
- Ho H.C., Ng M.H., Kwan H.C. Factors affecting serum IgA antibody to Epstein-Barr viral capsid antigens in nasopharyngeal carcinoma. *Br. J. Cancer.* 1978; 37: 356—62.
- Ho H.C., Kwan H.C., Wu P., Chan S.K., Ng M.H., Saw D. Epstein-Barr antibodies in suspected nasopharyngeal carcinoma. *Lancet.* 1978; 2(8099): 1094—5.
- Ho H.C., Kwan H.C., Ng M.H., de The G. Serum IgA antibodies to Epstein-Barr virus capsid antigen preceding symptoms of nasopharyngeal carcinoma. *Lancet.* 1978; 1(8061): 436.
- Yi Z., Yuxi L., Chunren L., Sanwen C., Jiheng W., Jisong Z. et al. Application of an immunoenzymatic method and an immunoradiographic method for a mass survey of nasopharyngeal carcinoma. *Intervirology.* 1980; 13(3): 162—8.
- Zeng Y., Pi G.H., Zhao W.P. Detection of EB virus nuclear antigen (EBNA) by anticomplement immunoenzymatic method. *Zhongguo Yi. Xue. Ke. Xue. Yuan Xue. Bao.* 1980; 2(2): 134—5.
- Parkin D.M., Bray F., Ferlay J., Pisani P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int. J. Cancer.* 2001; 94(2): 153—6.
- Parkin D.M., Bray F., Ferlay J., Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J. Clin.* 2005; 55(2): 74—108.
- Davydov M.I. Aksel' E.M. Statistics malignancies in Russia and CIS countries. *Vestnik Rossiyskogo onkologicheskogo nauchnogo tsentra imeni N.N. Blokhina RAMN.* 2008; 19 (2 prilozhenie 1). (in Russian)
- Barnes L., Eveson J.W., Reichart P., Sidransky D., eds. *Pathology and Genetics Head and Neck Tumors.* Lyon: IARC Press; 2005.
- Marks J.E., Phillips J.L., Menck H.R. The National Cancer Data Base report on the relationship of race and national origin to the histology of nasopharyngeal carcinoma. *Cancer.* 1998; 83(3): 582—8.
- Lidovskiy V.V. *Information Theory. Tutorial [Teoriya informatsii. Uchebnoe posobie].* Moscow: Kompaniya «Sputnik+»; 2004. (in Russian)
- Ho H.C., Ng M.H., Kwan H.C., Chau J.C. Epstein-Barr-virus-specific IgA and IgG serum antibodies in nasopharyngeal carcinoma. *Br. J. Cancer.* 1976; 34: 655—60.
- Pearson G.R. Epstein-Barr virus and nasopharyngeal carcinoma. *J. Cell Biochem. Suppl.* 1993; 17F: 150—4.
- Ringborg U., Henle W., Henle G., Ingimarsson S., Klein G., Silfverward C. et al. Epstein-Barr virus-specific serodiagnostic tests in carcinomas of the head and neck. *Cancer.* 1983; 52: 1237—43.
- Comess M.S., Beahrs O.H., Dockerty M.B. Cervical metastasis from occult carcinoma. *Surg. Gynecol. Obstet.* 1957; 104: 607—17.
- Belousova N.V., Mikhaylovskiy A.A., Alekseeva T.R., Shatskaya V.A. Endoscopic diagnosis of multiple primary cancers of the upper respiratory tract. *Vestnik otorinolaringologii.* 1996; (2): 33—5. (in Russian)
- Belousova N.V., Poddubnyy B.K., Ungiadze G.V., Kondrat'eva T.T., Azhkipov V.V., Probatova N.A. et al. Current diagnosis of nasopharyngeal cancer. *Sovremennaya onkologiya.* 2000; 2(3): 78—82. (in Russian)
- Li S., Deng Y., Li X., Chen Q.P., Liao X.C., Qin X. Diagnostic value of Epstein-Barr virus capsid antigen-IgA in nasopharyngeal carcinoma: a meta-analysis. *Chin. Med. J. (Engl.).* 2010; 123: 1201—5.
- Ling W., Cao S.M., Huang Q.H., Li Y.H., Deng M.Q. Prognostic implication of pretreatment titer of serum immunoglobulin A against Epstein-Barr virus capsid antigen in nasopharyngeal carcinoma patients in Sihui, Guangdong. *Ai. Zhong.* 2009; 28(1): 57—9.

21. Luo Y.L., Ou G.P., Chi P.D., Liang Y.N., Liu Y.H., Huang M.Y. Combined determination of Epstein-Barr virus-related antibodies and antigens for diagnosis of nasopharyngeal carcinoma. *Ai. Zheng.* 2009; 28(1): 76—8.
22. Song C., Yang S. A meta-analysis on the EBV DNA and VCA-IgA in diagnosis of Nasopharyngeal Carcinoma. *Pak. J. Med. Sci.* 2013; 29: 885—90.
23. Sidransky D. Emerging molecular markers of cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 2002; 2: 210—9.
24. Skvortsova T.E., Rykova E.Y., Tamkovich S.N., Bryzgunova O.E., Starikov A.V., Kuznetsova N.P. et al. Cell-free and cell-bound circulating DNA in breast tumours: DNA quantification and analysis of tumour-related gene methylation. *Br. J. Cancer.* 2006; 94: 1492—5.
25. Lichtenstein A.V., Melkonyan H.S., Tomei L.D., Umansky S.R. Circulating nucleic acids and apoptosis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2001; 945: 239—49.
26. Lo Y.M., Chan L.Y., Chan A.T., Leung S.F., Lo K.W., Zhang J. et al. Quantitative and temporal correlation between circulating cell-free Epstein-Barr virus DNA and tumor recurrence in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res.* 1999; 59: 5452—5.
27. Hou X., Zhao C., Guo Y., Han F., Lu L.X., Wu S.X. et al. Different Clinical Significance of Pre- and Post-treatment Plasma Epstein-Barr Virus DNA Load in Nasopharyngeal Carcinoma Treated with Radiotherapy. *Clin. Oncol. (R. Coll. Radiol).* 2011; 23(2): 128—33.
28. Leung S.F., Chan K.C., Ma B.B., Hui E.P., Mo F., Chow K.C. et al. Plasma Epstein-Barr viral DNA load at midpoint of radiotherapy course predicts outcome in advanced-stage nasopharyngeal carcinoma. *Ann. Oncol.* 2014; 25: 1204—8.
29. Wang W.Y., Twu C.W., Chen H.H., Jan J.S., Jiang R.S., Chao J.Y. et al. Plasma EBV DNA clearance rate as a novel prognostic marker for metastatic/recurrent nasopharyngeal carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 2010; 16: 1016—24.
30. Twu C.W., Wang W.Y., Liang W.M., Jan J.S., Jiang R.S., Chao J. et al. Comparison of the prognostic impact of serum anti-EBV antibody and plasma EBV DNA assays in nasopharyngeal carcinoma. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2007; 67: 130—7.
31. Shao J.Y., Zhang Y., Li Y.H., Gao H.Y., Feng H.X., Wu Q.L. et al. Comparison of Epstein-Barr virus DNA level in plasma, peripheral blood cell and tumor tissue in nasopharyngeal carcinoma. *Anticancer Res.* 2004; 24: 4059—66.
32. Gurtsevich V.E., Senyuta N.B., Kondratova V.N., Goncharova E.V., Ignatova A.V., Lomaya M.V. et al. Diagnostic value of DNA levels and antibodies to capsid antigen of Epstein-Barr virus in the blood plasma of patients with nasopharyngeal carcinoma in non-endemic region. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii.* 2015; 2(2): 56—67. (in Russian)

Получена 16.02.16

Принята в печать 29.03.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.36-002.2-022-06:616.36-004]:575.174.015.3.08

Масабаева М.Р.<sup>1</sup>, Аукунов Н.Е.<sup>1</sup>, Мусажанова Ж.Б.<sup>2</sup>, Саенко В.А.<sup>2</sup>, Рогунович Т.И.<sup>2</sup>, Шаймарданов Н.К.<sup>1</sup>, Курманова Б.Р.<sup>1</sup>, Баркибаева Н.Р.<sup>1</sup>, Yamashita Shunichi<sup>2</sup>, Рахыпбеков Т.К.<sup>1</sup>

## ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ В РАЙОНЕ ГЕНА *IL17A*: СВЯЗЬ С ХРОНИЧЕСКИМ ВИРУСНЫМ ГЕПАТИТОМ И ПРОГРЕССИРОВАНИЕМ К ЦИРРОЗУ ПЕЧЕНИ В КАЗАХСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

<sup>1</sup> Государственный медицинский университет, 071400, г. Семей, Казахстан;

<sup>2</sup> Atomic Bomb Disease Institute, Nagasaki University, 852-8523, г. Нагасаки, Япония

**Введение.** Настоящая работа является первым ассоциативным генетическим исследованием потенциальной связи однонуклеотидных полиморфизмов rs8193036 и rs2275913, локализующихся в промоторе гена *IL17A* на хромосоме 6p12, с хроническим вирусным гепатитом и его прогрессированием в казахской популяции. **Цель исследования** — оценка влияния генетического полиморфизма в промоторном участке *IL17A* на предрасположенность к заболеванию хроническим вирусным гепатитом В и/или С и дальнейшее развитие цирроза печени. **Материалы и методы.** В ретроспективном ассоциативном исследовании, проведенном методом случай — контроль, приняли участие 862 человека. Из них 100 пациентов имели в анамнезе цирроз печени и хронический вирусный гепатит В и/или С, 341 — только хронический вирусный гепатит. В качестве популяционного контроля привлечен 421 донор, который не имел заболеваний печени и был HBV- и HCV-отрицательным. Однонуклеотидные полиморфизмы rs8193036[T/C] и rs2275913[G/A] определяли методом TaqMan, используя для генотипирования ДНК клеток периферической крови. **Результаты.** Частоты минорных аллелей rs8193036[C] и rs2275913[A] в группах пациентов практически не отличались от таковых в контрольной выборке, в которой они составили соответственно около 0,4 и 0,3. Многофакторный логистический регрессионный анализ в мультипликативной модели наследования выявил отношения шансов, близкие к 1 с доверительным интервалом, перекрывающим значение 1, и статистической значимостью  $p > 0,4$  для любых групп сравнения. **Вывод.** Взаимосвязь двух исследованных однонуклеотидных полиморфизмов rs8193036 и rs2275913 в промоторе гена *IL17A* с предрасположенностью к заболеванию хроническим вирусным гепатитом В и/или С и его прогрессированием в цирроз печени в казахской популяции не выявлена.

**Ключевые слова:** *IL17A*; однонуклеотидный полиморфизм; rs2275913; rs2275913; хронический вирусный гепатит; цирроз печени.

**Для цитирования:** Масабаева М.Р., Аукунов Н.Е., Мусажанова Ж.Б., Саенко В.А., Рогунович Т.И., Шаймарданов Н.К., Курманова Б.Р., Баркибаева Н.Р., Yamashita Shunichi, Рахыпбеков Т.К. Генетический полиморфизм в районе гена *IL17A*: связь с хроническим вирусным гепатитом и прогрессированием к циррозу печени в казахской популяции. *Вопросы вирусологии.* 2016; 61(5): 212-219.

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-5-212-219

**Для корреспонденции:** Масабаева Меруерт Равильевна, докторант Государственного медицинского университета, 071400, г. Семей, Казахстан. E-mail: meruert-m@mail.ru

**Massabayeva M.R.<sup>1</sup>, Aukenov N.E.<sup>1</sup>, Mussazhanova Zh.B.<sup>2</sup>, Saenko V.A.<sup>2</sup>, Rogounovitch T.I.<sup>2</sup>,  
Shaimardanov N.K.<sup>1</sup>, Kurmanova B.R.<sup>1</sup>, Barkibaeva N.R.<sup>1</sup>, Shunichi Yamashita<sup>2</sup>, Rakhypbekov T.K.<sup>1</sup>**  
**IL17A GENE POLYMORPHISMS: RELATIONSHIP TO PREDISPOSITION FOR CHRONIC VIRAL  
HEPATITIS AND PROGRESSION TO LIVER CIRRHOSIS IN KAZAKH POPULATION**

<sup>1</sup> Semey State Medical University, Semey, 071400, Republic of Kazakhstan;

<sup>2</sup> Atomic Bomb Disease Institute, Nagasaki University, Nagasaki, 852-8523, Japan

**Introduction.** This work is the first genetic association study of a potential relationship of single nucleotide polymorphisms rs8193036 and rs2275913 located in the IL17A promoter on chromosome 6p12 to chronic viral hepatitis and its progression in Kazakh population.

**Purpose.** Evaluation of the effect of IL17A polymorphism on predisposition for chronic hepatitis B and C and its progression to liver cirrhosis.

**Material and methods.** A total of 862 individuals were enrolled in the retrospective case-control association study. Among the participants, 100 patients had chronic hepatitis B and/or C and liver cirrhosis, and 341 patients had chronic viral hepatitis only. Four hundred twenty-one (421) healthy HBV- and HCV-negative donors without liver diseases were recruited as population control. Single nucleotide polymorphisms rs8193036[T/C] and rs2275913[G/A] were genotyped by TaqMan assays using genomic DNA extracted from peripheral blood cells.

**Results.** Minor allele frequencies of rs8193036[C] and rs2275913[A] in the groups of patients were very similar to those observed in the control population, 0.4 and 0.3, respectively. Multivariate logistic regression analysis revealed odds ratios close to 1.0 and confidence intervals overlapping with the value of 1.0 and statistical significance  $p > 0.4$  for any groups under comparison in the multiplicative model of inheritance.

**Conclusion.** No significant association between two single nucleotide polymorphisms, rs8193036 and rs2275913 in the IL17A promoter, and susceptibility to chronic viral hepatitis C and/or B and disease progression to liver cirrhosis in Kazakh population were found.

**Key words:** IL17A; single nucleotide polymorphism; rs2275913; rs8193036; chronic viral hepatitis; liver cirrhosis.

**For citation:** Massabayeva M.R., Aukenov N.E., Mussazhanova Zh.B., Saenko V.A., Rogounovitch T.I., Shaimardanov N.K., Kurmanova B.R., Barkibaeva N.R., Shunichi Yamashita, Rakhypbekov T.K. IL17A gene polymorphisms: relationship to predisposition for chronic viral hepatitis and progression to liver cirrhosis in kazakh population. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2016; 61(5): 212-219. (In Russ.).

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-5-212-219

**For correspondence:** Meruyert R. Massabayeva, MD, PhD student, Semey State Medical University, Semey, 071400, Republic of Kazakhstan. E-mail: meruer-m@mail.ru

**Acknowledgments.** We express our deep gratitude to Atomic Bomb Disease Institute, Nagasaki University, Nagasaki, Japan for methodological assistance, reagents and equipment provided for this study.

**Funding.** This work was supported by the Ministry of Education and Science, Republic of Kazakhstan (Grant No. 0115PK01852).

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

Received 25 February 2016

Accepted 29 March 2016

## Введение

Вирусные гепатиты широко распространены в мире и являются одной из серьезных проблем здравоохранения [1]. Наиболее сложную проблему представляют парентеральные вирусные гепатиты В и С вследствие высокой степени хронизации и вероятности перехода процесса в конечные стадии — цирроз печени или гепатоцеллюлярную карциному [2, 3]. Исходы хронических вирусных гепатитов зависят от иммунного ответа [4], обусловленного в частности генетическими особенностями организма хозяина. Цитокины являются ключевыми медиаторами воспалительного процесса и формирования специфического иммунитета, ответственного за естественную элиминацию вируса гепатита [5].

На сегодняшний день отмечается повышение интереса к исследованию генетических детерминант предрасположенности к заболеваниям, а также их клинического течения и прогрессирования. К числу наиболее широко изучаемых генетических факторов относятся однонуклеотидные полиморфизмы, или SNP (single nucleotide polymorphism), которые могут быть функциональными и приводить к повышению или понижению уровня экспрессии продукта гена или его активности. Считается, что наличие однонуклеотидных замен является одним из факторов, определяющих индивидуальные особенности течения и прогноз заболевания [6].

В последнее время уделяется существенное внимание выяснению связи полиморфизма гена *IL17A* (кодирует интерлейкин 17 (ИЛ-17)) с предрасположенностью к различным заболеваниям [7]. ИЛ-17 относится к семейству провоспалительных цитокинов, продуцируемых Т-хелперами 17 (Th17) [8, 9], и играет важную роль в заболеваниях, ассоциированных с воспалением, таких как аутоиммунные процессы, инфекции и опухоли [10]. Th17-клетки вовлекаются в иммунный ответ при бактериальном заражении и патогенетически связаны с развитием хронических воспалительных процессов [11, 12].

Как показывают последние исследования, Th17-клетки ассоциированы с хроническими заболеваниями печени [13, 14], в том числе с хроническим вирусным гепатитом В, циррозом печени и гепатоцеллюлярной карциномой [15]. Было показано, что увеличение частоты встречаемости Th17-клеток в периферической крови и печени пациентов с хроническим вирусным гепатитом В связано с повышением уровня аланинаминотрансферазы (АЛТ) [16, 17].

Поскольку особенности иммунного ответа организма хозяина на патоген играют существенную роль в прогрессировании многих инфекционных заболеваний, а ИЛ-17 является типичным представителем цитокинов, участвующих в воспалении, регенерации и фиброгенезе [18], нами был выбран генетический полиморфизм в районе гена *IL17A* для изучения его возможного влияния

Таблица 1

Распределение больных циррозом печени вирусной этиологии, хроническим вирусным гепатитом В и/или С и лиц контрольной группы по полу и возрасту

Показатель	Пациенты с циррозом печени вирусной этиологии (n = 100)	Пациенты с хроническим вирусным гепатитом В/С (n = 341)	Контрольная группа (здоровые лица) (n = 421)
Пол, м/ж	56/44	143/198	205/216
Возраст, годы			
интервал	29—75	18—79	18—79
средний	50,13 ± 9,83	42,12 ± 13,20	43,25 ± 13,36
Хронический вирусный гепатит В/С	59/49*	98/243	—

Примечание. \* — гепатит В и С выявлен одновременно у 8 пациентов с циррозом печени.

на предрасположенность к заболеванию хроническим вирусным гепатитом и прогрессированию в цирроз печени вирусной этиологии.

Биоинформационный анализ показал, что в качестве кандидатных однонуклеотидных полиморфизмов предположительно могут выступать rs8193036[T/C] (хромосомная координата 6:52185695 согласно Genome Reference Consortium Human Build 38 patch release 2) и rs2275913[G/A] (6:52186235), которые локализируются в промоторе гена *IL17A* (6:52186387—52190638) и отделены от сайта начала транскрипции соответственно на 692 и 152 нуклеотидные пары (н. п.). Анализ последовательностей фрагментов референсного генома ДНК, содержащих указанные полиморфизмы +/-10 нуклеотидов, проведенный с помощью базы данных Jasparg (<http://jasparg.genereg.net/>, пороговое значение шкалы относительного профиля 80%), показал, что rs8193036 располагается в перекрывающихся сайтах связывания транскрипционных факторов YY1 и семейства GATA, являющихся важнейшими регуляторами транскрипционной активности Th-клеток, включая Th17 [19, 20].

Полиморфизм rs2275913 расположен в перекрывающихся сайтах связывания нескольких транскрипционных факторов, из которых наиболее биологически релевантным является, вероятно, ETS1, участвующий в процессе дифференцировки Th17-клеток [21]. Предполагалось, что указанные полиморфизмы могут играть функциональную роль, участвуя в регуляции транскрипции гена *IL17A*. Кроме того, в результате проведенного нами литературного поиска удалось обнаружить всего две работы, выполненные в Китае, в которых изучалась связь генетического полиморфизма в районе гена *IL17A* с вирусным гепатитом [8, 22], что указывает на недостаточную освещенность проблемы и необходимость анализа в независимой группе.

Цель исследования — анализ полиморфизма гена *IL17A* (rs8193036 и rs2275913) для оценки его связи с предрасположенностью к заболеванию хроническим вирусным гепатитом В и/или С и дальнейшим развитием цирроза печени в казахской популяции.

### Материал и методы

В исследовании приняли участие 862 совершеннолетних человека (этнические казахи) в возрасте от 18 до 70 лет, проживающих в Восточно-Казахстанской области. Принадлежность к казахской национальности устанавливали путем анкетирования и сверки с данными свидетельства о рождении, в котором указана национальность респондента и его родителей. В исследование не включали лиц, имеющих родителя или родителей неказахской национальности. Среди включенных в исследование лиц было 100 пациентов с диагнозом «цирроз печени вирусной этиологии», 341 пациент с диагнозом «хронический вирусный гепатит В или С» и 421 человек контрольной группы. Половозрастные характеристики приведены в табл. 1.

Исследование отвечало требованиям Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации (<http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/>). Все участники исследования были информированы о его целях и предстоящих процедурах, у всех было получено информированное письменное согласие на участие в исследовании.

Больные хроническим вирусным гепатитом В и/или С

или циррозом печени вирусной этиологии состояли на учете в Гепатологическом центре г. Семей. Подтверждение диагноза у пациентов или отсутствие хронического заболевания печени вирусной этиологии в контрольной группе проводилось на основании иммуноферментного анализа (ИФА) для определения антител к вирусу гепатита С и HB<sub>s</sub>-антигена для выявления вирусного гепатита В, полимеразной цепной реакции (ПЦР) — теста на вирус гепатита В и С (качественный и количественный), эластометрии печени (для определения степени фиброза у пациентов использовали шкалу Metavir) и биохимических анализов крови (АЛТ, АСТ, общий белок, общий билирубин).

Для исследования использовали периферическую кровь, забранную в вакуумные пробирки с K<sub>2</sub>/K<sub>3</sub> ЭДТА. Геномную ДНК выделяли из крови с применением набора QIAamp DNA Mini Kit («QIAGEN», Токио, Япония) в соответствии с инструкцией изготовителя. Концентрацию и чистоту ДНК оценивали с помощью спектрофотометра NanoDrop 1000 («Thermo Scientific», Валтам, США), измеряя оптическую плотность при длинах волн 230, 260 и 280 нм. Выделенную ДНК замораживали и хранили при -20 °С.

Генотипирование проводили методом ПЦР в реальном времени (real-time PCR) на приборе Light Cycler 480 II («Roche», Индианаполис, США) с помощью готовых смесей праймеров и TaqMan-зондов (C\_1799585\_10 для rs8193036 и C\_15879983\_10 для rs2275913) в присутствии реагента TaqMan Genotyping Master mix (все реактивы производства «Life Technologies», Фостер-Сити, США) и 10 нг ДНК в качестве матрицы в общем объеме 10 мкл в 386-луночных планшетах («Roche», Индианаполис, США). Программа амплификации включала предварительную денатурацию при 95 °С в течение 10 мин, далее 50 циклов при 92 °С в течение 15 с и 62 °С в течение 1 мин для обеих SNP.

Предварительно для каждого изучаемого полиморфизма были выявлены гомозиготные и гетерозиготные образцы, которые использовали в качестве стандартов. Для этой цели участки геномной ДНК, фланкирующие полиморфный нуклеотид, были ПЦР-амплифицированы с использованием праймеров, разработанных с помощью компьютерной программы Primer Express, версия 2.0 («Applied Biosystems», Фостер-Сити, США). Последовательности праймеров (5' → 3') были следующими:

rs2275913F ATAGAGCATAACTCTTCTGGCAGCTGTA (прямой);

rs2275913R GACAAAATGTAGCGCTATCGTCTCTCT (обратный);

rs8193036F GAACTATTCTCAAGGACCTGAGTCSAA (прямой);

rs8193036R CTCTGCTCAAGGAATAAATACTAGGTTCA (обратный).

