

**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
www.medlit.ru

ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ

Тел./факс +7-495-678-64-84

E-mail: info@idm.msk.ru

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 02.09.2016.

Подписано в печать 12.10.2016.

Формат 60 × 88%.

Печать офсетная.

Печ. л. 6,00.

Усл. печ. л. 5,88.

Уч.-изд. л. 6,36.

Заказ 672.

Отпечатано в типографии ООО

«Подольская Периодика»,

142110, г. Подольск, ул. Кирова, 15

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

Т. 61. № 6. 241–288

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.

6

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., проф.)

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.А. (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 • 6 • 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., Prof.; **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

ОБЗОРЫ

- Щелканов М.Ю., Кириллов И.М., Шестопалов А.М., Литвин К.Е., Дерябин П.Г., Львов Д.К.* Эволюция вируса гриппа А/Н5N1 (1996—2016) 245

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Видяева И.Г., Потапчук М.В., Репко И.А., Петров С.В., Цыбалова Л.М.* Высокорепродуктивные аттенуированные реассортанты H2N2 и H7N9 на основе донора А/Гонконг/1/68/162/35. 257
- Петленко С.В., Осидак Л.В., Смирнов В. С., Стукань Н.И., Афанасьева О.И., Головачева Е.Г.* Сравнительная клинико-лабораторная эффективность препаратов для патогенетического лечения острых респираторных вирусных инфекций 263
- Ибрагимова М.К., Цыганов М.М., Карабут И.В., Чуруксаева О.Н., Шpileва О.Н., Бычков В.А., Коломиец Л.А., Литвяков Н.В.* Интегративная и эписомальная формы генотипа 16 вируса папилломы человека при цервикальных интраэпителиальных неоплазиях и раке шейки матки 270
- Дворянинова О.Ю., Никитина Е.Г., Бычков В.А., Литвяков Н.В.* Генетические аспекты определения папилломавирусной инфекции в опухолевой и прилежащей ткани больных плоскоклеточным раком гортани. 275
- Ярославцева Н.Г., Игнатова Е.Н., Романова Т.Ю., Тихомиров Д.С., Туполева Т.А.* Интерференция вирусов гепатитов В и С при сочетанном инфицировании реципиентов множественных трансфузий. 280

В ПОМОЩЬ ВИРУСОЛОГУ

- Саакян С.В., Мякошина Е.Б., Кричевская Г.И., Слепова О.С., Пантелеева О.Г., Андрияшин А.Е., Хорошилова И.П., Захарова Г.П.* Обследование больных увеальной меланомой на наличие герпесвирусных инфекций 284
- Указатель статей, опубликованных в журнале «Вопросы вирусологии» в 2016 г.* 288

CONTENTS

REVIEWS

- Shchelkanov M.Yu., Kirillov I.M., Shestopalov A.M., Litvin K.E., Deryabin P.G., Lvov D.K.* Evolution of influenza A/H5N1 virus (1996-2016) 245

ORIGINAL RESEARCH

- Vidyaeva I.G., Potapchuk M.V., Repko I.A., Petrov S.V., Tsybalova L.M.* Highly reproductive attenuated H2N2 and H7N9 reassortants on the basis of A/Hong Kong/1/68/162/35 donor virus 257
- Petlenko S.V., Osidak L.V., Smirnov V.S., Stukan' N.I., Afanas'eva O.I., Golovacheva E.G.* Comparative efficiency of pathogen treatment of acute respiratory viral infections 263
- Ibragimova M.K., Tsyganov M.M., Karabut I.V., Churuksaeva O.N., Shpileva O.N., Bychkov V.A., Kolomiets L.A., Litviakov N.V.* Integrative and episomal forms of genotype 16 of human papillomavirus in patients with cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer 270
- Dvoryaninova O.Yu., Nikitina E.G., Bychkov V.A., Litviakov N.V.* Genetic aspects of HPV infection detection in tumor and adjacent tissues of patients with laryngeal squamous cell carcinoma 275
- Yaroslavtseva N.G., Ignatova E.N., Romanova T.Yu., Tikhomirov D.S., Tupoleva T.A.* Hepatitis B and C viruses interference in coinfecting multitransfused recipients 280

TO VIROLOGIST'S AID

- Saakyan S.V., Myakoshina E.B., Krichevskaya G.I., Slepova O.S., Panteleeva O.G., Andryushin A.E., Khoroshilova I.P., Zakharova G.P.* Testing patients with uveal melanoma for herpesvirus infections 284
- Index of articles published in 2016* 288

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

ОБЗОРЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 578.832.1:578.522

Щелканов М.Ю.¹⁻³, Кириллов И.М.⁴, Шестопалов А.М.⁵, Литвин К.Е.⁶, Дерябин П.Г.⁴, Львов Д.К.⁴

ЭВОЛЮЦИЯ ВИРУСА ГРИППА А/Н5N1 (1996–2016)

¹ ГАОУ ВПО «Дальневосточный федеральный университет», 690091, г. Владивосток;² ФГБНУ «Биолого-почвенный институт» ДВО РАН, 690022, г. Владивосток;³ ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Приморском крае», 690091, г. Владивосток;⁴ Институт вирусологии им. Д.И. Иванова ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва;⁵ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины» СО РАН, 630117, г. Новосибирск;⁶ ФГБНУ «Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова» РАН, 119071, г. Москва

Двадцать лет назад в южнокитайской провинции Гуандун вспыхнула эпизоотия, вызванная высоковирулентным вирусом гриппа А/Н5N1, которая положила начало крупнейшей эпизоотии в новейшей истории. Гемагглютинин прототипного штамма A/goose/Guangdong/1/1996 (H5N1), многократно изменяясь и порождая новые генетические подгруппы, участвовал в разнообразных реассортациях и просуществовал вплоть до сегодняшнего дня. Настоящий обзор посвящен ретроспективному анализу эволюции высоковирулентного вируса гриппа А/Н5N1 за последние 20 лет на территории Евразии, Африки и Америки. В основу обсуждения положена экологическая модель, согласно которой на путях миграций с теснейшим контактом между популяциями птиц и в зимовочных ареалах, где достигаются максимальные значения иммунной прослойки, формируются новые генетические варианты, а в местах гнездовых происходит амплификация вирусных вариантов в популяциях неиммунных сеголеток. Используется обновленная система обозначений генетических групп, введенная Рабочей группой ВОЗ/МЭБ/ФАО по эволюции Н5 (WHO/OIE/FAO H5 Evolution Working Group) в 2015 г.

Ключевые слова: вирус гриппа; HPAI/H5N1; эволюция; экология; генетические кластеры; Евразия; Америка; Африка.

Для цитирования: Щелканов М.Ю., Кириллов И.М., Шестопалов А.М., Литвин К.Е., Дерябин П.Г., Львов Д.К. Эволюция вируса гриппа А/Н5N1 (1996–2016). *Вопросы вирусологии*. 2016; 61(6): 245–256.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2016-61-6-245-256>Shchelkanov M. Yu.^{1,2,3}, Kirillov I. M.⁴, Shestopalov A. M.⁵, Litvin K. E.⁶, Deryabin P. G.⁴, Lvov D. K.⁴

EVOLUTION OF INFLUENZA A/H5N1 VIRUS (1996–2016)

¹ Far Eastern Federal University, Vladivostok, 690091, Russian Federation;² Institute of Biology and Soil Sciences, Vladivostok, 690022, Russian Federation;³ Hygienic and Epidemiological Center in Primorsky Krai, Vladivostok, 690091, Russian Federation;⁴ D. I. Ivanovsky Institute of Virology, Federal State Budgetary Institution «Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N. F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation;⁵ Research Institute of Experimental and Clinical Medicine, Novosibirsk, 630117, Russian Federation;⁶ A. N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Moscow, 119071, Russian Federation

Twenty years ago in the South Chinese province of Guangdong the epizooty of highly pathogenic avian influenza (HPAI) H5N1 virus, which has laid the foundation of the largest epizooty in the contemporary history, has flashed. Hemagglutinin of prototype A/goose/Guangdong/1/1996 (H5N1) changing many times and generating new genetic subgroups participated in various reassortations; it still exists today. The present review is devoted to the retrospective analysis of HPAI/H5N1 evolution for the last twenty years in the territory of Eurasia, Africa and America. The basis for the discussion is ecological model according to which new genetic variants are formed in the migration pathways with close contacts between different bird populations and in the overwintering areas where the maximum values of the immune layer occur; amplification of virus variants occurs in nesting areas among juvenile populations. The updated system of designations of genetic groups introduced by WHO/OIE/FAO H5 Evolution Working Group in 2015 is used.

Key words: influenza virus; HPAI/H5N1; evolution; ecology; genetic clusters; Eurasia; America; Africa.

For citation: Shchelkanov M. Yu., Kirillov I. M., Shestopalov A. M., Litvin K. E., Deryabin P. G., Lvov D. K. Evolution of influenza A/H5N1 virus (1996–2016). *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2016; 61(6):245–256. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2016-61-6-245-256>

For correspondence: Mikhail Yu. Shchelkanov, Head of Scientific Laboratory for microorganism ecology, Far Eastern Federal University; Head of Laboratory for virology, Institute of Biology and Soil Sciences; Expert of Hygienic and Epidemiological Center in Primorsky Krai, Vladivostok, 690091, Russian Federation. E-mail: adorob@mail.ru

Для корреспонденции: Щелканов Михаил Юрьевич, зав. науч. лаб. экологии микроорганизмов ГАОУ ВПО «Дальневосточный федеральный университет», 690091, г. Владивосток; зав. вирусологической лаб. ФГБНУ «Биолого-почвенный институт» ДВО РАН, 690022, г. Владивосток; эксперт ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Приморском крае». E-mail: adorob@mail.ru

Information about authors:Shchelkanov M.Y., <http://orcid.org/0000-0001-8610-7623>Lvov D. K. <http://orcid.org/0000-0001-8176-6582>Deryabin P. G. <http://orcid.org/0000-0002-8522-9554>**Acknowledgments.** The study had no sponsorship.**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 10 May 2016

Accepted 24 May 2016

Минуло 20 лет с тех пор, как во время эпизоотии на гусяной ферме в южнокитайской провинции Гуандун был изолирован высоковирулентный штамм вируса гриппа A/goose/Guangdong/1/1996 (H5N1) [1]. Со временем этот штамм породит целую серию вариантов и реассортантов, которые, распространяясь по путям сезонных миграций диких птиц, постепенно захватят Азию, Европу, Африку и проникнут в Северную Америку. Приближающееся развитие полноценной панзоотической ситуации является поводом проанализировать основные этапы эволюции вируса в контексте последней ревизии обозначений генетических групп [2].

Классификация вирусов гриппа А

Вирус гриппа А (Orthomyxoviridae¹, *Influenza A virus*), вызывающий опасные инфекционные заболевания человека и животных, является природно-очаговым возбудителем заболеваний животных и людей. Его резервуар находится в популяциях птиц водно-околоводного экологического комплекса, в первую очередь речных уток (Anatidae, Anatinae), чайковых (Laridae) и крачковых (Sternidae) [3–5].

Геном вируса гриппа А представлен 8 сегментами РНК негативной полярности: [PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M, NS]. Наибольший уровень генетической изменчивости демонстрируют HA и NA, кодирующие соответственно гемагглютинин и нейраминидазу, которые формируют поверхностные пепломеры вириона и являются основными мишенями для противовирусных антител [6–8]. В настоящее время известны штаммы 16 типов HA (H1—H16) и 9 типов NA (N1—N9). Из 144 теоретически возможных комбинаций типов HA и NA (субтипов) известны штаммы 115 субтипов, причем все они обнаружены в популяциях диких птиц в отличие от других хозяев, имеющих более узкий набор субтипов [4–6, 9, 10]. С помощью современных молекулярно-генетических методов у растительноядных летучих мышей Центральной Америки обнаружены субтипы H17N10 и H18N11 [11, 12].

Нуклеотидные последовательности каждого генетического сегмента подразделяются на подтипы и генотипы [9, 10, 13] — PB2: A—C, E—L (11 генотипов); PB1: A—I (8 генотипов); PA: A—K (11 генотипов); HA: H1: A—D (4 генотипа); H2: A—I (9 генотипов); H3: A—D, F (5 генотипов); H4: A—C (3 генотипа); H5: A—C, E—K (10 генотипов); H6: A—G (7 генотипов); H7: A—F (6 генотипов); H8: A (1 генотип); H9: A—C, E—G, I, J (8 генотипов); H10: A—E (4 генотипа); H11: A—C (3 генотипа); H12: A, B (2 генотипа); H13: A—C (3 генотипа); H14: A (1 генотип); H15: A (1 генотип); H16: A, B, C (3 генотипа) (итого для HA 16

подтипов, 70 генотипов); NP: A—H (8 генотипов); NA: N1: A—L (12 генотипов); N2: A—G, I (8 генотипов); N3: A—D, F (4 генотипа); N4: A—C (3 генотипа); N5: B—D (3 генотипа); N6: A—E (5 генотипов); N7: A—G (7 генотипов); N8: A—C (3 генотипа); N9: A, B (2 генотипа) (итого для NA 9 подтипов, 46 генотипов); M: A—G (7 генотипов); NS: подтип 1: A—F (6 генотипов); подтип 2: A, B, D (3 генотипа).

Полный генотип штамма включает указание генотипов всех сегментов, перечисленных в порядке, приведенном в предыдущем параграфе. Например, A/goose/Guangdong/1/1996 имеет полный генотип [K, G, D, 5J, F, 1J, F, 2A] [1, 9].

Варианты вирусов гриппа А птиц, имея аффинность рецепторсвязывающего сайта HA к 2'-3'-сиалозидам, поражают главным образом эпителий кишечника птиц [9, 14]. Инфекция слабовирулентными (LPAI — low pathogenic avian influenza) вариантами этого вируса может протекать инapparантно или в форме несложного энтерита. Высоковирулентные (HPAI — highly pathogenic avian influenza) варианты, связанные с подтипами HA/H5 и HA/H7, вызывают системное заболевание — классическую чуму птиц (КЧП), главными симптомами которой являются поражения нервной и сосудистой систем. Молекулярным маркером HPAI-фенотипа является обогащение сайта протеолитического нарезания HA базофильными аминокислотными остатками [3–6, 9, 15]. КЧП способна вызвать обширные эпизоотии с уровнем падежа, приближающимся к 100% [16].

Варианты вирусов гриппа А, адаптированные к млекопитающим, имея аффинность рецепторсвязывающего сайта HA к 2'-6'-сиалозидам, поражают эпителий слизистой оболочки верхних отделов респираторного тракта. Штаммы с различной рецепторной специфичностью имеют различную структуру рецепторсвязывающего сайта HA [3, 4, 9, 17–19].

Экологическая модель формирования новых генетических вариантов

Интенсивные популяционные взаимодействия птиц водно-околоводного экологического комплекса — основных хозяев вируса гриппа А — приводят к возникновению новых вирусных вариантов, которые амплифицируются, попадая в новые неиммунные популяции.

Движущей силой формирования новых генетических подгрупп является асимметрия экологических условий циркуляции вируса в гнездовых и зимовочных ареалах диких птиц. В период миграций в местах остановок происходит массовый обмен вирусами среди птиц из разных популяций одного и того же и различных видов [20]. На зимовках скапливается большое количество иммунных особей, уже проконтактировавших с вирусом. Это приводит к интенсивному генетическому дрейфу и появлению новых генетических вариантов, которые после весенней миграции попадают в гнездовые ареалы, селекционируются и амплифицируются в популяциях неиммунных сеголетних особей [3–5, 9, 20–22]. «Обширные пространства

¹ Семейство Orthomyxoviridae в настоящее время включает 6 родов: *Influenza A virus* (вирус гриппа А); *Influenza B virus* (вирус гриппа В); *Influenza C virus* (вирус гриппа С); *Thogotovirus* (вирусы Тогото (прототипный), Баткен, Дхори); *Quarantjavirus* (вирусы Кваранфил (прототипный), Джонстон-атолл, озера Чад, Тюлек); *Isavirus* (вирус инфекционной анемии лососевых) [4, 5, 10].

Северной Евразии можно сравнить с «кухней», где циркулируют различные генотипы вирусов гриппа А, а Юго-Восточную Азию — со «столовой», где происходит формирование высокопатогенных штаммов» [4, с. 82].

По мере накопления молекулярно-генетических данных Рабочая группа ВОЗ/МЭБ/ФАО по эволюции H5 (WHO/OIE/FAO H5 Evolution Working Group) вводила цифровые обозначения для генетических кластеров [2, 23]. Однако отсутствие в ней российских специалистов привело к тому, что не все генетические подгруппы, распространенные в Северной Евразии, получили номерное обозначение. Наиболее адекватным является сочетание номерных и собственноименных названий, сложившихся в русскоязычной научной литературе (см. далее).

Развитие эпизоотии HPAI/H5N1 в период 1997—2004 гг.

Первая волна реассортаций с участием прототипного A/goose/Guangdong/1/1996 [K, G, D, 5J, F, 1J, F, 2A] прошла в 1996—1997 гг., что привело к появлению генотипа <O>² (рис. 1) [1, 24—26]. Вторая волна эпизоотии началась в 1999—2000 гг., и уже к 2001 г. сформировалась группа штаммов HPAI/H5N1/2001, которые принадлежали к новым реассортантным генотипам <A> — <E>, <X₀>, <W> [27—30]. Некоторые авторы [29] дополнительно выделяют генотипы <X₁>—<X₃>, предшественники которых неизвестны, однако они не получили широкого распространения.

Увеличение генетического разнообразия происходило не только в группе HPAI/H5N1/2001 (которая не являлась изолированной), но и среди LPAI. Последнее было зафиксировано в ходе мониторинга гриппа А птиц осенью 2001 г. в пределах Дальневосточно-Притихоокеанского миграционного русла, когда на юге Приморского края были изолированы A/duck/Primorje/2633/2001 [G, G, D, 5H, F, 3B, F, 1E] и A/duck/Primorje/2621/2001 [K, G, D, 5H, F, 2D, F, 1E] [31, 32]. Это позволило отечественным специалистам предположить [31] приближение новой волны эпизоотии, связанной с HPAI/H5N1, в Юго-Восточной Азии. Действительно, на рубеже 2001—2002 гг. реассортации между и <X₀> привели к формированию <Z> и <Z⁺>, а , <D> и <X₀>—<Y> [29, 30] (см. рис. 1). С января 2002 г. <Z> начинает вытеснять остальные генотипы в южных провинциях Китая, а осенью 2003 г. полномасштабная эпизоотия HPAI/H5N1/<Z> охватила Юго-Восточную Азию [29]. При этом близкий к <Z> генотип <Z⁺> в феврале 2003 г. впервые с 1997 г. вызвал заболевания людей в Гонконге (A/HK/212/2003 и A/HK/213/2003). В 2003 г. <Z> участвовал в реассортации, приведшей к появлению генотипа <V>, в 2004 г. — <G> (см. рис. 1).

Все перечисленные генотипы HPAI/H5N1, кроме <X₀>—<X₃>, имели Δ_{80-84}^{NS1} (пятичленную делецию³ A₈₀IASS₈₄ в белке NS1 относительно родительского штамма A/goose/Guangdong/1/1996) и $\Delta_{92}^{NS1}E$, что повышает вирулентность по отношению к клеткам млекопитающих

и устойчивость к действию интерферона [33, 34]. Большинство генотипов за исключением , <W>, <Z⁺> и <G> содержат Δ_{49-68}^{NA} (C₄₉NQSIITYENNTWVNQTYVN₆₈ vs A/goose/Guangdong/1/1996); эта делеция в стеблевой части NA резко повышает вирулентность по отношению к курам (но не отменяет ее по отношению к другим видам птиц) [34, 35]. До 2004 г. подавляющее большинство штаммов независимо от генотипа не имели мутаций, свидетельствующих о потере чувствительности и появлении резистентности к ремантадину/амантадину (в первую очередь S₃₁^{M2}N или L₂₆^{M2}I, {V},₂₇^{M2}IG, A, S, T, {A₃₀}^{M2}IV, T, S, P, G₃₄^{M2}E) и озельтамивиру (E₉₉^{NA}V, H₂₅₅^{NA}Y, R₂₇₂^{NA}K, N₂₇₅^{NA}S). Неконтролируемое применение амантадина на птичьих фермах в Юго-Восточной Азии привело к тому, что большинство штаммов из этого региона, изолированных от сельскохозяйственных птиц после 2004 г., обладали резистентностью к ремантадину/амантадину [36, 37].

Стремительное распространение HPAI/H5N1 в популяциях диких и домашних птиц, начавшееся в Юго-Восточной Азии осенью 2003 г., стало самой масштабной эпизоотией за всю историю их научного описания начиная с 1959 г. [9, 38]. Уже в 2004 г. масштабы эпизоотии позволили отечественным специалистам выдвинуть предположение о возможном заносе вируса на территорию Северной Евразии [31]. Так и произошло.

Развитие эпизоотии HPAI/H5N1 в период 2005—2007 гг.

В апреле 2005 г. на оз. Кукунор⁴ в провинции Цинхай КНР (рис. 2) вспыхнула эпизоотия, этиологически связанная с HPAI/H5N1/<Z>/H5J 2.2 [39—41]. Согласно предварительным данным [39, 40], эпизоотия была вызвана единичным заносом вируса. Однако анализ более полных данных выявил заметное генетическое разнообразие⁵ [41]: ранние штаммы имели обычную для птичьих штаммов E₆₂₇^{PB2}, а поздние — замену E₆₂₇^{PB2}K, которая повышает уровень репликации вируса в клетках млекопитающих [42]. Нуклеотидные последовательности НА цинхайских штаммов (рис. 3) формируют достаточно рыхлый кластер, и даже функционально важный сайт протеолитического расщепления имеет аминокислотные замены, что согласуется с гипотезой о множественных независимых путях заноса вируса.

Вероятнее всего, зимой 2004—2005 гг. в западных областях Юго-Восточной Азии сформировались популяции зимующих диких птиц, обладающих достаточной устойчивостью к развитию заболевания при инфекции HPAI/H5N1/<Z>, и во время весеннего перелета 2005 г. вирусные штаммы начали свое перемещение на север вдоль Джунгарского миграционного русла, связывающего Юго-Восточную Азию со Средней Азией и Западной Сибирью (см. рис. 2). Озеро Кукунор является не только крупным гнездовым ареалом, но и крупнейшим миграци-

²Здесь и далее с помощью угловых скобок мы будем обозначать реассортационные генотипы, образованные в результате обмена генетическими сегментами, чтобы отличать их от генотипов отдельных генетических сегментов.

³Соответствующая делеция отсутствует в белке NS2, поскольку делетированный фрагмент входит в состав сплайсируемого участка в процессе формирования альтернативной ORF для NS2 [9].

⁴Озеро Кукунор (монг.), или Цинхай (кит.), или Цо Нгонпо (тибет.) является крупнейшим (105 × 65 км; 4200 км²) бессточным соленым (11 г/л) озером Центральной Азии, расположенным в северо-восточной части Тибетского плато на высоте 3200 м над уровнем моря. Первое научное описание озера Кукунор дано русским путешественником и натуралистом Н.М. Пржевальским в 1872 г.

⁵В работе [41] проведена классификация штаммов HPAI/H5N1/<Z>, изолированных на озере Кукунор в мае—июне 2005 г., на основе различных генетических паттернов; при этом вводятся понятия локальных генотипов, обозначаемых латинскими буквами, что может вызвать путаницу с ранее описанными генотипами.

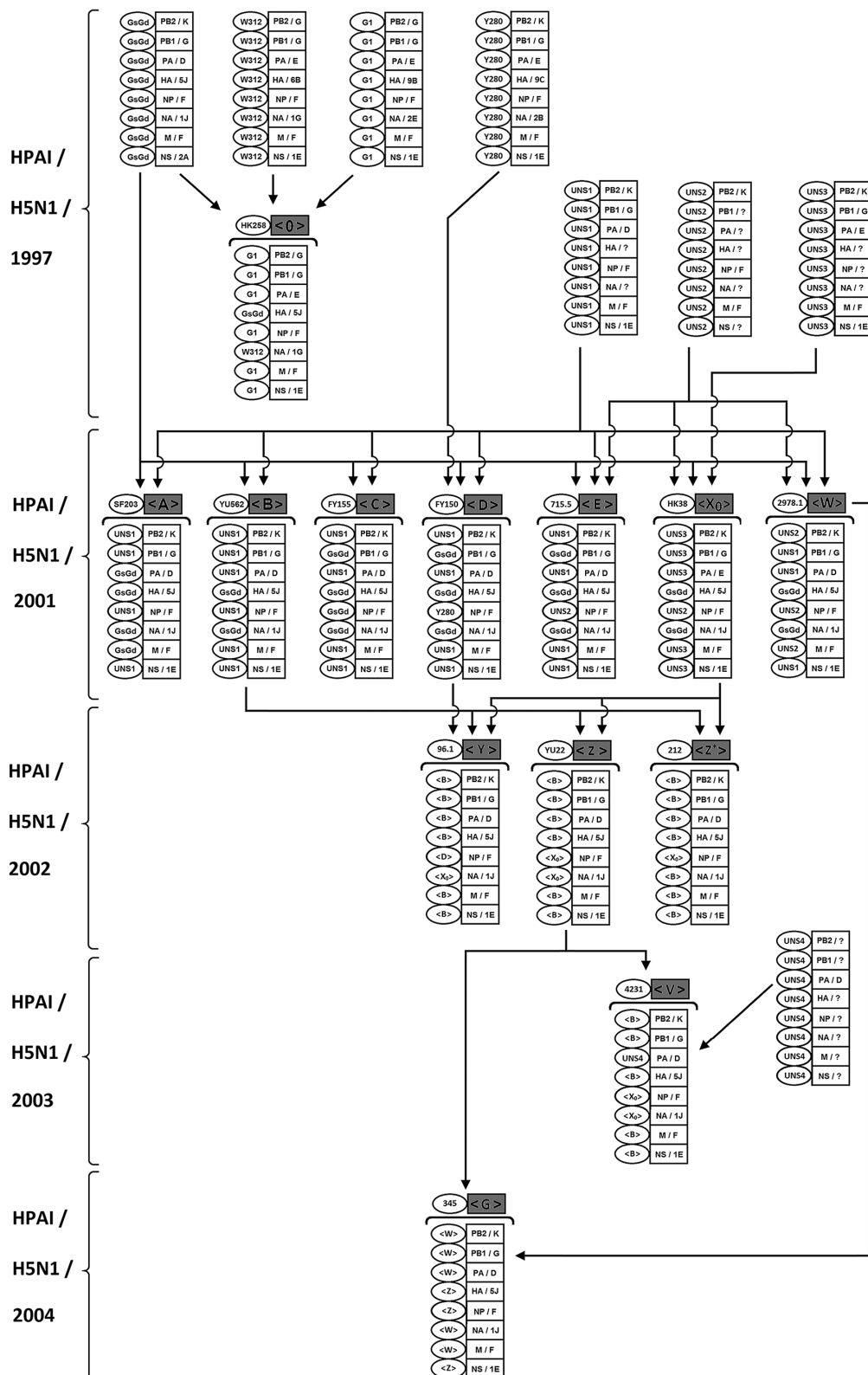


Рис. 1. Схема формирования реассортационных генотипов HPAI/H5N1 в период 1997—2004 гг. на территории Юго-Восточной Азии. Сокращенные обозначения штаммов: 212 — A/HK/212/2003 (H5N1); 2978.1 — A/teal/China/2978.1/2002 (H5N1); 345 — A/goose/Guangxi/345/2005 (H5N1); 4231 — A/chicken/Shantou/4231/2003 (H5N1); 715.5 — A/chicken/HK/715.5/2001 (H5N1); 96.1 — A/chicken/HK/96.1/2002 (H5N1); FY150 — A/chicken/HK/FY150/2001 (H5N1); FY155 — A/pheasant/HK/FY155/2001 (H5N1); HK38 — A/guinea fowl/HK/38/2002 (H5N1); HK258 — A/chicken/HK/258/1997 (H5N1); G1 — A/quail/HK/G1/1997 (H9N2); GsGd — A/goose/Guangdong/1/1996 (H5N1); SF203 — A/quail/HK/SF203/2001 (H5N1); UNS1, UNS2, UNS3 — неидентифицированные штаммы; W312 — A/teal/HK/W312/1997 (H6N1); Y280 — A/duck/HK/Y280/1997 (H9N2); YU22 — A/chicken/HK/YU22/2002 (H5N1); YU562 — A/chicken/HK/YU562/2001.

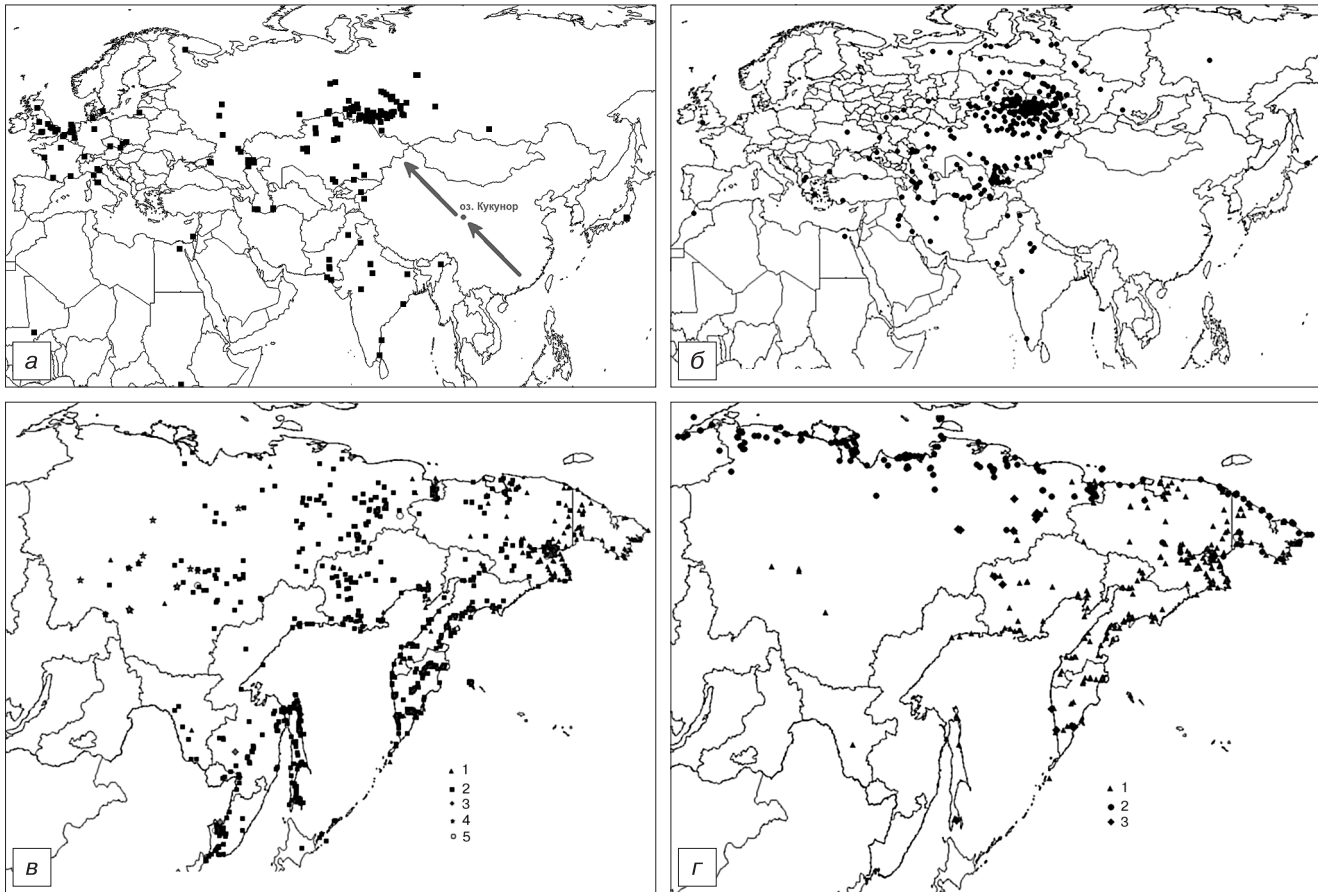


Рис. 2. Миграции речных уток (*Anatidae*, *Anatinae*) в Северной Евразии, по данным Центра кольцевания птиц ИПЭЭ РАН:

а — места кольцевания уток, встреченных на территории Западной Сибири (здесь и далее на рис. 2: в Томской, Новосибирской и Омской областях); показаны оз. Кукунор и Джунгарский пролетный путь (стрелками); *б* — прямые возвраты (т. е. весенние и летние возвраты, для которых промежуток времени между кольцеванием и находкой составлял не более 365 сут) колец с уток, окольцованных в Западной Сибири; *в* — возвраты колец с шилохвостей (*Anas acuta*), окольцованных в различных странах: 1 — США и Канада, 2 — Япония, 3 — Гонконг, 4 — Индия, 5 — Южная Корея; *г* — возвраты колец с массовых видов уток с американскими кольцами на территории Северо-Восточной Евразии: 1 — шилохвость (*A. acuta*), 2 — сибирская гага (*Polysticta stelleri*), 3 — морянка (*Clangula hyemalis*).

онным хабом, где перелетные птицы концентрируются в огромных количествах перед решающим «броском» через опустыненные Джунгарские ворота⁶. Высокий уровень популяционных взаимодействий в пределах смешанных птичьих колоний на островах озера Цинхай и привел к развитию эпизоотии HPAI/H5N1/<Z> в результате заноса из нескольких независимых источников.

Последующее проникновение HPAI/H5N1/<Z> в Западную Сибирь весной 2005 г. оставалось незамеченным вплоть до середины июля [3—6, 9, 21, 43—46]. Официально началом эпизоотии принято считать 10.07.2005, однако ретроспективно было установлено, что падеж среди диких птиц начался не позднее середины июня. Сильные дожди, прошедшие в начале июля, привели к поднятию уровня межгорных озер ложинно-западного рельефа, хорошо выраженного в Чановской котловине, что привело к интенсифи-

кации популяционных контактов диких и домашних птиц [9].

Западносибирские штаммы HPAI/H5N1/<Z>/2005 формируют достаточно компактную генетическую подгруппу, близкую к Цинхайским штаммам мая 2005 г. (некоторые из них даже продолжали принадлежать к Цинхайской подгруппе, например A/grebe/Novosibirsk/29/2005 на рис. 3). HA западносибирских штаммов относился к генетической группе H5J 2.2, которая в русскоязычной литературе получила название «Цинхай-Сибирская» [9, 44, 47]. Именно HPAI/(H5J 2.2)N1/<Z> распространился в Северной Евразии и вызвал здесь крупнейшую в истории эпизоотию среди диких и сельскохозяйственных птиц. При этом Цинхай-Сибирская генетическая группа в Северной Евразии все время сохраняла исходную мутацию E₆₂₇K, а также чувствительность к озельтамивиру и ремантадину/амантадину [9, 14, 22, 47—49].

Мониторинговые исследования не выявили циркуляции HPAI/H5 в популяциях диких птиц на территории Северной Евразии в период с 1962 г. вплоть до описываемых событий 2005 г. [3—6, 9, 22, 32, 50—55].

Распространение HPAI/H5JN1/2.2.1 Западносибирской подгруппы в Северной Евразии осенью 2005 г. происходило в южном направлении вдоль Индо-Азиатского

⁶ Термин «Джунгарские ворота» ввел русский путешественник и натуралист И.В. Мушкетов для обозначения узкого прохода (50 × 10 км), связывающего Джунгарскую равнину с Балхаш-Алакольской котловиной. В широком смысле под Джунгарскими воротами понимается тектоническое понижение между Тянь-Шанем и Монгольским Алтаем.

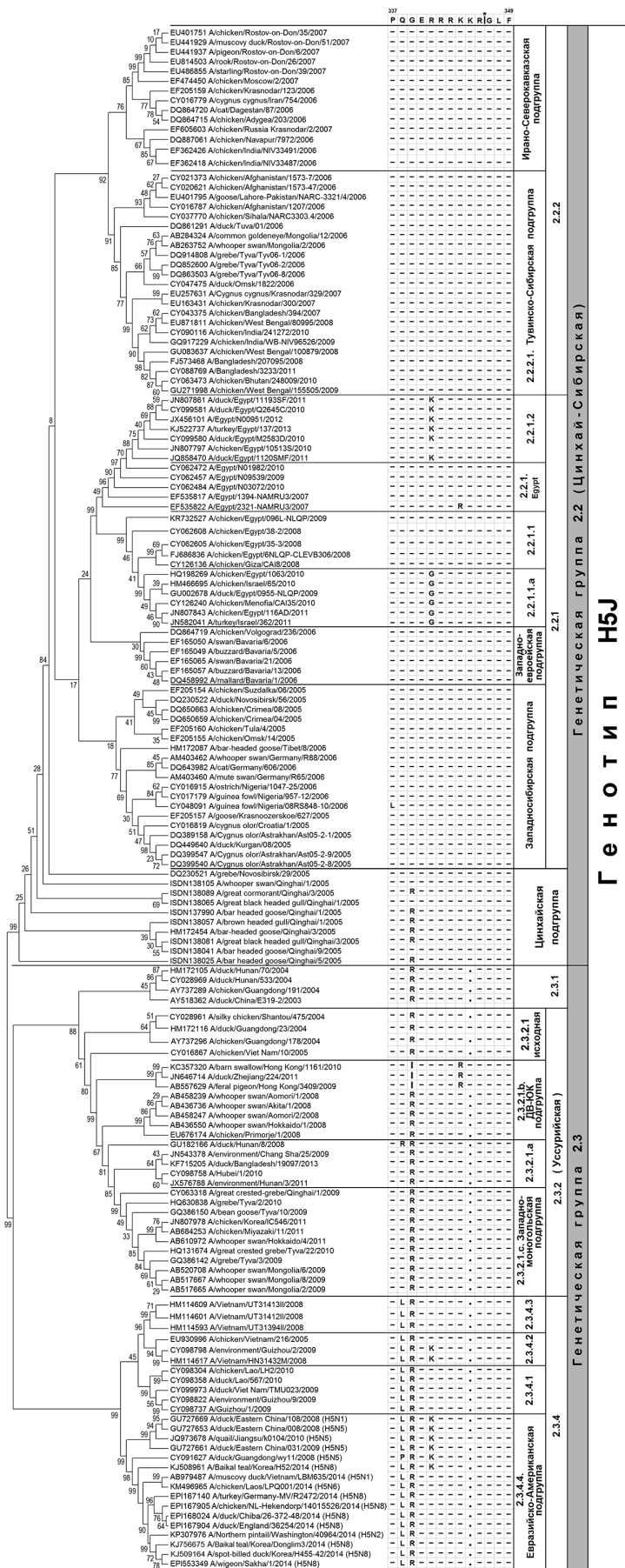


Рис. 3. Кластер-анализ нуклеотидных последовательностей полноразмерных генов НА НРА1/Н5J различных генетических подгрупп. Перед названием штамма указан идентификационный номер международной базы данных GenBank за исключением тех, которые начинаются с «EP» (международная база данных GISAD) и «ISDN» (база данных группы теоретической биологии Лос-Аламосской национальной лаборатории, США). Если субтип отличается от H5N1, он указан в скобках после названия штамма. Приведены аминокислотные последовательности сайта протеолитического нарезания НА в позициях 337–349 (точка разрыва ковалентной связи отмечена вертикальной чертой со звездочкой): «—» — соответствие консенсусу, приведенному сверху; замены относительно консенсуса обозначаются аминокислотами в однобуквенной нотации; точкой обозначена делеция. Сокращение ДВ-ЮК — Дальневосточно-Южнокуйтайская.

миграционного русла (в результате чего вирус проник на полуостров Индостан) и в юго-западном направлении вдоль Восточно-Европейского миграционного русла диких птиц, которые занесли вирус на юг Русской равнины (крупная эпизоотия была описана в дельте Волги [9, 22, 56, 57]), в Черноморско-Прикаспийский регион, откуда вирус проник в страны Восточной и Западной Европы, Закавказья, Ближнего Востока и Африки. В результате циркуляции вируса в Западно- и Южно-Европейском зимовочном ареале сформировалась Западноевропейская подгруппа в составе 2.2.1, которая весной 2006 г. регистрировалась в европейской части России (например, A/chicken/Volgograd/236/2006) в результате обратного заноса мигрирующими птицами. В зимовочном ареале в нижнем течении Нила (Египет) зимой 2005—2006 г. появилась генетическая подгруппа 2.2.1. Египт, которая быстро распространилась среди кур и вызвала волну заражений людей на рынках живой птицы [58].

Другой зимовочный ареал — на полуострове Индостан — в 2005—2006 г. стал местом естественной селекции Тувинско-Сибирской подгруппы (2.2.2.1), которая амплифицировалась летом 2006 г. в Западной Сибири, предгорном Алтае и Котловине Больших озер на западе Монголии [9, 22, 59], а затем с мигрирующими птицами проникла в европейскую часть и закрепилась в Кубанско-Приазовской низменности. Штаммы Тувинско-Сибирской подгруппы (2.2.2.1) изолировались здесь начиная с осени 2006 г. В сентябре 2007 г. крупная эпизоотическая вспышка, связанная с НРА1/Н5JN1/2.2.2.1, была зарегистрирована на Кубанско-Азовских плавнях вдоль восточного побережья Азовского моря [9, 22, 60].

В зимовочном ареале на территории Закавказья, включая южное побережье Каспийского моря и Ближний Восток, зимой 2005—2006 г. выделилась генетическая подгруппа, позже названная Ирано-Северокавказской. Это название объясняется тем, что штаммы этой подгруппы были обнаружены на Северном Кавказе уже весной 2006 г., а в феврале 2007 г. произошла уникальная в своем роде — при отсутствии птичьих перелетов — эпизоотическая вспышка в 9 точках Московского региона. Штаммы, оперативно изолированные во всех

9 точках, продемонстрировали чрезвычайно высокий уровень генетической гомогенности, указывавший на единый источник инфекции — им оказался Птичий рынок на окраине Москвы, куда завезли живых кур с Северного Кавказа. Молекулярно-генетический анализ прототипного штамма A/chicken/Moscow/2/2007 позволил установить его филогенетическое родство со штаммами HPAI/H5N1/2.2.2, изолированными в Причерномоско-Каспийском регионе, Иране и Индии [9, 22, 61]. Эти штаммы были выделены в отдельную генетическую подгруппу, получившую название «Ирано-Северокавказская» (см. рис. 3). В декабре 2007 г. HPAI/H5N1/2.2.2 вызвал обширную эпизоотию в Ростовской области. Особенностью этой эпизоотии было активное вовлечение в инфекционный процесс диких птиц наземного экологического комплекса, которые скапливаются на юге Русской равнины в суровые зимы [9, 22, 62].

В период 2005—2007 гг. в Государственную коллекцию вирусов РФ на базе НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского были депонированы 50 штаммов подгруппы 2.2.1 (см. рис. 3): из них 1 штамм принадлежал к Цинхайской генетической подгруппе (A/grebe/Novosibirsk/29/2005), 15 — к Западносибирской, 10 — к Тувинско-Сибирской, 24 — к Ирано-Северокавказской. Анализ биологических свойств этих штаммов показал постепенное снижение вирулентности [9, 22, 63] при одновременном расширении рецепторной специфичности в процессе эволюции на территории Северной Евразии. Затуханию эпизоотического процесса существенно способствовало широкое внедрение в РФ отечественной вакцины против HPAI/H5JN1 [64].

Развитие эпизоотии HPAI/H5J в период 2008—2012 гг.

Распространение HPAI/H5JN1/2.2.1 в период с весны 2005 г. по осень 2007 г. происходило в западном секторе Северной Евразии⁷. Мониторинговые исследования в Восточной Сибири и на Дальнем Востоке не выявили присутствия там HPAI/H5 [3—6, 9, 22, 53, 54] вплоть до весны 2008 г., хотя угроза его проникновения сюда оценивалась как высокая по двум основным причинам: во-первых, Юго-Восточная Азия связана с Дальним Востоком интенсивным Дальневосточно-Притихоокеанским миграционным руслом [20, 65] (см. рис. 2); во-вторых, в Южной Корее и Японии получил распространение HPAI/H5JN1/2.5 (прототипный штамм A/chicken/Korea/ES/2003) [23, 66].

В начале апреля 2008 г. вирус HPAI/H5JN1/2.3.2 с мигрирующими дикими птицами проник на территорию юга Приморского края, вызвав локальную эпизоотию среди непривитых домашних птиц в с. Воздвиженка Уссурийского городского округа (по этой причине подгруппа 2.3.2 получила название «Уссурийская») и распространившись далее на север — по крайней мере до Ханкайской низменности [4, 5, 9, 22, 67]. Вполне вероятно, что вирус проник гораздо севернее, вплоть до побережья Северного Ледовитого океана, однако отсутствие там индикаторных сельскохозяйственных птиц и мониторинговых исследований в природных биоценозах не позволило провести корректное выявление HPAI/H5JN1/2.3.2. Уже тогда стало очевидно, что появилась «...возможность в обозримом

будущем заражения в местах гнездования видов птиц, зимующих в Америке ...» [67, с. 8].

Штаммы Уссурийской подгруппы, изолированные весной 2008 г. — A/chicken/Primorje/1/2008 и A/Anas crecca/Primorje/8/2008, — оказались близки штаммам, изолированным ранее в южных провинциях Китая, Вьетнаме и Лаосе (см. рис. 3). Поэтому наиболее вероятной гипотезой был занос вируса зимующими там чирками-свистунками (*Anas crecca*). Когда позже накопилось большое количество представителей Уссурийской подгруппы и потребовалось более тонкое таксономическое деление, штаммы из Юго-Восточной Азии 2004—2007 гг. сформировали подгруппу 2.3.2.1. В 2008—2009 гг. эта подгруппа разделилась на 3 части: эволюция HPAI/H5JN1/2.3.2.1 в популяциях местных азиатских птиц привела к появлению подгруппы 2.3.2.1.a; проникновение одного из вариантов HPAI/H5JN1/2.3.2.1 вдоль Дальневосточно-Притихоокеанского миграционного русла на Дальний Восток [67] (в том числе через Японию [68]) и амплификация в гнездовом ареале на северо-востоке Сибири сформировали подгруппу, названную «Дальневосточно-Южнокитайская» [9, 22], или 2.3.2.1.b; проникновение другого варианта HPAI/H5JN1/2.3.2.1 вдоль Джунгарского пролетного русла в Котловину Больших озер и амплификация его в гнездовом ареале на западе Монголии привели к появлению «Западномонгольской подгруппы» [5, 9, 22], или 2.3.2.1.c. В 2009—2011 гг. подгруппа 2.3.2.1.b существенно эволюционировала, устойчивые мутации появились даже в области протеолитического нарезания HA (см. рис. 3), поэтому назрел вопрос о выделении более поздних штаммов 2.3.2.1.b в отдельную подгруппу.