ПЦР выполняли в амплификаторе C1000 Touch («Bio-Rad», Геркулес, США) в присутствии 200 pM прямого и обратного праймеров, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,025 Ед AmpliTaq Gold («Applied Biosystems», Фостер-Сити, США) и 50 нг ДНК в качестве матрицы в объеме 25 мкл. Условия реакции: предварительная денатурация при 95 °C в течение 10 мин, далее 35 циклов при 94 °C в течение 30 с, 58 °C в течение 30 с и 72 °C в течение 30 с и 1 цикл при 72 °C в течение 10 мин для обоих полиморфизмов. Наличие продуктов реакции подтверждали с помощью электрофореза в 1,5% агарозном геле в Трис-ацетатном электродном (ТАЭ) буфере; окрашивание выполняли бромистым этидием; размер ампликонов: rs2275913 — 301 н. п., rs8193036 — 294 н. п. Продукты ПЦР (5 мкл) обрабатывали 1 мкл реагента ExoSAP-IT («USB, Affymetrix», США) при 37 °C в течение 40 мин с последующей термоинактивацией при 80 °C в течение 20 мин. 3 мкл обработанного продукта ПЦР секвенировали в обоих направлениях с помощью прямого или обратного праймера (3,2 pM), используя набор реактивов BigDye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit («Applied Biosystems», Фостер-Сити, США) в объеме 20 мкл по следующей программе: при 96 °C в течение 1 мин, далее 25 циклов при 96 °C в течение 10 с и 60 °C в течение 4 мин для обоих полиморфизмов. Продукты очищали путем фильтрации через уравновешенный дистиллированной водой слой Сефадекса G-50 («GE Healthcare», Упсала, Швеция) и добавляли 20 мкл диметилформамида («Roche», Индианаполис, США). Анализ проводили на секвенаторе ABI PRISM 3130xl («Applied Biosystems», Фостер-Сити, США), хроматограммы визуализировали в программе Finch TV Version 1.3.1 («Geospiza», Сиэтл, США).

Статистический анализ выполняли с помощью пакета IBM SPSS Statistics Version 21 («International Business Machines Corp.», Армонк, США), сборника статистических программ WINPEPI [23] и/или Microsoft Office Excel. Для описательной статистики количественных переменных (возраст) использовали тесты Краскела—Уоллиса, Бонферрони—Данна и тренд-тест Джонкхиера—Терпстра. Все тесты были двусторонние. Для категориальных переменных (пол) прибегали к точному тесту Фишера и тесту отношения правдоподобия для парных сравнений. В ассоциативных исследованиях «случай — контроль» сравнение между группами проводили с помощью многомерного логистического регрессионного анализа. В ассоциативном генетическом анализе учитывали половозрастные данные. Ассоциативный сигнал характеризовали отношением шансов (OR), его 95% доверительным интервалом (95% ДИ) и статистической значимостью ( $p$ ).

Отклонение частот генотипов от равновесия Харди—Вайнберга оценивали с помощью теста  $\chi^2$ . Неоднородность (гетерогенность) OR между анализируемыми группами проверяли с помощью теста Бреслоу—Дэя. Для расчета количественных показателей неравновесно сцепления использовали программу MIDAS (Universi-

ty of Southampton, UK, <http://www.genes.org.uk/software/midas>). Оценку статистической мощности проводили с помощью программы G\*Power Version 3.1.3 [24]. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты

*Связь демографических характеристик со статусом заболевания.* Половозрастные характеристики групп пациентов, страдающих циррозом печени вирусной этиологии, хроническим вирусным гепатитом В или С, и лиц контрольной группы статистически значимо различались. Так, при сравнении распределения групп по полу статистическая значимость составила  $p = 0,003$  (расширение точного теста Фишера). Как показано в табл. 2, при попарных сравнениях (использовали тест отношения правдоподобия) выявлено большее количество мужчин в группе пациентов с циррозом печени по сравнению с контрольной группой ( $p = 0,003$ ), в то время как группа пациентов с хроническим вирусным гепатитом отличалась от контролей незначимо ( $p = 0,167$ ). Разница распределений по полу между двумя группами пациентов также не достигла статистической значимости ( $p = 0,152$ ). Эти результаты, с одной стороны, могли бы указывать на то, что шанс развития цирроза печени вирусной этиологии выше у мужчин, чем у женщин, что можно отчасти объяснить некоторыми особенностями образа жизни и питания, более характерными для мужчин (табакокурение, большее потребление алкоголя и жирной пищи и другие вмешивающиеся факторы), которые связаны с риском развития цирроза печени независимо от вирусной инфекции, но учесть влияние которых не представлялось возможным в рамках данного исследования. С другой стороны, полученный результат необходимо интерпретировать с осторожностью, поскольку количество пациентов мужского и женского пола в группе пациентов с циррозом печени было достаточно близким и приблизительно соответствовало таковому в популяции. Во всяком случае, результат показывает, что при дальнейшем сравнении групп нужно учитывать распределение по полу.

Сравнение трех групп по возрасту также выявило статистически значимую разницу ( $p = 1,055 \cdot 10^{-6}$ , тест Краскела—Уоллиса). В табл. 2 приведены оценки  $p$  для попарных сравнений между группами, из которых следует, что пациенты с циррозом печени были значимо старше ( $50,1 \pm 9,8$  года) пациентов с хроническим вирусным гепатитом ( $42,1 \pm 13,2$  года) и здоровых лиц ( $43,2 \pm 13,4$  года). Значимой разницы в возрасте между двумя последними группами не наблюдалось. Значимость связи статуса заболевания с возрастом была также выявлена в тренд-тесте ( $p = 0,010$ , тест Джонкхиера—Терпстра). Эти результаты, вероятно, указывают на то, что прогрессирование вирусного гепатита в цирроз печени растянуто во времени; в данном исследовании этот срок составлял примерно 8 лет.

Ввиду выявленных различий в распределении членов групп по полу и возрасту мы также оценивали влияние этих двух параметров на статус заболевания с помощью условной логистической регрессии (табл. 3). Расчеты показывают, что мужской пол и старший возраст были независимо связаны с шансом развития цирроза печени вирусной этиологии: статистически значимые различия были обнаружены при сравнении как с группой контроля, так и с группой пациентов с хроническим вирусным гепатитом В/С. В то же время

Таблица 2

**Сравнительная характеристика распределения трех групп по полу и возрасту (одномерный анализ)**

Группа	Хронический вирусный гепатит В/С	Контроль
Сравнение распределения по полу: OR (95% ДИ), $p^*$		
Пациенты с циррозом печени вирусной этиологии	1,561 (0,998—2,443), 0,152	2,080 (1,339—3,232), 0,003
Пациенты с хроническим вирусным гепатитом В/С		1,332 (0,993—1,787), 0,167
Сравнение распределения по возрасту: $p^{**}$		
Пациенты с циррозом печени вирусной этиологии	$1,544 \cdot 10^{-8}$	$7,627 \cdot 10^{-7}$
Пациенты с хроническим вирусным гепатитом В/С		0,533

Примечание. \* — значения  $p$  приведены с учетом поправки Бонферрони ( $p = p_{\text{одномерное}} \cdot 3$ ); \*\* — значения  $p$  оценены с помощью теста Бонферрони—Данна ( $p = 1 - (1 - p_{\text{одномерное}})^3$ ) [25].

связь пола и возраста с шансом развития заболевания хроническим вирусным гепатитом не выявлена при сравнении с контрольной группой. В целом данные многомерного регрессионного анализа хорошо соответствуют результатам одномерного и указывают на необходимость учета распределения по полу и возрасту при сравнении групп.

*Ассоциативный генетический анализ связи полиморфизма гена IL17A со статусом заболевания.* Результаты генетического анализа были получены с помощью технологии TaqMan в режиме реального времени.

Как показано в табл. 4, в зависимости от изучаемого полиморфизма количество генотипированных образцов составило 94—99 (из 100) в группе пациентов с циррозом печени вирусной этиологии, 326—334 (из 341) в группе пациентов с хроническим вирусным гепатитом и 412—414 (из 421) в контрольной группе. Соответ-

ствующие частоты отклика в этих группах составили 0,940—0,990, 0,956—0,979 и 0,979—0,983

Результаты ассоциативного генетического анализа, выполненного в мультипликативной модели наследования с учетом половозрастных характеристик каждой из групп, представлены в табл. 5. Обращает на себя внимание тот факт, что частоты минорных аллелей были очень близки в группах пациентов и контрольной группе, составляя около 0,4 и около 0,3 соответственно для rs8193036 и rs2275913. Отклонение от равновесия Харди—Вайнберга не было выявлено ни в одной группе ( $p > 0,2$ ), что указывает на отсутствие явных технических изъянов в результатах генотипирования.

При рассмотрении эффектов rs8193036 и rs2275913, скорректированных по полу и возрасту, было обнаружено, что ни один из ассоциативных сигналов значительно не отличался от значения 1 и не был статистически значимым ( $p > 0,4$  для любого сравнения) как при сравнении групп пациентов с циррозом печени или хроническим гепатитом с контролем, так и при сравнении двух групп пациентов между собой. Гетерогенности в размере эффектов (OR) также выявлено не было. Сходные результаты получены для доминантной, кодоминантной и рецессивной моделей наследования, в тренд-тесте Кохрана—Армитажа, в котором влияние половозрастных характеристик не учитывалось, а также при анализе гаплотипов (данные не приводятся). Оценка достигнутой статистической мощности находилась в пределах 10—13% для различных полиморфизмов и групп сравнения, что скорее всего связано с малым эффектом изучаемых полиморфизмов.

Еще одной из причин согласованного отсутствия (или наличия) ассоциативной связи изучаемых полиморфизмов с заболеванием может быть их неравновесное сцепление. В этом случае эффект одного полиморфизма предсказывает эффект другого. Однако оценка количественных показателей выявила показала, что rs8193036 и rs2275913 не являются неравновесно сцепленными ( $D' = 0,280$  и  $r^2 = 0,054$ ). Этот результат был несколько неожиданным, поскольку изучаемые полиморфизмы находятся на линейной дистанции всего 540 нуклеотидов. С другой стороны, отсутствие неравновесного сцепления

Таблица 3

**Многомерный логистический регрессионный анализ влияния пола и возраста на статус заболевания (парные сравнения)**

Группа	Хронический вирусный гепатит В/С, OR (95% ДИ), $p$	Контроль, OR (95% ДИ), $p$
Пациенты с циррозом печени вирусной этиологии:		
пол (м—ж)	1,786 (1,115—2,857), 0,016	2,381 (1,506—3,774), $2,101 \cdot 10^{-4}$
возраст	1,054 (1,034—1,074), $6,608 \cdot 10^{-8}$	1,047 (1,028—1,066), $p = 8,387 \cdot 10^{-7}$
Пациенты с хроническим вирусным гепатитом В/С:		
пол (м—ж)		1,319 (0,982—1,770), 0,065
возраст		0,994 (0,984—1,005), 0,296

Таблица 4

**Количество генотипированных образцов в изучаемых группах, частота отклика указана в скобках**

Полиморфизм	Идентификатор теста	Пациенты с циррозом печени вирусной этиологии ( $n = 100$ )	Пациенты с хроническим вирусным гепатитом В/С ( $n = 341$ )	Контрольная группа (здоровые лица) ( $n = 421$ )
rs8193036	C_1799585_10	99 (0,990)	334 (0,979)	414 (0,983)
rs2275913	C_15879983_10	94 (0,940)	326 (0,956)	412 (0,979)

Примечание. В скобках указана частота отклика.

Таблица 5

**Ассоциативный генетический анализ полиморфизма гена *IL17A* в группах пациентов с циррозом печени вирусной этиологии и хроническим вирусным гепатитом В/С с учетом половозрастных характеристик**

Показатель	rs8193036 T/C*	rs2275913 G/A*
Генотип в контрольной группе:	<i>n</i> = 414	<i>n</i> = 412
11	135	182
12	203	180
22	76	50
ЧМА	0,429	0,340
PXB	0,984	0,594
Генотип в группе пациентов с циррозом печени:	<i>n</i> = 99	<i>n</i> = 94
11	33	46
12	53	37
33	13	11
ЧМА	0,399	0,314
PXB	0,247	0,404
Ассоциативный сигнал, OR (95% ДИ), <i>p</i>	0,909 (0,651—1,270), 0,576	0,911 (0,643—1,290), 0,598
Статистическая мощность, %**	11,5	10,6
Генотип в группе пациентов с хроническим вирусным гепатитом В/С:	<i>n</i> = 334	<i>n</i> = 326
11	119	148
12	156	146
33	59	32
ЧМА	0,410	0,322
PXB	0,526	0,645
Ассоциативный сигнал, OR (95% ДИ), <i>p</i>	0,923 (0,751—1,135), 0,450	0,933 (0,749—1,162), 0,535
Статистическая мощность, %	13,3	11,4
Неоднородность OR, <i>p</i> ***	0,815	0,866
Сравнение двух групп пациентов		
Ассоциативный сигнал, OR (95% ДИ), <i>p</i>	1,003 (0,716—1,405), 0,987	0,948 (0,656—1,372), 0,779
Неоднородность OR, <i>p</i> #	0,967	

Примечание. \* — звездочкой помечен рисковый аллель; ЧМА — частота минорного аллеля; PXB — отклонение от равновесия Харди—Вайнберга, значение *p* согласно тесту  $\chi^2$ ; \*\* — post hoc оценка статистической мощности; \*\*\* — неоднородность OR для групп пациентов с циррозом печени и хроническим вирусным гепатитом при сравнении их с контрольной группой по каждому полиморфизму, тест Бреслоу—Дэя; # — неоднородность OR между rs8193036 и rs2275913 при сравнении двух групп пациентов между собой, тест Бреслоу—Дэя.

между rs8193036 и rs2275913 указывает на то, что их ассоциативная связь с заболеваниями изучалась в целом независимо, и, следовательно, полученные результаты по каждому полиморфизму взаимно подтверждают друг друга.

**Обсуждение**

Настоящая работа является первым исследованием потенциального влияния полиморфизмов rs8193036 и rs2275913 в промоторе гена *IL17A* на предрасположенность к заболеваниям печени вирусной этиологии в казахской популяции. Можно было предположить, что, локализуясь в сайтах связывания транскрипционных факторов, играющих важную роль в дифференцировке и транскрипционной активности Th-клеток, rs8193036[T/C] и rs2275913[G/A] участвуют в регуляции уровня экспрессии гена *IL17A*, продукт которого вовлечен в патогенетический механизм развития хронических воспалительных заболеваний [11, 12]. В связи с этим изучение возможной связи rs8193036 и rs2275913 с хроническими заболеваниями печени вирусной природы представляло определенный интерес и являлось обоснованным.

Анализ данных для rs8193036 показал, что аллель T встречался чаще как у больных циррозом печени вирусной этиологии или хроническим вирусным гепатитом, так и у лиц контрольной группы по сравнению с аллелем C, частота которого составляла около 0,4 (интервал 0,399—0,429). Заметим, что, согласно данным проекта «1000 Genomes» (<http://www.1000genomes.org/>), глобальная частота встречаемости аллеля C равна 0,380; в восточноазиатских популяциях средняя частота составляет 0,695 (0,596—0,776), в европейских — 0,258 (0,206—0,394). Следовательно, частота аллеля C rs8193036 в казахской популяции близка к глобальной и является промежуточной между таковыми в восточноазиатских и европейских этносах.

В rs2275913 аллель A встречался реже, чем аллель G, во всех трех группах с частотой около 0,3 (0,314—0,340). По данным «1000 Genomes», глобальная частота аллеля A равна 0,293; средняя частота в восточноазиатских популяциях — 0,493 (0,438—0,554), в европейских — 0,380 (0,341—0,429). Как и в случае предыдущего полиморфизма, в казахской популяции частота аллеля A rs2275913 была близка к глобальной, хотя и оказалась несколько ниже, чем в восточноазиатских и европейских популяциях.

Таким образом, частоты минорных аллелей двух изученных однонуклеотидных полиморфизмов в казахской популяции являются в целом промежуточными между восточноазиатскими и европейскими, что, вероятно, отчасти связано с историко-географическими и этническими особенностями Республики Казахстан. Информация, полученная в ходе данной работы, является полезной и важной для планирования будущих исследований. Она указывает на то, что в частности для ассоциативных генетических исследований групп этнических казахов необходимо учитывать опубликованные данные для популяций как азиатского, так и европейского происхождения, не ориентируясь ни на одну из них исключительно.

Ассоциативный анализ данных генотипирования rs8193036 и rs2275913, проведенный для различных моделей наследования и с помощью различных методик статистических расчетов, не выявил значимой связи полиморфизма с предрасположенностью ни к хроническому гепатиту В/С, ни к вероятности его прогрессирования в цирроз печени. Частоты рискованных аллелей в группах пациентов и группе контроля оказались очень близки между собой, и соответственно вычисленные OR оказались близки к значению 1, не отличаясь от него достоверно.

Наиболее вероятной причиной отсутствия статисти-

ческой значимости результатов анализа является малая выраженность эффектов изученных полиморфизмов. По нашим оценкам, например для rs8193036, номинальная значимость ассоциаций ( $p < 0,05$ ) могла бы быть достигнута при имеющемся объеме выборок при значении  $OR \geq 1,65$  (или  $\leq 0,60$ ) при сравнении группы пациентов с циррозом печени с контролем и при  $OR \geq 1,34$  (или  $\leq 0,75$ ) для сравнения контроля с группой пациентов с хроническим гепатитом.

Ретроспективно (post hoc) оцененная достигнутая статистическая мощность в нашем исследовании составила всего 10—13%, что существенно отличается от желательной минимальной 80%. Очевидно, для выявления значимых эффектов при полученных значениях OR понадобились бы намного большие выборки. Например, для rs8193036 наиболее «сильный» эффект ( $OR = 0,909$ ) был выявлен при сравнении с контролем группы пациентов с циррозом печени. При статистической мощности исследования 80% каждая из выборок должна была бы включать не менее 5724 человек для достижения порога значимости при обнаруженном эффекте и частоте минорного аллеля.

В настоящее время доступна единственная работа, в которой непосредственно изучалась связь rs8193036 и rs2275913 с вирусным гепатитом [8]. Исследование проводилось в китайской популяции, и выборки состояли из 395 пациентов с гепатитом В и 174 здоровых лиц, что несколько меньше, но вполне сравнимо с нашими группами. В этой работе ассоциации с заболеванием не были выявлены ( $p = 0,714$  и  $p = 0,907$  соответственно для rs8193036 и rs2275913), и наши результаты хорошо согласуются с этими данными. Во второй работе, опубликованной авторами из Китая, ассоциация полиморфизма rs8193036 с вирусологическим ответом на различные виды лечения больных гепатитом С также не была установлена [22], что подтверждает выводы предыдущего опубликованного [8] и настоящего исследований.

В заключение отметим, что два изученных в нашей работе полиморфизма не были неравномерно сцеплены между собой, и, следовательно, результат, полученный для одного из них, не предопределял результат для другого. Поскольку ни для rs8193036, ни для rs2275913 ассоциация с хроническим циррозом печени вирусной этиологии и/или хроническим гепатитом В/С не была установлена, можно с большой степенью уверенности утверждать, что эти полиморфизмы не являются генетическими детерминантами предрасположенности к указанным заболеваниям в казахской популяции. Поиск других генетических вариантов, вероятно, может оказаться более успешным, и имеющаяся в нашем распоряжении коллекция биологических материалов в совокупности с подробной демографической и клинической информацией может служить основой для будущих исследований.

### Благодарность

Выражаем глубокую признательность Институту изучения заболеваний, вызванных атомной бомбардировкой, университета г. Нагасаки, Япония (Atomic Bomb Disease Institute, Nagasaki University), за методологическую помощь, реактивы и оборудование, предоставленные для данного исследования.

**Финансирование.** Работа выполнена с финансовой поддержкой Министерства образования и науки Республики Казахстан, грант № 0115РК01852.

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

### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 2, 7—10, 13—25 см. REFERENCES)

1. Шайзадина Ф.М., Бейсекова М.М., Кутышева А.Т., Абуова Г.Т., Мендибай С.Т., Кудайбердиева С.М. Эпидемиологическая ситуация вирусных гепатитов в небольшом городе центрального Казахстана. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2013; (8-3): 88—9.
2. Масабаяева М.Р., Аукунов Н.Е., Копашева С.Ю., Баркибаева Н.Р., Смайл Е.М., Хамитова М.О. Молекулярно-генетические механизмы развития осложнений хронических вирусных гепатитов В и С (Обзор литературы). *Наука и здравоохранение*. 2014; (1): 11—4.
3. Яковенко Э.П., Григорьев П.Я. Хронические заболевания печени: диагностика и лечение. *Российский медицинский журнал*. 2003; 11(5): 291—6.
4. Арсентьева Н.А., Семенов А.В., Тотолян А.А. Роль полиморфизма генов цитокинов при вирусном гепатите С. *Инфекция и иммунитет*. 2012; 2(4): 687—98.
5. Самоходская Л.М., Игнатова Т.М., Абдуллаев С.М., Краснова Т.Н., Некрасова Т.П., Мухин П.А. и др. Прогностическое значение комбинации аллельных вариантов генов цитокинов и гемохроматоза у больных хроническим гепатитом С. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2007; 17(2): 50—6.
6. Кетлинский С.А. Th17 — новая линия дифференцировки Т-хелперов: обзор данных. *Цитокины и воспаление*. 2009; 8(2): 3—15.
7. Кологривова И.В., Кологривова Е.Н., Суслова Т.Е. Молекулярные аспекты функционирования Т-хелперов 17-го типа. *Бюллетень сибирской медицины*. 2011; 10(4): 93-9.

### REFERENCES

1. Shayzadina F.M., Beysekova M.M., Kutysheva A.T., Abuova G.T., Mendibay S.T., Kudayberdieva S.M. Epidemiological situation of viral hepatitis in the small city of the central Kazakhstan. *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy*. 2013; (8-3): 88—9. (in Russian)
2. Waly Raphael S., Yangde Z., Yuxiang C. Hepatocellular carcinoma: focus on different aspects of management. *ISRN Oncol*. 2012; 2012: 421673.
3. Masabaeva M.R., Aukenov N.E., Kopasheva S.Yu., Barkibaeva N.R., Smail E.M., Khamitova M.O. Molecular genetic mechanisms of developing complications of chronic viral hepatitis B and C (Literature review). *Nauka i zdravookhranenie*. 2014; (1): 11—4. (in Russian)
4. Yakovenko E.P., Grigor'ev P.Ya. Chronic diseases of liver: diagnostics and treatment. *Rossiyskiy meditsinskiy zhurnal*. 2003; 11(5): 291—6. (in Russian)
5. Arsent'eva N.A., Semenov A.V., Totolyan A.A. Role of polymorphism gene cytokines at viral hepatitis C. *Infektsiya i immunitet*. 2012; 2(4): 687—8. (in Russian)
6. Samokhodskaya L.M., Ignatova T.M., Abdullaev S.M., Krasnova T.N., Nekrasova T.P., Mukhin P.A. et al. Predictive value of combination allelic options in gene cytokines and hemochromatosis at patients with chronic hepatitis C. *Rossiyskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii*. 2007; 17(2): 50—6. (in Russian)
7. Nordang G.B., Viken M.K., Hollis-Moffatt J.E., Merriman T.R., Forre O.T., Helgetveit K. et al. Association analysis of the interleukin 17A gene in Caucasian rheumatoid arthritis patients from Norway and New Zealand. *Rheumatology (Oxford)*. 2009; 48(4): 367—70.
8. Li N., Zhu Q., Li Z., Han Q., Zhang G., Chen J. et al. IL17A gene polymorphisms, serum IL17A and IgE levels, and hepatocellular carcinoma risk in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Mol. Carcinog*. 2014; 53(6): 447—57.
9. Bettelli E., Carrier Y., Gao W., Korn T., Strom T.B., Oukka M. et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006; 441(7090): 235—8.
10. Omrane I., Marrakchi R., Baroudi O., Mezlini A., Ayari H., Medimegh I. et al. Significant association between interleukin-17A polymorphism and colorectal cancer. *Tumor Biol*. 2014; 35(7): 6627—32.
11. Ketlinskiy S.A. Th17 — a new line of differentiation of T-helpers: a review of data. *Tsitokiny i vospalenie*. 2009; 8(2): 3—15. (in Russian)
12. Kologrivova I.V., Kologrivova E.N., Suslova T.E. Molecular aspects of functioning T-helper of the 17th type. *Byulleten' sibirskoy meditsiny*. 2011; 10(4): 93—9. (in Russian)
13. Zenewicz L.A., Yancopoulos G.D., Valenzuela D.M., Murphy A.J., Karow M., Flavell R.A. Interleukin-22 but not interleukin-17 provides protection to hepatocytes during acute liver inflammation. *Immunity*. 2007; 27(4): 647—59.

14. Zhang J.Y., Zhang Z., Lin F., Zou Z.S., Xu R.N., Jin L. et al. Interleukin-17 — producing CD4<sup>+</sup> T cells increase with severity of liver damage in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology*. 2010; 51(1): 81-91.
15. Hu X., Ma S., Huang X., Jiang X., Zhu X., Gao H. et al. Interleukin-21 is upregulated in hepatitis B-related acute-on-chronic liver failure and associated with severity of liver disease. *J. Viral Hepat.* 2011; 18(7): 458—67.
16. Zhai S., Zhang L., Dang S., Yu Y., Zhao Z., Zhao W. et al. The ratio of Th-17 to Treg cells is associated with survival of patients with acute-on-chronic hepatitis B liver failure. *Viral Immunol.* 2011; 24(4): 303—10.
17. Wang X., Sun R., Wei H., Tian Z. High-mobility group box 1 (HMGB1) -toll-like receptor (TLR) 4-interleukin (IL)-23-IL-17A axis in drug-induced damage-associated lethal hepatitis: Interaction of  $\gamma\delta$  T cells with macrophages. *Hepatology*. 2013; 57(1): 373—84.
18. Meng F., Wang K., Aoyama T., Grivennikov S.I., Paik Y., Scholten D. et al. Interleukin-17 signaling in inflammatory, Kupffer cells, and hepatic stellate cells exacerbates liver fibrosis in mice. *Gastroenterology*. 2012; 143(3): 765—76.
19. Wang C., Collins M., Kuchroo V.K. Effector T cell differentiation: are master regulators of effector T cells still the masters? *Curr. Opin. Immunol.* 2015; 37: 6—10.
20. Ye C.J., Feng T., Kwon H.K., Raj T., Wilson M.T., Asinovski N. et al. Intersection of population variation and autoimmunity genetics in human T cell activation. *Science*. 2014; 345(6202): 1254665.
21. Moisan J., Grenningloh R., Bettelli E., Oukka M., Ho I.C. Ets-1 is a negative regulator of Th17 differentiation. *J. Exp. Med.* 2007; 204: 2825—35.
22. Nan Y.M., Zhang Y.G., Zheng H.W., An C.M., Li Y.S., Zhang Y. et al. Individualized treatment strategies and predictors of virological response for chronic hepatitis C: a multicenter prospective study from China. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2015; 8(9): 14871—84.
23. Abramson J.H. WINPEPI updated: computer programs for epidemiologists, and their teaching potential. *Epidemiol. Perspect. Innov.* 2011; 8(1): 1.
24. Faul F., Erdfelder E., Buchner A., Lang A.G. Statistical power analyses using G\*Power 3.1: Tests for correlation and regression analyses. *Behav. Res. Methods*. 2009; 41(4): 1149—60.
25. Dunn O.J. Multiple comparisons using rank sums. *Technometrics*. 1964; 6(3): 241—52.

Поступила 25.02.16

Принята в печать 29.03.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016  
УДК 616.98:578.825.11]-078.33-073.537:618.39

Глуховец Б.И., Глуховец Н.Г., Белитченко Н.В., Сосунова О.А.

## ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ДИАГНОСТИКА ГЕРПЕСВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ У МЕРТВОРОЖДЕННЫХ

Патологоанатомическое бюро Комитета здравоохранения Ленинградской области, 197110, г. Санкт Петербург

Врожденная герпетическая инфекция относится к разряду актуальных проблем перинатальной медицины. Патологоанатомическая диагностика этой инфекции неэффективна при рутинном методе аутопсийного исследования без использования вирусологических исследований. Цель исследования — определить значение метода флуоресцирующих антител в диагностике врожденной герпетической инфекции мертворожденных. В 96 случаях мертворождения проведено иммунофлуоресцентное определение вирусов простого герпеса 1-го и 2-го типов (ВПГ-1, ВПГ-2) и цитомегаловирусов (ЦМВ) в плаценте и внутренних органах (головной мозг, сердце, легкие, печень). Полученные данные сопоставлены с результатами расширенного гистологического исследования сердца, включая его ритмогенные центры. Герпетические вирусы обнаружены в 51 (53,1%) наблюдении, среди них ВПГ-1 — в 16 (16,7%), ВПГ-2 — в 19 (19,7%), ЦМВ — в 16 (16,7%). У 34 (35,8%) мертворожденных выявлены патоморфологические признаки герпетического атриального миокардита, которые были расценены в качестве причины смерти. Использование метода флуоресцирующих антител в аутопсийной практике является эффективным способом диагностики внутриутробной инфекции, обусловленной ВПГ и ЦМВ.

Ключевые слова: мертворожденный; метод флуоресцирующих антител; врожденная герпетическая инфекция.

Для цитирования: Глуховец Б.И., Глуховец Н.Г., Белитченко Н.В., Сосунова О.А. Иммунофлуоресцентная диагностика герпесвирусной инфекции у мертворожденных. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61(5): 219-221.

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-5-219-221

Glukhovets B.I., Glukhovets N.G., Belitchenko N.V., Sosunova O.A.

### IMMUNOFLUORESCENCE DIAGNOSIS OF THE HERPESVIRUS STILLBORN INFECTION

Pathological Anatomy Bureau, Committee of Health of the Leningrad Region, St. Petersburg, 197110, Russian Federation

Congenital herpes infection belongs to the category of actual problems of Perinatal Medicine. Pathological diagnosis of this disease is not effective in the routine method of autopsy studies without virological research. Objective. Determination of the value of the fluorescent antibody technique in the diagnosis of congenital herpes infection of the stillborn is a promising approach to medical diagnosis. Subjects and methods. In 96 cases of stillbirth immunofluorescent identification of herpes simplex virus types 1 and 2 and cytomegalovirus in the placenta and internal organs (brain, heart, lungs, and liver) was implemented. The findings were compared with the results of a complete histological examination of the heart, including its rhythmogenic centers. Results. The herpes viruses were found in 51 observations (53.1%). Among them, HSV-1 were found in 16 observations (16.7%), HSV-2, in 19 (19.7%), CMV, in 16 (16.7%). In 34 stillbirths (35.8%) the pathological signs of herpetic atrial

Для корреспонденции: Глуховец Борис Ильич, д-р мед. наук, Патологоанатомическое бюро Комитета здравоохранения Ленинградской области, 197110, г. Санкт Петербург. E-mail: 2307165@yandex.ru

**myocarditis were observed, which were regarded as the cause of death. Conclusion. The use of the fluorescent antibody technique in the autopsy practice is an effective way of diagnosis of intrauterine infection caused by the herpes simplex virus and cytomegalovirus.**

**Key words:** stillborn; fluorescent antibody technique; congenital herpes infection.

**For citation:** Glukhovets B.I., Glukhovets N.G., Belitchenko N.V., Sosunova O.A. Immunofluorescence diagnosis of the herpesvirus stillborn infection. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2016; 61(5): 219-221. (In Russ.).

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-5-219-221

**For correspondence:** Boris I. Glukhovets, MD, PhD, DSc, Pathological Anatomy Bureau, Committee of Health of the Leningrad Region, St. Petersburg, 197110, Russian Federation. E-mail: b2307165@yandex.ru

**Funding.** The study had no sponsorship.

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

Received 02 October 2015  
Accepted 19 November 2015

Герпетическая инфекция, обусловленная вирусами простого герпеса 1-го и 2-го типов (ВПГ-1, ВПГ-2) и цитомегалии (ЦМВ), представляет серьезную угрозу для развития беременности при любом сроке гестации и нередко служит причиной ранних и поздних выкидышей, а также внутриутробной гибели жизнеспособных плодов [1—5]. В то же время в большинстве подобных случаев при аутопсийном исследовании мертворожденных патоморфологическая диагностика вирусной патологии не имеет должной основы в связи с рутинной методикой вскрытия без использования целенаправленных вирусологических методов [6]. На этом основании в подавляющем большинстве регионов Российской Федерации в структуре причин перинатальной смертности до настоящего времени преобладает диагноз «внутриутробная гипоксия», в то время как герпесвирусная инфекция относится к числу казуистических явлений [7].

Цель исследования — определить возможность применения и значение метода флуоресцирующих антител (МФА) в аутопсийной практике для диагностики внутриутробного инфицирования ВПГ и ЦМВ.

### Материал и методы

Проведено комплексное исследование в 96 случаях мертворождения, имевших место в родовспомогательных учреждениях Ленинградской области. 68 плодов были недоношенными с массой тела от 500 до 2500 г и сроком гестации от 22 до 37 нед, остальные 28 — доношенными с массой тела свыше 2500 г и сроком гестации 38—41 нед.

В работе использованы иммунофлуоресцентный и топографогистологический методы.

МФА в его прямой и непрямой модификации имеет широкое распространение в лабораторной диагностике различных вирусных заболеваний. Достоинства метода включают приемлемую стоимость, высокую специфичность (90%) и значительную чувствительность (55—75%), быстроту получения результатов; недостатками являются зависимость от качества забора материала и стадии заболевания, а также от квалификации врача-вирусолога [1, 2].

В нашей практике иммунофлуоресцентные исследования на вирусные агенты осуществлялись с некоторыми модификациями. С целью повышения эффективности применяли расширенную методику забора исследуемого материала, включающую приготовление мазков-соскобов базальной (материнской) поверхности плаценты, конвексимальной поверхности мягких мозговых оболочек, эндокарда правого предсердия, а также поверхности разреза легких и печени. Существенным

условием успешного выявления флуоресцирующих антигенов в аутопсийном материале оказалось наличие в мазке достаточного количества (не менее 10—15) эпителиальных (эндотелиальных) клеток. Кроме того, каждая локализация требовала забора на 3 отдельных предметных стекла по числу искомым вирусам (ВПГ-1, ВПГ-2, ЦМВ). В связи с этим проводилось иммунофлуоресцентное исследование не менее 15 препаратов в каждом наблюдении, и лишь при таком объеме можно было рассчитывать на максимальную эффективность лабораторной верификации вирусных антигенов в органах умершего плода. В работе использовали люминесцентный микроскоп ЕС ЛЮМАМ-РПО 11 и диагностические тест-системы производства «ЛабДиагностика» (Москва), а также иммуноглобулины флуоресцирующие для быстрой диагностики вирусных инфекций, выпускаемые «Предприятием по производству диагностических препаратов НИИ гриппа» (Санкт-Петербург).

Топографогистологический метод заключался в анатомической препаровке сердца с последующим микроскопическим исследованием препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, состояния левого и правого желудочков, межжелудочковой перегородки, а также купола правого предсердия и нижнего сегмента межпредсердной перегородки, в которых соответственно располагаются синоатриальный и атриовентрикулярный биоэлектрические узлы. Подобным образом обеспечивалась возможность прицельного исследования сократительной, проводящей и ритмогенной систем миокарда, что имело принципиальное значение в связи с ведущей ролью *асистолии* в танатогенезе антенатальной гибели плода [8].

### Результаты

В исследованной группе антигены герпетических вирусов были выявлены у 51 (53,1%) мертворожденного, в том числе ВПГ-1 — у 16 (16,7%), ВПГ-2 — у 19 (19,7%), ЦМВ — у 16 (16,7%). Чаще всего вирусы определялись в плаценте (64,7%), мягких мозговых оболочках (35,3%) и эндокарде (15,7%) в основном в изолированном (68,6%) и реже (31,4%) в сочетанном вариантах. В отличие от этого в мазках-соскобах из печени и легких антигены выявлялись в единичных случаях.

При сопоставлении результатов иммунофлуоресцентной диагностики с гестационным сроком было установлено, что в целом относительная частота инфицирования недоношенных и доношенных мертворожденных находилась на одном статистическом уровне (соответственно 52,9 и 53,6%). При этом в группе недоношенных плодов отмечено некоторое преобладание частоты обнаружения антигенов ВПГ-1 (20,5%) по сравнению

со сходными показателями ВПГ-2 и ЦМВ (по 16,2%). В отличие от этого у доношенных плодов преобладали антигены ВПГ-2 (28,6%) и ЦМВ (17,9%), в то время как антигены ВПГ-1 были обнаружены всего у 7,1%.

При патоморфологическом исследовании мертворожденных в 34 (35,8%) наблюдениях герпетической инфекции, возбудители которой были выявлены в плаценте и органах плода, обнаружены патоморфологические признаки поражения сердца. Эти изменения не имели существенных вирусотипических различий и локализовались преимущественно в атриальном отделе, в связи с чем были обозначены как «атриальный миокардит». Основные проявления герпетического поражения сердца включали повреждение эндотелия дистальных ветвей коронарных артерий, некробиотические изменения кардиомиоцитов и вегетативных ганглиев, мелкоочаговые моноцитарные инфильтраты и острое нарушение микроциркуляторного кровоснабжения в стенке правого предсердия. Развитие атриального миокардита в 24 (22,1%) наблюдениях внутриутробной смерти плодов имело изолированный характер. Генерализация инфекционного процесса, обнаруженная в остальных 10 (10,5%) наблюдениях герпетической инфекции, наряду с поражением сердца документировалась как моноцитарная инфильтрация мягких мозговых оболочек и очаговые проявления гигантоклеточного гепатита. У 17 (17,9%) мертворожденных антигены герпетических вирусов были выявлены исключительно в базальной пластине плаценты на фоне декомпенсированной хронической плацентарной недостаточности, которая и была расценена в качестве основной причины внутриутробной гибели плода в связи с отсутствием признаков атриального миокардита.

### Обсуждение

Полученные данные свидетельствуют о высокой информативности МФА в диагностике врожденной инфекции, обусловленной ВПГ-1, ВПГ-2 и ЦМВ. Достоверность использованного метода в определенной мере подтверждается опубликованными ранее результатами вирусологического обследования внутренних органов 48 мертворожденных, проведенного с помощью ПЦР [9]. ВПГ верифицированы в 23,8%, а ЦМВ — в 23,1% случаев, что в целом составило 46,9%. Эти данные, с одной стороны, сопоставимы с полученными нами показателями (53,1%), а с другой — свидетельствуют о возможности ложноположительных результатов при использовании люминесцентного выявления флуоресцирующих иммунных комплексов.

Обнаружение антигенов герпетических вирусов в плаценте и органах мертворожденных безусловно свидетельствует о наличии соответствующей врожденной инфекции, но не объясняет причину внутриутробной гибели плода. Для этого требуются целенаправленные поиски патоморфологических эквивалентов заболевания, в ходе которых особое внимание следует обращать на наличие признаков вирусного поражения ритмогенных зон сердца, что, по нашим данным, служит ведущей причиной антенатальной смерти плодов, инфицированных ВПГ и ЦМВ.

Некоторые различия в частоте верификации различных видов простого герпеса у недоношенных и доношенных мертворожденных, вероятнее всего, связаны с вирусным фоном материнского организма и особенностями иммунного статуса фетоплацентарной системы у незрелых и зрелых плодов [5]. Врожденных пороков

развития в исследованной группе мертворожденных с герпесвирусной инфекцией не обнаружено.

### Заключение

Использование МФА в аутопсийной практике является достаточно эффективным способом диагностики внутриутробной инфекции, обусловленной ВПГ и ЦМВ. При этом наибольшей информативностью отличаются исследования мазков-соскобов базальной поверхности плаценты, мягких мозговых оболочек и эндокарда. Полученные данные служат основанием для прицельного поиска патоморфологических проявлений врожденной вирусной болезни, среди которых наибольшее значение имеют признаки атриального миокардита. В целом проведенные исследования имеют прямое отношение к решению важнейшей проблемы современного акушерства — достоверной диагностике причины внутриутробной смерти плодов и свидетельствуют о целесообразности внедрения МФА в практическую деятельность патолого-анатомической службы.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

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

### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 3—5 см. REFERENCES)

1. Баринский И.Ф., Чешик С.Г. Герпесвирусные инфекции. В кн.: Львов Д.К., ред. *Медицинская вирусология*. М.: Медицинское информационное Агентство; 2008: 412—34.
2. Исаков В.А., Архипова Е.И., Исаков Д.В. *Герпесвирусные болезни человека*. СПб.: СпецЛит; 2013.
3. Глуховец Б.И., Глуховец Н.Г., Перетятко Л.П. Введение в фетальную нозологию. *Архив патологии*. 2010; (6): 9—11.
4. Фролова О.Г., Шувалова М.П., Гребенник Т.К., Долгушина Н.В. Перинатальная смертность в Российской Федерации. Возможные пути ее снижения. *Акушерство и гинекология*. 2012; (6): 47—51.
5. Глуховец Б.И. Миокардиодистрофия с точки зрения детского патологоанатома. *Вопросы современной педиатрии*. 2011; 10(1): 103—5.
6. Адиева А.А., Нисевич Л.Л., Гаджиева З.С., Цибилов А.С., Талалаев А.Г., Каск Л.Н. и др. ПЦР in situ для выявления ДНК вируса простого герпеса и цитомегаловируса в материалах аутопсии плодов и умерших новорожденных. *Вопросы диагностики в педиатрии*. 2010; (2): 20—5.

### REFERENCES

1. Barinskiy I.F., Cheshik S.G. Herpesvirus infections. In: L'vov D.K., ed. *Medical Virology [Meditsinskaya virusologiya]*. Moscow: Meditsinskoe informatsionnoe Agentstvo; 2008: 412—34. (in Russian)
2. Isakov V.A., Arkhipov E.I., Isakov D.V. *Herpesvirus Disease in Humans [Gerpesvirusnye bolezni cheloveka]*. St. Petersburg: SpetsLit; 2013. (in Russian)
3. Kimberlin D.W., Lin C.Y., Jacobs R.F. Neonatal herpes simplex infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 2004; 17(1): 1—13.
4. Malm G., Engman M.L. Congenital cytomegalovirus infections. *Semin. Fetal. Neonatal. Med.* 2007; 12 (3): 154—9.
5. Rudnick C.M., Hoekzema G.S. Neonatal herpes simplex virus infections (Revege). *Am. Fam. Physician.* 2002; 65 (6): 1138—43.
6. Glukhovets B.I., Glukhovets N.G., Peretyat'ko L.P. Introduction to fetal nosology. *Arkhiv patologii*. 2010; (6): 9—11. (in Russian)
7. Frolova O.G., Shuvalov M.P., Grebennik T.K., Dolgushina N.V. Perinatal mortality in the Russian Federation. Possible ways to reduce it. *Akusherstvo i ginekologiya*. 2012; (6): 47—51. (in Russian)
8. Glukhovets B.I. Myocardiodystrophy in terms of child pathologist. *Voprosy sovremennoy pediatrii*. 2011; 10(1): 103—5. (in Russian)
9. Adieva A.A., Nisevich L.L., Gadzhieva Z.S., Tsibizov A.S., Talalae A.G., Kask L.N. et al. In situ PCR to detect DNA of the herpes simplex virus and cytomegalovirus in material autopsy of dead fetuses and newborns. *Voprosy diagnostiki v pediatrii*. 2010; (2): 20—5. (in Russian)

Поступила 02.10.15  
Принята в печать 19.11.15

Лебедев А.В.<sup>1,3</sup>, Казеннова Е.В.<sup>1</sup>, Зверев С.Я.<sup>2</sup>, Нистратова Ю.И.<sup>2</sup>, Лага В.Ю.<sup>1</sup>, Туманов А.С.<sup>1</sup>, Глушченко Н.В.<sup>1</sup>, Ярыгина Е.И.<sup>3</sup>, Бобкова М.Р.<sup>1</sup>

## АНАЛИЗ ИЗМЕНЧИВОСТИ ГЕНА *env* ВАРИАНТА IDU-A ВИЧ-1 В ХОДЕ РАЗВИТИЯ ЭПИДЕМИИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ НА ТЕРРИТОРИИ ПЕРМСКОГО КРАЯ РОССИИ (1996—2011)

<sup>1</sup>Институт вирусологии им. Д.И. Иванковского ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва;

<sup>2</sup>ГКУЗ «Пермский краевой центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями», 614088, г. Пермь;

<sup>3</sup>ФГБОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина», 109472, г. Москва

Проанализированы 132 генетические последовательности C2-V3-C3-области гена *env* ВИЧ-1 варианта IDU-A, полученные для вирусов, циркулировавших в разное время среди потребителей инъекционных наркотиков (ПИН) и гетеросексуалов на территории Пермского края. В ходе исследования установлено, что степень дивергенции вариантов IDU-A ВИЧ-1 от общего предка в указанном регионе в 2011 г. была выше в 4,3 раза ( $p < 0,001$ ) по сравнению с началом эпидемии. Темп эволюции ВИЧ-1 различается в двух изученных группах риска инфицирования. Средние генетические дистанции между вариантами ВИЧ-1, циркулирующими среди гетеросексуалов, больше в среднем в 1,3 раза ( $p = 0,008$ ), чем среди ПИН. Скорость накопления нуклеотидных, в том числе несинонимичных замен в C2-V3-C3-области гена *env* ВИЧ-1 среди лиц, инфицированных гетеросексуальным путем, была в 1,7 раза выше, чем в группе ПИН. Продемонстрированы различия в положениях кодонов, находящихся под действием положительного отбора, в зависимости от принадлежности вариантов ВИЧ-1 к указанным группам риска.

Ключевые слова: ВИЧ-1; вариант IDU-A; группы риска; эволюция.

**Для цитирования:** Лебедев А.В., Казеннова Е.В., Зверев С.Я., Нистратова Ю.И., Лага В.Ю., Туманов А.С., Глушченко Н.В., Ярыгина Е.И., Бобкова М.Р. Анализ изменчивости гена *env* варианта IDU-A ВИЧ-1 в ходе развития эпидемии ВИЧ-инфекции на территории Пермского края России (1996—2011). *Вопросы вирусологии*. 2016; 61(5): 222-229.