С появлением Уссурийской подгруппы в Северной Евразии сформировалась генетическая стратификация: Цинхай-Сибирская группа (2.2) — в западном, Уссурийская (2.3.2) — в восточном секторе. Дистанция между полноразмерными нуклеотидными последовательностями HA HPAI/H5JN1/2.3.2 и HPAI/H5JN1/2.2 составляет 4,5—7%, в среднем 5,8%, а сайт протеолитического расщепления HA имеет заметные отличия (см. рис. 3). При этом в Котловине Больших озер на западе Монголии начиная с 2009 г. Западномонгольская подгруппа (2.3.2.1.c) полностью вытеснила Тувинско-Сибирскую подгруппу (2.2.2.1) [5, 9, 22]. С 2008 г. эволюция подгруппы 2.2.1 сосредоточилась на западе ареала HPAI/H5JN1/2.2 в Старом Свете — в дельте Нила, где не удалось остановить эпизоотию среди сельскохозяйственных птиц и надежно предотвратить их популяционные взаимодействия с дикими, — в результате сформировались новые подгруппы 2.2.1.1, 2.2.1.1.a, 2.2.1.2 (см. рис. 3) [58].

Начиная с 2008 г. — в то время как подгруппа 2.3.2 начала активно осваивать восточный сектор Северной Евразии — в Юго-Восточной Азии эта подгруппа стала активно вытесняться подгруппой 2.3.4. При этом нумерация четвертого уровня, 2.3.2.*, не соответствует хронологии их появления: сначала появилась 2.3.4.2, затем 2.3.4.4, 2.3.4.3 и 2.3.4.1; кроме того, существовавшая некоторое время подгруппа 2.3.4.6. была впоследствии сведена к 2.3.4.4 [2, 23].

Согласно данным Y. Tang и соавт. [69], замена Q_{338}^{HA} и делеция в 345-й позиции относительно консенсуса сайта протеолитического нарезания HA (см. рис. 3) способствуют повышению репликативной способности в утках. Возможно, по этой причине генетическая группа 2.3 широко распространилась в Юго-Восточной Азии.

⁷ Западнее р. Енисей; при этом западномонгольская Котловина Больших озер находится примерно на границе между западным и восточным секторами Северной Евразии.

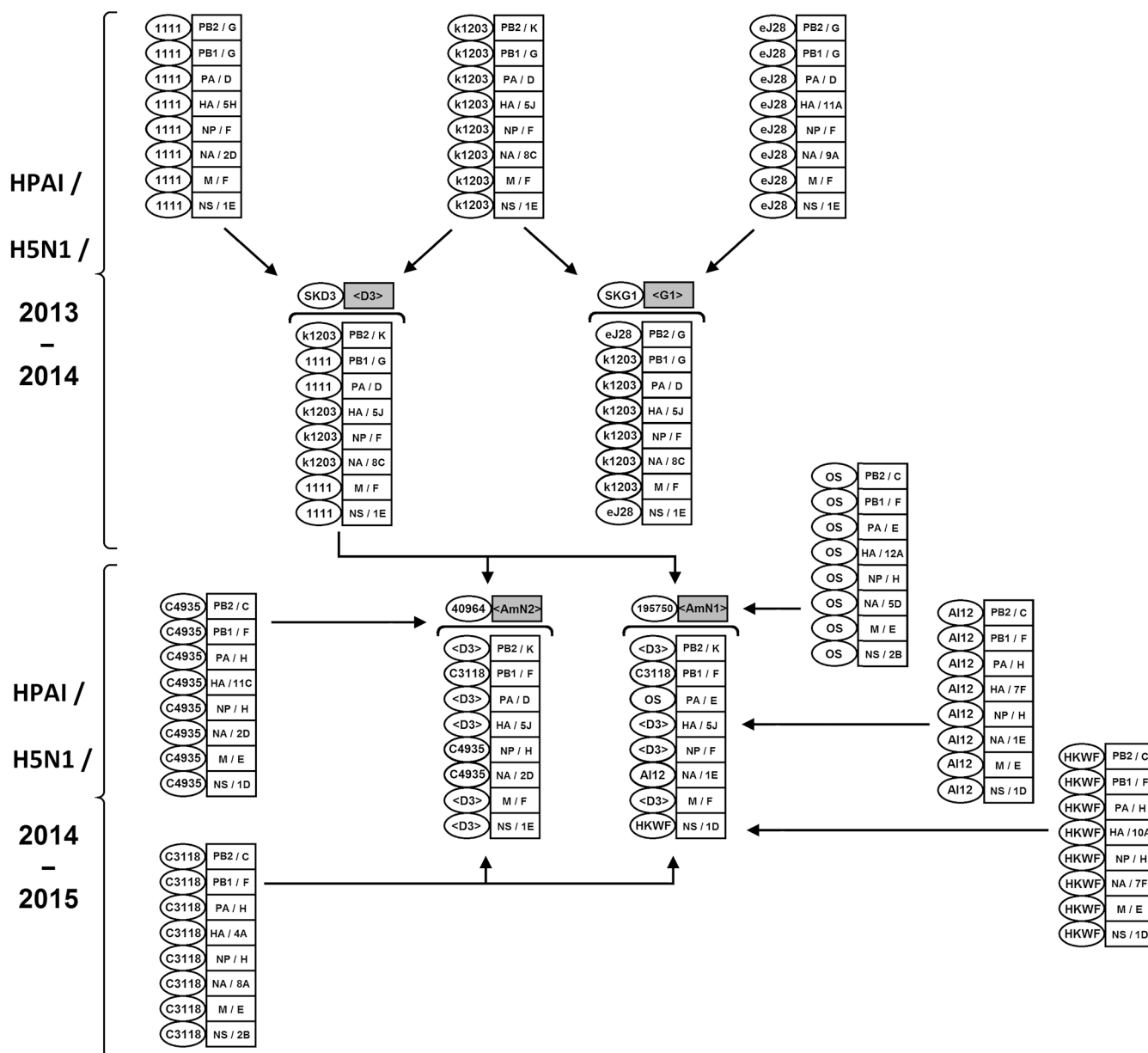


Рис. 4. Схема формирования реассортационных генотипов HPAI/H5J в период 2013—2016 гг. на территории Юго-Восточной Азии и Северной Америки.

Сокращенные обозначения штаммов: 1111 — A/duck/Eastern China/1111/2011 (H5N2); 195750 — A/American green-winged teal/Washington/195750/2014 (H5N1); 40964 — A/northern pintail/Washington/40964/2014 (H5N2); AI12 — A/blue-winged teal/Texas/AI12-909/2012 (H7N1); C3118 — A/bufflehead/California/3118/2011 (H4N8); C4935 — A/bufflehead/California/4935/2012 (H11N2); D3 — A/Baikal teal/Korea/Donglim3/2014 (H5N8); eJ28 — A/environment/Jiangxi/28/2009 (H11N9); HKWF — A/northern shoveler/California/HKWF392sm/2007 (H10N7); k1203 — A/duck/Jiangsu/k1203/2013 (H5N8); OS — A/American green-winged teal/Wisconsin/11OS3425/2011 (H12N5); SKD3 — A/Baikal teal/Korea/Donglim3/2014 (H5N8); SKG1 — A/breeder duck/Korea/Gochang1/2014 (H5N8).

В частности, HPAI/H5J/2.3.4.4 в период 2009—2013 гг. участвовали в появлении на территории восточнокитайских провинций многочисленных реассортантов H5N2, H5N5, H5N6 и H5N8 [70—73], однако их распространение осталось ограниченным территорией Юго-Восточной Азии.

Развитие эпизоотии HPAI/H5J в период 2013—2016 гг.

Зимой 2013—2014 гг. эпизоотически важные генотипы HPAI/H5JN8/2.3.4.4 формировались в зимовочном ареале

на территории Корейского полуострова. В середине января 2014 г. эпизоотия с 60% летальностью вспыхнула на утиной ферме вблизи заповедника Донглим в юго-западной провинции Чонбук Республики Корея. В это же время в самом заповеднике начался падеж среди массово зимующих там чирков-клоктунов (*A. formosa*). Молекулярно-генетический анализ изолированных штаммов позволил выявить 2 новых генотипа [74, 75], являющихся результатом реассортации восточнокитайских штаммов (рис. 4): <G1> обладал повышенной вирулентностью по отношению к курам [74] и вызвал массовые эпизоотии на корей-

ских фермах в 2014—2016 гг.; <D3> закрепился в популяциях диких пластинчатоклювых.

Через Корейский полуостров проходит Дальне-восточно-Притихоокеанское миграционное русло [20] (см. рис. 2), поэтому весной 2014 г. <D3> проник в Юго-Восточную Азию. Кроме того, перезимовавшие на Корейском полуострове птицы широким веером разлетаются по территории Северной Евразии, где смешиваются в гнездовых ареалах с птицами других миграционных русел. Так, осенью 2014 г. <D3> был обнаружен в Якутии (A/wigeon/Sakha/1/2014) [76], Нидерландах, Германии, Великобритании и Италии [77—79]; миграции птиц в восточном направлении инициировали эпизоотический процесс в Японии [79], в северном направлении — в гнездовых ареалах Северо-Восточной Азии, откуда через Берингов пролив стала достижимой территория Северной Америки осенью того же года [20, 80] (см. рис. 2).

В конце ноября 2014 г. на западном побережье Канады недалеко от границы с США в Абботсфорде среди индеек и в Чилливаке среди кур вспыхнула эпизоотия с высокой летальностью, вызванная HPAI/H5JN2 [81]. Обследование близлежащих природных биотопов выявило падеж среди диких птиц водного экологического комплекса на сопредельной американской территории [82]. Практически идентичный канадским штаммам прототипный штамм A/northern pintail/Washington/40964/2014⁸ принадлежал к HA-подгруппе 2.3.4.4 (вследствие чего подгруппа получила название «Евразийско-Американская») (см. рис. 3) и представлял собой реассортант (<AmN2>) евразийского генотипа <D3> и американских LPAI (см. рис. 4) [83]. Штамм A/gyrfalcon/Washington/41088-6/2014, изолированный от кречета (*Falco rusticolus*), полностью соответствовал <D3> [84], и в декабре 2014 г. именно этот генотип стал причиной серии локальных эпизоотий среди цесарок, цыплят, уток и гусей на частных подворьях в расположенном южнее штате Орегон. В этот же период от чирка-свистунка (*Anas crecca*) в штате Вашингтон был изолирован A/American green-winged teal/Washington/195750/2014 — генотип <AmN1> — реассортант <D3> и местных LPAI [85] (см. рис. 4). При этом указанные эпизоотические штаммы отличались от A/Alberta/01/2014 [K, G, D, 5J, F, 1J, F, 1E], принадлежавшего к подгруппе 2.3.2.1.c и изолированного в Канаде в результате заражения на территории Китая [86]. Таким образом, на территории Северной Америки присутствуют 3 различных генотипа HPAI/H5J: восточноазиатский <D3> и сформировавшиеся с его участием <AmN1> и <AmN2> (см. рис. 4).

Занос HPAI/H5J осенью 2014 г. в Калифорнийский зимовочный ареал происходил вдоль Тихоокеанского миграционного русла диких пластинчатоклювых [20]. Однако уже весной 2015 г. во время весенних миграций птиц по Северо-Американскому континенту вирус обнаруживался вдоль других миграционных путей, в первую очередь Миссисипского [85]. По данным МЭБ, в период с декабря 2014 г. по июнь 2015 г. в США были зарегистрированы 232 эпизоотические вспышки (свыше 50 млн голов), связанные с HPAI/H5J (<D3> и <AmN2>), на территории 15 штатов: от Вашингтона на западе до Индианы и Арканзаса на востоке. Это свидетельствует о

диссеминации вируса в гнездовых ареалах центральной и северной части континента. Имеющиеся данные позволяют заключить, что по крайней мере массовые заносы HPAI/H5J в Центральную и Южную Америку пока отсутствуют. Однако это, несомненно, случится во время ближайших осенних миграций по мере расширения ареала вируса в гнездовых ареалах Северной Америки [20]. Учитывая циркуляцию среди рукокрылых Центральной Америки уникальных вариантов вируса гриппа А [11, 12], следует внимательно отнестись к возможности появления здесь неожиданных реассортантов HPAI.

Поскольку мигранты из Северо-Восточной Азии составляют меньшинство в зимовочных ареалах птиц Северной Америки, там еще отсутствует значительная иммунная прослойка, которая только начала формироваться. Поэтому в 2014—2016 гг. в североамериканском зимовочном ареале не происходило формирование новых HA-подгрупп, как это наблюдалось и наблюдается в зимовочных ареалах на территории Старого Света. Однако в ближайшие годы в процессе увеличения доли иммунных особей следует ожидать появления новых генетических вариантов HPAI/H5J на Американском континенте.

Двадцать лет — это миг для глобальной эволюции вируса, но и его хватило для того, чтобы HPAI/H5J продемонстрировал потенциал своей экологической пластичности. Человечество пока не в силах ограничить этот потенциал, но понимание механизмов его реализации позволяет минимизировать ущерб от эпизоотий и эпидемий в интересах устойчивого развития.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1, 2, 5, 6, 8, 11, 13, 15, 22—25, 27—31, 33, 35—42, 46, 57, 58, 65, 66, 68—86 см. REFERENCES)

- Львов Д.К., ред. *Медицинская вирусология*. М.: МИА; 2008.
- Львов Д.К., ред. *Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных*. М.: МИА; 2013.
- Каверин Н.В., Руднева И.А., Тимофеева Т.А., Игнатьева А.В. Антигенная структура гемагглютиниона вируса гриппа А. *Вопросы вирусологии*. 2012; Приложение 1: 148—58.
- Щелканов М.Ю. *Эволюция высоковирулентного вируса гриппа А (H5N1) в экосистемах Северной Евразии (2005—2009 годы)*: Дисс. ... докт. биол. наук. М.; 2010.
- Щелканов М.Ю., Львов Д.К. Генотипическая структура рода Influenza A virus. *Вестник РАМН*. 2011; (5): 19—23.
- Щелканов М.Ю., Львов Д.К. Новый субтип вируса гриппа А от летучих мышей и новые задачи эколого-вирусологического мониторинга. *Вопросы вирусологии*. 2012; Приложение 1: 159—68.
- Гамбарян А.С., Маринина В.П., Солодарь Т.А., Бовин Н.В., Тузинов А.Б., Пазынина Г.В. и др. Различная рецепторная специфичность вирусов гриппа уток и кур и ее отражение в составе сиалозидов на хозяйских клетках и муцинах. *Вопросы вирусологии*. 2006; 51(4): 24—32.
- Сюрин В.Н., Самуйленко А.Я., Соловьев Б.В., Фомина Н.В. *Вирусные болезни животных*. М.: ВНИИТИБП; 1998.
- Львов Д.К., Яшкуллов К.Б., Прилипов А.Г., Бурцева Е.И., Щелканов М.Ю., Шляпникова О.В. и др. Обнаружение аминокислотных замен аспарагиновой кислоты на глицин и глутаминовую кислоту в рецептор-связывающем сайте гемагглютиниона в штамме пандемического вируса гриппа H1N1 от больных с летальным исходом и со средне-тяжелой формой заболевания. *Вопросы вирусологии*. 2010; 55(3): 15—8.
- Львов Д.К., Бурцева Е.И., Прилипов А.Г., Богданова В.С., Щелканов М.Ю., Бовин Н.В. и др. Возможная связь летальной пневмонии с мутациями пандемического вируса гриппа A/H1N1 sw1 в рецептор-связывающем сайте субъединицы HA1 гемагглютиниона. *Вопросы вирусологии*. 2010; 55(4): 4—9.
- Львов Д.К., Щелканов М.Ю., Бовин Н.В., Малышев Н.А., Чуралин А.Г., Колобухина Л.В. и др. Корреляция между рецептор-

⁸ В названии штамма A/northern pintail/Washington/40964/2014 (H5N2) фигурирует название американского штата Вашингтон, сопредельного канадскому штату Британская Колумбия.

- ной специфичностью штаммов пандемического вируса гриппа А (H1N1) pdm09, изолированных в 2009—2011 гг., структурой рецептор-связывающего сайта и вероятностью развития летальной первичной вирусной пневмонии. *Вопросы вирусологии*. 2012; 57(1): 14—20.
20. Львов Д.К., Ильичёв В.Д. *Миграции птиц и перенос возбудителей инфекции*. М.: Наука; 1979.
 21. Львов Д.К. Популяционные взаимодействия в биологической системе: вирус гриппа А — дикие и домашние птицы — люди; причины и последствия проникновения на территорию России высокопатогенного вируса гриппа А/H5N1. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2006; (3): 96—100.
 26. Липатов А.С., Смирнов Ю.А., Каверин Н.В., Вебстер Р.Г. Эволюция вирусов гриппа птиц H5N1 с 1997 по 2004 год в Южной и Юго-Восточной Азии. *Вопросы вирусологии*. 2005; (4): 11—7.
 32. Львов Д.К., Ямникова С.С., Федякина И.Т., Аристова В.А., Львов Д.Н., Ломакина Н.Ф. и др. Экология и эволюция вирусов гриппа в России (1979—2002 годы). *Вопросы вирусологии*. 2004; 49(3): 17—24.
 34. Щелканов М.Ю., Попов А.Ф., Симакова А.И., Зенин И.В., Прошина Е.С., Кириллов И.М. и др. Патогенез гриппа: механизмы модуляции белками возбудителя. *Журнал инфектологии*. 2015; 7(2): 31—46.
 43. Щелканов М.Ю., Власов Н.А., Киреев Д.Е., Славский А.А., Гребенникова Т.В., Прилипов А.Г. и др. Клинические признаки заболевания у птиц, вызванного высокопатогенными вариантами вируса гриппа А/H5N1, в эпицентре эпизоотии на юге Западной Сибири (июль 2005 года). *Журнал инфекционной патологии*. 2005; 12(3—4): 121—4.
 44. Львов Д.К., Щелканов М.Ю., Дерябин П.Г., Гребенникова Т.В., Прилипов А.Г., Непоклонов Е.А. и др. Изоляция штаммов вируса гриппа А/H5N1 от домашних и диких птиц в период эпизоотии в Западной Сибири (июль 2005 года) и их депонирование в Государственную Коллекцию вирусов РФ (08 августа 2005 года). *Вопросы вирусологии*. 2006; 51(1): 11—4.
 45. Онищенко Г.Г., Шестопалов А.М., Терновой В.А., Евсеенко В.А., Дурьманов А.Г., Рассадкин Ю.Н. и др. Выявление в Западной Сибири высокопатогенных H5N1-вирусов гриппа, генетически родственных вирусам, циркулирующим в Юго-Восточной Азии в 2003—2005 годы. *Доклады Академии наук*. 2006; 406(2): 278—80.
 47. Львов Д.К., Прилипов А.Г., Щелканов М.Ю., Дерябин П.Г., Шилов А.А., Гребенникова Т.В. и др. Молекулярно-генетический анализ биологических свойств высокопатогенных штаммов вируса гриппа А/H5N1, изолированных от диких и домашних птиц в период эпизоотии в Западной Сибири (июль 2005 года). *Вопросы вирусологии*. 2006; 51(2): 15—9.
 48. Львов Д.К., Федякина И.Т., Щелканов М.Ю., Прилипов А.Г., Дерябин П.Г., Галегов Г.А. Действие in vitro противовирусных препаратов на репродукцию высокопатогенных штаммов вируса гриппа А/H5N1, вызвавших эпизоотию среди домашних птиц летом 2005 года. *Вопросы вирусологии*. 2006; 51(2): 20—2.
 49. Федякина И.Т., Щелканов М.Ю., Дерябин П.Г., Ленёва И.А., Гудова Н.В., Кондратьева Т.В. и др. Изучение чувствительности пандемических штаммов вируса гриппа А H1N1 и высоковирулентных вирусов гриппа птиц А (H5N1) к противовирусным химиопрепаратам. *Антибиотики и химиотерапия*. 2011; 56(3—4): 3—9.
 50. Львов Д.К., Ковтунов А.И., Яшкулов К.Б., Громашевский В.Л., Джаркенов А.Ф., Щелканов М.Ю. и др. Проблемы безопасности в связи с новыми и вновь возникающими инфекциями. *Вестник РАМН*. 2004; (5): 20—5.
 51. Разумова Ю.В., Щелканов М.Ю., Юрлов А.К., Беклемишев А.Б., Шестопалов А.М., Львов Д.К. Особенности циркуляции вирусов гриппа А в популяциях диких птиц на юге Западной Сибири. *Журнал инфекционной патологии*. 2004; 11(3—4): 91—4.
 52. Разумова Ю.В., Щелканов М.Ю., Дурьманова А.А., Золотых С.И., Терновой В.А., Славский А.А. и др. Молекулярно-генетическое разнообразие вируса гриппа А в популяциях диких птиц на юге Западной Сибири. *Вопросы вирусологии*. 2005; 50(4): 31—5.
 53. Щелканов М.Ю., Громашевский В.Л., Львов Д.К. Роль эколого-вирусологического районирования в прогнозировании влияния климатических изменений на ареалы арбовирусов. *Вестник РАМН*. 2006; (2): 22—5.
 54. Щелканов М.Ю., Ананьев В.Ю., Львов Д.Н., Киреев Д.Е., Гурьев Е.Л., Аканина Д.С. и др. Комплексный эколого-вирусологический мониторинг на территории Приморского края (2003—2006). *Вопросы вирусологии*. 2007; 52(5): 37—48.
 55. Яшкулов К.Б., Щелканов М.Ю., Львов С.С., Джамбинов С.Д., Галкина И.В., Федякина И.Т. и др. Изоляция вирусов гриппа А (Orthomyxoviridae, Influenza A virus), Дхори (Orthomyxoviridae, Thogotovirus) и болезни Ньюкасла (Paramyxoviridae, Avulavirus) на острове Малый Жемчужный в северо-западной части акватории Каспийского моря. *Вопросы вирусологии*. 2008; 53(3): 34—8.
 56. Львов Д.К., Щелканов М.Ю., Дерябин П.Г., Бурцева Е.И., Галкина И.В., Гребенникова Т.В. и др. Эпизоотия среди лебедьшипунов (*Cygnus olor*) в нижней дельте Волги (ноябрь 2005 год), вызванная высокопатогенным вирусом гриппа А/H5N1. *Вопросы вирусологии*. 2006; 51(3): 10—6.
 59. Львов Д.К., Щелканов М.Ю., Дерябин П.Г., Федякина И.Т., Бурцева Е.И., Прилипов А.Г. и др. Изоляция высокопатогенных (HPAI) штаммов вируса гриппа А/H5N1 от диких птиц в очаге эпизоотии на озере Убсу-Нур (июнь 2006 год) и их депонирование в Государственную Коллекцию вирусов РФ (03 июля 2006 год). *Вопросы вирусологии*. 2006; 51(6): 14—8.
 60. Львов Д.К., Щелканов М.Ю., Дерябин П.Г., Прилипов А.Г., Фролов А.В., Федякина И.Т. и др. Эпизоотия среди диких и домашних птиц, вызванная высоковирулентным вирусом гриппа А/H5N1 генотипа 2.2 (Цинхай—Сибирский) на пути осенних миграций в северо-восточной части бассейна Азовского моря (Краснодарский край). *Вопросы вирусологии*. 2008; 53(2): 14—9.
 61. Львов Д.К., Щелканов М.Ю., Прилипов А.Г., Дерябин П.Г., Аканина Д.С., Галкина И.В. и др. Молекулярно-генетическая характеристика штамма A/chicken/Moscow/2/2007 (H5N1) из очага эпизоотии высокопатогенного гриппа А среди сельскохозяйственных птиц в Подмосковье (февраль 2007 год). *Вопросы вирусологии*. 2007; 52(6): 40—7.
 62. Львов Д.К., Щелканов М.Ю., Прилипов А.Г., Дерябин П.Г., Федякина И.Т., Галкина И.В. и др. Расшифровка эпизоотической вспышки среди диких и домашних птиц на юге европейской части России в декабре 2007 года. *Вопросы вирусологии*. 2008; 53(4): 18—23.
 63. Щелканов М.Ю., Прилипов А.Г., Львов Д.К., Федякина И.Т., Казарян А.С., Галкина И.В. и др. Динамика вирулентности штаммов высоковирулентного вируса гриппа А H5N1 генотипа 2.2, изолированных на территории России в 2005—2007 годы. *Вопросы вирусологии*. 2009; 54(2): 8—17.
 64. Львов Д.К., Щелканов М.Ю., Дерябин П.Г., Гребенникова Т.В., Прилипов А.Г., Непоклонов Е.А. и др. *Метод первичной изоляции штаммов вируса гриппа А, штамм virus A/duck/Novosibirsk/56/05 (H5N1) для приготовления диагностических, профилактических и лечебных препаратов, для оценки противовирусной активности различных соединений*. Патент РФ № 2309983; 2005.
 67. Львов Д.К., Щелканов М.Ю., Власов Н.А., Прилипов А.Г., Дерябин П.Г., Федякина И.Т. и др. Первый прорыв нового для России генотипа 2.3.2 высоковирулентного вируса гриппа А/H5N1 на Дальнем Востоке. *Вопросы вирусологии*. 2008; 53(5): 4—8.

REFERENCES

1. Xu X., Subbarao K., Cox N.J., Guo Y. Genetic characterization of the pathogenic influenza A/goose/Guangdong/1/96 (H5N1) virus: similarity of its hemagglutinin gene to those of H5N1 viruses from the 1997 outbreaks in Hong Kong. *Virology*. 1999; 261(1): 15—9.
2. Smith G.J., Donis R.O. WHO/OIE/FAO H5 Evolution Working Group. Nomenclature updates resulting from the evolution of avian influenza A (H5) virus clades 2.1.3.2a, 2.2.1, and 2.3.4 during 2013—2014. *Influenza Other Respir. Viruses*. 2015; 9(5): 271—6.
3. L'vov D.K., ed. *Medical Virology [Meditsinskaya virusologiya]*. Moscow: MIA; 2008. (in Russian)
4. L'vov D.K., ed. *Handbook of Virology. Viruses and Viral Infections of Humans and Animals [Rukovodstvo po virusologii. Virusy i virusnye infektsii cheloveka i zhivotnykh]*. Moscow: MIA; 2013. (in Russian)
5. Lvov D.K., Shchelkanov M.Yu., Alkhovskiy S.V., Deryabin P.G. *Zoonotic Viruses of Northern Eurasia. Taxonomy and Ecology*. Elsevier Academic Press; 2015.
6. Lvov D.K., Kaverin N.V. Avian influenza in Northern Eurasia. In: Klenk H.D., Matrosovich M., Steh J., eds. *Monographs in Virology. Volume 27: Avian Influenza*. Basel, Switzerland: Karger; 2008: 41—58.
7. Kaverin N.V., Rudneva I.A., Timofeeva T.A., Ignat'eva A.V. Antigenic structure of influenza A virus hemagglutinin. *Voprosy virusologii*. 2012; Suppl. 1: 148—58. (in Russian)
8. Bedford T., Suchard M.A., Lemey P., Dudas G., Gregory V., Hay A.J. et al. Integrating influenza antigenic dynamics with molecular evolution. *Elife*. 2014; 3: e01914.

9. Shchelkanov M.Yu. *Evolution of Highly Pathogenic Avian Influenza A (H5N1) in Ecosystems of Northern Eurasia (2005—2009)*: Diss. Moscow; 2010. (in Russian)
10. Shchelkanov M.Yu., L'vov D.K. Genotypic structure of the genus influenza A virus. *Vestnik RAMN*. 2011; (5): 19—23. (in Russian)
11. Tong S., Zhu X., Li Y., Shi M., Zhang J., Bourgeois M. et al. New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog*. 2013; 9(10): e1003657.
12. Shchelkanov M.Yu., L'vov D.K. New subtype of influenza A virus from bats and new tasks for ecologo-virological monitoring. *Voprosy Virusologii*. 2012; Suppl. 1: 159—68. (in Russian)
13. Lu G., Rowley T., Garten R., Donis R.O. FluGenome: a web tool for genotyping influenza A virus. *Nucleic Acids Res*. 2007; 35 (Web Server issue): W275—9.
14. Gambarian A.S., Marinina V.P., Solodar' T.A., Bovin N.V., Tuzikov A.B., Pazygina G.V. et al. Different receptor specificity of influenza viruses from ducks and chickens and its reflection in the composition of sialosides on host cells and mucins. *Voprosy Virusologii*. 2006; 51(4): 24—32. (in Russian)
15. Alexander D.J., Parsons G., Manvell R.J. Experimental assessment of the pathogenicity of eight avian influenza A viruses of H5 subtype for chickens, turkeys, ducks and quail. *Avian Pathol*. 1986; 15: 647—62.
16. Syurin V.N., Samuylenko A.Ya., Solov'ev B.V., Fomina N.V. *Viral Diseases of Animals [Virusnye bolezni zhivotnykh]*. Moscow: VNIITIBP; 1998. (in Russian)
17. L'vov D.K., Yashkulov K.B., Prilipov A.G., Burtseva E.I., Shchelkanov M.Yu., Shlyapnikova O.V. et al. Detection of amino acid substitutions of asparaginic acid for glycine and asparagine at the receptor-binding site of hemagglutinin in the variants of pandemic influenza H1N1 virus from patients with fatal outcome and moderate form of the disease. *Voprosy virusologii*. 2010; 55(3): 15—8. (in Russian)
18. L'vov D.K., Burtseva E.I., Prilipov A.G., Bogdanova V.S., Shchelkanov M.Yu., Bovin N.V. et al. Possible association of fatal pneumonia with mutations of pandemic influenza A / H1N1 swl virus in the receptor-binding site of HA1 subunit. *Voprosy virusologii*. 2010; 55(4): 4—9. (in Russian)
19. L'vov D.K., Shchelkanov M.Yu., Bovin N.V., Malyshev N.A., Chuchalin A.G., Kolobukhina L.V. et al. Correlation between the receptor specificities of pandemic influenza A (H1N1) pdm09 virus strains isolated in 2009—2011 and the structure of the receptor-binding site and the probabilities of fatal primary virus pneumonia. *Voprosy virusologii*. 2012; 57(1): 14—20. (in Russian)
20. L'vov D.K., Il'ichev V.D. *Avian Migrations and the Transmission of Infection Agents [Migratsii ptits i perenos vozбудiteley infektsii]*. Moscow: Nauka; 1979. (in Russian)
21. L'vov D.K. Populational interactions in biological system: influenza virus A — wild and domestic animals — humans; relations and consequences of introduction of high pathogenic influenza virus A / H5N1 on Russian territory. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2006; (3): 96—100. (in Russian)
22. L'vov D.K., Shchelkanov M.Yu., Prilipov A.G., Vlasov N.A., Fedyakina I.T., Deryabin P.G. et al. Evolution of HPAI H5N1 virus in Natural ecosystems of Northern Eurasia (2005—2008). *Avian Dis*. 2010; 54: 483—95.
23. WHO/OIE/FAO H5N1 Evolution Working Group. Towards a Unified Nomenclature System for the Highly Pathogenic H5N1 Avian Influenza Viruses. 2008. Available at: www.who.int/csr/disease/influenza/en.
24. Guan Y., Shortridge K.F., Krauss S., Webster R.G. Molecular characterization of H9N2 influenza viruses: were they the donors of the «internal» genes of H5N1 viruses in Hong Kong? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999; 96(16): 9363—7.
25. Hoffmann E., Stech J., Leneva I., Krauss S., Scholtissek C., Chin P.S. et al. Characterization of the influenza A virus gene pool in avian species in southern China: was H6N1 a derivative or a precursor of H5N1? *J. Virol*. 2000; 74(14): 6309—15.
26. Lipatov A.S., Smirnov Yu.A., Kaverin N.V., Webster R.G. Evolution of avian influenza viruses H5N1 (1997—2004) in southern and south-eastern Asia. *Voprosy virusologii*. 2005; (4): 11—7. (in Russian)
27. Hatta M., Gao P., Halfmann P., Kawaoka Y. Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science*. 2001; 293(5536): 1840—2.
28. Guan Y., Peiris J.S., Lipatov A.S., Ellis T.M., Dyrting K.C., Krauss S. et al. Emergence of multiple genotypes of H5N1 avian influenza viruses in Hong Kong SAR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002; 99(13): 8950—5.
29. Li K.S., Guan Y., Wang J., Smith G.J., Xu K.M., Duan L. et al. Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature*. 2004; 430(6996): 209—13.
30. Gutierrez R.A., Naughtin M.J., Horm S.V., San S., Buchy P.A. (H5N1) virus evolution in South East Asia. *Viruses*. 2009; 1(3): 335—61.
31. L'vov D.K., Yamnikova S.S., Fedyakina I.T., Lomakina N.F., Lvov D.N., Synitsyn B.V. et al. Evolution of H4, H5 influenza A viruses in natural ecosystems in Northern Eurasia. In: *Options for the Control of Influenza*. Elsevier; 2004: 169—73.
32. L'vov D.K., Yamnikova S.S., Fedyakina I.T., Aristova V.A., L'vov D.N., Lomakina N.F. et al. Ecology and evolution of influenza viruses in Russia (1979—2002). *Voprosy virusologii*. 2004; 49(3): 17—24. (in Russian)
33. Long J.X., Peng D.X., Liu Y.L., Wu Y.T., Liu X.F. Virulence of H5N1 avian influenza virus enhanced by a 15-nucleotide deletion in the viral nonstructural gene. *Virus Genes*. 2008; 36(3): 471—8.
34. Shchelkanov M.Yu., Popov A.F., Simakova A.I., Zenin I.V., Proshina E.S., Kirillov I.M. et al. Influenza pathogenesis: mechanisms of modulation by agent proteins. *Zhurnal infektologii*. 2015; 7(2): 31—46. (in Russian)
35. Matrosovich M., Zhou N.N., Kawaoka Y., Webster R.G. The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens, and wild aquatic birds have distinguishable properties. *J. Virol*. 1999; 73: 1146—55.
36. Cheung C.L., Rayner J.M., Smith G.J., Wang P., Naipospos T.S., Zhang J. et al. Distribution of amantadine-resistant H5N1 avian influenza variants in Asia. *J. Infect. Dis*. 2006; 193(12): 1626—9.
37. Hurt A.C., Selleck P., Komadina N., Shaw R., Brown L., Barr I.G. Susceptibility of highly pathogenic A(H5N1) avian influenza viruses to the neuraminidase inhibitors and adamantanes. *Antiviral. Res*. 2007; 73(3): 228—31.
38. Alexander D.J. A review of avian influenza in different bird species. *Vet. Microbiol*. 2000; 74: 3—13.
39. Chen H., Smith G.J.D., Zhang S.Y., Qin K., Wang J., Li K.S. et al. Avian flu: H5N1 virus outbreak in migratory waterfowl. *Nature*. 2005; 436: 191—2.
40. Liu J., Xiao H., Lei F., Zhu Q., Qin K., Zhang X. et al. Highly pathogenic H5N1 influenza virus infection in migratory birds. *Science*. 2005; 309(5738): 1206.
41. Chen H., Li Y., Li Z., Shi J., Shinya K., Deng G. Properties and dissemination of H5N1 viruses isolated during an influenza outbreak in migratory waterfowl in Western China. *J. Virol*. 2006; 80(12): 5976—83.
42. Shinya K., Hamm S., Hatta M., Ito H., Ito T., Kawaoka Y. PB2 amino acid at position 627 affects replicative efficiency, but not cell tropism, of Hong Kong H5N1 influenza A viruses in mice. *Virology*. 2004; 320: 258—66.
43. Shchelkanov M.Yu., Vlasov N.A., Kireev D.E., Slavskiy A.A., Grebennikova T.V., Prilipov A.G. et al. Clinical symptoms of bird disease provoked by highly pathogenic variants of influenza A / H5N1 virus in the epicenter of epizooty on the south of Western Siberia. *Zhurnal infektionnoy patologii*. 2005; 12(3—4): 121—4. (in Russian)
44. L'vov D.K., Shchelkanov M.Yu., Deryabin P.G., Grebennikova T.V., Prilipov A.G., Nepoklonov E.A. et al. Isolation of influenza A/H5N1 virus strains from poultry and wild birds during epizootic outbreak in Western Siberia (July 2005) and their incorporation in Russian State Collection of viruses (August 08, 2005). *Voprosy virusologii*. 2006; 51(1): 11—4. (in Russian)
45. Onishchenko G.G., Shestopalov A.M., Ternovoy V.A., Evseenko V.A., Durymanov A.G., Rassadkin Yu.N. et al. Highly pathogenic influenza virus H5N1 found in western Siberia is genetically related to viruses that circulated in Southeast Asia in 2003—2005. *Doklady Akademii nauk*. 2006; 406(2): 278—80. (in Russian)
46. Shestopalov A.M., Durimanov A.G., Evseenko V.A., Ternovoi V.A., Rassadkin Y.N., Razumova Y.V. et al. H5N1 influenza virus, domestic birds, Western Siberia, Russia. *Emerg. Infect. Dis*. 2006; 12(7): 1167—9.
47. L'vov D.K., Prilipov A.G., Shchelkanov M.Yu., Deryabin P.G., Shilov A.A., Grebennikova T.V. et al. Molecular genetic analysis of the biological properties of highly pathogenic influenza A / H5N1 virus strains isolated from wild birds and poultry during epizooty in Western Siberia (July 2005). *Voprosy virusologii*. 2006; 51(2): 15—9. (in Russian)
48. L'vov D.K., Fedyakina I.T., Shchelkanov M.Yu., Prilipov A.G., Deryabin P.G., Galegov G.A. In vitro effects of antiviral drugs on the reproduction of highly pathogenic influenza A / H5N1 virus strains that induced epizooty among poultry in the summer of 2005. *Voprosy virusologii*. 2006; 51(2): 20—2. (in Russian)

49. Fedyakina I.T., Shchelkanov M.Yu., Deryabin P.G., Leneva I.A., Gudova N.V., Kondrat'eva T.V. et al. Susceptibility of pandemic influenza A 2009 H1N1 and highly pathogenic avian influenza virus A H5N1 to antiinfluenza agents in cell culture. *Antibiotiki i khimioterapiya*. 2011; 56(3—4): 3—9. (in Russian)
50. L'vov D.K., Kovtunov A.I., Yashkulov K.B., Gromashevskiy V.L., Dzharfenov A.F., Shchelkanov M.Yu. et al. Safety issues in new and emerging infections. *Vestnik RAMN*. 2004; (5): 20—5. (in Russian)
51. Razumova Yu.V., Shchelkanov M.Yu., Yurlov A.K., Beklemishev A.B., Shestopalov A.M., L'vov D.K. Peculiarities of Influenza A virus circulation among wild birds populations in the south of Western Siberia. *Zhurnal infeksionnoy patologii*. 2004; 11(3—4): 91—4. (in Russian)
52. Razumova Yu.V., Shchelkanov M.Yu., Durymanova A.A., Zolotykh S.I., Ternovoy V.A., Slavskiy A.A. et al. Genetic variety of influenza A virus in the populations of wild birds in the south of Western Siberia. *Voprosy virusologii*. 2005; 50(4): 31—5. (in Russian)
53. Shchelkanov M.Yu., Gromashevskiy V.L., L'vov D.K. The role of ecologo-virological zoning in prediction of the influence of climatic changes on arbovirus habitats. *Vestnik RAMN*. 2006; (2): 22—5. (in Russian)
54. Shchelkanov M.Yu., Anan'ev V.Yu., L'vov D.N., Kireev D.E., Gur'ev E.L., Akanina D.S. et al. Complex environmental and virological monitoring in the Primorje Territory in 2003—2006. *Voprosy virusologii*. 2007; 52(5): 37—48. (in Russian)
55. L'vov D.K., Shchelkanov M.Yu., Deryabin P.G., Burtseva E.I., Galkina I.V., Grebennikova T.V. et al. Isolation of influenza virus A (Orthomyxoviridae, Influenza A virus), Dhori virus (Orthomyxoviridae, Thogotovirus), and Newcastle's disease virus (Paromyxoviridae, Avulavirus) on the Malyy Zhemchuzhnyi Island in the north-western area of the Caspian Sea. *Voprosy virusologii*. 2006; 51(3): 10—6. (in Russian)
56. L'vov D.K., Shchelkanov M.Yu., Deryabin P.G., Burtseva E.I., Galkina I.V., Grebennikova T.V. et al. Highly pathogenic influenza A / H5N1 virus-caused epizooty among mute swans (*Cygnus olor*) in the low estuary of the Volga River (November 2005). *Voprosy virusologii*. 2006; 51(3): 10—6. (in Russian)
57. Lipatov A.S., Evseenko V.A., Yen H.L., Zaykovskaya A.V., Durimanov A.G., Zolotykh S.I. et al. Influenza (H5N1) viruses in poultry, Russian Federation, 2005—2006. *Emerg. Infect. Dis*. 2007; 13(4): 539—46.
58. Scotch M., Mei C., Makonnen Y.J., Pinto J., Ali A., Vegso S. et al. Phylogeography of influenza A H5N1 clade 2.2.1.1 in Egypt. *BMC Genomics*. 2013; 14: 871.
59. L'vov D.K., Shchelkanov M.Yu., Deryabin P.G., Fedyakina I.T., Burtseva E.I., Prilipov A.G. et al. Isolation of highly pathogenic avian influenza (HPAI) A/H5N1 strains from wild birds in the epizootic outbreak on the Ubsu-Nur Lake (June 2006) and their incorporation to the Russian Federation State Collection of viruses (July 3, 2006). *Voprosy virusologii*. 2006; 51(6): 14—8. (in Russian)
60. L'vov D.K., Shchelkanov M.Yu., Deryabin P.G., Prilipov A.G., Frolov A.V., Fedyakina I.T. et al. Epizooty caused by high-virulent influenza virus A/H5N1 of genotype 2.2 (Qinghai-Siberian) among wild and domestic birds on the paths of fall migrations to the north-western part of the Azov Sea basin (Krasnodar Territory). *Voprosy virusologii*. 2008; 53(2): 14—9. (in Russian)
61. L'vov D.K., Shchelkanov M.Yu., Prilipov A.G., Deryabin P.G., Akanina D.S., Galkina I.V. et al. Molecular genetic characteristics of the strain A/chicken/Moscow/2/2007 (H5N1) strain from an epizootic focus of highly pathogenic influenza A among agricultural birds in the near-Moscow region (February 2007). *Voprosy virusologii*. 2007; 52(6): 40—7. (in Russian)
62. L'vov D.K., Shchelkanov M.Yu., Prilipov A.G., Deryabin P.G., Fedyakina I.T., Galkina I.V. et al. Interpretation of the epizootic outbreak among wild and domestic birds in the south of the European part of Russia in December 2007. *Voprosy virusologii*. 2008; 53(4): 18—23. (in Russian)
63. Shchelkanov M.Yu., Prilipov A.G., L'vov D.K., Fedyakina I.T., Kazaryan A.S., Galkina I.V. et al. Dynamics in virulence of highly pathogenic influenza A virus A/H5N1 genotype 2.2 strains isolated in Russia in 2005-2007. *Voprosy virusologii*. 2009; 54(2): 8—17. (in Russian)
64. L'vov D.K., Shchelkanov M.Yu., Deryabin P.G., Grebennikova T.V., Prilipov A.G., Nepoklonov E.A., et al. *Method for Primary Isolation of Influenza A Virus Strains, Strain A/duck/Novosibirsk/56/05 (H5N1) for the Development of Diagnostic, Prophylaxis and Treatment Preparations, for the Evaluation of the Activity of Different Antivirals*. Patent RF № 2309983; 2005. (in Russian)
65. L'vov D.K., Shchelkanov M.Yu., Deryabin P.G., Prilipov A.G., Grebennikova T.V., Vlasov N.A. et al. High pathogenic avian flu (HPAI) H5N1: causes and consequences virus penetration into Northern Eurasia. In: *Proceedings of VI International Conference. Options for the Control of Influenza (Toronto, Canada; June, 17—23, 2007)*. Toronto; 2007: 31.
66. Lee Y.J., Choi Y.K., Kim Y.J., Song M.S., Jeong O.M., Lee E.K. et al. Highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) in domestic poultry and relationship with migratory birds, South Korea. *Emerg. Infect. Dis*. 2008; 14(3): 487—90.
67. L'vov D.K., Shchelkanov M.Yu., Vlasov N.A., Prilipov A.G., Deryabin P.G., Fedyakina I.T. et al. The first break-through of the genotype 2.3.2 of highly virulence influenza A / H5N1 virus, which is new for Russia, in the Far East. *Voprosy virusologii*. 2008; 53(5): 4—8. (in Russian)
68. Uchida Y., Mase M., Yoneda K., Kimura A., Obara T., Kumagai S. et al. Highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) isolated from whooper swans, Japan. *Emerg. Infect. Dis*. 2008; 14(9): 1427—9.
69. Tang Y., Wu P., Peng D., Wang X., Wan H., Zhang P. et al. Characterization of duck H5N1 influenza viruses with differing pathogenicity in mallard (*Anas platyrhynchos*) ducks. *Avian Pathol*. 2009; 38(6): 457—67.
70. Zhao G., Gu X., Lu X., Pan J., Duan Z., Zhao K. et al. Novel reassortant highly pathogenic H5N2 avian influenza viruses in poultry in China. *PLoS One*. 2012; 7(9): e46183.
71. Zhao K., Gu M., Zhong L., Duan Z., Zhang Y., Zhu Y. et al. Characterization of three H5N5 and one H5N8 highly pathogenic avian influenza viruses in China. *Vet. Microbiol*. 2013; 163: 351—7.
72. Wu H., Peng X., Xu L., Jin C., Cheng L., Lu X. et al. Novel reassortant influenza A (H5N8) viruses in domestic ducks, Eastern China. *Emerg. Infect. Dis*. 2014; 20(8): 1315—8.
73. Claes F., Morzaria S.P., Donis R.O. Emergence and dissemination of clade 2.3.4.4 H5Nx influenza viruses-how is the Asian HPAI H5 lineage maintained. *Curr. Opin. Virol*. 2016; 16: 158—63.
74. Lee Y.J., Kang H.M., Lee E.K., Song B.M., Jeong J., Kwon Y.K. et al. Novel reassortant influenza A (H5N8) viruses, South Korea, 2014. *Emerg. Infect. Dis*. 2014; 20(6): 1087—9.
75. Kang H.M., Lee E.K., Song B.M., Jeong J., Choi J.G., Jeong J. et al. Novel reassortant influenza A (H5N8) viruses among inoculated domestic and wild ducks, South Korea, 2014. *Emerg. Infect. Dis*. 2014; 21(2): 298—304.
76. Marchenko V.Y., Susloparov I.M., Kolosova N.P., Goncharova N.I., Shipovalov A.V., Durymanov A.G. et al. Influenza A (H5N8) virus isolation in Russia, 2014. *Arch. Virol*. 2015; 160(11): 2857—60.
77. Adlhoeh C., Gossner C., Koch G., Brown I., Bouwstra R., Verdonck F. et al. Comparing introduction to Europe of highly pathogenic avian influenza viruses A (H5N8) in 2014 and A (H5N1) in 2005. *Euro Surveill*. 2014; 19(50): 20996.
78. Avian influenza outbreak in Yorkshire: strain identified as H5N8. *Vet. Rec*. 2014; 175(20): 495—6.
79. Bouwstra R.J., Koch G., Heutink R., Harders F., van der Spek A., Elbers A.R. et al. Phylogenetic analysis of highly pathogenic avian influenza A (H5N8) virus outbreak strains provides evidence for four separate introductions and one between-poultry farm transmission in the Netherlands, November 2014. *Euro Surveill*. 2015; 20(26): pii 21174.
80. Winker K., McCracken K.G., Gibson D.D., Pruett C.L., Meier R.M., Huettmann F. et al. Movements of birds and avian influenza from Asia into Alaska. *Emerg. Infect. Dis*. 2007; 13(4): 547—52.
81. Pasick J., Berhane Y., Joseph T., Bowes V., Hisanaga T., Handel K. et al. Reassortant highly pathogenic influenza A H5N2 virus containing gene segments related to Eurasian H5N8 in British Columbia, Canada, 2014. *Sci. Rep*. 2015; 5: 9484.
82. Ip H.S., Torchetti M.K., Crespo R., Kohrs P., DeBruyn P., Mansfield K.G. et al. Novel Eurasian highly pathogenic avian influenza A H5 viruses in wild birds, Washington, USA, 2014. *Emerg. Infect. Dis*. 2015; 21(5): 886—90.
83. Torchetti M.K., Killian M.L., Dusek R.J., Pedersen J.C., Hines V., Bodenstern B. et al. Novel H5 clade 2.3.4.4 reassortant (H5N1) virus from a green-winged teal in Washington, USA. *Genome Announc*. 2015; 3(2): pii e00195-15.
84. Lee D.H., Torchetti M.K., Winker K., Ip H.S., Song C.S., Swayne D.E. Intercontinental spread of Asian-origin H5N8 to North America through Beringia by migratory birds. *J. Virol*. 2015; 89(12): 6521—4.
85. Clement T., Kutish G.F., Nezworski J., Scaria J., Nelson E., Christopher-Hennings J. et al. Complete genome sequence of a highly pathogenic avian influenza virus (H5N2) associated with an outbreak in commercial chickens, Iowa, USA, 2015. *Genome Announc*. 2015; 3(3): e00613-5.
86. Pabbaraju K., Tellier R., Wong S., Li Y., Bastien N., Tang J.W. et al. Full-genome analysis of avian influenza A (H5N1) virus from a human, North America, 2013. *Emerg. Infect. Dis*. 2014; 20(5): 887—91.