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-5-222-229

Lebedev A.V.<sup>1,3</sup>, Kazennova E.V.<sup>1</sup>, Zverev S.Ya.<sup>2</sup>, Nistratova Yu.I.<sup>2</sup>, Laga V.Yu.<sup>1</sup>, Tumanov A.S.<sup>1</sup>, Glushchenko N.V.<sup>1</sup>, Yarygina E.I.<sup>3</sup>, Bobkova M.R.<sup>1</sup>

## ANALYSIS OF THE *env* GENE VARIABILITY OF THE IDU-A HIV-1 VARIANT IN THE OUTBREAK OF THE HIV INFECTION EPIDEMIC IN PERM REGION OF RUSSIA (1996-2011)

<sup>1</sup>D.I. Ivanovsky Institute of Virology «Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation;

<sup>2</sup>Perm Regional Center for Prevention and Control of AIDS and Infectious Diseases, Perm, 614088, Russian Federation;

<sup>3</sup>K.I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow, 109472, Russian Federation

In the present work, a total of 132 HIV-1 *env* gene C2-V3-C3 sequences belonging to the IDU-A genetic variant were analyzed. The variants were obtained from the viruses circulating among IDUs and heterosexuals in the Perm region at different periods. It was shown that the rate of the divergence of the IDU-A HIV-1 viruses from a common ancestor increased 4.3 times ( $p < 0.001$ ) in 2011 as compared with the onset of the epidemics. The rate of the HIV-1 evolution was different in the two risk groups of the infection. The mean genetic distance of HIV-1 variants circulating among heterosexuals was 1.3 times longer ( $p = 0.008$ ) than that among IDUs. The accumulation rate of the nucleotide (including nonsynonymous) substitutions in the C2-V3-C3 HIV-1 *env* gene region among individuals infected by heterosexual contacts was 1.7 times higher than that among IDUs. The differences in the positions of the codons subjected to positive selection were demonstrated depending on the infection risk group tested.

Keywords: HIV-1; IDU-A variant; group risk; evolution.

**For citation:** Lebedev A.V., Kazennova E.V., Zverev S.Ya., Nistratova Yu.I., Laga V.Yu., Tumanov A.S., Glushchenko N.V., Yarygina E.I., Bobkova M.R. Analysis of the *env* gene variability of the IDU-A HIV-1 variant in the outbreak of the HIV infection epidemic in Perm region of Russia (1996-2011). *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2016; 61(5): 222-229. (In Russ.). DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-5-222-229

**For correspondence:** Aleksey V. Lebedev, Junior researcher of the Laboratory of T-lymphotropic viruses, D.I. Ivanovsky Institute of Virology «Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation. E-mail: lebedevalsha236@gmail.com

### Information about authors:

Lebedev A.V., <http://orcid.org/0000-0001-6787-9345>

Bobkova M.R., <http://orcid.org/0000-0001-5481-8957>

Kazennova E.V., <http://orcid.org/0000-0002-7912-4270>

**Funding.** This work was supported by the Russian Science Foundation (Project No. 15-15-00050).

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

Received 12 October 2015  
Accepted 19 November 2015

**Для корреспонденции:** Лебедев Алексей Владимирович, мл. науч. сотр. лаб. вирусов лейкозов Института вирусологии им. Д.И. Иванковского ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва. E-mail: lebedevalsha236@gmail.com

Вирус иммунодефицита человека 1-го типа (ВИЧ-1) характеризуется значительной степенью генетической изменчивости и высокой скоростью эволюции, что обусловлено низкой точностью процесса обратной транскрипции наряду с высоким темпом репликации вируса [1, 2]. Наибольшая скорость эволюции, составляющая от  $2,02 \cdot 10^{-3}$  до  $16,90 \cdot 10^{-3}$  замен на нуклеотидную позицию в год, характерна для V3-области белка gp120, кодируемого геном *env* [3, 4], что определяет выбор этого участка генома для изучения генетических изменений ВИЧ-1 во времени. Кроме того, V3-область *env* содержит основные антигенные и нейтрализующие эпитопы ВИЧ-1. Изменение этой области, а также фланкирующих ее C2- и C3-областей вместе с действием диверсифицирующего (положительного) отбора позволяет вирусу избегать действия нейтрализующих антител, что является основной движущей силой молекулярной эволюции гена *env* ВИЧ-1 [5, 6].

В ранее проведенных исследованиях было показано, что по мере развития эпидемии эволюционные (генетические) дистанции между вариантами ВИЧ-1 и их общим предком возрастают, приводя к увеличению общей гетерогенности вирусной популяции [7, 8]. При анализе эпидемии ВИЧ-инфекции в различных группах риска инфицирования вирусом в разных исследованиях отмечалось более близкое генетическое сходство между вариантами ВИЧ-1, циркулирующими в группах потребителей инъекционных наркотиков (ПИН), по сравнению с вирусами, распространяющимися в результате половых контактов [3, 9, 10]. Высокая гомогенность ВИЧ-1 среди ПИН свидетельствует о том, что темп эволюции вируса на популяционном уровне в данной группе ниже такового среди лиц с половым путем передачи инфекции. Это связано с особенностями распространения вируса в данных группах риска.

Для изучения генетической изменчивости вариантов ВИЧ-1, циркулирующих в двух основных группах риска — ПИН и лиц с гетеросексуальным путем инфицирования, нами был выбран Пермский край, что обусловлено наличием постоянно пополняемой коллекции образцов от ВИЧ-инфицированных лиц с наличием полных эпидемиологических данных начиная с первого, зарегистрированного в 1988 г., случая заболевания [11].

В Пермском крае широкое распространение ВИЧ-1 началось с момента проникновения варианта IDU-A подтипа A1 в популяцию ПИН в 1996 г., при этом ранее случаев ВИЧ-инфекции в этой группе риска выявлено не было. С начала 2000-х годов произошел выход данного варианта вируса за пределы указанной группы риска и его распространение среди лиц, основным фактором риска заражения которых были гетеросексуальные контакты (гетеросексуалов) [11, 12]. С 1996 г. по настоящее время варианту IDU-A принадлежит основная роль в развитии эпидемического процесса на территории края.

Целью настоящего исследования является анализ генетической изменчивости C2-V3-C3-области гена *env* среди вирусов, относящихся к варианту IDU-A и циркулирующих в основных группах риска на территории Пермского края в ходе развития эпидемии ВИЧ-инфекции.

### Материал и методы

**Исследуемые пациенты.** В исследовании была использована коллекция образцов моноклеарных клеток периферической крови (МКПК), полученных в период с 1996 по 2011 г. от 132 ВИЧ-инфицированных лиц, про-

живающих на территории Пермского края. На момент забора крови ни одному из пациентов не назначалась антиретровирусная терапия. Выявление факторов риска, возможных мест заражения, эпидемиологических связей с другими ВИЧ-инфицированными лицами проводили путем опроса пациентов при сборе эпидемиологического анамнеза. Весь полученный клинический материал использовали с информированного согласия пациентов на основании одобрения Локальным комитетом по этике на базе ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России проведения научно-исследовательской работы (протокол 06-13 заседания Локального комитета по этике от 05.06.2013).

**Выделение, амплификация и секвенирование ДНК.** Геномную ДНК, включая провирусную ДНК, из МКПК выделяли с применением наборов QIAmp DNA Blood Mini Kit и прибора QIAcube («Qiagen», США) в соответствии с инструкциями производителя. Для получения нуклеотидных последовательностей, соответствующих области C2-V3-C3 гена *env* с координатами 7092—7310 (координаты даны относительно штамма HXB2 ВИЧ-1, номер в GenBank K03455) размером 213 нуклеотидных оснований, фрагменты ДНК амплифицировали методом гнездовой ПЦР с использованием двух пар праймеров: *envF1/envR1* [13] и *ES7/ES8* [14] для первого и второго раунда соответственно. Секвенирование амплифицированных фрагментов ДНК проводили с использованием набора реагентов BigDye Terminator™ v. 3.1 на автоматическом секвенаторе ABI 3130 («Applied Biosystems», США). Обработку полученных сиквентов, а также построение консенсусной последовательности осуществляли с помощью пакета программ DNASTAR Lasergene v. 8.0 («DNASTAR», США).

**Определение подтипа и филогенетический анализ.** Принадлежность последовательности к вирусам разных подтипов и рекомбинантных форм ВИЧ-1 определяли с использованием программ REGA HIV-1 Subtyping Tool v. 2.0. (<http://hivdb.stanford.edu>) и COMET HIV-1 (<http://comet.retrovirology.lu/>). Выравнивание последовательностей методом ClustalW и филогенетический анализ с использованием метода максимального правдоподобия (ML — maximum-likelihood) проводили с помощью программы MEGA v. 6 [15]. Выбор оптимальной модели нуклеотидных замен осуществляли с использованием приложения jModelTest 2.0 [16]. В качестве таковой была выбрана обобщенная реверсивная модель (GTR) с учетом гамма-распределения (+G).

**Анализ последовательностей.** Попарные нуклеотидные и аминокислотные дистанции последовательностей образцов ВИЧ-1 от их самого последнего общего предка (tMRCA — the most recent common ancestor) (степень дивергенции между ними) определяли с использованием моделей Тамуры—Нея (TrN + G) и Джонса—Тейлора—Торнтон (JTT + G) соответственно, с учетом гамма-распределения. Несинонимичные (число несинонимичных замен на несинонимичный сайт — dN) и синонимичные (число синонимичных замен на синонимичный сайт — dS) дистанции определяли модифицированным методом Нея—Годжобори (MNG) с рассчитанным значением отношения транзиций/трансверсий (MEGA 6). Отношение несинонимичных замен к синонимичным (dN/dS) для последовательностей, полученных в определенные периоды, свидетельствующее о наличии положительного (dN/dS > 1), отрицательного (dN/dS < 1) или нейтрального (dN/dS = 1) отбора [17], а также положения кодонов, на-

Таблица 1

Распределение обследованных ВИЧ-инфицированных пациентов по полу и возрасту ( $n = 132$ )

Время получения образца, год	Количество образцов, $n$	Мужчины/женщины, $n$ (%)	Медиана (МКИ**) возраста, годы
1996—1998*	17	15/2 (88/12)	23,0 (21,0—31,0)
2000—2002*	14	10/4 (71/29)	21,0 (18,0—23,0)
2003—2005	23	6/17 (26/74)	
ПИН	12	5/7 (42/58)	23,0 (19,5—27,5)
Гетеросексуалы	11	1/10 (9/91)	
2008	41	15/25 (38/62)	
ПИН	19	8/13 (38/62)	30,0 (28,0—35,0)
Гетеросексуалы	21	7/12 (43/57)	
2011	38	13/25 (34/66)	
ПИН	20	9/11 (45/55)	28,5 (25,0—34,0)
Гетеросексуалы	18	4/14 (22/78)	

Примечание. \* — для данных периодов получены образцы только от ПИН; \*\* — межквартильный интервал.

ходящиеся под позитивной селекцией, определяли с использованием программного пакета HYPHY, доступного на веб-ресурсе <http://www.datamonkey.org> [18]. Тесты на селекцию проводили с использованием метода фиксированных эффектов (FEL) и модели нуклеотидных замен Хасегава—Кишино—Яно (HKY85). Кодоны считали положительными в отношении действия отбора при  $p < 0,1$ . Поскольку отношение  $dN/dS$  при использовании данного метода для оценки действия отбора на уровне единичных сайтов кодонов может быть неопределяемым (при  $dN = 0$  и  $dS = 0$ ) или стремящимся к бесконечности (при  $dS \rightarrow 0$ ), мы приводим нормализованные значения разности между этими показателями — Norm.  $dN - dS$ . Частоту встречаемости аминокислот в каждом конкретном положении анализируемых последовательностей определяли с помощью онлайн-ресурса <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/VESPA/vespa.html>.

**Статистический анализ.** Весь статистический анализ проводили в пакете прикладных программ Statistica v.12.0 («StatSoft», США). Статистическую значимость различий оценивали с использованием  $U$ -теста Манна-Уитни и  $t$ -теста Стьюдента. Достоверными считали различия при  $p < 0,05$ .

## Результаты

**Характеристика исследуемых групп.** В ходе исследования определены нуклеотидные последовательности С2-V3-С3-области гена *env* 132 образцов ВИЧ-1, полученных от ВИЧ-инфицированных пациентов в Пермском крае. Из них 82 (62,1%) принадлежали ПИН, 50 (37,9%) — гетеросексуалам. Данные о пациентах суммированы в табл. 1.

Среди исследованных образцов, полученных нами от гетеросексуалов в 2003—2005, 2008 и 2011 гг., большинство принадлежали пациентам женского пола, доля которых составляла 90,9, 57,1 и 77,7% соответственно. Среди пациентов-мужчин в охваченный в исследовании период эпидемии основным путем инфицирования являлся парентеральный при употреблении инъекционных наркотиков. Медиана возраста пациентов, составляющих исследованные группы, согласно датам получения образцов ВИЧ-1 варьировала от 21 года до 30 лет, однако значимых различий в данном показателе среди групп пациентов обнаружено не было ( $p > 0,05$ ) (см. табл. 1).

**Определение подтипа и филогенетический анализ.** В ходе анализа полученных нуклеотидных последовательностей была установлена принадлежность всех исследованных образцов (132/132, 100%) к подтипу А1 ВИЧ-1. Для выяснения принадлежности изучаемых последовательностей с генотипом А1 к генетическому варианту IDU-A ВИЧ-1 был проведен филогенетический анализ.

На представленном на рис. 1 фило-

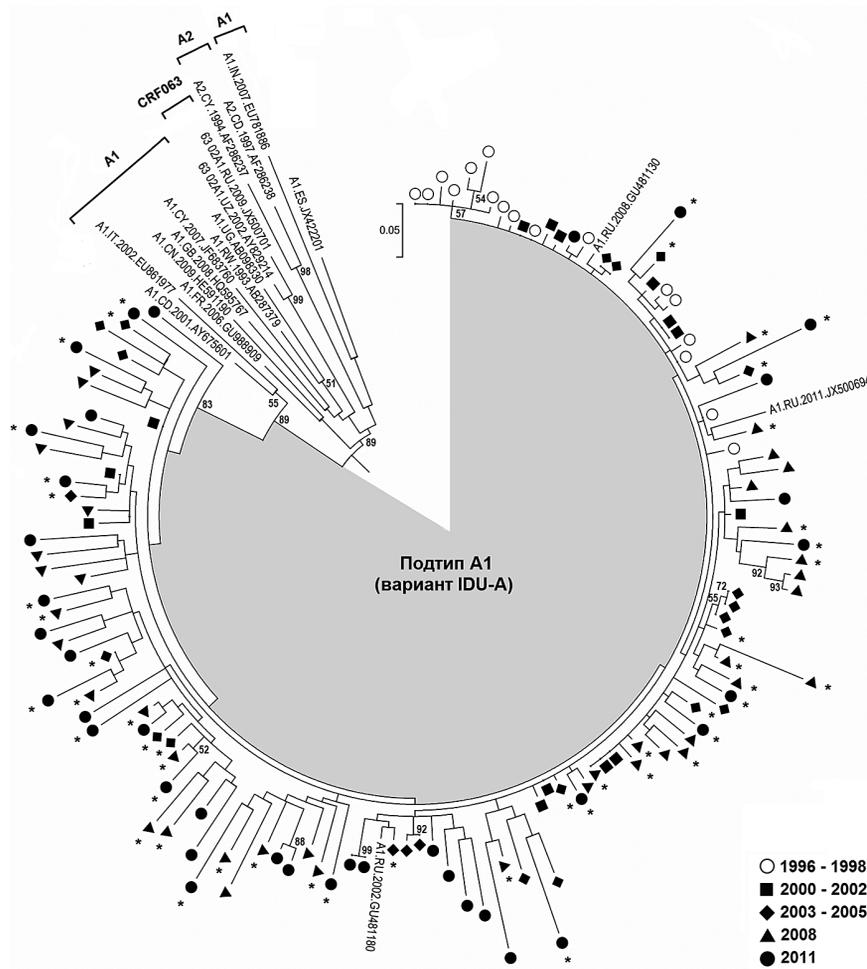


Рис. 1. Филогенетическое дерево 132 нуклеотидных последовательностей образцов ВИЧ-1 из Пермского края, референсных последовательностей подтипов А1, А2, CRF063\_02А1 (объединены квадратными скобками) и генетического варианта IDU-A ВИЧ-1, построенное с использованием метода максимального правдоподобия.

Область, выделенная серым цветом, соответствует последовательностям варианта IDU-A подтипа А1 ВИЧ-1. Символы  $\circ$ ,  $\blacksquare$ ,  $\blacklozenge$ ,  $\blacktriangle$ ,  $\bullet$  соответствуют времени получения образца; звездочкой отмечены образцы, полученные от гетеросексуалов. Цифрами у основания узлов ветвления указаны значения Bootstrap(BS)-поддержки, полученные при 1000 итераций (указаны значения  $\geq 50\%$ ).

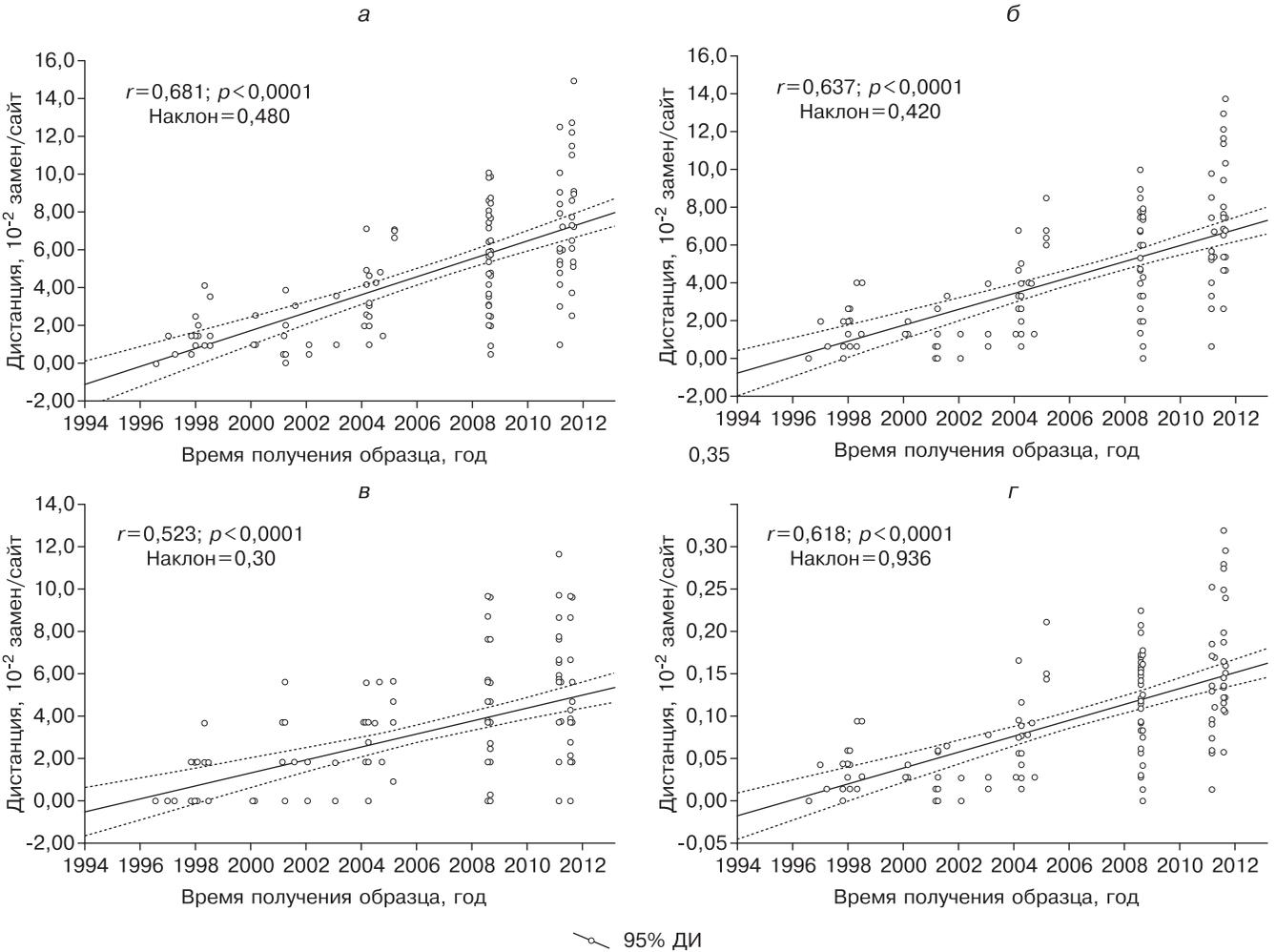


Рис. 2. Динамика эволюционных дистанций C2-V3-C3-области гена *env* варианта IDU-A ВИЧ-1.

Точки на графиках показывают нуклеотидные (а), несинонимичные (б), синонимичные (в) и аминокислотные (г) дистанции между индивидуальными последовательностями ( $n = 132$ ), полученными в разное время эпидемии, и их tMRCA. Приведена линия регрессии с указанием 95% доверительного интервала (ДИ). Коэффициенты корреляции, наклон и  $p$ -значения указаны на каждом графике.

генетическом дереве видно, что все нуклеотидные последовательности C2-V3-C2-области гена *env* ВИЧ-1, полученные для образцов из Пермского края в период с 1996 по 2011 гг., формируют субкластер (BS = 84%) с тремя референс-последовательностями варианта IDU-A из других регионов России. Кроме того, данный субкластер находится в составе филогенетической группы (BS = 89%) с образцами ВИЧ-1 подтипа A1, выделенными от пациентов из Демократической Республики Конго и Италии (ранее прибывшего из Республики Гвинея-Бисау), являющимися, по данным литературы, наиболее вероятными родоначальниками варианта IDU-A [19, 20]. Таким образом, результаты анализа свидетельствуют о принадлежности исследованных в настоящей работе образцов ВИЧ-1 к генетическому варианту IDU-A подтипа A1 ВИЧ-1.

В ходе раздельного филогенетического анализа последовательностей, полученных от ПИН и гетеросексуалов в 2003—2005, 2008 и 2011 гг., мы не наблюдали групповой кластеризации между ними, что указывает на взаимное проникновение вируса между группами риска инфицирования ВИЧ-1 (филогенетические деревья не приводятся).

*Анализ последовательностей.* Поскольку дата начала

эпидемии ВИЧ-инфекции, вызванной вариантом IDU-A среди ПИН в Пермском крае, известна [10], в качестве последнего общего предка был использован консенсус, реконструированный из последовательностей, полученных для вариантов вируса, циркулировавших в Пермском крае в 1996—1998 гг. [7, 8].

Эволюционные дистанции между индивидуальными C2-V3-C3-последовательностями гена *env* ( $n = 132$ ), полученными от вирусов варианта IDU-A, циркулировавших в разное время, и их tMRCA были проанализированы с помощью регрессионного анализа. В ходе анализа выявлена положительная корреляция между датой получения образцов и их эволюционными дистанциями до tMRCA (рис. 2). На рис. 2 видно, что дистанции между индивидуальными последовательностями и их общим предком значительно варьируют, и близкие к предку последовательности выявлены в разное время от начала эпидемии. Тем не менее средние значения эволюционных дистанций, полученные для вирусов, циркулирующих в тот или иной период эпидемии, в целом со временем увеличиваются (табл. 2), и за 15-летний период (1996—2011) данный показатель вырос в 4,3 раза ( $p < 0,001$ ).