Поступила 10.05.16

Принята в печать 24.05.16

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016
УДК 615.371:578.832.1].012

Видяева И.Г., Потапчук М.В., Репко И.А., Петров С.В., Цыбалова Л.М.

ВЫСОКОРЕПРОДУКТИВНЫЕ АТТЕНУИРОВАННЫЕ РЕАССОРТАНТЫ H2N2 И H7N9 НА ОСНОВЕ ДОНОРА А/ГОНКОНГ/1/68/162/35

ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, 197376, г. Санкт-Петербург

На основе созданного в НИИ гриппа штамма вируса гриппа А/Гонконг/1/68/162/35 (H3N2), обладающего свойствами аттенуации и высокой репродуктивности, получены реассортантные штаммы, содержащие поверхностные антигены вирусов гриппа А потенциально пандемических вирусов А/H2N2 и А/H7N9. Высокая репродуктивная активность реассортантных штаммов и иммуногенность живой и инактивированной гриппозных вакцин, полученных на их основе, определяют возможность использования их в качестве вакцинных штаммов при создании живых и инактивированных вакцин против потенциально пандемических вирусов гриппа А.

Ключевые слова: *вирус гриппа; вирусные реассортанты; донор; живая гриппозная вакцина; инактивированная гриппозная вакцина.*

Для цитирования: Видяева И.Г., Потапчук М.В., Репко И.А., Петров С.В., Цыбалова Л.М. Высокопродуктивные аттенуированные реассортанты H2N2 и H7N9 на основе донора А/Гонконг/1/68/162/35. *Вопросы вирусологии.* 2016; 61(6): 257-262.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2016-61-6-257-262>

Vidyayeva I.G., Potapchuk M.V., Repko I.A., Petrov S.V., Tsybalova L.M.

HIGHLY REPRODUCTIVE ATTENUATED H2N2 AND H7N9 REASSORTANTS ON THE BASIS OF A/HONG KONG/1/68/162/35 DONOR VIRUS

Research Institute of Influenza, St. Petersburg, 197376, Russian Federation

Reassortants with surface antigens from potentially pandemic A/H2N2 and A/H7N9 influenza viruses were created on the basis of attenuated and highly reproductive A/Hong Kong/1/68/162/35(H3N2) donor virus obtained in the Research Institute of Influenza. High reproductive activity of reassortant viruses and immunogenicity of live and inactivated influenza vaccines based on these viruses indicate the possibility to use obtained reassortants for production of live and inactivated vaccines against potentially pandemic influenza A viruses.

Key words: *influenza virus; virus reassortants; donor strain; live influenza vaccine; inactivated influenza vaccine.*

For citation: Vidyayeva I.G., Potapchuk M.V., Repko I.A., Petrov S.V., Tsybalova L.M. Highly reproductive attenuated H2N2 and H7N9 reassortants on the basis of A/Hong Kong/1/68/162/35 donor virus. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal).* 2016; 61(6): 257-262. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2016-61-6-257-262>

For correspondence: Inna G. Vidyayeva, Candidate of Medical Sciences, Senior research scientist, Laboratory of influenza vaccines, Research Institute of Influenza, St. Petersburg, 197376, Russian Federation. E-mail: inessa2775@inbox.ru

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

Received 07 April 2016
Accepted 24 May 2016

Введение

Пандемия «азиатского» гриппа 1957—1958 г., вызванная вирусом гриппа А подтипа H2N2, унесла жизни около 2 млн человек. К 1968 г. подтип H2N2 перестал циркулировать среди людей и сохранился в популяции птиц. В настоящее время вирус циркулирует среди птиц и рассматривается как один из наиболее вероятных возбудителей новой пандемии, так как люди моложе 50 лет не обладают иммунитетом к этому подтипу. В 2014 г. в журнале *Virology* группой авторов опубликовано исследование 22 вирусов подтипа А/H2N2, изолированных от диких и домашних птиц, которое показало, что все они имеют низкий уровень генетической и антигенной из-

менчивости. Большая часть изолятов проявила антигенное сходство с пандемическим вирусом А/Сингапур/1/57 (H2N2), что предполагает возможность использования вирусов, выделенных в период пандемии 1957 г., для разработки вакцин [1]. В работе С. Pappas и соавт. [2] были проанализированы возможности передачи млекопитающим (хорькам) птичьих вирусов подтипа H2 (А/H2N2 и А/H2N3). Генетический анализ гемагглютинина (НА), полученного из носовых смывов хорьков, показал наличие мутаций в первой субъединице (НА1), включая рецепторспецифичные адаптивные мутации Gln226Leu, определяющие человеческий тип рецепторов α-2-6, что указывает на возможность адаптации H2-вирусов к

Для корреспонденции: Видяева Инна Геннадьевна, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаб. гриппозных вакцин ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, 197376, г. Санкт-Петербург. E-mail: inessa2775@inbox.ru

млекопитающим и их потенциальную опасность для человека [2].

Другими потенциально пандемическими вирусами гриппа являются штаммы подтипа Н7. В 2003 г. зафиксирована наиболее масштабная вспышка заболевания птиц, вызванного высокопатогенным вирусом А/Н7N7 в Нидерландах, во время которой птичьим вирусом были заражены 89 человек, один со смертельным исходом [3]. Кроме того, периодически регистрируются вспышки низкопатогенного гриппа птиц подтипа Н7, сопровождающиеся инфицированием людей. До недавнего времени не выявлялось случаев инфицирования вирусом А/Н7N9 птиц, животных или людей. Первые сообщения об инфицировании людей этим штаммом поступили в ВОЗ 31 марта 2013 г. из Китая. К настоящему времени зарегистрировано 602 случая инфицирования людей вирусом А/Н7N9 — большинство в континентальном Китае [4]. Характерной особенностью нового штамма стало большое количество случаев со смертельным исходом среди заболевших людей (примерно 36%). Результаты нескольких исследований указывают на способность вирусов А/Н7N9 активно размножаться в органах мышей, хорьков и приматов, а также в клетках, выстилающих эпителий дыхательных путей человека [5, 6]. Эти явления обусловили актуальность получения вакцинных штаммов против вируса А/Н7N9.

С целью получить вакцинный реассортант на основе эпидемического вируса А/Н2N2, который был бы эффективен против вероятного возбудителя пандемии, мы проанализировали изменчивость первой субъединицы НА Н2 на протяжении 10 лет циркуляции вирусов А/Н2N2 и выбрали 2 штамма как основу для создания вакцины: штамм А/Япония/305/57 (Н2N2), идентичный по последовательности аминокислотных остатков НА1 эталонному штамму А/Сингапур/1/57, и А/Калифорния/1/66 (Н2N2), филогенетически наиболее удаленный от эталонного штамма и отражающий состояние вируса на момент его элиминации из человеческой популяции (рис. 1).

В качестве донора внутренних генов при получении реассортантов на основе вирусов А/Н2N2 и А/Н7N9 мы использовали разработанный в НИИ гриппа универсальный донор А/Гонконг/1/68/162/35 (Н3N2) [7, 8], который ориентирован на получение

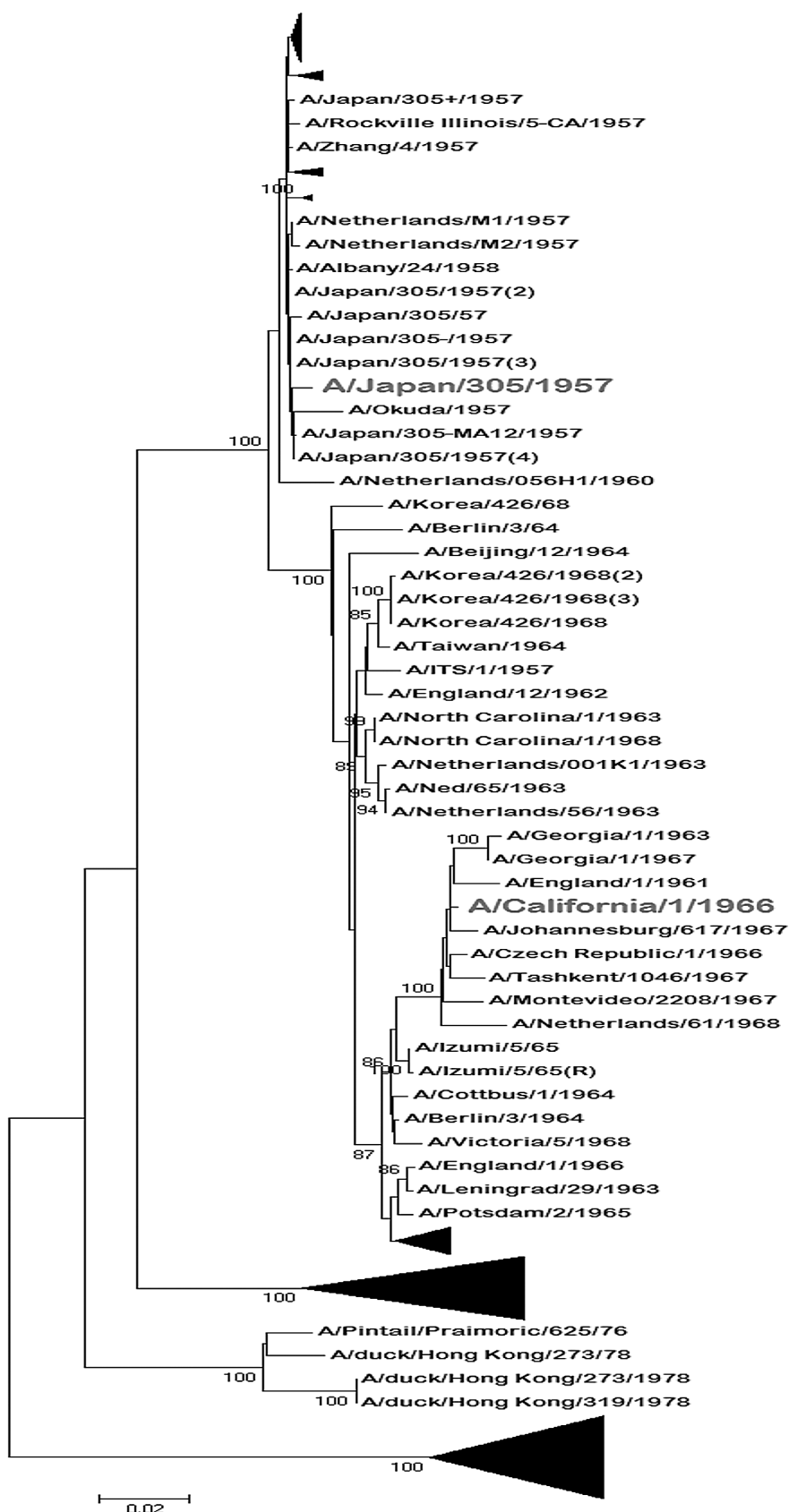


Рис. 1. Филогенетическое дерево нуклеотидных последовательностей гемагглютининов подтипов Н2 вирусов гриппа А, циркулировавших в человеческой популяции с 1957 по 1966 г.

реассортантных штаммов как для живой (ЖГВ), так и для инактивированной (ИГВ) гриппозных вакцин. Ранее нами было показано, что донор А/Гонконг/1/68/162/35 имеет высокую репродуктивную (9—9,5 lg ЭИД₅₀) и гемагглютинирующую (1:1024—1:2048) активность, а также маркеры аттенуации к человеку ts-, са-фенотип. Реассортанты на основе донора А/Гонконг/1/68/162/35 наследуют ts-, са-фенотип и приобретают более высокую инфекционную, гемагглютинирующую и репродуктивную активность. При этом они безопасны и нетоксичны для лабораторных животных [8—10].

Цель работы — получение реассортантов на основе вирусов гриппа А/Н2N2 и А/Н7N9 и донора внутренних генов А/Гонконг/1/68/162/35 в качестве кандидатных вакцинных штаммов, исследование их репродуктивных свойств и иммуногенности.

Материал и методы

Вирусы. А/Гонконг/1/68/162/35 (H3N2) — А/ГК/ХА — холодоадаптированный штамм — донор аттенуации и высокой репродуктивной активности (получен в лаборатории гриппозных вакцин ФБГУ «НИИ гриппа» [патент № 2511431]. А/Shanghai/2/2013 (H7N9) — PR8-IDCDC-RG32A — реассортант, полученный методом обратной генетики на основе вируса гриппа А/Шанхай/2/2013 (H7N9) и донора А/Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1) (Центр по контролю и профилактике инфекционных болезней (CDC), Атланта, США). А/Калифорния/1/66 (H2N2) — эпидемический штамм, полученный из ФГБУ «НИИ-ЭМ» РАН. А/Япония/305/57 (H2N2) — эпидемический штамм из коллекции вирусов ФГБУ «НИИ гриппа».

Реассортацию проводили классическим методом в 10—11-дневных развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ) [11]. Состав генома реассортантов определяли методом ОТ-ПЦР и рестрикционного анализа с использованием специально подобранных праймеров и рестриктаз. Принадлежность нейраминидазы определяли методом ОТ-ПЦР с типоспецифичными праймерами к различным субтипам. Принадлежность НА определяли в РТГА [12].

Подготовка вакцинных препаратов. Для получения ЖГВ накопленный вирусный материал реассортантных вирусов разводили фосфатно-солевым буфером (ФСБ) до концентрации 6,5 lg ЭИД₅₀/мл. Препараты ИГВ получали методом изопикнического центрифугирования

в градиенте плотности сахарозы. Инактивацию проводили 0,02% формалином. Содержание НА в вакцинных препаратах оценивали методом электрофореза в полиакриламидном геле с последующей денситометрией. Препараты ИГВ содержали 15 мкг НА на дозу (0,5 мл). В качестве адьюванта использовали гидроксид алюминия — 500 мкг на дозу.

Температурочувствительность и холодоадаптированность вирусов оценивали по результатам их параллельного титрования в РКЭ при оптимальной (32 °С), повышенной (39 °С) и пониженной (26 °С) температуре и выражали в виде разницы показателей инфекционной активности в lg ЭИД₅₀/0,2 мл (соответственно RCT₃₉ и RCT₂₆).

Иммунизация животных. Мышей линии Balb/c массой 18—20 г иммунизировали ЖГВ двукратно интраназально в дозе 6,5 lg ЭИД₅₀. Препараты ИГВ вводили внутримышечно двукратно с интервалом 2 нед в дозе 15 мкг НА на мыш. Сыворотки крови забирали у 5 мышей каждой группы на 14-й день после 2-й иммунизации. Контрольные группы иммунизировали ФСБ.

Серологические исследования. Реакцию торможения гемагглютинации (РТГА) проводили микрометодом, реакцию нейтрализации (РН) выполняли в культуре клеток MDCK [13].

Статистическую обработку результатов проводили с помощью непараметрического критерия Манна—Уитни. Все работы с животными проводили согласно Международным рекомендациям по проведению медико-биологических исследований с использованием животных [14].

Результаты

Методом прямой генетической реассортации были получены реассортанты RA-36 (А/Япония/ГК/6:2 H2N2), RA-40 (А/Калифорния/ГК/6:2 H2N2) и RA-35 (А/Шанхай/ГК/6:2 H7N9), заимствовавшие поверхностные антигены от потенциально пандемических штаммов, а гены внутренних белков — от штамма-донора А/ГК/ХА, что подтверждается результатами ОТ-ПЦР-рестрикционного анализа (рис. 2).

Реассортанты, полученные на основе донора А/ГК/ХА, показали высокую репродуктивную активность в РКЭ. Гемагглютинирующая активность реассортанта RA-36

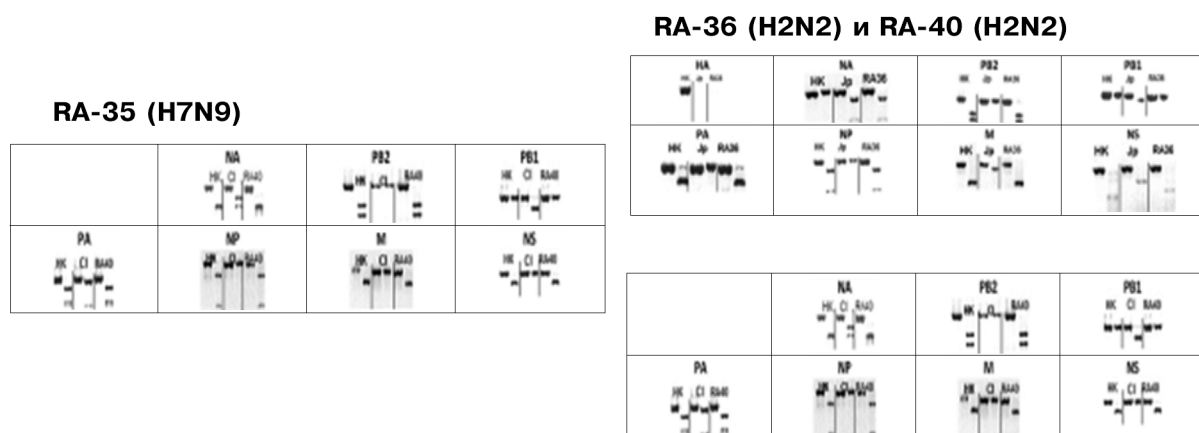


Рис. 2. Геномный состав реассортантов, полученных на основе донора внутренних генов А/Гонконг/1/68/162/35 (H3N2). RA-36 (А/Япония/ГК/6:2 H2N2), RA-40 (А/Калифорния/ГК/6:2 H2N2) и RA-35 (А/Шанхай/ГК/6:2 H7N9).

Таблица 1

Биологические свойства реассортантов и родительских вирусов

Штамм	Инфекционная активность при температуре, lg ЭИД ₅₀ /0,2 мл			RCT _{26°} фено-тип	RCT _{39°} фено-тип	ГАЕ/ ₅₀ мл
	26 °С	32 °С	39 °С			
A/Shanghai/2/2013 (H7N9) — PR8-IDCDC-RG32A	<0,5	7,66	6,0	7,1 non-ca-	1,66 non-ts-	128—256
RA-35 A/Шанхай/ГК/6:2 (H7N9)	8,33	9,5	<0,5	1,2 ca-	9,0 ts-	512—1024
A/Япония/305/57	5,0	8,5	5,5	3,5 non-ca-	3,0 non-ts-	128—256
RA-36 (A/Япония/ГК/6:2 H2N2)	6,75	9,5	2,5	2,75 ca-	7,0 ts-	1024
A/Калифорния/1/66	2,75	8,5	2,0	5,75 non-ca-	6,5 ts-	64—128
RA-40 (A/Калифорния/ГК/6:2 H2N2)	6,75	9,5	<0,5	2,75 ca-	9,0 ts-	1024
A/ГК/1/68/162/35	8,5—9,5	9,0—10,0	1,5	0,5 ca-	7,5 ts-	1024—2048

Таблица 2

Антигенная специфичность реассортанта А/Шанхай/ГК/6:2 (H7N9) в РТГА

Сыворотки, титр в РТГА	Тестируемые вирусы	
	А/Шанхай/2/2013 (H7N9)	А/Шанхай/ГК/6:2 (H7N9)
A(H1N1)pdm09 (160)	<10	<10
A(H1N1) (160)	<10	<10
A(H2N2) (160)	<10	<10
A(H3N2) (320)	<10	<10
B (320)	<10	<10
A(H7N9) (640)	640	640
A(H7N3) (640)	320	320

составила 1:1024 ГАЕ, RA-40 — 1:2048 ГАЕ, RA-35 — 1:1024, что соответствует повышению титра вируса в 4—8 раз по сравнению с исходными вариантами для всех штаммов. Инфекционная активность в РКЭ возросла на 1—2 lg ЭИД₅₀/0,2 мл и достигла 9,5 lg ЭИД₅₀/0,2 мл (табл. 1).

Все полученные реассортанты наследовали от штамма-донора А/Гонконг/1/68/162/35 ts-, ca-фенотип — спо-

собность хорошо репродуцироваться при пониженной температуре и почти полную потерю способности к репродукции при повышенной температуре (см. табл. 1). Для оценки генетической стабильности реассортантных вакцинных штаммов их 5-кратно пассировали при 32°С в системе РКЭ. Все вирусы после пассирования сохранили фенотипические характеристики, присущие исходным вариантам. Степень температурочувствительности и холодоадаптированности, а также уровень репродукции не изменялись при 5-кратном пассировании. Таким образом, реассортантные штаммы удовлетворяют требованиям температурочувствительности и холодовой адаптации, предъявляемым к вакцинным штаммам для ЖГВ, и высокой репродуктивности для ИГВ.