В свою очередь средняя скорость эволюции C2-V3-

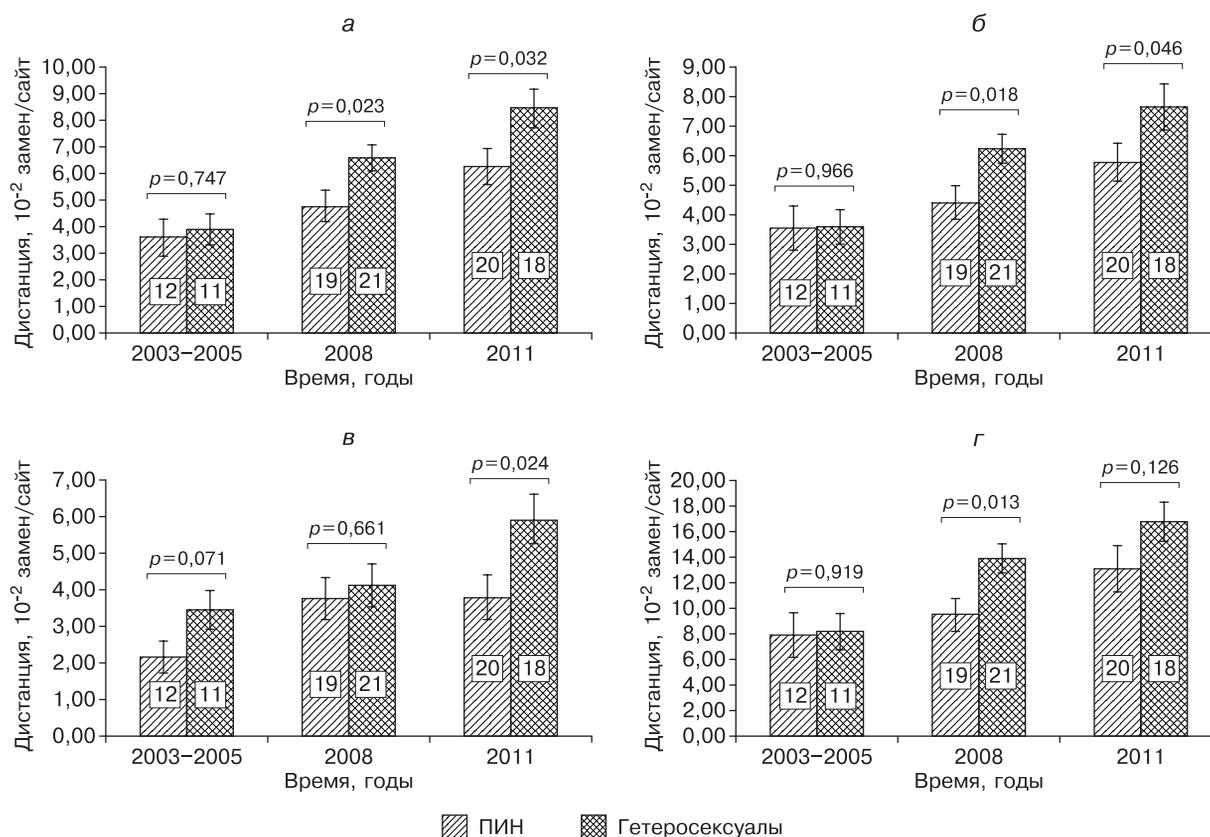


Рис. 3. Средние эволюционные дистанции участка гена *env* последовательностей варианта IDU-A ВИЧ-1, рассчитанные для вирусов, циркулировавших среди ПИН и гетеросексуалов в разные периоды эпидемии. Столбики соответствуют средним значениям нуклеотидных (а), несинонимичных (б), синонимичных (в) и аминокислотных (г) дистанций между последовательностями и их tMRCA с указанием стандартной ошибки среднего. Сверху приведены *p*-значения для разницы между группами; цифрами внутри столбиков указано количество использованных последовательностей.

С3-области гена *env* для варианта IDU-A составила  $4,80 \cdot 10^{-3}$  нуклеотидных замен на сайт в год. Средняя скорость аминокислотных, синонимичных и несинонимичных замен составила  $9,36 \cdot 10^{-3}$ ,  $4,20 \cdot 10^{-3}$  и  $3,00 \cdot 10^{-3}$  замен на сайт в год соответственно.

В связи с имеющимися в литературе данными о различии в скорости дивергенции вариантов вирусов на уровне популяции ПИН и гетеросексуалов [3] мы провели сравнительный анализ образцов ВИЧ-1, полученных от пациентов из данных групп риска в периоды эпидемии 2003—2005, 2008 и 2011 гг.

В ходе анализа установлено, что средние эволюционные дистанции между вариантами ВИЧ-1, циркулирующими в данных группах риска, различаются, и начиная с 2008 г. эти различия носят статистически значимый характер ( $p < 0,05$ ). Среди вирусов, выделенных в 2008 г. от пациентов из группы риска ПИН, средние значения нуклеотидных и несинонимичных дистанций меньше таковых у гетеросексуалов в 1,24 ( $p = 0,023$ ) и 1,31 ( $p = 0,018$ ) раза соответственно. В 2011 г. аналогичные показатели также были меньше для вирусов, распространяющихся среди ПИН, чем для вирусов, циркулирующих в среде гетеросексуалов, и различались в 1,33 ( $p = 0,032$ ) и 1,28 ( $p = 0,046$ ) раза соответственно (рис. 3). В среднем же степень дивергенции вирусов, циркулировавших в 2003—2011 гг. среди гетеросексуалов, выше таковой у ПИН в 1,3 раза ( $p = 0,008$ ). Средняя скорость эволюции анализируемой области гена *env* была выше в 1,7 раза

( $p < 0,001$ ) для вирусов, распространяющихся среди гетеросексуалов, и составила  $6,60 \cdot 10^{-3}$  нуклеотидных за-

Таблица 2

Средние эволюционные дистанции последовательностей C2-V3-C3-области гена *env* образцов ВИЧ-1 варианта IDU-A, выделенных в разное время на территории Пермского края, от их tMRCA

Время получения образца, год	Дистанция, 10 <sup>-2</sup> замен/сайт*			
	нуклеотидная	аминокислотная	dN**	dS***
1996—1998 (n = 17)	1,48 ± 0,25	3,64 ± 0,68	1,62 ± 0,29	0,85 ± 0,27
2000—2002 (n = 14)	1,42 ± 0,30 [ <i>p</i> = 0,869]	2,69 ± 0,59 [ <i>p</i> = 0,311]	1,26 ± 0,28 [ <i>p</i> = 0,384]	1,32 ± 0,49 [ <i>p</i> = 0,499]
2003—2005 (n = 23)	3,74 ± 0,44 [ <i>p</i> < 0,001]	8,04 ± 1,11 [ <i>p</i> < 0,001]	3,58 ± 0,46 [ <i>p</i> < 0,001]	2,77 ± 0,36 [ <i>p</i> = 0,041]
2008 (n = 41)	5,72 ± 0,39 [ <i>p</i> = 0,002]	11,81 ± 0,90 [ <i>p</i> = 0,012]	5,38 ± 0,39 [ <i>p</i> = 0,005]	3,75 ± 0,39 [ <i>p</i> = 0,058]
2011 (n = 38)	7,31 ± 0,51 [ <i>p</i> = 0,016]	14,83 ± 1,19 [ <i>p</i> = 0,051]	6,66 ± 0,50 [ <i>p</i> = 0,047]	4,79 ± 0,47 [ <i>p</i> = 0,170]

Примечание. \* — среднее ± стандартная ошибка; \*\* — несинонимичная дистанция; \*\*\* — синонимичная дистанция. В квадратных скобках указаны *p*-значения для разницы между показателями, соответствующими разным временным периодам, т. е. полученные при сравнении значения дистанции между вирусами, выделенными в данный период, с предыдущим.

Таблица 3

Позиции, находящиеся под действием позитивного отбора, в областях V3 и C3 gp120 *env* ВИЧ-1 среди вариантов, распространяющихся в группах риска ПИН и гетеросексуалов

Группа риска	Область гена <i>env</i>	НХВ2 <i>env</i> , позиция *	Norm. dN-dS	<i>p</i>	Кодируемые аминокислоты, %**
ПИН ( <i>n</i> = 82)	V3	322	2,14	0,008	D(72), A(12), E(9)↑
		323	1,16	0,084	I(85), T(13)↓
	C3	336***	1,66	0,014	A(73)↓, E(6)↑, T(17)↑
		337	1,74	0,057	A(77),E/D(12) ↑
		339	0,87	0,086	N(93)↓,E(4)↑
		344***	1,36	0,046	K(76)↓, E(6)↑, N(12)
		347***	3,09	0,019	T(70)↓, A(18)↑
	354	1,24	0,046	N(87), K(2)	
Гетеросексуалы ( <i>n</i> = 50)	V3	300	0,61	0,085	G(82)↓, S(10)↑,N(6)↑
	C3	326	1,13	0,042	T(67)↓, P(12), T(10)↑
		330	1,07	0,028	H(60)↑, Y(40)↓
		335	1,05	0,092	R(58)↓, K(18)↑
		336***	1,25	0,086	A(52)↓, T(32), E(8)
		340	1,36	0,053	S(48)↓, N(20), K/R(24)
		344***	1,84	0,005	K(50)↑, E(20)↓, N(18)
347***	1,95	0,042	T(58), A/I(18), K/R(16)		

Примечание. \* — координаты даны относительно области gp120 варианта НХВ2 ВИЧ-1 (номер в GenBank K03455); \*\* — указана частота встречаемости наиболее распространенных аминокислот в данном положении; \*\*\* — положения, находящиеся под действием позитивной селекции, общие для двух групп риска; ↓↑ — увеличение или снижение частоты встречаемости конкретной аминокислоты в данном положении по мере развития эпидемического процесса.

мен на сайт в год против аналогичного показателя для ПИН, равного  $3,84 \cdot 10^{-3}$  нуклеотидных замен на сайт в год. Скорость несинонимичных замен в указанной области генома в данных группах риска также различалась в 1,7 раза ( $p < 0,001$ ) и составила  $3,36 \cdot 10^{-3}$  и  $5,88 \cdot 10^{-3}$  замен на сайт в год для ПИН и гетеросексуалов соответственно.

Помимо различий в степени дивергенции и скорости эволюции вариантов ВИЧ-1, циркулирующих в группах риска ПИН и лиц с половым путем инфицирования, в ранних работах было отмечено наличие определенных позиций в геноме вируса, ассоциированных с той или иной группой риска [10]. В настоящем исследовании мы не обнаружили значимых различий в частоте встречаемости тех или иных нуклеотидов и/или аминокислот в C2-V3-C3-области гена *env* ВИЧ-1, связанных с изучаемыми группами риска. Однако анализ отбора, действующего на уровне анализируемой области гена *env* среди вариантов ВИЧ-1, циркулирующих в группах риска ПИН и гетеросексуалов, показал некоторые различия.

Суммарно на уровне C2-V3-C3-области гена *env* значения dN/dS для вирусов, циркулировавших среди ПИН в 2003—2005, 2008 и 2011 гг., составили: 1,21; 1,32 и 1,16 соответственно. Аналогичный показатель для вирусов, выделенных от гетеросексуалов, составил 1,07; 1,38 и 0,90 для 2003—2005, 2008 и 2011 гг. соответственно. Средний показатель dN/dS, полученных на основе анализа вирусов, выделенных от пациентов в 2003—2011 гг., равнялся 1,23 для ПИН и 1,12 для гетеросексуалов соответственно, что в целом говорит о наличии позитивного

отбора в C2-V3-C3-области гена *env* ВИЧ-1. При анализе позитивной селекции на уровне единичных кодонов было обнаружено, что отбору подвергаются различные положения кодонов в зависимости от принадлежности вирусов к той или иной группе риска (табл. 3). В пределах анализируемого участка гена *env* ВИЧ-1 только в C2-области не было обнаружено позиций, находящихся под действием позитивного отбора.

Как видно из табл. 3, общими относительно действия позитивного отбора для вирусов, циркулирующих среди ПИН и гетеросексуалов, являются кодоны в положениях 336, 344 и 347. Другие 5 положений, находящихся под действием позитивной селекции, различаются между вирусами из данных групп. Кроме того, были отмечены различия в частоте встречаемости тех или иных аминокислот в данных положениях. Так, в положении 344 для вирусов, распространяющихся среди ПИН, со временем наблюдалось снижение частоты встречаемости аминокислоты лизина (K) и увеличение доли глутаминовой кислоты (E) ( $p < 0,05$ ). В то же время среди вирусов, выделенных от гетеросексуалов, наблюдалась обратная картина: доля K увеличивалась, а доля E уменьшалась ( $p < 0,05$ ). Стоит отметить, что действие позитивного отбора на уровне кодонов в положениях 336 и 344 независимо от принадлежности вирусов к группе риска было характерным на протяжении всех исследуемых периодов эпидемии с 2003 по 2011 г.

### Обсуждение

В ходе исследования был проведен анализ изменчивости участка гена *env* варианта IDU-A ВИЧ-1 на примере вирусов, выделенных от пациентов из Пермского края в период 1996—2011 гг. Ретроспективный эпидемиологический анализ показывает, что основными группами риска инфицирования на территории края являются ПИН и гетеросексуалы. По мере развития эпидемического процесса в регионе происходили изменения в структуре путей передачи вируса, характеризующиеся постепенным увеличением доли гетеросексуального пути с 6,3% в 1996—2001 гг. до 36,1% в 2011 г. Превалирование женщин в гендерной структуре гетеросексуального пути передачи (см. табл. 1) характерно для развития эпидемического процесса в Пермском крае начиная с 2003 г., когда инфицирование в результате гетеросексуальных контактов стало ведущим путем передачи вируса среди женщин.

Анализ эволюционных дистанций между вирусами, циркулировавшими в разное время на территории региона, и их tMRCA продемонстрировал наличие временной модели (молекулярных часов) в эволюции варианта IDU-A ВИЧ-1, ранее описанной на примере вирусов других подтипов [7, 8]. Вирусы, выделенные в более поздние периоды эпидемии, в целом характеризуются большими значениями эволюционных дистанций от их общего предка, чем варианты, циркулировавшие в предшествующие периоды. При этом, как было показано, со временем степень дивергенции вирусов от их общего предка значительно возрастает (см. табл. 2, рис. 2). Наличие образцов вирусов, полученных за длительный период эпидемии ВИЧ-инфекции в регионе, позволило также оценить среднюю скорость эволюции исследуе-

мого участка гена *env* ВИЧ-1, составившую  $4,80 \cdot 10^{-3}$  нуклеотидных замен на сайт в год, что согласуется с ранее приведенными данными [3, 21].

Согласно эпидемиологическим исследованиям, выход варианта IDU-A за пределы группы риска ПИН и их половых партнеров и проникновение в среду гетеросексуалов отмечается в начале 2000-х годов. При этом половые партнеры ПИН могут рассматриваться в качестве так называемой проводниковой группы, служащей звеном в цепи передачи вируса между данными группами риска.

Примечательно, что продемонстрированные в настоящем исследовании значимые различия в степени дивергенции между вирусами, циркулирующими среди ПИН и гетеросексуалов, еще не обнаруживаются для вирусов, полученных в 2003—2005 гг. Данный факт скорее всего обусловлен недостаточным количеством времени, прошедшего с момента проникновения вируса в новую группу риска. Со временем различия в уровне дивергенции между вирусами, циркулирующими в данных группах риска, приобретают более заметный характер и свидетельствуют о более высоком уровне гетерогенности вариантов ВИЧ-1, распространяющихся среди гетеросексуалов. Кроме того, при сравнении средней скорости эволюции C2-V3-C3-участка гена *env* было установлено, что данный показатель выше для вирусов, распространяющихся среди гетеросексуалов. Согласно предположению, выдвинутому I. Veegu и соавт. [3], полученные результаты могут быть обусловлены различием в темпах распространения вируса в конкретных группах риска и влиянием со стороны иммунной системы организма хозяина на популяцию вируса [3]. В среде ПИН распространение вариантов ВИЧ-1 происходит быстро и, как правило, в начальной стадии инфекции до того, как со стороны иммунной системы будет оказано селективное давление на его популяцию. Это приводит к передаче вариантов ВИЧ-1, генетически близких друг другу, обуславливая тем самым высокую степень гомогенности вирусов, циркулирующих в данной группе риска. В противоположность этому распространение ВИЧ-1 среди гетеросексуалов происходит намного медленнее и определяется временем, необходимым для формирования новых социальных контактов, а также более низкой частотой инфицирования вирусом в результате полового акта, чем при парентеральном пути заражения. В результате передача вируса в ряду донор—реципиент происходит в более поздних стадиях инфекции, когда вирус в пределах организма ВИЧ-инфицированного лица уже успевает претерпеть генетические изменения, что приводит к увеличению гетерогенности популяции вирусов, циркулирующих среди гетеросексуалов.

Выявленные в данной работе расхождения в положениях 5 кодонов, находящихся под действием позитивного отбора (см. табл. 3), среди вирусов, циркулирующих в группах риска ПИН и гетеросексуалов, вероятно, также могут быть следствием различий в скорости распространения вируса в данных группах риска. Тем не менее позитивная селекция тех или иных аминокислот в данных положениях среди вирусов, циркулирующих в среде ПИН и гетеросексуалов, может быть следствием адаптивной эволюции ВИЧ-1 к распространению в этих группах риска.

Таким образом, результаты настоящего исследования демонстрируют значительное увеличение со временем дивергенции между вариантами IDU-A ВИЧ-1, циркулирующими на территории Пермского края, и неоди-

наковый темп эволюции вируса в группах риска ПИН и гетеросексуалов. Данный факт наряду с позитивным отбором, действующим на уровне различных позиций в составе указанной области генома ВИЧ-1, свидетельствует об особенностях эволюции вируса в зависимости от его распространения в конкретной группе риска — ПИН или гетеросексуалов.

Полученные в нашем исследовании нуклеотидные последовательности депонированы в GenBank под номерами KR493349—KR493380, KR817642—KR817673 и KT737386—KT737424.

**Финансирование.** Исследование было поддержано грантом Российского научного фонда (проект № 15-15-00050).

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

#### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1—10, 14—21 см. REFERENCES)

11. Бобков А.Ф., Зверев С.Я., Бобкова М.Р., Осташова В.Л., Красникова Л.А., Зубриков В.В. и др. Эпидемиологическая и генетическая характеристика первых 40 случаев ВИЧ-инфекции на территории Пермской области. *Вопросы вирусологии*. 2000; 45(4): 18—21.
12. Фельдблом И.В., Зверев С.Я., Остапович А.В., Аликина Ю.И., Суханова А.Л., Казеннова Е.В. и др. Молекулярно-эпидемиологические аспекты распространения ВИЧ-инфекции в Пермском крае. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2007; (2): 18—24.
13. Лага В.Ю., Казеннова Е.В., Васильев А.В., Лаповок И.А., Исмаилова А., Бейшеева Н. и др. Молекулярно-генетическая характеристика вариантов ВИЧ-1, распространенных на территории Киргизии. *Вопросы вирусологии*. 2012; 57(5): 26—32.

#### REFERENCES

1. Joos B., Fischer M., Schweizer A., Kuster H., Böni J., Wong J.K. et al. Positive in vivo selection of the HIV-1 envelope protein gp120 occurs at surface-exposed regions. *J. Infect. Dis.* 2007; 196(2): 313—20.
2. Lythgoe K.A., Fraser C. New insights into the evolutionary rate of HIV-1 at the within-host and epidemiological levels. *Proc. Biol. Sci.* 2012; 279(1741): 3367—75.
3. Berry I.M., Ribeiro R., Kothari M., Athreya G., Daniels M., Lee H.Y. et al. Unequal evolutionary rates in the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) pandemic: the evolutionary rate of HIV-1 slows down when the epidemic rate increases. *J. Virol.* 2007; 81(19): 10625—35.
4. Korber B., Muldoon M., Theiler J., Gao F., Gupta R., Lapedes A. et al. Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. *Science*. 2000; 288(5472): 1789—96.
5. Frost S.D., Wrin T., Smith D.M., Kosakovsky Pond S.L., Liu Y., Paxinos E. et al. Neutralizing antibody responses drive the evolution of human immunodeficiency virus type 1 envelope during recent HIV infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005; 102(51): 18514—9.
6. Barroso H., Borrego P., Bartolo I., Marcelino J.M., Familia C., Quintas A. et al. Evolutionary and structural features of the C2, V3 and C3 envelope regions underlying the differences in HIV-1 and HIV-2 biology and infection. *PLoS One*. 2011; 6(1): e14548.
7. Abebe A., Lukashov V.V., Rinke De Wit TF, Fisseha B., Tegbaru B., Kliphuis A. et al. Timing of the introduction into Ethiopia of subcluster C of HIV type 1 subtype C. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2001; 17(7): 657—61.
8. Lukashov V.V., Goudsmit J. Recent evolutionary history of human immunodeficiency virus type 1 subtypes B: reconstruction of epidemic onset based on sequence distances to the common ancestor. *J. Mol. Evol.* 2002; 54(5): 680—91.
9. Kuiken C., Thakallapalli R., Esklid A., de Ronde A. Genetic analysis reveals epidemiologic patterns in the spread of human immunodeficiency virus. *Am. J. Epidemiol.* 2000; 152(9): 814—22.
10. Dukhovlina E., Masharsky A., Tousseva O., Verevchkin S., Solovyeva T., Meringof M. et al. Two Independent HIV Epidemics in Saint Petersburg, Russia Revealed by Molecular Epidemiology. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2015; 31(6): 608—14.
11. Bobkov A.F., Zverev S.Ya., Bobkova M.R., Ostashova V.L., Krasnikova L.A., Zubrikov V.V. et al. Epidemiological and genetical characteristics of first 40 cases of HIV infection in Perm region. *Voprosy virusologii*. 2000; 45(4): 18—21. (in Russian)

12. Fel'dblyum I.V., Zverev S.Ya., Ostapovich A.V., Alikina Yu.I., Sukhanova A.L., Kazennova E.V. et al. The molecular epidemiological aspects of HIV-infection spreading in Perm region. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2007; (2): 18—24. (in Russian)
13. Laga V.Yu., Kazennova E.V., Vasil'ev A.V., Lapovok I.A., Ismailova A., Beysheeva N. et al. Molecular-genetic characterization of the HIV-1 variants abundant in Kirghizia. *Voprosy virusologii*. 2012; 57(5): 26—32. (in Russian)
14. Delwart E., Shpaer E.G., Louwagie J., McCutchan F.E., Grez M., R@tbsamen-Waigmann H. et al. Genetic relationships determined by a DNA heteroduplex mobility assay analysis of HIV—1 env genes. *Science*. 1993; 262(5137): 1257—61.
15. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 2013; 30(12): 2725—9.
16. Darriba D., Taboada G.L., Doallo R., Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods*. 2012; 9(8): 772.
17. Yang W., Bielawski J.P., Yang Z. Widespread adaptive evolution in the human immunodeficiency virus type 1 genome. *J. Mol. Evol.* 2003, 57(2): 212—21.
18. Delport W., Poon A.F., Frost S.D., Kosakovsky Pond S.L. Datamonkey 2010: a suite of phylogenetic analysis tools for evolutionary biology. *Bioinformatics*. 2010; 26(19): 2455—7.
19. Thomson M.M., de Parga E.V., Vinogradova A., Sierra M., Yakovlev A., Rakhmanova A. et al. New insights into the origin of the HIV type 1 subtype A epidemic in former Soviet Union's countries derived from sequence analyses of preepidemic transmitted viruses. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2007; 23(12): 1599—604.
20. Riva C., Romano L., Saladini F., Lai A., Carr J.K., Francisci D. et al. Identification of a possible ancestor of the subtype A1 HIV Type 1 variant circulating in the former Soviet Union. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2008; 24(10): 1319—25.
21. Lemey P., Rambaut A., Pybus O.G. HIV evolutionary dynamics within and among hosts. *AIDS Rev*. 2006; 8(3): 125—40.

Поступила 12.10.15

Принята в печать 19.11.15

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 578.833.26.083.2

*Мельникова О.В., Адельшин Р.В., Корзун В.М., Трушина Ю.Н., Андаев Е.И.*

## ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА ИЗ ПРИРОДНЫХ ОЧАГОВ В ИРКУТСКОЙ ОБЛАСТИ И УТОЧНЕНИЕ ГЕНОТИПИЧЕСКОГО ПЕЙЗАЖА

ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, 664047, г. Иркутск

Иркутская область является уникальной территорией, на которой зафиксирована циркуляция вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) всех известных в настоящее время субтипов. В последние годы в некоторых областях Российской Федерации описан феномен смены субтипов ВКЭ с замещением дальневосточного субтипа сибирским. В настоящей работе представлены результаты индивидуального исследования 11 522 экземпляров иксодовых клещей и проб мозга 81 мелкого млекопитающего, собранных в природных очагах КЭ на территории Иркутской области с 2006 по 2014 г. Выделено и исследовано вирусологическими методами более 60 штаммов ВКЭ, 68 изолятов типированы по фрагменту гена E (1193 п. н.). Большинство штаммов независимо от субтипа продемонстрировали высокую вирулентность для лабораторных мышей (ЛМ) как при внутримозговом, так и при периферическом пути введения вируса. Все штаммы, выделенные от теплокровных (мелких млекопитающих и человека), обладали высокой степенью вирулентности для ЛМ, но на филогенетическом древе попадали в один кластер с изолятами от клещей, собранных в том же районе. «Клещевые» штаммы разной степени вирулентности также не образовывали отдельных кластеров на древе. Филогенетический анализ показал, что генотипический пейзаж ВКЭ на обследованной территории в настоящее время претерпевает изменения, характеризующиеся абсолютным преобладанием сибирского субтипа (94,1%), представленного двумя группами с прототипными штаммами Заусаев и Васильченко. Группа штаммов Васильченко распространена на всей обследованной территории, штаммы группы Заусаев изолированы в основном в ближайших пригородах Иркутска. В природных очагах Прибайкалья постоянно циркулирует ВКЭ европейского субтипа (не менее 5% выборки), и его штаммы обладают высокой вирулентностью для беспородных белых мышей. ВКЭ дальневосточного субтипа в группе изолятов 2006—2014 гг. не обнаружен. Филогенетическое родство исследованных штаммов больше связано с местом, чем с годом и источником выделения изолята.

Ключевые слова: вирус клещевого энцефалита; субтипы; штаммы; вирулентность для лабораторных мышей.

Для цитирования: Мельникова О.В., Адельшин Р.В., Корзун В.М., Трушина Ю.Н., Андаев Е.И. Характеристика изолятов вируса клещевого энцефалита из природных очагов в Иркутской области и уточнение генотипического пейзажа. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61(5): 229-234.

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-5-229-234

*Mel'nikova O.V., Adel'shin R.V., Korzun V.M., Trushina Yu.N., Andaev E.I.*

### TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS ISOLATES FROM NATURAL FOCI OF THE IRKUTSK REGION: CLARIFICATION OF THE GENOTYPE LANDSCAPE

Irkutsk Antiplague Research Institute, Irkutsk, 664047, Russian Federation

Для корреспонденции: Мельникова Ольга Витальевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. природно-очаговых вирусных инфекций ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, 664047, г. Иркутск. E-mail: melnikovaovit@gmail.com

The Irkutsk region is the unique territory where all known subtypes of tick-borne encephalitis virus (TBEV) circulate. In the last years, the phenomenon of changes in TBEV subtypes (substitution of the Far-Eastern subtype by the Siberian one) was noted in some regions of the Russian Federation. The results of individual investigation of 11522 *Ixodes persulcatus* ticks and brain specimens from 81 small mammals collected in natural foci of the Irkutsk region during 2006-2014 are presented in the article. More than 60 TBEV strains have been isolated and studied by virological methods; E gene fragments (1193 b.p.) of 68 isolates have been typed. The majority of the strains (irrespective of subtype) were of high virulence for laboratory mice (LM) in case of both intracerebral and subcutaneous inoculation of virus. All isolates from warm-blooded small mammals and humans were of high virulence for LM, but placed in the same clusters of the phylogenetic tree with ticks collected in the same area. Tick-borne strains of different virulence also did not form separate clusters on the tree. Phylogenetic analysis showed that modern TBEV genotypic landscape of the studied territory is changing toward absolute predominance of the Siberian subtype (94.1%). This subtype is represented by two groups with prototype strains "Zausaev" and "Vasilchenko". The "Vasilchenko" group of strains is spread on the whole territory under study; the strains of "Zausaev" group were isolated previously in the Irkutsk suburbs. The European subtype of TBEV circulates in natural foci of Pribaikalie permanently (at least 5% of the random sampling); the strains are of high virulence for LM. The Far-Eastern TBEV subtype was not found within the group of isolates collected in 2006-2014. The phylogenetic relationship of the strains under study had a higher correlation with the place of isolation than with the year or source.

**Key words:** tick-borne encephalitis virus (TBEV); subtypes; strains; virulence for laboratory mice.

**For citation:** Mel'nikova O.V., Adel'shin R.V., Korzun V.M., Trushina Yu.N., Andaev E.I. Tick-borne encephalitis virus isolates from natural foci of the Irkutsk region: clarification of the genotype landscape. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2016; 61(5): 229-234. (In Russ.).

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-5-229-234

**For correspondence:** Olga V. Mel'nikova, Candidate of Biological Sciences, Senior research scientist, Laboratory of natural foci infections, Irkutsk Antiplague Research Institute, Irkutsk, 664047, Russian Federation. E-mail: melnikovaovit@gmail.com

**Acknowledgments.** The authors are grateful to the scientists working in the Laboratory of natural foci infections and the Department of zoology and parasitology of the Irkutsk Antiplague Research Institute, Russian Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Well-being, S. A. Borisov, T. I. Borisova, D. B. Verzhbutskii, E. A. Vershinin, P. E. Vershinin, M. O. Gorina, G. V. Zimareva, I. M. Morozov, E. T. Petrova, N. N. Piven', A. V. Sevost'yanova, E. A. Sidorova, A. G. Trukhina, A. V. Kholin, S. E. Khudchenko, R. A. Shivarenko, and N. V. Yakovchits, and the scientists of the Sochava Institute of Geography, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, N. E. Krasnoshtanova and S. I. Lesnykh for collection of specimens.

**Funding.** The study had no sponsorship.

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

Received 29 September 2015

Accepted 19 November 2015

В процессе более чем 75-летнего изучения вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) знания о его природе и свойствах существенно изменяются. В последние годы появляется все больше свидетельств эволюции вируса, проявляющейся расширением нозоареала [1], ростом и изменением структуры заболеваемости на эндемичных территориях [2, 3], регистрацией случаев заболеваний на неэндемичных прежде территориях [1, 4], патоморфозом инфекции [5, 6]. Наконец, в некоторых областях Российской Федерации описан феномен смены субтипов ВКЭ с замещением дальневосточного субтипа сибирским [6—8].

В Прибайкалье с начала 60-х годов XX века стали выделять оригинальные штаммы ВКЭ, отличающиеся как от западного, так и от восточного серотипа [9]. При этом только 2 (Айна/1448, выделенный от больной хронической формой КЭ, и 147 — из мозга полевки) из 21 исследованного штамма, изолированного из разных источников, демонстрировали подобные свойства [10]. В последующие годы В.В. Погодина [11] при изучении большой группы таких штаммов выделила их в отдельный серотип, который назвала среднесибирско-забайкальским или сибирским. В 70-е и 80-е годы прошлого века доля штаммов сибирского серотипа в исследуемых коллекциях штаммов стала возрастать. А.Г. Трухина [12] из 81 штамма ВКЭ, выделенного в природных очагах Прибайкалья (Иркутская область и Республика Бурятия), к серотипу Айна/1448 отнесла 41 штамм, к восточному — 37, и 3 штамма были определены как занимающие промежуточное положение между двумя серотипами вируса. В

первом десятилетии XXI века с помощью молекулярно-генетических методов показано абсолютное доминирование (более 80%) сибирского субтипа ВКЭ в большинстве обследованных районов Иркутской области [13—15].

В то же время, изучая большие коллекции сибирского варианта ВКЭ, исследователи обращали внимание на его выраженную генотипическую изменчивость [12]. Филогенетический анализ 86 последовательностей изолятов ВКЭ, относящихся к сибирскому субтипу, показал, что существуют так называемые азиатский и европейский его топоварианты. Азиатский топовариант представлен как минимум двумя значительными группами изолятов с прототипными штаммами Заусаев и Васильченко [16].

Цель данного исследования — изучение группы штаммов ВКЭ, выделенных с 2006 по 2014 г. в разных районах Иркутской области, и уточнение в этой связи генотипического пейзажа ВКЭ в регионе на настоящее время.

## Материал и методы

Голодных имаго *Ixodes persulcatus* собирали на флаг с конца апреля до начала июля в 2006—2014 гг. на нескольких территориях Иркутской области с длительно существующими природными очагами КЭ (табл. 1). Мелких млекопитающих отлавливали ловушками Геро на тех же участках в июле—сентябре. Кровь больной с диагнозом «клещевой энцефалит?» была направлена на исследование в нашу лабораторию из ОГБУЗ «Иркутская областная инфекционная клиническая больница».

Клещей исследовали индивидуально иммунофермент-

Таблица 1

Места сбора материала, результаты серологического исследования и изоляции штаммов ВКЭ (2006—2014)

Место сбора материала	Исследовано в ИФА/из них положительных	Вирусофорность, %	Способ изоляции			Всего изолятов ВКЭ
			БМ	КК СПЭВ	ОТ-ПЦР	
Клещи						
Байкальский тракт, 23 км	1887/19	1,0 ± 0,23	7	0	0	7
То же, 30 км	74/1	1,4 ± 1,34	1	0	0	1
" ", 43 км	3756/71	1,9 ± 0,22	26	1	2	29
" ", 47 км	4812/80	1,7 ± 0,18	11	2	1	14
Голоустненский тракт	1036/5	0,5 ± 0,22	1	0	0	1
УОБО	165/8	4,8 ± 1,67	0	9	0	9
Слюдянский район	1474/9	0,6 ± 0,20	4	0	1	5
Итого ...	11522/193	1,5 ± 0,10	50	12	4	66
Мелкие млекопитающие						
Байкальский тракт, 23 км	5/2	40,0 ± 21,91	0	0	0	0
То же, 43 км	64/17	26,6 ± 5,52	2	0	0	2
Слюдянский район	12/0	0 ± 7,12	0	0	0	0
Итого ...	81/19	23,5 ± 4,71	2	0	0	2
Больные люди						
Кровь больной К., укус клеща на 17-м километре Байкальского тракта	н/и	н/и	1	н/и	1	1

Примечание. н/и — не исследовали.

ным методом с помощью набора реагентов ИФА ТС АГ ВКЭ («Микроген», Томск) в соответствии с инструкцией производителя. Из мозга мелких млекопитающих готовили 10% суспензию на физиологическом растворе и исследовали на той же тест-системе.

Из клещевых и мозговых суспензий, показавших положительный и/или сомнительный результат на наличие антигена (АГ) ВКЭ, изолировали вирус на 2—3-дневных сосунках беспородных белых мышей (БМ) [17] со сроком наблюдения 21 день. Часть клещевых суспензий, отрицательных и/или сомнительных по результатам ИФА, преимущественно с территорий с низкой численностью клещей (Усть-Ордынский Бурятский округ — УОБО) исследовали на микрокультуре клеток почки эмбриона свиньи (СПЭВ) по наличию цитопатического действия (ЦПД) [17] с последующим тестированием в ИФА и закреплением в пассажах на мышах.

Для оценки нейровирулентности и периферической активности изоляты ВКЭ титровали на БМ массой 6—8 г путем их внутримозгового (по 0,03 мл) и подкожного (по 0,25 мл) заражения. За животными наблюдали 14 дней. Титр вируса вычисляли методом Рида и Менча [17]. Нейроинвазивность оценивали по индексу инвазивности (ИИ) — разности титров вируса при церебральном и подкожном заражении ( $\lg \text{ЛД}_{50}/\text{мл}$ ). Работу на животных выполняли в соответствии с «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации» (утверждены приказом Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации № 708н от 23.08.2010).

Положительные по результатам ИФА суспензии клещей и мозга мелких млекопитающих в 2012—2014 гг. верифицировали в обратнотранскриптазной полимераз-

ной цепной реакции (ОТ-ПЦР) (набор реагентов АмплиСенс® TBEV, *B. burgdorferi* s.l., *A. phagocytophilum*, *E. chaffeensis/E. muris*-FL ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора РФ, Москва). Вирусную РНК из суспензий выделяли с помощью набора АмплиПрайм® РИБО-преп (ООО «НекстБио», Москва). Обратную транскрипцию проводили при помощи набора реагентов РЕВЕРТА-L-100 (ЦНИИ эпидемиологии).

ПЦР-продукт гена E получали с помощью набора реагентов ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) («Синтол», Москва) и праймеров, любезно предоставленных Л.С. Карань (ЦНИИ эпидемиологии). Полученные ПЦР-продукты визуализировали в 1% агарозе и затем выделяли согласно стандартной методике [18] с некоторыми модификациями. ПЦР-продукты секвенировали с использованием набора реактивов ABI Prism BigDye Terminator v.1.1 Cycle Sequencing Kit на приборе Genetic Analyzer 3500 xL («Applied Biosystems»). Анализ и выравнивание нуклеотидной последовательности проводили в программе BioEdit v. 7.0.5.3 [19]. Бескорневое филогенетическое BioNJ-дерево построено с помощью программы Splits Tree4 [20].

Для статистической обработки результатов использовали общепринятые непараметрические методы: точный критерий Фишера, U-критерий Вилкоксона, Манна - Уитни [21]. Расчеты проводили с помощью программного обеспечения Microsoft Excel и Statistica.

### Результаты и обсуждение

За 9 лет разными методами от клещей, мелких млекопитающих и из крови больной выделено 65 штаммов ВКЭ и 4 изолята РНК (см. табл. 1). Большая часть суспензий, содержащих АГ ВКЭ, не вызвала видимых проявлений болезни при заражении БМ. Из клещевых суспензий вирус удалось выделить в 25% случаев, из мозговых суспензий мелких млекопитающих — в 10,5%. Высокое содержание АГ в клещах увеличивало вероятность изоляции штаммов на БМ ( $p > 0,01$ ). В большинстве (86,8%) случаев мыши заболели при первичном заражении. Инкубационный период колебался в широком диапазоне (табл. 2) и в среднем составил 6,5 сут, в последующих пассажах — 3—4 сут.

При заражении клеточных культур (КК) СПЭВ отрицательными и сомнительными по результатам ИФА суспензиями клещей ( $n = 299$ ) было изолировано 12 штаммов ВКЭ: 9 из УОБО и 3 с Байкальского тракта. Следует отметить, что из слабopоложительных по результатам ИФА клещей на уровне слепого пассажа на БМ, а также из отрицательной суспензии на КК было изолировано 3 штамма, при генотипировании оказавшиеся ВКЭ европейского субтипа.

Для расшифровки нуклеотидных последовательностей штаммы ВКЭ брали в работу не позднее уровня 1 пассажа, поскольку геном вируса может претерпевать изменения при адаптации к лабораторным животным [22]. В 4 случаях удалось секвенировать участок гена E

Генетическая принадлежность изолятов и биологические свойства групп штаммов ВКЭ с разных территорий

Место сбора материала	Количество изолятов*	Генотипированы		Вариант сибирского генотипа		Инкубационный период при 1-м заражении мышей, сут	Инкубационный период в пассажирах, сут	Церебральная активность**	Периферическая активность**	ИИ
		сибирский тип	европейский тип	Васильченко	Заусаев					
Байкальский тракт, 17 км#	1	1	0	0	1	4	3	10,1	9,1	1
Байкальский тракт, 23 км	7	7***	0	1	5	4—7	3—4	7,0—10,9	4,8—8,3	1,0—3,0
Байкальский тракт, 30 км	1	1	0	1	0	7	3	10,2	6,9	3,3
Байкальский тракт, 43 км	31*	28	3	23	5	4—18	3—4,5	6,9—11,0	3,3—9,9	0,8—3,7
Байкальский тракт, 47 км	14*	12	1	10	2	3—14	3—4	6,2—10,7	4,5—9,3	1,1—2,8
Голоустненский тракт	1	1	0	1	0	5—8	4	9,1	8,2	0,9
УОБО	9	9	0	9	0	КК	3	8,1—11,5	7,1—9,3	1,0—2,4
Слюдянский район	5*	5	0	5	0	5—15	3—4	9,2—10,0	7,1—8,1	1,1—2,9

Примечание. \* — с учетом изолятов РНК; \*\* — Ig ЛД<sub>50</sub>/мл; \*\*\* — 1 штамм — сибирский тип; # — кровь больной, укушенной клещом на 17-м километре Байкальского тракта.

непосредственно в клещевой суспензии, в 2 случаях — в мозговой суспензии после первичного заражения БМ.

Генотипирование 64 штаммов и 4 РНК-изолятов ВКЭ (фрагмент гена E, 1193 п. н.) показало, что 94,1% из них принадлежали к сибирскому субтипу и 5,9% — к европейскому. Ни одного штамма восточного субтипа обнаружено не было.

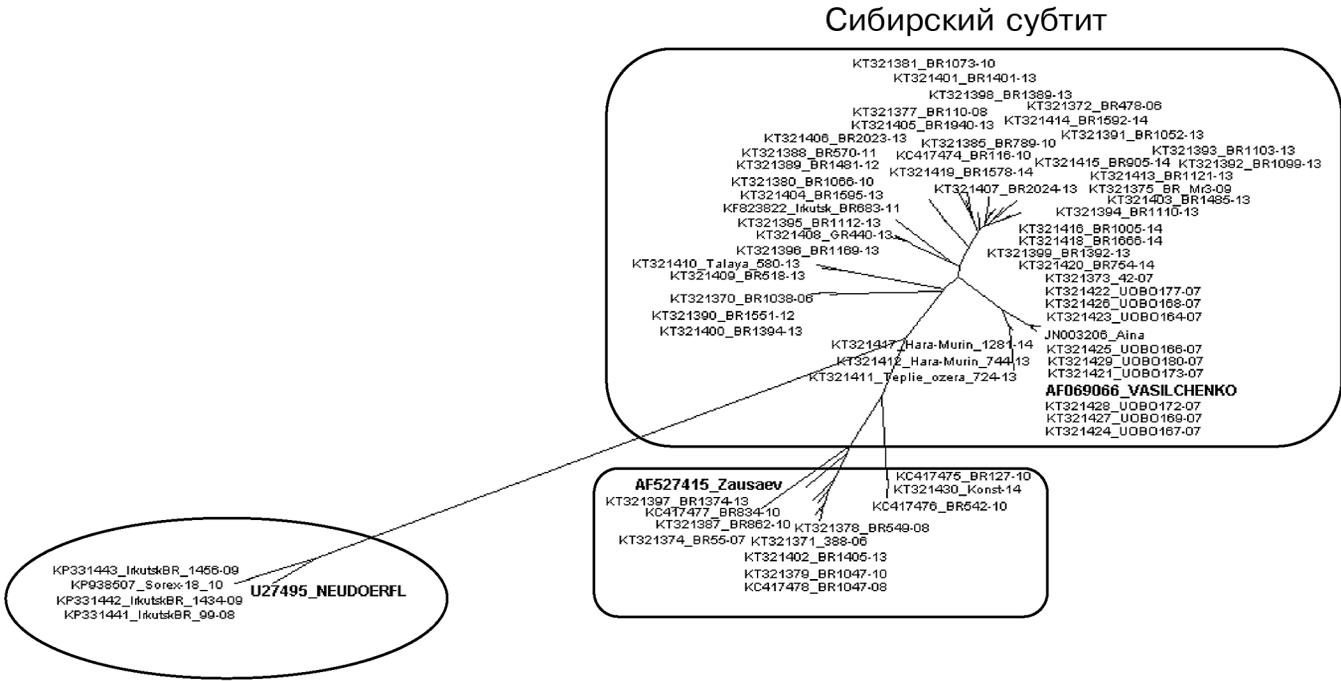
Циркуляция в регионе европейского субтипа отмечалась еще с 70-х годов прошлого века: антитела (АТ) к АГ западного (штамм 256) варианта обнаруживали в 6,6% сывороток крови людей [23]. В начале XXI века наличие в Прибайкалье штаммов ВКЭ европейского субтипа было подтверждено молекулярными методами (5,7% от числа исследованных) [14]. Большинство из них было выделено от больных людей или мелких млекопитающих.

На филогенетическом древе изоляты сибирского субтипа разделились на 2 большие группы: подавляющее большинство (79,4%) оказалось в кладе с прототипным штаммом Васильченко, остальные — в кладе с прототипным штаммом Заусаев. Примечательно, что в группу Заусаев попали изоляты только с Байкальского тракта — территории с наибольшей степенью риска заражения для жителей Иркутска, по данным литературы и результатам наших исследований [24]. При этом в данной группе оказались 6 из 7 изолятов с участков, расположенных ближе всего к областному центру (17 и 23 км Байкальского тракта) — территории с большой концентрацией садоводств. Между тем с распространенностью этого субтипа связывают ухудшение клинического течения и рост числа очаговых форм КЭ в некоторых регионах [5].

Генотипический пейзаж на отдаленных от города и наименее затронутых антропогенным воздействием лесных участках, прилегающих к Байкальскому тракту, оказался наиболее разнообразным: здесь циркулируют 2 субтипа вируса и 2 варианта сибирского субтипа (см. табл. 2). При этом в выборках с 43-го и 47-го километров преимущественно обнаружены штаммы сибирского субтипа из группы Васильченко, а с 17-го и 23-го — Заусаев. Сравнение распределений частоты встречаемости вариантов сибирского субтипа на двух расположенных рядом участках (43 и 47 км Байкальского тракта) по точному

критерию Фишера показало отсутствие различий между ними ( $p = 1$ ). Это позволило объединить данные выборки для дальнейшего анализа. Сопоставление распределений вариантов штаммов, полученных с 43-го, 47-го и 17-го, 23-го километров, показало существенную степень различий между ними ( $p = 0,001$ ). Все изоляты с прочих обследованных нами территорий относились к варианту Васильченко (см. табл. 2). Между встречаемостью субтипов, обнаруженных в УОБО и на 17-м и 23-м километрах Байкальского тракта, наблюдается высокая степень неоднородности ( $p = 0,0009$ ), тогда как статистически значимые различия между выборками из УОБО и с 43-го и 47-го километров не выявлены ( $p = 0,3221$ ). На рисунке хорошо видно, что ветви, образуемые группами штаммов на филогенетическом древе, больше связаны с местом, чем с годом выделения изолята. Следует отметить, что все современные изоляты из УОБО практически не отличаются от прототипного штамма Айна/1448, выделенного на территории округа почти полвека назад.