При исследовании антигенной специфичности полученных реассортантов в РТГА было показано, что все они не реагировали с гетерологичными типоспецифическими сыворотками. Реассортант А/Шанхай/ГК/6:2 (H7N9) реагировал со специфическими иммунными крысиными сыворотками типа А/Н7N9 и А/Н7N3 (табл. 2). При исследовании специфичности вирусов H2N2 было выявлено наличие перекрестного антигенного взаимодействия (табл. 3), что соответствует данным литературы [15] и результатам, полученным в наших исследованиях иммунных сывороток мышей (рис. 3, 4).

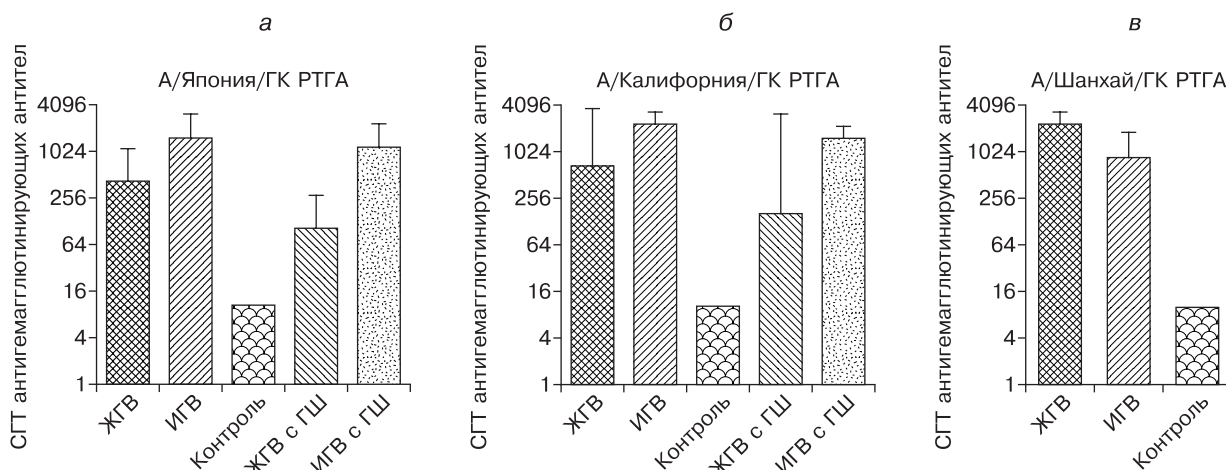


Рис. 3. Титры геммагглютинирующих антител в сыворотках крови мышей, иммунизированных ЖГВ и ИГВ на основе вирусов H2N2 (а, б) и H7N9 (в).

Здесь и на рис. 4: ГШ — гетерологичный штамм.

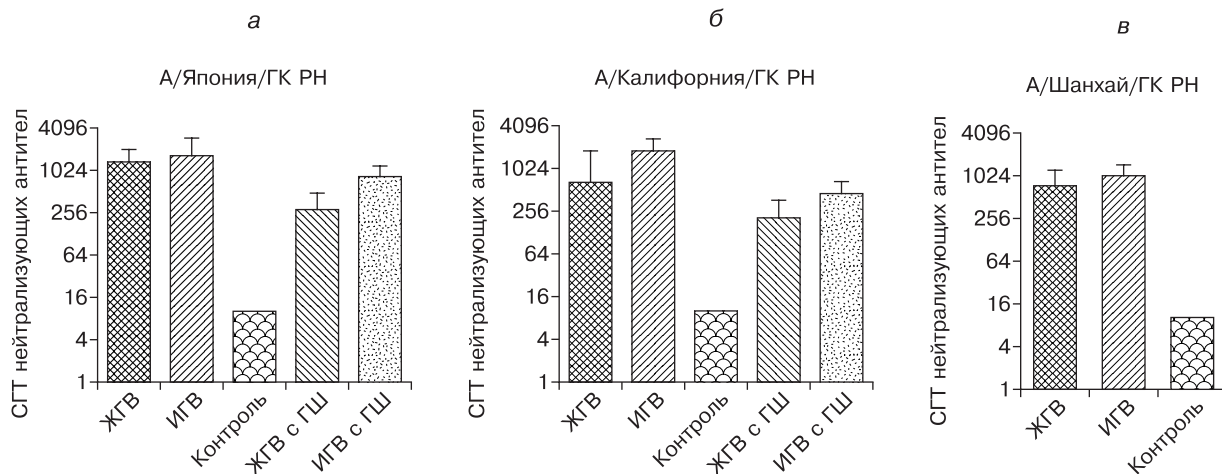


Рис. 4. Титры нейтрализующих антител в сыворотках крови мышей, иммунизированных ЖГВ и ИГВ на основе вирусов H2N2 (а, б) и H7N9 (в).

Препараты ЖГВ и ИГВ, подготовленные на основе реассортантных штаммов, использовали для иммунизации мышей и исследования иммуногенности. Данные по содержанию антигемагглютинирующих и нейтрализующих антител к вирусам гриппа в сыворотках крови мышей, иммунизированных препаратами ЖГВ и ИГВ реассортантных штаммов (см. рис. 3, 4), демонстрируют достоверное ($p < 0,05$) повышение уровня антигемагглютинирующих и вируснейтрализующих антител по сравнению с контрольными животными во всех группах.

После иммунизации ИГВ на основе реассортантных вирусов А/Калифорния/ГК/6:2 (H2N2), А/Япония/ГК/6:2 (H2N2) и А/Шанхай/ГК/6:2 (H7N9) в сыворотках мышей были выявлены антигемагглютинирующие и вируснейтрализующие антитела в титрах, достаточных для формирования защитного иммунитета (СГТ в РТГА от 403 до 1940,1, в РН — от 640 до 1940,1) (см. рис. 3, 4). В случае штаммов H2N2 в сыворотках мышей выявлялись антигемагглютинирующие и нейтрализующие антитела как к штамму, на основе которого были получены вакцины, так и к гетерологичному штамму того же подтипа, что позволяет предполагать широкий спектр действия вакцин в рамках подтипа вируса гриппа А/H2N2.

Заключение

Работы по созданию вакцин против пандемических вирусов гриппа ведутся во всем мире, ряд вакцин прошли или проходят испытания на приматах и людях. Это в

основном вакцины, полученные на основе штаммов вируса гриппа А/H2N2, циркулировавших в человеческой популяции с 1957 по 1968 г., или на основе современных штаммов животного происхождения [16— 19]. Аналогичные работы ведутся и в отношении вируса гриппа А/ H7N9 [15, 20, 21]. Во всех случаях проводились исследования либо живых, либо инактивированных вакцин. В нашем исследовании одни и те же штаммы использовались для получения и живой, и инактивированной вакцины и в обоих случаях показали аттенуированность, высокую репродуктивность, а препараты, полученные на их основе, — высокую иммуногенность. Можно заключить, что все исследованные штаммы обладают набором признаков, необходимых вакцинному штамму, — структурой генома, антигенной специфичностью НА соответствующих вирусов «дикого» типа, хорошей адаптацией к культивированию при пониженной температуре, температурочувствительностью, а также высоким уровнем репродукции в куриных эмбрионах. Высокие уровни титров гемагглютинирующих и нейтрализующих антител в сыворотках крови иммунизированных животных позволяют рассматривать полученные реассортанты RA-35 (А/Шанхай/ГК/6:2 H7N9), RA-36 (А/Япония/ГК/6:2 H2N2) и RA-40 (А/Калифорния/ГК/6:2 H2N2) в качестве кандидатных вакцинных и производственных штаммов в условиях предпандемической ситуации для производства как инактивированной, так и живой гриппозной вакцины после исследований, посвященных

Таблица 3

Антигенная специфичность вирусов H2N2 в РТГА

Сыворотки, титр в РТГВ	Тестируемые вирусы					
	А/Калифорния/1/66 H2N2	А/Япония/305/57 H2N2	А/Токио/3/67 H2N2	А/Сингапур/1/57 H2N2	А/Япония/ГК/6:2 H2N2	А/Калифорния/ГК/6:2 H2N2
А(H1N1)pdm09 (160)	<10	<10	<10	<10	<10	<10
А(H1N1) (160)	<10	<10	<10	<10	<10	<10
А(H3N2) (320)	<10	<10	<10	<10	<10	<10
В (320)	<10	<10	<10	<10	<10	<10
А/Калифорния/1/66 H2N2 (512)	512	256	128	256	256	512
А/Япония/305/57 H2N2 (512)	32	512	16	128	512	128

специфической безопасности штаммов и протективно-му действию препаратов, полученных на их основе. В настоящее время проводится цикл исследований полученных нами реассортантов в данном направлении.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1—6, 15—21 см. REFERENCES)

7. Цыбалова Л.М., Горев Н.Е., Репко И.А., Потапчук М.В., Сергеева М.В., Киселев О.И. Вирус гриппа А/Гонконг/1/68/162/35 — универсальный донор внутренних генов для вакцинных и производственных штаммов. Патент РФ № 2511431; 2011.
8. Цыбалова Л.М., Горев Н.Е., Потапчук М.В., Репко И.А., Коротков А.В., Сергеева М.В. и др. Характеристика холодоадаптированного штамма вируса гриппа А/Гонконг/1/68/162/35 как потенциального донора аттенуации и высокой репродуктивности. *Вопросы вирусологии.* 2012; 57(6): 13—7.
9. Потапчук М.В., Репко И.А., Сергеева М.В., Коротков А.В., Комиссаров А.Б., Сандыбаев Н.Т. и др. Характеристика реассортантных штаммов вируса гриппа на основе нового донора А/HongKong/1/68/162/35(H3N2). *Вопросы вирусологии.* 2012; 57(6): 42—6.
10. Сергеева М.В. Сравнительное исследование специфической активности живой и инактивированной вакцин против потенциально пандемического гриппа на морских свинках. *Медицинский академический журнал.* 2012; 12(4): 52—4.
11. Александрова Г.И. Применение метода генетической реассортации для получения вакцинных штаммов вируса гриппа. *Вопросы вирусологии.* 1997; 42(4): 387—95.
12. МУ 3.3.2.1758—03. Методы определения показателей качества иммунобиологических препаратов для профилактики и диагностики гриппа. М.; 2003.
13. Соминина А.А., Кривичья В.З., Войцеховская Е.М., Медведева Н.А., Липина Н.В., Потапенко Л.Б. *Практические рекомендации по лабораторной диагностике вирусных инфекций.* СПб.; 2005.
14. Международные рекомендации по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (Биоэтический кодекс). Available at: <http://www.msu.ru/bioetika/recomend.doc>
15. attachment to the respiratory tract of five animal models. *J. Virol.* 2014; 88(8): 4595—9.
16. Tsybalova L.M., Gorev N.E., Repko I.A., Potapchuk M.V., Sergeeva M.V., Kiselev O.I. Influenza virus strain A/Hong Kong/1/68/162/35 — universal donor of internal genes for reassortants and reassortant strains. Patent RF N 2511431; 2011. (in Russian)
17. Tsybalova L.M., Gorev N.E., Potapchuk M.V., Repko I.A., Korotkov A.V., Sergeeva M.V. et al. Characteristics of cold-adapted strain of influenza A/Hong Kong/1/68/162/35 as a potential donor of attenuation and high fertility. *Voprosy virusologii.* 2012; 57(6): 13—7. (in Russian)
18. Potapchuk M.V., Repko I.A., Sergeeva M.V., Korotkov A.V., Komissarov A.B., Sandybaev N.T. et al. Characteristics of reassortant influenza virus strains based on new donor A/HongKong/1/68/162/35 (H3N2). *Voprosy virusologii.* 2012; 57(6): 42—6. (in Russian)
19. Sergeeva M.V. A comparative study of the specific activity of live and inactivated vaccines against potential pandemic influenza in guinea pigs. *Meditsinskiy akademicheskiy zhurnal.* 2012; 12(4): 52—4. (in Russian)
20. Aleksandrova G.I. Use of a method of a genetic reassortation for receiving vaccine influenza strains. *Voprosy virusologii.* 1997; 42(4): 387—95. (in Russian)
21. Methodical instructions 3.3.2.1758—03. Methods for determination of parameters of quality of immunobiological drugs for the prevention and diagnosis of influenza. Moscow; 2003. (in Russian)
22. Somnina A.A., Krivitskaya V.Z., Voytsekhovskaya E.M., Medvedeva N.A., Lipina N.V., Potapenko L.B. et al. *Practical Recommendations for the Laboratory Diagnosis of Viral Infections [Prakticheskie rekomendatsii po laboratornoy diagnostike virusnykh infektsiy].* St. Petersburg; 2005. (in Russian)
23. International recommendations for biomedical research involving animals (Bioethics Code). Available at: <http://www.msu.ru/bioetika/recomend.doc> (in Russian)
24. Duan Y., Gu H., Chen R., Zhao Z., Zhang L., Xing L. et al. Response of mice and ferrets to a monovalent influenza A (H7N9) split vaccine. *PLoS One.* 2014; 9(6): e99322.
25. Isakova-Sivak I., Stukova M., Erofeeva M., Naykhin A., Donina S., Petukhova G. et al. H2N2 live attenuated influenza vaccine is safe and immunogenic for healthy adult volunteers. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2015; 11(4): 970—82.
26. Broadbent A.J., Santos C.P., Paskel M., Matsuoka Y., Lu J., Chen Z. et al. Replication of live attenuated cold-adapted H2N2 influenza virus vaccine candidates in non human primates. *Vaccine.* 2015; 33(1): 193—200.
27. Chen G.L., Lamirande E.W., Cheng X., Torres-Velez F., Orandle M., Jin H. et al. Evaluation of three live attenuated H2 pandemic influenza vaccine candidates in mice and ferrets. *J. Virol.* 2014; 88(5): 2867—76.
28. Isakova-Sivak I., de Jonge J., Smolnogina T., Rekstin A., van Amerongen G., van Dijken H. et al. Development and Pre-Clinical Evaluation of Two LAIV Strains against Potentially Pandemic H2N2 Influenza Virus. *PLoS One.* 2014; 9(7): e102339.
29. To K.K., Zhang A.J., Chan A.S., Li C., Cai J.P., Lau C.C. et al. Recombinant influenza A virus hemagglutinin HA2 subunit protects mice against influenza A(H7N9) virus infection. *Arch. Virol.* 2015; 160(3): 777—86.
30. Kong H., Zhang Q., Gu C., Shi J., Deng G., Ma S. et al. A live attenuated vaccine prevents replication and transmission of H7N9 virus in mammals. *Sci. Rep.* 2015; 5: 11233.

REFERENCES

1. Jones J.C., Baranovich T., Marathe B.M., Danner A.F., Seiler J.P., Franks J. et al. Risk assessment of H2N2 influenza viruses from the avian reservoir. *J. Virol.* 2014; 88(2): 1175—88.
2. Pappas C., Yang H., Carney P.J., Pearce M.B., Katz J.M., Stevens J. et al. Assessment of transmission, pathogenesis and adaptation of H2 subtype influenza viruses in ferrets. *Virology.* 2015; 477: 61—71.
3. Koopmans M., Wilbrink B., Conyn M., Natrop G., van der Nat H., Vennema H. et al. Transmission of H7N7 avian influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands. *Lancet.* 2004; 363(9409): 587—93.
4. World Health Organization. Available at: <http://www.euro.who.int>
5. Bao L., Xu L., Zhu H., Deng W., Chen T., Lv Q. et al. Transmission of H7N9 influenza virus in mice by different infective routes. *Virol. J.* 2014; 11: 185.
6. Siegers J.Y., Short K.R., Leijten L.M., de Graaf M., Spronken M.I., Schrauwen E.J. et al. Novel avian-origin influenza A (H7N9) virus

Поступила 07.04.16

Принята в печать 24.05.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 615.281.8.03:616.2-022.6-036.11-085

Петленко С.В.¹, Осидак Л.В.², Смирнов В.С.¹, Стукань Н.И.¹, Афанасьева О.И.², Головачева Е.Г.²

СРАВНИТЕЛЬНАЯ КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ ОСТРЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

¹ ЗАО «Медико-биологический научно-производственный комплекс «Цитомед», 191023, г. Санкт-Петербург;² ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, 197376, г. Санкт-Петербург

В статье представлены материалы клинического исследования, посвященного изучению сравнительной эффективности различных лекарственных форм препаратов Цитовир-3 (сироп и порошок для приготовления раствора для приема внутрь) и Иммунал при лечении острых респираторных вирусных инфекций у детей. В ходе сравнительного рандомизированного исследования в параллельных группах из 90 детей в возрасте от 2 до 6 лет было установлено, что препарат Цитовир-3 (сироп и порошок) способствовал более быстрому, чем препарат сравнения Иммунал, купированию температурной реакции, редукции некоторых проявлений общей интоксикации и респираторного синдрома, а также повышению содержания сывороточного иммуноглобулина А. Все исследуемые препараты в равной степени оказывали нормализующее влияние на содержание лейкоцитов периферической крови и скорость оседания эритроцитов. Препараты сравнения характеризовались хорошей переносимостью, отсутствием побочных реакций и высокой профилактической эффективностью в отношении осложнений респираторной патологии. По соотношению клинико-лабораторной эффективности, безопасности и переносимости Цитовир-3 и Иммунал сопоставимы и могут применяться для лечения респираторной патологии у детей от 2 до 6 лет.

Ключевые слова: Цитовир-3; Иммунал; рандомизированное клиническое исследование; дети; сравнительная эффективность.

Для цитирования: Петленко С.В., Осидак Л.В., Смирнов В.С., Стукань Н.И., Афанасьева О.И., Головачева Е.Г. Сравнительная клинико-лабораторная эффективность препаратов для патогенетического лечения острых респираторных вирусных инфекций. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61(6): 263-269.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2016-61-6-263-269>

Petlenko S.V.¹, Osidak L.V.², Smirnov V.S.¹, Stukan' N.I.¹, Afanas'eva O.I.², Golovacheva E.G.²

COMPARATIVE EFFICIENCY OF PATHOGEN TREATMENT OF ACUTE RESPIRATORY VIRAL INFECTIONS

¹ Biomedical Research and Production Complex "Cytomed", St. Petersburg, 191023, Russian Federation;² Research Institute of Influenza, St. Petersburg, 197376, Russian Federation

The article presents the results of clinical studies on the comparative effectiveness of different forms of the drug Cytovir-3 (syrup and powder for solution for oral administration) and Immunal I in the treatment of acute respiratory viral infections in children. It was found in a comparative randomized parallel-group study of 90 children aged two through six years that the drug Cytovir-3 (syrup and powder) became active faster than the comparison drug Immunal, providing normalization of body temperature, reduction of some manifestations of the general intoxication and respiratory syndrome, as well as elevated levels of serum immunoglobulin A. All drugs in the study had an equally normalizing effect on the content of peripheral blood leukocytes and erythrocyte sedimentation rates. The compared products were characterized by good tolerability, lack of side effects and high preventive efficacy against respiratory disease complications. Cytovir-3 drugs (syrup and powder for oral solution) and Immunal had similar ratios of clinical and laboratory safety, efficacy and tolerability. Both products can be used for the treatment of respiratory diseases in children aged two through six years.

Key words: Cytovir-3; Immunal; randomized clinical trial; children; comparative effectiveness.

For citation: Petlenko S.V., Osidak L.V., Smirnov V.S., Stukan' N.I., Afanas'eva O.I., Golovacheva E.G. Comparative efficiency of pathogen treatment of acute respiratory viral infections. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2016; 61(6):263-269. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2016-61-6-263-269>

For correspondence: Sergey V. Petlenko, MD, Head of the Department of clinical studies, Biomedical Research and Production Complex "Cytomed", St. Petersburg, 191023, Russian Federation. E-mail: petlenko@mail.ru

Acknowledgments. Clinical studies were performed and the scientific paper was written as a part of regular research activities without extra funding.

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

Received 10 May 2016

Accepted 24 May 2016

Введение

Несмотря на успехи современной медицины, грипп и другие острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ) до сих пор играют ведущую роль в структуре

инфекционной заболеваемости населения, особенно детей младшего и среднего возраста. К сожалению, эти инфекции далеко не всегда ограничиваются кратковременным нарушением самочувствия и легкой симпто-

Для корреспонденции: Петленко Сергей Викторович, д-р мед. наук, рук. отдела клинических исследований ЗАО МБНПК «Цитомед», 191023, г. Санкт-Петербург. E-mail: petlenko@mail.ru

Таблица 1

Клинические диагнозы ОРВИ у детей наблюдавшихся групп

Диагноз	Частота диагноза у детей наблюдавшихся групп, абс/% (n = 30)		
ОРВИ	4/13,3	6/20	1/3,3
ОРВИ + ОСЛТ	4/13,3	4/13,3	6/20
ОРВИ + ОБ	17/56,7	20/66,7	18/60
ОРВИ + стоматит	0	1/3,3	2/6,7
ОРВИ + отит	4/13,3	1/3,3	2/6,7
ОРВИ + судороги	1/3,3	0	1/3,3

Примечание. ОСЛТ — острый стенозирующий ларинготрахеит; ОБ — острый бронхит; n — число детей в каждой группе.

матикой, обусловленной поражением верхних отделов респираторного тракта. Нередки случаи тяжелого течения заболеваний с высокой температурой тела, выраженными поражениями респираторного тракта вплоть до развития пневмонии и дыхательной недостаточности. В крайних случаях, особенно в период пандемий гриппа, эти поражения могут привести к летальному исходу. Для экстренной профилактики и лечения гриппа и ОРВИ в настоящее время применяются многочисленные лекарственные средства различной природы [1]. В первую очередь это препараты с прямым противовирусным действием. К ним относятся производные адамантанов (амантадин, римантадин), ингибиторы нейраминидазы (озельтамивир, занамивир, перамивир) и аномальные нуклеотиды (рибавирин) [2, 3]. К сожалению, к одним из этих препаратов вирус способен формировать невосприимчивость, другие дают побочные реакции и не разрешены к применению у детей младшего возраста. Кроме того, большинство из них эффективно только в ранних стадиях инфекционного процесса [4, 5].

Другой подход к профилактике и терапии ОРВИ и гриппа заключается в применении средств, влияющих на патогенез инфекции через сигнальные пути организма и/или механизмы врожденного иммунитета. К числу таких средств относятся в частности иммуномодуляторы, индукторы синтеза интерферона и антиоксиданты [6, 7]. Препараты этих групп не влияют непосредственно на вирус, но могут, модифицируя патогенез инфекционного процесса, способствовать снижению его тяжести или риска развития осложнений, а при использовании в продромальном периоде даже приводить к инволюции заболевания за счет мобилизации механизмов врожденного иммунитета [2].

К числу подобных лекарственных средств относятся комбинированный препарат Цитовир-3 [8] и препараты на основе эхинацеи [9, 10].