Соотношение показателей вирулентности для БМ при введении вируса в мозг и экстраневральным путем является индивидуальной характеристикой, маркером каждого штамма [25]. Подавляющее большинство (88,7%) исследованных нами штаммов были высоковирулентны при периферическом пути введения (6 и более lg ЛД<sub>50</sub>/мл), 6 — умеренно вирулентны (от 4,1 до 5,9 lg ЛД<sub>50</sub>/мл) и только 2 — слабовирулентны (меньше 4 lg ЛД<sub>50</sub>/мл). Все 4 штамма европейского субтипа оказались высоковирулентными для БМ, что согласуется с меняющимися на сегодняшний день представлениями о его слабой патогенности [26]. ИИ превышал 2,5 lg у 19,4% штаммов и лишь в трех случаях совпал с умеренной и низкой вирулентностью для мышей при периферическом пути введения. Штаммы от млекопитающих (красно-серая полевка КСП-3 и бурозубка Б-18) были высоковирулентны для БМ при обоих путях введения и по биологическим свойствам не отличались от основной массы штаммов, выделенных из клещей. На филогенетическом древе штаммы от млекопитающих оказались на одной ветви с клещевыми штаммами с той же территории (43 км Байкальского тракта). Это подтверждает мнение других исследователей о



Филогенетическое древо нуклеотидных последовательностей штаммов вируса КЭ, выделенных на территории Иркутской области в 2006—2014 гг. Прописными буквами и жирным шрифтом выделены прототипные штаммы.

корреляции между географической и филогенетической кластеризацией независимо от хозяина [12, 27]. Штаммы с разной степенью вирулентности для ЛМ также не образовали отдельных клад, хотя для дальневосточных изолятов от пациентов с разной степенью тяжести заболевания КЭ показано разделение на кластеры [28, 29]. Вероятно, для выявления факторов, влияющих на патогенность, необходимо исследование полного генома штаммов.

Для обнаружения различий между группами штаммов Васильченко и Заусаев мы сравнили их по нескольким параметрам: успешности изоляции в зависимости от количества АГ в клеще (по величине экстинкции), доле изолятов при первичном заражении, частоте встречаемости штаммов с высокой периферической активностью и нейроинвазивностью для БМ. Статистически достоверные различия для имеющейся выборки были получены только по длительности инкубационного периода при первичном заражении сосунков БМ. Средние значения данного параметра у групп штаммов Заусаев и Васильченко составили соответственно 4,8 и 7,3 сут. Сравнение этих показателей по U-критерию Вилкоксона, Манна-Уитни показало их существенную разницу ( $U = 54,5; z = 3,30; n_1 = 10; n_2 = 35; p < 0,001$ ). Это позволяет заключить, что исследованная нами группа штаммов Заусаев значительно быстрее вызывает развитие инфекционного процесса КЭ у БМ по сравнению со штаммами Васильченко.

**Выводы**

1. Генотипический пейзаж ВКЭ в Прибайкалье в настоящее время претерпевает изменения, характеризующиеся абсолютным преобладанием сибирского субтипа, представленного двумя группами с прототипными штаммами Заусаев и Васильченко.

2. Группа штаммов Васильченко распространена на всей обследованной территории, штаммы группы Заусаев изолированы в основном в ближайших пригородах Иркутска.

3. Европейский генотип ВКЭ в природных очагах Прибайкалья циркулирует постоянно, и его штаммы обладают высокой вирулентностью для БМ. Доказательством постоянства его циркуляции является выделение штаммов на протяжении многих лет из разных источников в природных очагах КЭ, а также его участие в формировании иммунитета и патологии населения.

4. ВКЭ дальневосточного субтипа в группе изолятов 2006—2014 гг. не обнаружен.

5. Филогенетическое родство исследованных штаммов больше связано с местом, чем с годом и источником выделения изолята.

**Благодарность**

Авторы выражают признательность сотрудникам лаборатории природно-очаговых инфекций и зоолого-паразитологического отдела ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора РФ С.А. Борисову, Т.И. Борисовой, Д.Б. Вержуцкому, Ю.А. Вержуцкой, Е.А. Вершинину, П.Е. Вершинину, М.О. Гориной, Г.В. Зимаревой, И.М. Морозову, Е.Т. Петровой, Н.Н. Пивень, А.В. Севостьяновой, Е.А. Сидоровой, А.Г. Трухиной, А.В. Холину, С.Э. Худченко, Р.А. Шиваренко, Н.В. Яковичу и сотрудникам Института географии им. В.Б. Сочавы СО РАН Н.Е. Красноштановой и С.И. Лесных, принимавшим в разные годы участие в сборе материала.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

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

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1—4, 19, 20, 26—29  
см. REFERENCES)

5. Конькова-Рейдман А.Б., Тер-Багдасарян Л.В., Злобин В.И. Изучение генетической структуры природных популяций вируса и эпидемиология клинических форм клещевого энцефалита на Южном Урале. *Инфекционные болезни*. 2013; 11(Приложение 1): 204—5.
6. Погодина В.В. Актуальные проблемы клещевого энцефалита на современном этапе. *Медицинская вирусология*. 2013; XXVII (1): 11—5.
7. Герасимов С.Г. Эволюция клещевого энцефалита в Центральном федеральном округе России. *Моделирование смены подтипов возбудителя в эксперименте*: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. М.; 2012.
8. Локтев В.Б., Терновой В.А., Нетесов С.В. Молекулярно-генетическая характеристика вируса клещевого энцефалита. *Вопросы вирусологии*. 2007; (5): 10—6.
9. Краминская Н.Н., Живовляпина Р.Р., Мейерова Р.А. Своеобразный штамм вируса КЭ, выделенный от больного с прогрессивным течением заболевания. В кн.: *Актуальные проблемы вирусных заболеваний*. М.; 1965: 190—1.
10. Живовляпина Р.Р. Материалы к изучению штаммов вируса клещевого энцефалита, выделенных в Иркутской области. *Доклады Иркутского противочумного института*. 1971; (9): 163—6.
11. Погодина В.В., Бочкова Н.Г., Корешкова Г.В. Свойства штаммов вируса клещевого энцефалита серотипа Айна/1448. *Вопросы вирусологии* 1981; (6): 741—5.
12. Трухина А.Г. Особенности популяций возбудителя клещевого энцефалита в зоне распространения двух серотипов вируса на территории Прибайкалья: Дисс. ... канд. мед. наук. Иркутск; 1989.
13. Андаев Е.И. Научно-организационные основы эпидемиологического надзора за природно-очаговыми и особо опасными вирусными инфекциями в Восточной Сибири: Дисс. ... докт. мед. наук. Иркутск; 2009.
14. Верхозина М.М., Злобин В.И., Козлова И.В., Демина Т.В., Джиоев Ю.П., Лисак О.В. и др. Эпидемиологический и молекулярно-генетический анализ популяции вируса клещевого энцефалита в Иркутской области. *Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения РАН*. 2007; (Приложение 3): 79—85.
15. Джиоев Ю.П., Беликов С.И., Демина Т.В., Козлова И.В., Клер С.А., Адельшин Р.В. и др. Характеристика генетической дифференциации штаммов вируса клещевого энцефалита на территории Сибири. *Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения РАН*. 2004; (1-3): 112—6.
16. Карань Л.С., Погодина В.В., Колясникова Н.М., Левина Л.С., Герасимов С.Г., Маленко Г.В. и др. Сибирский подтип вируса клещевого энцефалита, доминирующий на территории России. 2. Генетические кластеры. *Медицинская вирусология*. 2013; XXVII (1): 87.
17. Мейхи Б., ред. *Вирусология. Методы*. Перевод с английского. М.: Мир; 1988.
18. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. *Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование*. М.: Мир; 1984.
19. Закс Л. *Статистическое оценивание*. М.: Статистика; 1976.
20. Дрокин Д.А., Злобин В.И., Карганова И.Г., Вихорева Т.В., Якименко В.В., Дживанян Т.И. и др. Изменение геномов штаммов вируса клещевого энцефалита в результате пассажей на мышах. *Вопросы вирусологии*. 1994; (4): 160—2.
21. Горин О.З., Васенин А.А., Ценев Л.В., Зарубинский В.Я. Результаты серологического обследования на арбовирусы населения южных районов Восточной Сибири. В кн.: *Вопросы краевой эпидемиологии и иммунологии*. Ленинград; 1977: 15—8.
22. Мельникова О.В., Вершинин Е.А., Корзун В.М., Сидорова Е.А., Андаев Е.И. Особенности территориального распределения заболеваемости клещевым энцефалитом среди жителей г. Иркутска. *Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения РАН*. 2012; (2-1): 104—9.
23. Погодина В.В. *Вирусы антигенного комплекса клещевого энцефалита (биология, дифференциация, нейровирулентность и связанные с ней особенности патогенеза и иммунологии)*: Автореф. дисс. ... докт. мед. наук. М.; 1966.
- genetical structure of the natural viral populations and the epidemiology of tick-borne encephalitis clinical forms in the South Urals. *Infektsionnye bolezni*. 2013; 11(Suppl. 1): 204—5. (in Russian)
6. Pogodina V.V. The actual problems of tick-borne encephalitis nowadays. *Meditsinskaya virusologiya*. 2013; XXVII (1): 11—5. (in Russian)
7. Gerasimov S.G. *The Evolution of Tick-Borne Encephalitis in the Central Federal Ocrug of Russia. Experimental Modeling of the Agent Subtypes Changing*: Diss. Moscow; 2012. (in Russian)
8. Loktev V.B., Ternovoy V.A., Netesov S.V. Molecular and genetic characteristics of tick-borne encephalitis virus. *Voprosy virusologii*. 2007; (5): 10—6. (in Russian)
9. Kraminskaya N.N., Zhivolyapina R.R., Meyerova R.A. Original tick-borne encephalitis virus strain isolated from patient with chronic form of the disease. In: *Actual Problems of Viral Diseases [Aktual'nye problemy virusnykh zabollevaniy]*. Moscow; 1965: 190—1. (in Russian)
10. Zhivolyapina R.R. The materials for tick-borne encephalitis virus strains study, isolated in Irkutsk region. *Doklady Irkutskogo protivochumnogo instituta*. 1971; (9): 163—6. (in Russian)
11. Pogodina V.V., Bochkova N.G., Koreschkova G.V. Characteristics of the serotype Aina/1448 tick-borne encephalitis virus strains. *Voprosy virusologii*. 1981; (6): 741—5. (in Russian)
12. Trukhina A.G. *The Features of Tick-Borne Encephalitis Virus Populations in the Distribution Area of the Two Viral Serotypes on the Territory of Pribaikalia*: Diss. Irkutsk; 1989. (in Russian)
13. Andaev E.I. *Scientific and Organization Basis of Epidemiological Surveillance for Natural-Focal and Particularly Dangerous Infections in the Eastern Siberia*: Diss. Irkutsk; 2009. (in Russian)
14. Verkhozina M.M., Zlobin V.I., Kozlova I.V., Demina T.V., Dzhioev Yu.P., Lisak O.V. et al. The epidemiological and molecular genetical analysis of tick-borne encephalitis virus population in the Irkutsk region. *Byulleten' Vostochno-Sibirskogo nauchnogo tsentra Sibirskogo otdeleniya RAMN*. 2007; (Suppl. 3): 79—85. (in Russian)
15. Dzhioev Yu.P., Belikov S.I., Demina T.V., Kozlova I.V., Kler S.A., Adel'shin R.V. et al. Characteristics of the tick-borne encephalitis virus strains genetical differentiation in Siberia. *Byulleten' Vostochno-Sibirskogo nauchnogo tsentra Sibirskogo otdeleniya RAMN*. 2004; (1-3): 112—6. (in Russian)
16. Karan' L.S., Pogodina V.V., Kolyasnikova N.M., Levina L.S., Gerasimov S.G., Malenko G.V. et al. The Siberian subtype of the tick-borne encephalitis virus dominating in Russia. 2. Genetic clusters. *Meditsinskaya virusologiya*. 2013; XXVII (1): 87. (in Russian)
17. Mahy B.W.J., ed. *Virology. A Practical Approach*. Washington: IRL Press, Oxford; 1985.
18. Maniatis T., Fritch E., Sembruk Dzh. *Molecular Cloning [Metody geneticheskoy inzhenerii. Molekulyarnoe klonirovanie]*. Moscow: Mir; 1984. (in Russian)
19. Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 1999; 41: 95—8.
20. Huson D.H., Bryant D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol. Biol. Evol.* 2006; 23(2): 254—67.
21. Zaks L. *Statistical Estimation [Statisticheskoe otsenivanie]*. Moscow: Statistika; 1976. (in Russian)
22. Drokin D.A., Zlobin V.I., Karganova I.G., Vikhoreva T.V., Yakimenko V.V., Dzhivanyan T.I. et al. Changing of the tick-borne encephalitis virus strains as a result of passages on laboratory mice. *Voprosy virusologii*. 1994; (4): 160—2. (in Russian)
23. Gorin O.Z., Vasenin A.A., Tsenev L.V., Zarubinskiy V.Ya. The results of serological investigation of the population of Eastern Siberia southern areas for arboviruses. In: *The Problems of Regional Epidemiology and Immunology [Voprosy kraevoy epidemiologii i immunologii]*. Leningrad; 1977: 15—8. (in Russian)
24. Mel'nikova O.V., Verшинin E.A., Korzun V.M., Sidorova E.A., Andaev E.I. The peculiarities of territorial distribution of the tick-borne encephalitis infection between Irkutsk residents. *Byulleten' Vostochno-Sibirskogo nauchnogo tsentra Sibirskogo otdeleniya RAMN*. 2012; (2-1): 104—9. (in Russian)
25. Pogodina V.V. *Viruses of the Tick-Borne Encephalitis Complex (Biology, Differentiation, Neurovirulence and Associated Peculiarities of Pathogenesis and Immunology)*: Diss. Moscow; 1966. (in Russian)
26. Gäumann R., Růžek D., Mühlemann K., Mühlemann K., Strasser M., Beuret C.M. Phylogenetic and virulence analysis of tick-borne encephalitis virus field isolates from Switzerland. *J. Med. Virol.* 2011; 83(5): 853—63.
27. Fajs L., Durmiš E., Knap N., Strle F., Avsic-Zupanc T. Phylogeographic characterization of tick-borne encephalitis virus from patients, rodents and ticks in Slovenia. *PLoS One*. 2012; 7(11): e48420.
28. Leonova G.N., Belikov S.I., Kondratov I.G., Takashima I. Comprehensive assessment of the genetics and virulence of tick-borne encephalitis virus strains isolated from patients with inapparent and clinical forms of the infection in the Russian Far East. *Virology*. 2013; 443(1): 89—98.
29. Belikov S.I., Kondratov I.G., Potapova U.V., Leonova G.N. The relationship between the structure of the tick-borne encephalitis virus strains and their pathogenic properties. *PLoS One*. 2014; 9(4): e94946.

REFERENCES

1. Randolph S.E. Tick-borne encephalitis virus, ticks and humans: short-term and long-term dynamics. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2008; 21(5): 462—7.
2. Kriz B., Maly M., Benes C., Daniel M. Epidemiology of tick-borne encephalitis in the Czech Republic 1970—2008. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2012; 12(11): 994—9.
3. Zeman P., Pazardora P., Benes C. Spatio-temporal variation of tick-borne encephalitis (TBE) incidence in the Czech Republic: Is the current explanation of the disease's rise satisfactory? *Ticks Tick. Borne Diseases*. 2010; 1(3): 129—40.
4. Tokarevich N.K., Tronin A.A., Blinova O.V., Buzinov R.V., Boltanov V.P., Yurasova E.D. et al. The impact of climate change on the expansion of Ixodes persulcatus habitat and the incidence of tick-borne encephalitis in the north of European Russia. *Glob. Health Action*. 2011; 4: 8448.
5. Kon'kova-Reydmán A.B., Ter-Bagdasyan L.V., Zlobin V.I. Study of

## В ПОМОЩЬ ВИРУСОЛОГУ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 578.824.11.083.2

Дедков В.Г.<sup>1,2</sup>, Девяткин А.А.<sup>1-3</sup>, Полещук Е.М.<sup>4</sup>, Сафонова М.В.<sup>1,3</sup>, Маркелов М.Л.<sup>2</sup>, Шипулин Г.А.<sup>1</sup>

### РАЗРАБОТКА И АПРОБАЦИЯ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ РНК КЛАССИЧЕСКОГО ВИРУСА БЕШЕНСТВА МЕТОДОМ ОТ-ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

<sup>1</sup>ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, 111123, г. Москва;

<sup>2</sup>ФГБНУ «НИИ медицины труда», 105275, г. Москва;

<sup>3</sup>ФГБУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова», 142783, г. Москва;

<sup>4</sup>ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора, 644080, г. Омск

С целью повышения эффективности лабораторной диагностики бешенства и оптимизации надзорных мероприятий разработан набор реагентов для выявления РНК вируса бешенства методом обратнотранскриптазной полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флюоресцентной детекцией. Аналитическая чувствительность разработанного набора составила  $4 \cdot 10^3$  копий РНК в 1 мл. Высокая специфичность набора реагентов показана на репрезентативной выборке образцов, содержащих генетический материал родственных вирусов, и на образцах, содержащих мозговую ткань разных видов млекопитающих.

Ключевые слова: вирус бешенства; диагностика; ОТ-ПЦР в реальном времени.

**Для цитирования:** Дедков В.Г., Девяткин А.А., Полещук Е.М., Сафонова М.В., Маркелов М.Л., Шипулин Г.А. Разработка и апробация набора реагентов для определения РНК классического вируса бешенства методом ОТ-ПЦР в реальном времени. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61(4): 235-240.

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-4-235-240

**Dedkov V.G.<sup>1,2</sup>, Deviatkin A.A.<sup>1,2,3</sup>, Poleschuk E.M.<sup>4</sup>, Safonova M.V.<sup>1,3</sup>, Markelov M.L.<sup>2</sup>, Shipulin G.A.<sup>1</sup>**

#### DEVELOPMENT AND EVALUATION OF THE RT-PCR KIT FOR THE RABIES VIRUS DIAGNOSIS

<sup>1</sup>Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, 111123, Russian Federation;

<sup>2</sup>Institute of Occupational Health, Moscow, 105275, Russian Federation;

<sup>3</sup>Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis, Moscow, 142783, Russian Federation;

<sup>4</sup>Omsk Research Institute of Natural Foci Infections, Omsk, 644080, Russian Federation

To improve the diagnosis, surveillance, and control for the rabies virus, a kit for hybridization-triggered fluorescence detection of rabies virus DNA by the RT-PCR technique was developed and evaluated. The analytical sensitivity of the kit was  $4 \cdot 10^3$  GE per ml. High specificity of the kit was shown using representative sampling of viral, bacterial, and human nucleic acids.

Key words: Rabies virus; diagnosis; RT-PCR.

**For citation:** Dedkov V.G., Deviatkin A.A., Poleschuk E.M., Safonova M.V., Markelov M.L., Shipulin G.A. Development and evaluation of the RT-PCR kit for the rabies virus diagnosis. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2016; 61(5): 235-240. (In Russ.).

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-5-235-240

**For correspondence:** Vladimir G. Dedkov, Scientific researcher, Branch of genetic engineering and biotechnology, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russian Federation. E-mail: vgdedkov@yandex.ru

**Funding.** The study had no sponsorship.

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

Received 04 November 2015

Accepted 26 January 2016

#### Введение

Классический вирус бешенства *Rabies virus* (RABV) — нейротропный РНК(-) содержащий вирус, принадлежит к роду *Lyssavirus* семейства *Rhabdoviridae*. Помимо классического вируса бешенства род *Lyssavirus* включает следующие виды: лиссавирус австралийских летучих мышей (ABLV), лиссавирусы европейских летучих мышей типов 1 и 2 (EBL1, 2), вирус Худжанд (KHUV), вирус

Араван (ARAV), вирус Иркут (IRKV), вирус Дувенхаге (DUVV), вирус летучих мышей Лагос (LBV), вирус Моккола (MOKV), западнокавказский вирус летучих мышей (WCBV), вирус летучих мышей Шимони (SHIBV) [1].

Все лиссавирусы являются нейротропными инфекционными агентами, вызывающими необратимые поражения головного мозга человека и теплокровных животных — бешенство. Однако наибольшее эпиде-

**Для корреспонденции:** Дедков Владимир Георгиевич, науч. сотр. группы генной инженерии и биотехнологии ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, 111123, г. Москва. E-mail: vgdedkov@yandex.ru

миологическое и эпизоотологическое значение имеет классический вирус RABV, поскольку является этиологическим агентом подавляющего большинства случаев бешенства, зарегистрированных у животных и человека. Прочие лиссавирусы имеют ограниченные ареалы распространения и ограниченный круг хозяев, в большинстве случаев это летучие мыши. Поэтому инфицирование человека происходит очень редко.

Бешенство относится к зоонозным заболеваниям с контактным механизмом передачи возбудителя. Несмотря на значительный прогресс, достигнутый в сфере эпидемиологического надзора и профилактики [2], случаи заболевания бешенством ежегодно регистрируются на всех континентах за исключением Антарктиды [3]. Так, на территории Российской Федерации в период 2007—2011 гг. зарегистрировали 22 264 случая бешенства животных и 67 случаев бешенства людей [4, 5].

В настоящее время в РФ при лабораторной диагностике бешенства исследуют аутопсийный материал, преимущественно методом флуоресцирующих антител (МФА). В случае отрицательного или сомнительного результата МФА используют вспомогательные способы диагностики заболевания: метод выделения вируса бешенства на животных (белые мыши) или в культуре клеток, иммуноферментный анализ (ИФА), реакцию диффузионной преципитации [6, 7]. Прижизненная диагностика бешенства не практикуется. Данный подход находится в полном соответствии с существующими рекомендациями ВОЗ по лабораторной диагностике бешенства [8]. В рамках данных рекомендаций молекулярные методы диагностики играют вспомогательную роль. Однако использование этих методов, на наш взгляд, имеет большие перспективы, что обусловлено их высокой чувствительностью и специфичностью, а также простотой выполнения и интерпретации результатов в сравнении с большинством применяемых в настоящее время методов. Основанием для такого утверждения является и наш собственный опыт ретроспективной диагностики двух случаев бешенства у пациентов из Астраханской области, погибших в 2003 г. от энцефалита неясной этиологии [9].

Цель работы — создание набора реагентов для выявления РНК RABV методом обратнотранскриптной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) в реальном времени.

### Материал и методы

**Биологический материал.** В работе использован материал 31 штамма RABV, 8 из них были охарактеризованы количественно. Штаммы изолированы из источников, собранных в период 2008—2012 гг., в том числе от диких ( $n = 17$ ), домашних ( $n = 4$ ) и сельскохозяйственных ( $n = 10$ ) животных на территориях Ненецкого автономного округа ( $n = 3$ ), Республики Дагестан ( $n = 4$ ), Республики Тыва ( $n = 4$ ), Республики Хакасия ( $n = 2$ ), Воронежской ( $n = 1$ ), Тверской ( $n = 2$ ), Омской ( $n = 6$ ), Новосибирской ( $n = 3$ ), Липецкой ( $n = 2$ ) областей, Алтайского края ( $n = 2$ ), Красноярского края ( $n = 2$ ). Также использованы 25 образцов первичного положительного по бешенству материала, 23 образца первичного отрицательного по бешенству материала, а также нуклеиновые кислоты следующих вирусов и млекопитающих: семейства *Rhabdoviridae* (вирус Араван, вирус Худжанд), семейства *Bunyaviridae* (вирус Тягиня, вирус Багаи, вирус Дхори, вирус крымской геморрагической лихорадки, вирус Инкоо), семейства *Reoviridae* (вирус Кемерово,

ротавирус), семейства *Togaviridae* (вирус Чикунгунья, вирус Синдбис, вирус краснухи), семейства *Flaviviridae* (вирус желтой лихорадки, вирус лихорадки Западного Нила, вирус клещевого энцефалита), семейства *Picornaviridae* (энтеровирус ЕСНО-71), семейства *Retroviridae* (вирус иммунодефицита человека), ДНК из тканей головного мозга мыши, собаки, кошки, человека. Штаммы RABV, РНК вирусов семейства *Rhabdoviridae* и первичный материал являются частью рабочей коллекции лиссавирусов ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора, прочие образцы вирусной РНК, а также образцы мозговой ткани различных животных — частью коллекции ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора.