Цитовир-3 является фармацевтической композицией, в состав которой входят 3 лекарственных субстанции: глутамил-триптофан натрия, 2-бензилбензимидазола гидрохлорид (бендазол) и аскорбиновая кислота [11]. Фармакологический эффект композиции обусловлен аддитивностью механизмов действия образующих ее компонентов. Считается, что бендазол стимулирует факторы врожденного иммунитета, что проявляется индукцией интерферонов типа 1 и стимуляцией фагоцитарной активности [8, 12]. Глутамил-триптофан натрия — синтетический иммуномодулятор, влияющий на процессы дифференцировки иммунокомпетентных клеток за счет изменения баланса циклофосфатов в лимфоидных клетках [13]. Кроме того, данный дипептид способен усиливать интерферониндуцирующий потенциал бендазола [14]. Аскорбиновая кислота, кроме хорошо документированной роли в системе клеточного дыхания, а также ее антиоксидантных свойств, обладает способностью подавлять высвобождение фактора трансляции NF-κB вследствие ингибирования репликативного комплекса [15]. Применение

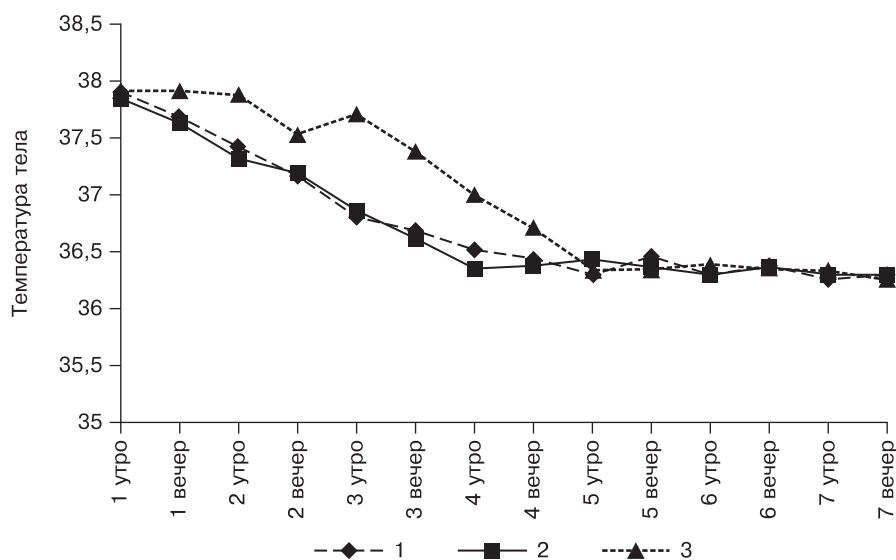
фармакологической композиции Цитовир-3 в медицинской практике позволяет эффективно снижать уровень заболеваемости острыми респираторными инфекциями (ОРВИ) и гриппом [16].

Препараты эхинацеи широко используются в Северной Америке и Европе для профилактики и лечения простудных заболеваний [9]. Имеется несколько различных препаратов эхинацеи, применяемых в медицинской практике. Чаще всего в педиатрии используют экстракты и сок эхинацеи в виде сиропа [17, 18]. Фармакологическое действие препаратов эхинацеи, в том числе на иммунную систему, обусловлено широким спектром природных биологически активных соединений, являющихся компонентами растения [9].

Целью исследования была сравнительная оценка эффективности и безопасности лекарственных форм препаратов Цитовир-3 (сироп и порошок для приготовления раствора для приема внутрь) и Иммунал (сок эхинацеи в виде раствора для детей) при лечении ОРВИ у детей.

Материал и методы

Проведено сравнительное рандомизированное исследование в параллельных группах эффективности и безопасности препаратов Цитовир-3 (порошок и сироп) и



Динамика температуры тела на фоне применения препаратов сравнения.

По оси абсцисс: время измерения температуры; 1 — дети, получавшие Цитовир-3 порошок; 2 — дети, получавшие Цитовир-3 сироп; 3 — дети, получавшие Иммунал сироп.

Таблица 2
Клинические проявления ОРИ в период разгара заболевания у детей в группах сравнения

Признак	Частота признака в наблюдаемых группах, %		
	Цитовир-3		Иммунал (n = 30)
	порошок (n = 30)	сироп (n = 30)	
Повышение температуры тела, °С			
Всего	90	100	96,7
37—37,9	40	66,7	63,4
38—38,9	46,7	30	33,3
≥39	3,3	3,3	0
<i>M ± m</i>	37,89 ± 0,73	37,84 ± 0,50	37,92 ± 0,51
<i>Me</i> (МКР)	37,95 (37,50—38,60)	37,75 (37,60—38,05)	37,85 (37,60—38,33)
Интоксикация			
Всего	86,7	93,3	86,7
Недомогание	10	10	16,7
Адинамия	33,3	40	43,3
Снижение аппетита	86,7	93,3	86,7
Рвота	0	3,3	3,3
Бледность	10	13,3	20
Цианоз	1/3,3	1/3,3	4/13,3
Катаральные явления			
Всего	100	100	100
Затруднение носового дыхания	66,7	50	53,3
Ринит			
серозно-слизистый	73,3	90	56,7
слизисто-гнойный	3,3	0	0
Гиперемия дужек зева	96,7	100	96,7
Зернистость задней стенки глотки	20	23,3	23,3
Кашель			
сухой	90	86,7	86,7
влажный	10	10	6,7
Конъюнктивит	0	6,7	10
Осиплость голоса	13,3	13,3	26,7
Одышка	33,3	26,7	43,3
Жесткое дыхание	90	93,3	83,3
Хрипы в легких			
сухие	40	56,7	46,7
влажные	20	10	6,7
сухие и влажные	0	3,3	3,3
Увеличение			
лимфоузлов	3,3	6,7	10,0
печени	3,3	3,3	3,3
Стоматит	0	3,3	3,3

Примечание. *Me* — медиана; МКР — межквартильный размах.

Иммунал (протокол № IV/ЦПС-2013; разрешение Минздрава № 514 от 12.08.2013):

— Цитовир-3 порошок для приготовления раствора для приема внутрь [для детей]. Регистрационный номер ЛП-000423 от 28.12.2011. Препарат произведен ЗАО «МБНПК «Цитомед», Россия, серия 040113.

— Цитовир-3 сироп [для детей]. Регистрационный номер ЛС000942 от 10.06.2010. Препарат произведен ЗАО

«МБНПК «Цитомед», Россия, серия 570313.

— Иммунал раствор для приема внутрь. Регистрационный номер П N013458/01 от 26.11.2007. Препарат произведен «Lek d.d.», Словения, серия ДД 2383.

В исследовании участвовали 90 детей в возрасте от 2 до 6 лет (45 мальчиков и 45 девочек). При анализе преморбидного фона не выявлено хронических заболеваний и иных состояний, которые могли бы послужить основанием для невключения пациентов в исследование. Включение в исследование проводилось в строгом соответствии с законодательством РФ на основании подписанного родителями или законными представителями детей информированного согласия.

В соответствии с критериями включения методом случайной выборки (рандомизации) было сформировано 3 группы детей по 30 человек в каждой с верифицированным диагнозом гриппа или ОРВИ. Дети 1-й группы (исследуемой) получали Цитовир-3 (порошок), дети 2-й группы (исследуемой) — Цитовир-3 (сироп), дети 3-й группы (сравнения) — Иммунал. Препараты назначали строго в соответствии с инструкциями по применению. Продолжительность применения Цитовира-3 (порошок и сироп) — 4 дня, Иммунала — 7 дней.

Результаты первичного обследования показали, что сформированные группы детей были репрезентативны как по преморбидному фону, так и по верифицированным диагнозам острых инфекций.

Этиологию заболевания устанавливали путем обнаружения возбудителей гриппа, парагриппа, респираторно-синцитиального вируса, аденовируса, коронавируса, метапневмовируса, герпесвирусов и легочной микоплазмы с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) [19].

Об эффективности проводимой терапии судили по продолжительности температурной реакции, скорости редукции катаральных симптомов в носоглотке, продолжительности реконвалесценции и наличию осложнений. Оценка эффективности включала определение клеточного состава периферической крови [4] и содержание сывороточного IgA (sIgA) в носовых смывах [20].

Безопасность исследуемых препаратов оценивали по переносимости (субъективная оценка пациентом или его законным представителем переносимости препарата с помощью визуально-аналоговой шкалы), частоте развития нежелательных явлений (НЯ) и побочных лекарственных реакций (ПЛР).

Статистический анализ полученных результатов про-

Длительность сохранения симптомов интоксикации и катаральных явлений у детей групп сравнения при оценке лечебной эффективности препаратов Цитовир-3 (порошок и сироп) и Иммунал

Симптом	Группа	Частота и выраженность симптомов интоксикации у детей исследуемых групп по дням наблюдения, %														
		1-й		2-й		3-й		4-й		5-й		6-й		7-й		
		А	Б	А	Б	А	Б	А	Б	А	Б	А	Б	А	Б	
Температура тела $\geq 37^\circ\text{C}$	1-я	40,0	50,0	76,7	6,7 [^]	53,3 ^{**}	0	16,7	0	3,3	0	0	0	0	0	
	2-я	66,7	30,0	80,0	20,0	43,3 [#]	3,3 [^]	0	0	0	0	0	0	0	0	
	3-я	63,3	33,3	56,7	43,3	66,7	6,7	40,0	0 [^]	6,7	0	0	0	0	0	
Недомогание	1-я	3,3	6,7	6,7	3,3	3,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2-я	3,3	6,7	6,7	3,3	0	3,3	3,3	0	0	0	0	0	0	0	
	3-я	10,0	6,7	13,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Адинамия	1-я	30,0	3,3	30,0	0	23,3	0	3,3	0	3,3	0	0	0	0	0	
	2-я	36,7	3,3	33,3	0	30,0	0	10,0	0	6,7	0	6,7	0	0	0	
	3-я	36,7	6,7	40,0	0	33,3	0	20,0	0	3,3	0	0	0	0	0	
Снижение аппетита	1-я	73,3	13,3	76,7	10,0	73,3	3,3	56,7	3,3	46,7	0	36,7	0	13,3	0	
	2-я	73,3	20,0	80,6	10,0	83,9	3,3	80,0	0	40,0	0	36,7	0	3,3	0	
	3-я	66,7	20,0	70,0	13,3	80,0	3,3	63,3	3,3	20,0	3,3	10,0	3,3	10,0	3,3	
Бледность	1-я	13,3	0	13,3	0	3,3	0	3,3	0	3,3	0	3,3	0	0	0	
	2-я	13,3	0	10,0	0	10,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	3-я	6,7	3,3	16,7	3,3	10,0	0	6,7	0	3,3	0	0	0	0	0	
Ринит	заложенность носа	1-я	53,3	13,3	60,0	6,7	53,3	6,7	50,0	0	23,3 [^]	0	0	0	0	0
		2-я	40,0	10,0	36,7	10,0	43,3	0	23,3 [^]	0	3,3	0	3,3	0	3,3	0
		3-я	43,3	10,0	43,3	10,0	46,7	0	30,0	0	13,3 [^]	0	3,3	0	0	0
слизисто-серозный секрет	1-я	43,3	30,0	43,3	30,0	53,3	13,3	60,0	6,7	56,7	0	10,0 [^]	0	0	0	
	2-я	60,0	26,6	60,0	26,7	60,0	26,7	56,7	10,0	40,0 [^]	3,3	20,0	0	3,3	0	
	3-я	33,3	26,7	33,3	26,7	46,7	13,3	53,3	3,3	46,7	0	23,3	0	3,3	0	
Гиперемия дужек	1-я	80,0	16,7	80,0	16,7	90,0	6,7	93,3	0	83,3	0	63,3	0	26,7 [*]	0	
	2-я	86,7	13,3	86,7	13,3	86,7	13,3	86,7	10,0	83,3	6,7	74,2	0	23,3 ^{**}	0	
	3-я	90,0	10,0	90,0	10,0	96,7	3,3	93,3	0	86,7	0	80,0	0	53,3	0	
Кашель	сухой	1-я	40,0	50,0	40,0	46,7	70,0	10,0 [^]	53,3	0	30,0 [^]	0	6,7	0	3,3	0
		2-я	36,7	50,0	40,0	50,0	53,3	16,7 [^]	60,0	0	26,7	0	10,0	0	0	0
		3-я	50,0	40,0	53,3	36,7	63,3	13,3 [^]	56,7	0	6,7	0	3,3	0	0	0
влажный	1-я	0	13,3	0	16,7	3,3	20,0 [^]	33,3	10,0	46,7	3,3	46,7	3,3	16,7 [*]	0	
	2-я	3,3	6,6	3,3	6,6	16,7	13,3	20,0 [^]	7	26,7	13,3	40,0	20,0	23,3	0	
	3-я	3,3	3,3	3,3	3,3	10,0	13,3	23,3 [^]	13,3	40,0	13,3	46,7	10,0	36,7	0	

Примечание. Различия показателей статистически значимы: * — между 1-й и 3-й группой; ** — между 2-й и 3-й группой; # — между 1-й и 2-й группой; ^ — по отношению к соответствующему показателю в 1-й день; А — температура тела утром; Б — то же вечером.

водили с использованием пакета статистических программ IBM SPSS Statistics 21. Достоверность различий оценивали с надежностью 95%.

Результаты

Средний возраст детей составил в 1-й группе $37,7 \pm 1,95$ мес, во 2-й — $37,1 \pm 1,37$ мес, в 3-й — $34,4 \pm 1,75$ мес; различия недостоверны. В 1-й группе преобладали мальчики (60%), в двух других — девочки (56,7 и 53,3%). Различия между группами по гендерному признаку были незначимы. При клиническом обследовании

у всех детей была диагностирована ОРИ с теми или иными преобладающими проявлениями (табл. 1).

ОРИ у детей чаще всего протекала с проявлениями острого бронхита, реже это была инфекция без каких-либо сопутствующих проявлений (см. табл. 1). Такие явления, как стоматит, отит и судороги, отмечены в единичных случаях.

Заболевание во всех случаях начиналось остро с повышения температуры тела до более $37,1^\circ\text{C}$. Чаще всего температура варьировала в пределах $37\text{—}37,9^\circ\text{C}$, более высокие значения в пределах $38\text{—}38,9^\circ\text{C}$ наблюдались у

Таблица 4
Динамика показателей периферической крови пациентов в процессе лечения сравниваемыми препаратами ($M \pm m$)

Показатель	Срок исследования, дни	Цитовир-3 порошок	Цитовир-3 сироп	Иммунал сироп
Гемоглобин, г/л	1-й	126,87 ± 5,67	125,3 ± 6,0	114,7 ± 5,5
	6-й	124,77 ± 5,18	123,8 ± 5,5	113,7 ± 5,4
Эритроциты, $\cdot 10^{12}/л$	1-й	3,98 ± 0,45	4,3 ± 0,44	4,12 ± 0,42
	6-й	4,06 ± 0,40	4,3 ± 0,35	4,0 ± 0,36
Лейкоциты, $\cdot 10^9/л$	1-й	11,73 ± 9,93	9,24 ± 2,31	9,26 ± 2,49
	6-й	9,09 ± 3,37*	8,18 ± 1,29*	8,08 ± 1,44
Форменные элементы периферической крови				
эозинофилы	1-й	2,48 ± 0,31	1,77 ± 0,22	2,33 ± 0,36
	6-й	1,86 ± 0,22	1,47 ± 0,26	1,73 ± 0,28
нейтрофилы	1-й	48,07 ± 15,73	49,37 ± 14,5	46,4 ± 12,08
	6-й	48,23 ± 14,40	48,93 ± 11,8	47,6 ± 12,11
палочкоядерные	1-й	3,37 ± 0,35	1,57 ± 0,31	1,33 ± 0,22
	6-й	1,40 ± 0,08	1,07 ± 0,26	0,50 ± 0,14
сегментоядерные	1-й	46,53 ± 15,46	47,87 ± 14,5	45,17 ± 1,48
	6-й	48,00 ± 14,13	47,87 ± 11,7	47,07 ± 1,52
лимфоциты	1-й	39,47 ± 15,12	42,27 ± 15,6	43,6 ± 11,68
	6-й	38,03 ± 12,56	41,57 ± 11,4	42,5 ± 11,01
моноциты	1-й	7,80 ± 0,48	6,70 ± 2,8	7,70 ± 0,64
	6-й	10,57 ± 0,4	8,03 ± 2,6	8,13 ± 0,58
Тромбоциты, $\cdot 10^9/л$	1-й	236,79 ± 63,14	224,1 ± 37,5	224,1 ± 37,5
	6-й	222,00 ± 57,74	224,5 ± 43,2	224,5 ± 43,2
СОЭ, мм/ч	1-й	18,43 ± 6,37	19,86 ± 2,78	19,86 ± 2,78
	6-й	14,16 ± 4,17*	14,8 ± 2,55*	14,8 ± 2,55*

Примечание. * — различия показателей статистически значимы по отношению к исходным данным.

детей 1-й группы (46,7%), в то время как в двух других группах число детей с такой температурой не превышало 30—33,3%. Температура выше 39 °С отмечена только в единичных случаях. Статистический анализ не показал достоверных различий между группами по этому параметру. Другие клинические симптомы были типичными для ОРВИ и проявлялись преимущественно гиперемией и зернистостью дужек зева и задней стенки глотки, а также жестким дыханием. Достоверных межгрупповых различий в клинической картине не выявлено.

По результатам ПЦР в этиологической структуре преобладали аденовирусы (до 12%), вирусы парагриппа (до 12%) респираторно-синцициальный вирус (36%), вирусы гриппа А (H1N1) выявлены в одном случае, А (H3N2) — у 4 больных 1-й группы и 3 больных 3-й группы. Вирусы гриппа В обнаружены у одного больного 1-й группы. В отдельных случаях выявляли комбинацию нескольких возбудителей у одного больного. В целом, характеризуя этиологическую структуру инфекции, следует отметить, что по данному показателю группы сравнения достоверно не отличались друг от друга.

Таким образом, на основании исходных данных все три группы можно признать репрезентативными для проведения сравнительных исследований и последую-

щей статистической обработки полученных материалов.

У большинства детей заболевание начиналось остро с типичными клиническими проявлениями острой респираторной вирусной инфекции (табл. 2).

В процессе клинического исследования, продолжавшегося в среднем 5—7 дней, проводили весь комплекс клинических наблюдений, предусматривавший ежедневное двукратное измерение температуры тела, подсчет частоты дыхания, частоты сердечных сокращений, оценку состояния кожных покровов и слизистых оболочек верхних отделов респираторного тракта, а также миндалин. Особое внимание уделяли выраженности и продолжительности симптомов интоксикации и катаральных явлений в носоглотке. Как следует из представленного графика (см. рисунок), применение сравниваемых препаратов сопровождалось быстрой нормализацией температуры тела. Так, у детей, получавших Цитовир-3 в любой лекарственной форме, нормализация температурной реакции наблюдалась уже к утру 3-го дня. В этот период у детей, которым назначали Иммунал, температура сохранялась на субфебрильных значениях и нормализовалась только к 4-му дню.

Следует отметить, что динамика температуры не сопровождалась какими-либо существенными изменениями частоты дыхания или пульса у детей во всех группах сравнения.

Указанные показатели варьировали в пределах 23—24 дыхательных движений в минуту; частота сердечных сокращений составила 120—123 в минуту в основном в течение первых 2 сут (см. табл. 2).

Хотя достоверных изменений отмечено немного, создавалось впечатление, что у детей, получавших Иммунал, катаральные симптомы и явления общей интоксикации, такие как недомогание, адинамия, бледность кожных покровов, ринит и другие, сохранялись примерно на сутки дольше, чем при использовании различных лекарственных форм препарата Цитовир-3 (табл. 3). В силу принятой в исследовании статистической методологии перечисленные выше изменения были реализованы только на уровне тенденции, тем не менее следует помнить, что при таких острых инфекционных заболеваниях, какими являются грипп и ОРВИ, сокращение продолжительности основной симптоматики на сутки для этиопатогенетических препаратов можно считать хорошим результатом (при исследовании противовирусного препарата Озелтамивир сокращение продолжительности основной симптоматики по сравнению с контрольной группой также составило 16—24 ч). Что касается состояния периферической крови, в большинстве случаев показатели варьировали в пределах интервала референсных значений (табл. 4). Так, в 56,7—36,7—40% случаев у детей, получавших Цитовир-3 порошок, Цитовир-3 сироп и Иммунал соответственно, отмечено повышенное (на $0,1—0,7 \cdot 10^{12}/л$) содержание эритроцитов по отношению к возрастной норме ($3,5—4,5 \cdot 10^{12}/л$), что нередко наблюдается при острых и хронических воспалительных процессах в органах дыхания [14].

Среди пациентов, получавших Цитовир-3 (сироп),

Динамика содержания sIgA в носоглоточных смывах детей с ОРВИ, получавших Цитовир-3 порошок, Цитовир-3 сироп и Иммунал

Уровень sIgA, мкг/мл	Динамика уровня sIgA в материале из носовых ходов детей, %								
	Цитовир-3 порошок			Цитовир-3 сироп			Иммунал		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
Норма 1,5—3	23,3	53,3	76,7*	20,0	23,3	70,0*	23,3	46,7	46,7*
Повышение	0	66,7	66,7	0	76,7	76,7	0	66,7	53,3
Снижение	0	3,3	16,7	0	13,3	20,0	0	16,7	53,3
Среднее значение <i>M ± m</i>	1,42 ± 0,33	1,44 ± 0,28	1,67 ± 0,33	1,23 ± 0,25	1,38 ± 0,21	1,57 ± 0,28	1,27 ± 0,27	1,41 ± 0,23	1,51 ± 0,25

Примечание. I — 1-е сутки; II — 3-и сутки; III — 6-е сутки; * — межгрупповые различия статистически достоверны.

Цитовир-3 (порошок) и Иммунал, в 23,3—16,7—13,3% случаев соответственно наблюдалось повышение количества лейкоцитов, нормализовавшееся к 6-му посещению, у пациентов всех групп. У большинства пациентов всех сравниваемых групп регистрировали увеличение СОЭ ($18,43 \pm 6,37$ — $19,86 \pm 2,78$ мм/ч), снижавшейся к 6-му посещению до нормы у пациентов, получавших Цитовир-3 сироп и Иммунал, но это снижение было статистически недостоверно по сравнению с данными у детей, получавших Цитовир-3 порошок (23,3—26,7% против 13,4%).

Одним из факторов противоинфекционной защиты является содержание сывороточного IgA, защищающего слизистую оболочку носоглотки от проникновения вирусов в эпителиальные клетки респираторного тракта [20].

Существенных различий в динамике сывороточного IgA у обследованных детей в процессе лечения не отмечено. Однако исходный уровень sIgA в секретах из носовых ходов в 76,7—80% случаев был ниже нормы (1,5—3 мкг/мл) (табл. 5).

Во всех группах отмечено достоверное повышение числа детей с нормальными значениями сывороточного IgA только к концу срока наблюдения (см. табл. 4). Однако отмеченные различия были статистически недостоверны, хотя число детей с нормальными показателями на фоне применения Иммунала было несколько меньше, чем при лечении различными лекарственными формами препарата Цитовир-3.

Таким образом, полученные результаты сравнительной оценки эффективности препаратов Цитовир-3 и Иммунал свидетельствуют о том, что сравниваемые средства по большинству показателей у детей с ОРВИ легкой и средней степени тяжести позволяют эффективно купировать инфекционное заболевание.