**Дизайн олигонуклеотидов.** Геном RABV составляет около 12 000 нуклеотидных оснований (н. о.) и включает 5 последовательно расположенных генов 3'-N-P-M-G-L-5' (N — нуклеопротеин, G — гликопротеин, P — фосфопротеин, M — матриксный белок, L — РНК-зависимая РНК-полимераза), кодирующих соответственно 5 белков и лидерную РНК длиной 50 н. о. Гены разделены некодирующими областями [1]. При этом ген N является наиболее консервативной частью генома RABV [10]. В связи с этим обстоятельством выбор таргетной области для амплификации и детекции RABV осуществляли в пределах последовательности N-гена.

Дизайн праймеров и зонда осуществляли с учетом общих требований, предъявляемых к олигонуклеотидным праймерам и зондам типа TaqMan при проектировании тест-систем в формате ПЦР в реальном времени [11—13]. Оценку температуры плавления праймеров рассчитывали при помощи программы *Oligonucleotide Properties Calculator* [14]. Термодинамические характеристики зонда и возможность образования вторичных структур оценивали с помощью программ *Oligonucleotide Properties Calculator* и *MFOLD* [16].

**Выделение РНК и обратная транскрипция.** Вирусную РНК выделяли с использованием набора РИБО-золь С (ЦНИИЭ, Москва) в соответствии с рекомендациями производителя.

Реакцию обратной транскрипции проводили при помощи набора реагентов для обратной транскрипции Реверта-Л (ЦНИИЭ, Москва) в соответствии с рекомендациями производителя.

**Определение нуклеотидных последовательностей N-гена.** Для определения первичных нуклеотидных последовательностей N-гена амплифицировали по 2 перекрывающихся фрагмента (область перекрытия 76 пар оснований (п. о.)), полученных с помощью двух пар праймеров (табл. 1), в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 10 мкл ПЦР-смеси-2-blue (ЦНИИЭ, Москва), по 0,4 мкМ прямого и обратного праймеров, 2,5 мкл дНТФ (1,76 мМ; ЦНИИЭ, Москва), 2 мкл кДНК RABV.

ПЦР выполняли с использованием «горячего старта» на приборе Терцик («ДНК-технология», Россия) в следующем режиме: 95 °C — 2 мин, 95 °C — 15 с, 57 °C — 25 с, 72 °C — 10 с — 40 циклов; 72 °C — 3 мин.

Наличие ПЦР-продукта необходимой длины контролировали электрофоретическим методом в 1,5% агарозном геле с добавлением бромистого этидия. Очистку ампликонов проводили с помощью набора реагентов QIAquick PCR Purification Kit («Qiagen», Германия). Очищенный ПЦР-продукт секвенировали на приборе для автоматического капиллярного секвенирования ABI PRISM 3500 («Applied Biosystems», США).

Таблица 1

**Олигонуклеотиды, использованные для амплификации и последующего секвенирования фрагментов генома RABV**

Название праймера	Нуклеотидная последовательность, 5'-3'	Позиция референсного сиквенса, н. т. JQ944704 (GeneBank NCBI)	Длина ампликона, п. о.
Rab1f	ACGCTTAACAACAAAATCATAGAAG	1—25	709
Rab1r	AACATGTCGTAGGTTCCGGC	689—708	
Rab2f	ATGACAACCTCACAAAATGTGYGC	632—653	
Rab2r	GGATTGACGAAGATCTTGCTCAT	1514—1536	

Построения выравнивания первичных нуклеотидных последовательностей N-гена 23 штаммов RABV осуществляли с помощью пакета программ CLC Main Workbench 5 («Qiagen», Германия).

*Положительные контрольные образцы.* В качестве положительного контрольного образца (ПКО) ПЦР (К+) использовали участок кДНК N-гена RABV (штамм 8202л\_Омская\_2013) (905 п. о.), включающий фрагмент, являющийся мишенью для праймеров и зонда. Для этого соответствующий ПЦР-продукт очищали с помощью набора MiniElute Gel Extraction Kit («Qiagen», Германия), лигировали в плазмидный вектор pGEM-T («Promega», США) под контролем промотора T7 РНК-полимеразы и трансформировали им *Escherichia coli* (штамм XL1 blue) [15]. Рекombinantные плазмиды из индивидуальных клонов очищали с помощью набора Plasmid Miniprep Kit («Ахуген») и проверяли их на наличие и отсутствие мутаций в области посадки праймеров и зонда. Проверку осуществляли методом Сэнгера с помощью прибора автоматического капиллярного секвенирования ABI-Prism 3500 XL («Applied Biosystems», США).

Плазмиды после измерения концентрации и разведения использовали в качестве ПКО ПЦР (К+), а также

для получения рекомбинантной РНК на основе MS2-фага в защитной белковой оболочке [16, 17]. Полученный продукт обрабатывали ДНКазой-I («Fermentas», Латвия) для удаления остатков ДНК, измеряли концентрацию, разбавляли в стабилизирующем растворе RNA Later («Life Technologies», США) и использовали далее в качестве положительного защищенного РНК-контроля (ПКО). Отсутствие в препарате ПКО остаточной ДНК после обработки контролировали с помощью специфических праймеров и зонда в ходе проведения ПЦР в реальном времени (без стадии обратной транскрипции). Концентрацию положительного контроля ПЦР (К+) и рекомбинантного контроля (ПКО) измеряли на приборе QX100 system («Bio-Rad») с помощью наборов PCR Supermix for Probes Kit («Bio-Rad»), One-step ddPCR Supermix for Probes Kit («Bio-Rad») и специфических праймеров и зонда (табл. 2).

*Внутренний контрольный образец.* Для оценки эффективности выделения РНК из биологического материала в состав набора реагентов включили экзогенный внутренний контрольный образец (ВКО) STI-87гес (ЦНИИЭ, Москва), представляющий собой искусственную последовательность РНК в защитной белковой оболочке на основе MS2-фага длиной 150 н. т. с GC-составом около 50%.

*Состав реакционной смеси и режим амплификации.* ОТ-ПЦР в реальном времени проводили в объеме 25 мкл. Реакционная смесь содержала следующие компоненты: 10 мкл РНК-пробы, по 0,2 мМ праймеров и зонда Rt\_Rab-2f\_Neuer, Rt\_Rab-2r\_Neu, Rt\_Rab-z2\_neu, по 0,2 мМ праймеров и зонда для детекции STI-87гес, 2,5 мкл дНТФ (1,76 мМ; ЦНИИЭ, Москва), 5 мкл смеси RT-PCR mix2 FER/FRT (ЦНИИЭ, Москва), 0,25 мкл MMLV-ревертазы (ЦНИИЭ, Москва), 0,25 мкл RTG-mix2 (ЦНИИЭ, Москва) и 0,5 мкл TaqF-полимеразы (ЦНИИЭ, Москва). Реакцию выполняли в приборе для ПЦР в реальном вре-

Таблица 2

**Структура и основные характеристики праймеров и зонда, используемых в наборе реагентов для диагностики бешенства**

Название праймера	Нуклеотидная последовательность, 5'-3'	Позиция референсного сиквенса, н. т. JQ944704 (GeneBank NCBI)	Длина ампликона, п. о.
Rt_Rab-2f_Neuer	AAGAACCTTTGAGGAAGAGATAAGAAG	857—882	140
Rt_Rab-z2_neu	R6G-AGGAGACAGCTGTTCCCTCACTCCTAT-BHQ1	900—925	
Rt_Rab-2r_Neu	AACACATGACCAACRCGATTCGAT	973—997	

Таблица 3

**Характеристика штаммов RABV, использованных для определения аналитической чувствительности**

Штамм	Год изоляции	Регион изоляции	Источник	Количество частиц в 1 LD <sub>50</sub> /мл	Аналитическая чувствительность, LD <sub>50</sub> /мл	Аналитическая чувствительность, копии ПКО в 1 мл
8202л_Омская_2013	2013	Омская область	Лисица	43 165	0,1	4317
8247ен.соб._Омская_2013	2013	То же	Енотовидная собака	2760	1,0	2760
8300ен.соб._Омская_2013	2013	" "	То же	32150	0,1	3215
8313л_Омская_2013	2013	" "	Лисица	11515	0,1	1152
8315крс_Новосибирская_2013	2013	Новосибирская область	Крупный рогатый скот	5960	0,1	596
8317л_Новосибирская_2013	2013	То же	Лисица	2970	1,0	2970
8318л_Новосибирская_2013	2013	" "	" "	58945	0,1	5895
1п8202л_Омская_2013	2013	Омская область	" "	41595	0,1	4160

Таблица 4

Образцы биологического материала, содержащего RABV

Изолят	Год изоляции	Регион изоляции	Источник изоляции	Пороговый уровень, Ct
7985	2011	Республика Якутия	Северный олень	22,0
8202	2013	Омская область	Лисица	23,5
7496	2008	НАО	Северный олень	22,6
7511	2008	Воронежская область	Лисица	17,8
7551	2008	Белгородская область	" "	15,4
7555	2008	Тюменская область	Северный олень	18,7
7557	2008	То же	Песец	19,1
7558	2008	Республика Дагестан	КРС	16,5
7559	2008	То же	Собака	17,5
7560	2008	" "	Кошка	12,2
7561	2008	" "	Собака	17,7
7576	2008	Тверская область	Енотовидная собака	17,8
7941	2008	Красноярский край	Лисица	15,3
7990	2011	Республика Якутия	Песец	28,3
8093	2011	Республика Тыва	Верблюд	15,8
8300	2013	Омская область	Енотовидная собака	26,6
828 Л 816	1989	Воронежская область	Лисица	22,4
8247	2013	Омская область	Енотовидная собака	14,0
8313	2013	То же	Лисица	16,6
8315	2013	Новосибирская область	КРС	23,4
8317	2013	То же	Лисица	22,3
8318	2013	" "	" "	21,2
1п8202	2013	Омская область	" "	13,3
8229Н	2003	Астраханская область	Человек	33,9
8330Н	2003	То же	" "	29,4

Примечание. НАО — Ненецкий автономный округ; КРС — крупный рогатый скот.

мени Rotor Gene 6000 («Qiagen», Germany) в следующем режиме: 50°C — 15 мин; 95°C — 15 мин; 95°C — 10 с, 57°C — 25 с, 72°C — 10 с; n = 45. Детекцию проводили при 57°C на канале Yellow (для специфического сигнала) и Green (для сигнала внутреннего контроля). Пороговую линию флуоресценции устанавливали в середине линейного участка прироста значения флуоресценции положительного контроля, выраженного в логарифмических единицах. Результаты амплификации интерпретировали как положительные, если наблюдали пересечение кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией.

*Аналитическая чувствительность и специфичность.* Для оценки аналитической чувствительности готовили с 10-кратным шагом разведения ПКО известной концентрации на плазме от здоровых людей, выделяли и исследовали с помощью разработанной диагностической системы для выявления минимального порогового разведения, при котором образец детектируется как положительный. Порог чувствительности устанавливали по минимальному разведению, детектированному в трех повторях.

Аналитическую чувствительность оценивали с помощью 8 штаммов RABV с известной концентрацией, рассчитанной по методу Рида и Менча в единицах LD<sub>50</sub>/мл [18]. Порог чувствительности устанавливали по минимальному разведению, детектированному в трех повторях. Соответствие LD<sub>50</sub>/мл количеству копий защищенного контроля устанавливали в количественной ОТ-ПЦР (табл. 3). В качестве калибраторов использовали разведения препарата ПКО известной концентрации.

Аналитическую специфичность диагностической системы оценивали с помощью РНК 23 штаммов RABV, РНК из высокотитражных культур 17 видов других вирусов, а также ДНК из мозговой ткани животных и человека.

*Диагностическая чувствительность и специфичность.* Диагностическую чувствительность и специфичность оценивали на выборке первичного материала (мозговые суспензии) от инфицированных вирусом

Таблица 5

Образцы биологического материала, отрицательного по RABV

Образец	Год получения материала	Регион изоляции	Источник выделения
8215	2013	Омская область	Норка
8217	2013	То же	" "
8218	2013	" "	" "
8220	2013	" "	" "
8221	2013	" "	" "
8222	2013	" "	" "
8224	2013	" "	Енотовидная собака
8225	2013	" "	Лисица
8226	2013	" "	" "
8229	2013	" "	Енотовидная собака
8230	2013	" "	" "
8233	2013	" "	Лисица
8234	2013	" "	" "
8235	2013	" "	" "
8236	2013	" "	" "
8237	2013	" "	" "
8238	2013	" "	" "
8239	2013	" "	" "
8241	2013	" "	" "
8270	2013	" "	Соболь
8271	2013	" "	Куница
8316	2013	Новосибирск	Собака

Таблица 6

**Определение аналитической чувствительности с помощью штаммов известной концентрации**

Штамм	10 LD <sub>50</sub> /1 мл			1 LD <sub>50</sub> /1 мл			0,1 LD <sub>50</sub> /мл		
8202л_Омская_2013	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8247ен.соб._Омская_2013	+	+	+	+	+	+	+	-	-
8300ен.соб._Омская_2013	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8313л_Омская_2013	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8315крс_Новосибирская_2013	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8317л_Новосибирская_2013	+	+	+	+	+	+	+	+	-
8318л_Новосибирская_2013	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1п8202л_Омская_2013	+	+	+	+	+	+	+	+	+

бешенства животных и человека ( $n = 25$ ; табл. 4) и от животных, у которых вирус бешенства не был обнаружен ( $n = 22$ ; табл. 5). Все образцы предварительно были исследованы при помощи МФА.

**Результаты**

В результате секвенирования получены первичные нуклеотидные последовательности N-гена 23 штаммов RABV, выделенных на различных территориях РФ. На основании полученных сиквенсов, а также данных о последовательностях N-гена, представленных в GeneBank ранее, построено выравнивание, для которого определены участки наибольшей консервативности, и осуществлен дизайн олигонуклеотидных праймеров и зонда для выявления РНК RABV (см. табл. 2). Аналитическая чувствительность, оцененная при помощи разведений ПКО, составила  $4 \cdot 10^3$  копий ПКО в 1 мл. Чувствительность, измеренная с помощью 8 охарактеризованных штаммов, представлена в табл. 3, 6.

При исследовании аналитической специфичности ложноположительных и ложноотрицательных результатов зафиксировано не было.

**Обсуждение**

Как упоминалось выше, общепринятым методом диагностики бешенства является МФА. Однако данный метод имеет ряд недостатков, основной из которых — зависимость его чувствительности от времени, прошедшего между забором материала и проведением анализа. Кроме того, на результаты МФА влияют профессиональные навыки исследователя, качество конъюгата и люминесцентного микроскопа. По данным сравнительного анализа диагностическая чувствительность МФА и ОТ-ПЦР в реальном времени сравнимы только в случае проведения анализа *ex tempore*. В противном случае диагностическая чувствительность ОТ-ПЦР в реальном времени существенно выше и составляет от  $10^2$  до  $10^4$  копий в 1 мл для разных штаммов [19]. Исследования зарубежных ученых, направленные на оценку молекулярных методов для диагностики бешенства, неоднократно демонстрировали их перспективность, особенно в формате ОТ-ПЦР в реальном времени. В частности, продемонстрирована способность выявлять РНК 67 изолятов RABV, циркулировавших на территории Северной Америки. При этом среднее пороговое значение флуоресценции Ct для тестируемых образцов составило 16,4 [19].

Совпадение данных, получаемых при помощи МФА, и данных ОТ-ПЦР в реальном времени показано на примере исследования 5 образцов от больных бешенством животных в Бразилии [20]. В то же время в сравнительных испытаниях 14 тест-систем для выявления РНК RABV и других лиссавирусов, проведенных в 16 европейских лабораториях на панели образцов, разработанной в институте Фридриха Лефлера (Германия), показано, что ни одна тест-система не способна выявлять все генетические варианты RABV, представленные в панели [21].

Таким образом, внедрению метода ОТ-ПЦР в реальном времени в качестве основного мешает как отсутствие зарегистрированных наборов реагентов, так и нерешенные вопросы диагностической чувствительности при использовании такого подхода. В частности, отсутствуют данные о диагностических характеристиках тестов при выявлении различных штаммов RABV. В последние годы на отечественном рынке появился ряд наборов в формате ОТ-ПЦР в реальном времени, позволяющих выявлять РНК RABV. Однако данные системы не имеют удостоверений о государственной регистрации, и их диагностическая ценность не определена.

В результате проделанной работы была создана диагностическая система в формате ОТ-ПЦР в реальном времени для выявления классического RABV, предназначенная для выявления штаммов, циркулирующих на территории РФ. При оценке аналитической чувствительности на выборке из 8 штаммов известной концентрации установлено, что ее значение составляет от  $6 \cdot 10^3$  до  $6 \cdot 10^2$  копий в 1 мл для различных штаммов. Таким образом, аналитическая чувствительность для различных штаммов различается в 10 раз. Однако данное обстоятельство, по нашему мнению, не является существенным, так как концентрация вирусных частиц в мозговой ткани, используемой в качестве исследуемого материала, существенно выше пороговых значений для любого из исследованных штаммов (см. табл. 4).

Таким образом, в рамках данного исследования система продемонстрировала высокие показатели аналитической и диагностической чувствительности, что делает перспективным ее использование в качестве скринингового теста при исследовании животных в рамках эпизоотологического надзора, а также с целью лабораторной диагностики бешенства у людей. Однако окончательное подтверждение диагноза бешенства должно осуществляться на основании МФА или метода биологической пробы до тех пор, пока не будут накоплены данные о диагностической ценности молекулярных методов при выявлении RABV.

**Выводы**

1. Разработана диагностическая система в формате ОТ-ПЦР в реальном времени для выявления РНК штаммов классического RABV.
2. Аналитические характеристики разработанной системы позволяют успешно проводить выявление РНК штаммов RABV, циркулирующих на территории РФ, что было показано на широкой выборке первичного материала от инфицированных бешенством животных и людей, полученного в различных регионах.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

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

**ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1, 2, 8, 10—21 см. REFERENCES)**

3. Информационный бюллетень ВОЗ № 99, сентябрь 2015 года. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs099/ru/>.
4. Полещук Е.М., Сидоров Г.Н., Березина Е.С. *Бешенство в Российской Федерации. Информационно-аналитический бюллетень*. Омск: полиграфический центр Кан; 2013.
5. Полещук Е.М., Сидоров Г.Н., Березина Е.С. Бешенство животных в России в 2007—2011 гг. *Российский ветеринарный журнал. Мелкие домашние и дикие животные*. 2012; (6): 8—12.
6. ГОСТ 26075—2013. Животные. Методы лабораторной диагностики бешенства. М.: Стандартинформ; 2013.
7. Хисматуллина Н.А. Методические указания по лабораторной диагностике бешенства животных. Утверждены Департаментом Ветеринарии Министерства сельского хозяйства и продовольствия Российской Федерации 14 мая 1997 г. М.; 1997.
9. Дедков В.Г., Бекова М.В., Девяткин А.А., Кулешов К.В., Полещук Е.М., Маркелов М.Л. и др. Ретроспективная диагностика двух случаев бешенства у пациентов из Астраханской области. В кн.: *Материалы VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика — 2014»*. М.; 2014: 453—4.

**REFERENCES**

1. King M.Q., Michael A.J., Carstens B.E., Lefkowitz J.E. Virus taxonomy, classification and nomenclature of viruses. In: *Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Amsterdam: Elsevier, Academic Press; 2012: 95—111.
2. Dietzschold B., Faber M., Schnell M.J. New approaches to the prevention and eradication of rabies. *Expert. Rev. Vaccines*. 2003; 2(3): 399—406.
3. WHO Fact Sheet № 99 Updated September 2015. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs099/ru/>. (in Russian)
4. Poleshchuk E.M., Sidorov G.N., Berezina E.S. *Rabies in the Russian Federation. Information-analytical Bulletin [Beshenstvo v Rossiyskoy Federatsii. Informatsionno-analiticheskiy byulleten']*. Omsk: poligraficheskiy tsentr Kan; 2013. (in Russian)
5. Poleshchuk E.M., Sidorov G.N., Berezina E.S. Rabies of animals in the Russian Federation in 2007—2011. *Rossiyskiy veterinarnyy zhurnal. Melkie domashnie i dikiye zhivotnye*. 2012; (6): 8—12. (in Russian)
6. GOST 26075—2013. Animals. Methods of laboratory diagnostics of rabies. Moscow: Standartinform; 2013. (in Russian)
7. Khismatullina N.A. Methodological guideline for laboratory diag-

- agnostics of rabies in animals. Approved by the Veterinary Department of the Ministry of Agriculture and Food of the Russian Federation May 14, 1997. Moscow; 1997. (in Russian)
8. WHO. Expert Consultation on Rabies. Second report. WHO Technical Report Series 982. Geneva: WHO Press; 2013.
9. Dedkov V.G., Bekova M.V., Devyatkin A.A., Kuleshov K.V., Poleshchuk E.M., Markelov M.L. et al. Retrospective diagnosis of two cases of rabies in patients from the Astrakhan region. In: *Proceedings of VIII All-Russian Scientific-Practical Conference with International Participation «Molecular Diagnostics — 2014» [Materialy VIII Vserossiyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem «Molekulyarnaya diagnostika — 2014»]*. Moscow; 2014: 453—4. (in Russian)
10. Delmas O., Holmes E.C., Talbi C., Larrous F., Dacheux L., Bouchier C. et al. Genomic diversity and evolution of the lyssaviruses. *PLoS One*. 2008; 3(4): e2057.
11. Tyagi S., Kramer F.R. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat. Biotechnol.* 1996; 14(3): 303—8.
12. Van Pelt-Verkuil E., van Belkum A., Hays J.P. *Principles and Technical Aspects of PCR Amplification*. NY: Springer; 2008.
13. Yuryev A., ed. *Methods in Molecular Biology. Vol. 402: PCR Primer Design*. Totowa, New Jersey: Humana Press; 2007.
14. Kibbe W.A. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic. Acids Res.* 2007; 35(Web Server issue): W43-6.
15. Maniatis T., Fritsch E.E., Sambrook J. *Molecular Cloning. A laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 2003.
16. Pasloske B.L., Walkerpeach C.R., Obermoeller R.D., Winkler M., Du Bois D.B. Armored RNA technology for production of ribonuclease-resistant viral RNA controls and standards. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36(12): 3590—4.
17. Cheng Y., Niu J., Zhang Y., Huang J., Li Q. Preparation of His-tagged armored RNA phage particles as a control for real-time reverse transcription-PCR detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44(10): 3557—62.
18. Reed L.J., Muench H. A simple method of estimation of fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg.* 1938; 27: 493—7.
19. Dupuis M., Brunt S., Appler K., Davis A., Rudd R. Comparison of Automated qRT-PCR and Direct Fluorescent Antibody Detection for Routine Rabies Diagnosis in the United States. *J. Clin. Microbiol.* 2015; 53(9): 2983—9.
20. Appolinário C., Allendorf S.D., Vicente A.F., Ribeiro B.D., Fonseca C.R., Antunes J.M. et al. Fluorescent antibody test, quantitative PCR pattern and clinical aspects of rabies virus strains isolated from main reservoirs in Brazil. *Braz. J. Infect. Dis.* 2015; 19(5): 479—85.
21. Fischer M., Wernike K., Freuling C.M., Müller T., Aylan O., Brochier B. et al. A step forward in molecular diagnostics of lyssaviruses—results of a ring trial among European laboratories. *PLoS One*. 2013; 8(3): e58372.

Поступила 04.11.15  
Принята в печать 26.01.16