Обсуждение

В целом сравниваемые препараты по противовирусной эффективности близки друг другу и позволяют в течение 2—3 сут эффективно купировать вирусную инфекцию. Ни у одного ребенка нами не зафиксировано осложнений. Вместе с тем на основании динамического наблюдения за инфекционным процессом получены результаты, указывающие на некоторое преимущество различных лекарственных форм препарата Цитовир-3 перед препаратом сравнения (Иммунал). Это вполне соответствует существующим представлениям о том, что Цитовир-3 является быстрым и эффективным средством профилактики и лечения ОРВИ у детей и взрослых [8,

17, 21]. Что касается препаратов эхинацеи, их лекарственные свойства хорошо известны, и они широко применяются в медицине [8, 22]. Однако в последнее время появились работы, в которых высказываются некоторые сомнения относительно если не эффективности, то как минимум стандартности состава некоторых препаратов эхинацеи [5, 13, 23]. Полученные нами сравнительные результаты исследования эффективности лекарственных форм препаратов Цитовир-3 и эхинацеи также свидетельствуют в пользу эффективности Цитовира-3, хотя, может быть, и не столь убедительно.

Заключение

Таким образом, все три лекарственных препарата являются препаратами выбора и могут быть использованы при лечении ОРВИ у детей.

Финансирование. Клиническое исследование и научная статья выполнены в плановом порядке без спонсорской помощи.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 3, 5, 7, 9, 10, 15, 17, 18, 21—23 см. REFERENCES)

- Зарубаев В.В., Смирнов В.С. Воздействие на клеточные мишени как средство борьбы с гриппозной инфекцией. *Инфекция и иммунитет*. 2014; 4(1): 15—26.
- Росток О.И. *Химиопрепараты и химиотерапия гриппа*. СПб.: Росток; 2012.
- Маркина М.В. *Общеклинические анализы крови, мочи, их показатели, референсные значения, изменение параметров при патологии*. Новосибирск; 2006.
- Романцов М.Г., Горячева Л.Г., Коваленко А.Л. *Противовирусные и иммуномодулирующие препараты в детской практике*. СПб.; 2008.
- Смирнов В.С. *Профилактика и лечение гриппа и острых респираторных вирусных инфекций*. СПб.: ФАРМИндекс; 2012.
- Смирнов В.С., Куликов С.В., Власов В.Ю. *Фармацевтическая композиция для лечения вирусных заболеваний*. Патент РФ № 2155254; 2001.
- Эберт Л.Я., Бухарин О.В., Брауде А.И. *Профилактика инфекционных заболеваний лекарственными средствами*. Челябинск; 1968.
- Смирнов В.С., ред. *Клиническая фармакология тимогена*. СПб.: ФАРМИндекс; 2004.
- Смирнов В.С., Селиванов А.А. *Биорегуляторы в профилактике и лечении гриппа*. СПб.: Наука; 1996.
- Шипицын К.С., Огарков П.И., Смирнов В.С., Жоголев С.Д., Жоголев К.Д. Профилактика острых респираторных вирусных инфекций и пневмоний в организованном коллективе. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2010; (1): 57—61.
- Сборник методических рекомендаций по выделению вирусов,

ИФ и ПЦР-диагностике гриппа и вводу данных сигнального надзора в системе on-line. СПб.: Медицинское информационное агентство; 2011.

20. Галкина О.В., Грязева И.В., Самойлович В.Б. Количественное определение секреторного иммуноглобулина А в биологических жидкостях с помощью моноклональных антител. *Медицинская иммунология*. 2000; 2(2): 155.

REFERENCES

- Zarubaev V.V., Smirnov V.S. Impact on the target cell as a means to combat influenza infection. *Infektsiya i immunitet*. 2014; 4(1): 15—26. (in Russian)
- Kiselev O.I. *Chemotherapy Drugs and Chemotherapy Flu [Khimiopreparaty i khimioterapiya grippa]*. St.Petersburg: Rostok; 2012. (in Russian)
- Monod A., Swale C., Tarus B., Tissot A., Delmas B., Ruigrok R.W. et al. Learning from structure-based drug design and new antivirals targeting the ribonucleoprotein complex for the treatment of influenza. *Expert Opin. Drug. Discov.* 2015; 10(4): 345—71.
- Markina M.V. *General Clinical Tests of Blood, Urine, and their Indicators, Reference Values, Change the Parameters in the Pathology [Obshcheklinicheskie analizy krovi, mochi, ikh pokazateli, referentsnye znacheniya, izmenenie parametrov pri patologii]*. Novosibirsk; 2006. (in Russian)
- Van der Vries E., Schutten M., Fraaij P., Boucher C., Osterhaus A. Influenza virus resistance to antiviral therapy. *Adv. Pharmacol.* 2013; 67: 217—46.
- Romantsov M.G., Goryacheva L.G., Kovalenko A.L. *Antiviral and Immune Preparations in Pediatric Practice [Protivovirusnye i immunotropnye preparaty v detskoj praktike]*. St.Petersburg; 2008. (in Russian)
- Fedson D.S. Treating influenza with statins and other immunomodulatory agents. *Antiviral Res.* 2013; 99(3): 417—35.
- Smirnov V.S. *Prevention and Treatment of Influenza and Acute Respiratory Virus Infection [Profilaktika i lechenie grippa i ostrykh respiratornykh virusnykh infektsiy]*. St.Petersburg: FARMIndeks; 2012. (in Russian)
- Karsch-Völk M., Barrett B., Kiefer D., Bauer R., Ardjomand-Woelkart K., Linde K. Echinacea for preventing and treating the common cold. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2014; (2): CD000530.
- Lindenmuth G.F., Lindenmuth E.B. The efficacy of echinacea compound herbal tea preparation on the severity and duration of upper respiratory and flu symptoms: a randomized, double-blind placebo-controlled study. *J. Altern. Complement. Med.* 2000; 6(4): 327—34.
- Smirnov V.S., Kulikov S.V., Vlasov V.Yu. *A Pharmaceutical Composition for the Treatment of Viral Diseases*. Patent RF № 2155254; 2001. (in Russian)
- Ebert L.Ya., Bukharin O.V., Braude A.I. *Use of Medications for Prevention of Infectious Diseases [Profilaktika infektsionnykh zabolovaniy lekarstvennymi sredstvami]*. Chelyabinsk; 1968. (in Russian)
- Smirnov V.S., ed. *Clinical Pharmacology of the Timogen [Klinicheskaya farmakologiya timogena]*. St.Petersburg: FARMIndeks; 2004. (in Russian)
- Smirnov V.S., Selivanov A.A. *Bioregulators in the Prevention and Treatment of Influenza [Bioregulatory v profilaktike i lechenii grippa]*. St.Petersburg: Nauka; 1996. (in Russian)
- Bowie A.G., O'Neill L.A. Vitamin C inhibits NF-κB activation by TNF via the Activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Immunol.* 2000; 165: 7180—8.
- Shipitsyn K.S., Ogarkov P.I., Smirnov V.S., Zhogolev S.D., Zhogolev K.D. Prevention of acute respiratory viral infections and pneumonia in an organized team. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni*. 2010; (1): 57—61. (in Russian)
- Fashner J., Ericson K., Werner S. Treatment of the common cold in children and adults. *Am. Fam. Physician.* 2012; 86(2): 153—9.
- Schapowal A. Efficacy and safety of Echinaforce® in respiratory tract infections. *Wien. Med. Wochenschr.* 2013; 163(3-4): 102—5.
- Collection of guidelines for virus isolation, IF and PCR diagnosis of influenza and input signal supervision data on-line system. St.Petersburg: Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo; 2011. (in Russian)
- Galkina O.V., Gryazeva I.V., Samoylovich V.B. Quantitative determination of the secretory immunoglobulin A in biological fluids using monoclonal antibodies. *Meditsinskaya immunologiya*. 2000; 2(2): 155. (in Russian)
- Loregian A., Mercorelli B., Nannetti G., Compagnin C., Palù G. Antiviral strategies against influenza virus: towards new therapeutic approaches. *Cell Mol. Life Sci.* 2014; 71(19): 3659—83.
- Giles J.T., Palat C.T.3rd, Chien S.H., Chang Z.G., Kennedy D.T. Evaluation of echinacea for treatment of the common cold. *Pharmacotherapy*. 2000; 20(6): 690—7.
- Woelkart K., Linde K., Bauer R. Echinacea for preventing and treating the common cold. *Planta Med.* 2008; 74(6): 633—7.

Поступила 10.05.16

Принята в печать 24.05.16

Ибрагимова М.К.^{1,2}, Цыганов М.М.^{1,2}, Карабут И.В.^{1,3}, Чуруксаева О.Н.¹, Шpileва О.Н.¹, Бычков В.А.¹, Коломиец Л.А.^{1,3}, Литвяков Н.В.^{1,2}

ИНТЕГРАТИВНАЯ И ЭПИСОМАЛЬНАЯ ФОРМЫ ГЕНОТИПА 16 ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ЦЕРВИКАЛЬНЫХ ИНТРАЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ НЕОПЛАЗИЯХ И РАКЕ ШЕЙКИ МАТКИ

¹Томский НИИ онкологии, 634050, г. Томск;

²Национальный исследовательский Томский государственный университет, 634050, г. Томск;

³ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, 634050, г. Томск

Обследованы 500 пациенток с LSIL (low grade squamous intraepithelial Lesion — низкая степень интраэпителиального повреждения плоского эпителия), HSIL (high grade squamous intraepithelial lesion — высокая степень интраэпителиального повреждения плоского эпителия), раком шейки матки (РШМ) I—IV стадии, инфицированных вирусом папилломы человека (ВПЧ), и 235 женщин без патологических изменений слизистой оболочки шейки матки. Комплексное обследование включало кольпоскопию, цитологическое, гистологическое исследование, выявление и генотипирование ВПЧ высокого канцерогенного риска с помощью полимеразной цепной реакции, оценку вирусной нагрузки ДНК ВПЧ и определение физического статуса ДНК ВПЧ типа 16 при моноинфекции ($n = 148$). Количество вирусопозитивных среди женщин без морфологических изменений шейки матки составило 51,9%, среди пациенток с LSIL и HSIL — 69,2%, среди больных РШМ — 76,7%. Показана связь вирусной нагрузки с морфологическими изменениями в цервикальном эпителии. Среди пациенток с высокой вирусной нагрузкой статистически значимо увеличивалась частота интегрированной формы и снижалась практически до нуля частота эписомальной формы ВПЧ по сравнению с больными с низкой вирусной нагрузкой. Это дает основания полагать, что высокая вирусная нагрузка ВПЧ типа 16 увеличивает вероятность его интеграции в клеточный геном и может быть использована в качестве прогностического фактора риска развития цервикальных интраэпителиальных неоплазий и РШМ.

Ключевые слова: вирус папилломы человека; вирусная нагрузка; интегрированная и эписомальная формы вируса папилломы человека; рак шейки матки; цервикальная интраэпителиальная неоплазия.

Для цитирования: Ибрагимова М.К., Цыганов М.М., Карабут И.В., Чуруксаева О.Н., Шpileва О.Н., Бычков В.А., Коломиец Л.А., Литвяков Н.В. Интегративная и эписомальная формы генотипа 16 вируса папилломы человека при цервикальных интраэпителиальных неоплазиях и раке шейки матки. *Вопросы вирусологии.* 2016; 61(6): 270-274.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2016-61-6-270-274>

Ibragimova M.K.^{1,2}, Tsyganov M.M.^{1,2}, Karabut I.V.^{1,3}, Churuksaeva O.N.¹, Shpileva O.N.¹, Bychkov V.A.¹, Kolomiets L.A.^{1,3}, Litviakov N.V.^{1,2}

INTEGRATIVE AND EPISOMAL FORMS OF GENOTYPE 16 OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS IN PATIENTS WITH CERVICAL INTRAEPITHELIAL NEOPLASIA AND CERVICAL CANCER

¹Tomsk Cancer Research Institute, Tomsk, 634050, Russian Federation;

²National Research Tomsk State University, Tomsk, 634050, Russian Federation;

³Siberian State Medical University, Tomsk, 634050, Russian Federation

The study involved 500 patients with LSIL (low grade squamous intraepithelial lesion), HSIL (high grade squamous intraepithelial lesion), stage I-IV cervical cancer, infected with human papillomavirus (HPV), as well as 235 women without pathological changes in cervical mucosa. The comprehensive survey included colposcopy, cytological and histological analysis, detection and genotyping of high-risk human papillomavirus. Viral load and physical status of HPV16 DNA was evaluated in cases of mono-infection ($n = 148$).

The prevalence of virus-positive cases among the patients with LSIL/HSIL, cervical cancer patients and healthy women was 69.2%, 76.7% and 51.9%, respectively. An association between the severity of disease and high viral load was revealed. The frequency of integrated DNA was strongly increased in patients with a high viral load. The frequency of episomal forms was either reduced or not detectable in patients with high viral load as compared to patients with low viral load. It is reasonable to suggest that a high HPV16 viral load may cause an increase in the frequency of integration of virus DNA into the cellular/host genome. This suggests that a high HPV16 viral load may be considered as a risk factor for prognosis of cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer.

Key words: human papillomavirus; viral load; integrated and episomal forms of HPV; CIN; cervical cancer.

For citation: Ibragimova M.K., Tsyganov M.M., Karabut I.V., Churuksaeva O.N., Shpileva O.N., Bychkov V.A., Kolomiets L.A., Litviakov N.V. Integrative and episomal forms of genotype 16 of human papillomavirus in patients with cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal).* 2016; 61(6): 270-274. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2016-61-6-270-274>

For correspondence: Marina K. Ibragimova, Associate Scientist, Laboratory of Oncovirology, Tomsk Cancer Research Institute, Tomsk, 634050, Russian Federation. E-mail: imk1805@yandex.ru

Acknowledgments. This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (Grant No. 15-34-20568 «Changes in the Genetic Landscape of Dysplasia during Malignant Transformation») and the Competitiveness Enhancement Project of the National Research Tomsk State University.

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

Received 09 February 2016

Accepted 29 March 2016

Введение

Важнейшим фактором канцерогенеза шейки матки является инфицирование женщин вирусом папилломы человека (ВПЧ) [1]. Попадая в организм, ВПЧ инфицирует базальный слой эпителия. Основной мишенью для воздействия онкогенных типов вируса является зона трансформации шейки матки. После проникновения в базальную клетку многослойного плоского эпителия освободившаяся от капсида ДНК ВПЧ высокого канцерогенного риска (ВКР) поступает в ядро, где поддерживается в виде эписомы. В жизненном цикле ВПЧ важнейшую роль играет «ранний» вирусный белок E2, который регулирует репликацию вирусного генома и процессы транскрипции онкогенов E6 и E7. Персистенция ВПЧ может сопровождаться интеграцией ДНК ВПЧ в геном клеток эпителия шейки матки, что в свою очередь приводит к геномной нестабильности и потере способности к апоптозу и является ключевым событием в злокачественной трансформации эпителиальных клеток [2]. Встраивание ВПЧ в клеточный геном сопровождается снижением функциональной активности вирусного белка E2, которое приводит к повышенной экспрессии вирусных белков E6 и E7 [3]. Морфологическими признаками вышеупомянутого процесса принято считать изменения, характерные для LSIL (low grade squamous intraepithelial lesion — низкая степень интраэпителиального повреждения плоского эпителия) и HSIL (high grade squamous intraepithelial lesion — высокая степень интраэпителиального повреждения плоского эпителия) с возможным последующим озлокачествлением [4].

Таким образом, в инфицированной клетке ДНК вируса может существовать в различных состояниях: в эписомальной форме (вне хромосом клетки), интегрированной (встроена в геном клетки) и смешанной форме (наличие свободной ДНК вируса и встроеной в геном клетки-хозяина) [5].

Прогрессирование от момента инфицирования в цервикальные неоплазии может протекать от нескольких месяцев [6] до нескольких лет через ряд промежуточных этапов [7], что, несомненно, доказывает важность своевременного мониторинга лиц с папилломавирусной инфекцией и проведения вирусологических исследований для выявления групп риска развития онкологической патологии.

Целью настоящей работы явилось изучение частоты интегрированных форм ВПЧ генотипа 16 при цервикальных неоплазиях и РШМ.

Материал и методы

В исследование были включены 735 жительниц Томской области в возрасте от 17 до 83 лет, проходивших обследование и лечение в Томском НИИ онкологии. Материалом для исследования служили соскобы эпителия цервикального канала. Были обследованы 235 женщин (средний возраст $31,7 \pm 0,7$ года), не имеющих морфологических изменений шейки матки; 234 пациентки ($37,5 \pm 0,7$ года) с диспластическими изменениями шейки мат-

ки (CIN — цервикальная интраэпителиальная неоплазия шейки матки), в том числе с LSIL, к которой относят CIN I, и HSIL, к которой относят CIN II—III, и 266 больных РШМ I—IV стадии ($43,9 \pm 0,8$ года).

Комплексное обследование включало гинекологический осмотр, кольпоскопию, цитологическое и гистологическое исследование, что позволило верифицировать диагноз, выявление и генотипирование ДНК ВПЧ. Из всех обследованных была выделена группа пациенток с носительством моноинфекции ВПЧ 16 ($n = 148$), в том числе 30 пациенток без морфологических изменений шейки матки, 6 пациенток с LSIL, 47 — с HSIL и 65 пациенток с РШМ I—IV стадии. У этих больных помимо выявления и генотипирования ДНК ВПЧ определяли физический статус ДНК ВПЧ 16.

Выявление и генотипирование ДНК ВПЧ проводили методом мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени на приборе Rotor-Gene 6000 («Corbett Research», Австралия) с использованием комплектов реагентов фирмы «Amplisens®» (АмплиСенс® ВПЧ ВКР скрин-титр-FL, кат# R-V31-T-4x (RG, iQ, Mx); АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип-FL, кат# R-V25 (RG, iQ, Mx) (Москва, Россия)). Физический статус ДНК ВПЧ 16 определяли с использованием набора реагентов «Amplisens®» ВПЧ ВКР скрин-титр-FL (с дифференциацией генотипа 16), кат# R-V31-F (Москва, Россия). Значение вирусной нагрузки рассчитывали в геномных эквивалентах ДНК ВПЧ/10⁵ клеток, порог референтного количества вируса принимали равным 3 lg ДНК ВПЧ/10⁵ клеток в соскобе. Выявление области E6 при отсутствии области E1/E2 интерпретировали как интеграцию ВПЧ в ДНК человека, выявление области E6 при наличии области E1/E2 — как смешанную форму/частичную интеграцию вируса в ДНК человека, отсутствие области E6 при наличии области E1/E2 — как эписомальную форму вируса. Для оценки статистической значимости различий в распределении частот качественных признаков между группами использовали критерий Фишера. Подсчеты осуществляли на калькуляторе <http://vassarstats.net/odds2x2.html>. Для таблицы 2 × 3 (тест хи-квадрат) был использован калькулятор http://gen-exp.ru/calculator_or.php.

Результаты

Инфицированность ВПЧ ВКР обследованных жительниц Томской области составила 66,5%. Анализ инфицированности в группах исследования показал, что среди женщин без морфологических изменений шейки матки количество вирусопозитивных пациенток составило 51,9%, среди пациенток с LSIL и HSIL — 69,2% (различия являются статистически значимыми по сравнению с пациентками без морфологических изменений шейки матки ($p = 0,0002$; OR (отношение шансов) при 95% доверительном интервале (95% CI) = 2,08 (1,42—3,04)); среди женщин, больных РШМ, количество вирусопозитивных пациенток составило 76,7% ($p = 0,0377$; OR (95% CI) = 1,46 (1,18—2,17) по сравнению с пациентка-

Таблица 1

Распределение частот генотипов ВПЧ в исследуемых группах

Типы ВПЧ	Количество и частота носителей среди всех ВПЧ-положительных пациенток, n (%) (n = 489)	Количество и частота носителей среди ВПЧ-положительных пациенток без морфологических изменений шейки матки, n (%) (n = 122)	Количество и частота носителей среди ВПЧ-положительных пациенток с LSIL и HSIL (CIN I—III), n (%) (n = 163)	Количество и частота носителей среди ВПЧ-положительных пациенток с РШМ I—IV, n (%) (n = 204)
16	382 (78,1)	89 (73,0)	127 (77,9)	166 (81,4)
33	58 (11,9)	11 (9,01)	19 (11,7)	28 (13,7)
31	51 (10,4)	12 (9,8)	20 (12,3)	19 (9,3)
18	48 (9,8)	15 (12,3)	19 (11,7)	14 (6,7)
56	40 (8,2)	11 (9,01)	14 (8,6)	15 (7,4)
52	32 (6,5)	4 (3,3)	11 (6,8)	17 (8,3)
39	31 (6,3)	7 (5,7)	9 (5,5)	15 (7,4)
51	45 (9,2)	8 (6,6)	16 (9,8)	21 (10,3)
35	29 (5,9)	6 (4,9)	4 (2,5)	19 (9,3)
45	24 (4,9)	6 (4,9)	11 (6,8)	7 (3,4)
58	26 (5,3)	0	11 (6,8)	15 (7,4)
59	28 (5,7)	2 (1,6)	12 (7,4)	14 (6,7)

Примечание. Частоту встречаемости каждого типа ВПЧ рассчитывали от общего количества ВПЧ-положительных пациенток в группе.

ми с LSIL и HSIL, с пациентками без морфологических изменений шейки матки — $p = 0,0001$; OR(95% CI) = 3,6 (2,44—5,41).

При генотипировании вирусопозитивных образцов было установлено, что в Томской области ВПЧ 16 встречается в 78,1% случаев, что согласуется с мировыми данными и ранее полученными результатами относительно распространенности данного типа ВПЧ в Томском регионе [8, 9]. Крупное исследование, охватившее 1624 случая заболевания РШМ в Республике Саха (Якутия) (регион с повышенными показателями заболеваемости и смертности от данного типа онкопатологии), показало, что ВПЧ 16 встречается в 72,2% случаев [10].

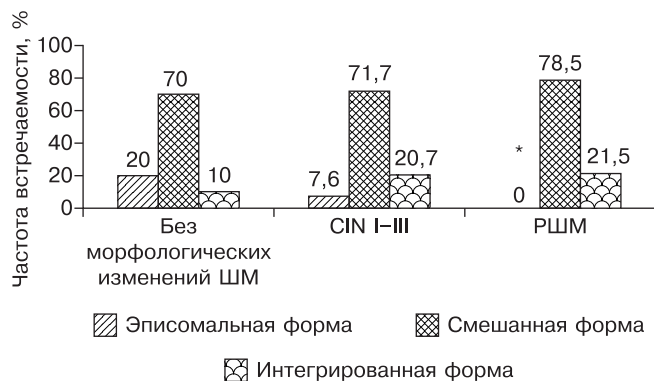


Рис. 1. Распределение частот различных форм ВПЧ 16 в группах наблюдения.

Примечание. * — различия статистически значимы по сравнению с группой пациенток, не имеющих морфологических изменений шейки матки, $p = 0,0006$.

В Томской области 2-е и 3-е место занимает ВПЧ типов 33 и 31 (11,9 и 10,4% соответственно) (табл. 1), в то время как, согласно данным литературы, во многих регионах мира 2-е место по распространенности занимает ВПЧ 18 [9], в том числе в различных регионах России и даже Сибирском регионе [11]. Только в Томской области ВПЧ 18 занимает 4-е место. Для прояснения этой особенности в Томской области требуются дальнейшие эпидемиологические исследования.

Обследованные группы пациенток без морфологических изменений шейки матки и больных женщин существенно не различались по распределению частот генотипов ВПЧ, и прослеживалось четкое превалирование ВПЧ 16 (см. табл. 1).

При определении вирусной нагрузки (концентрации ДНК вируса) в исследуемых образцах было показано, что количество пациенток с показателем низкой вирусной нагрузки ($<3 \lg$ ДНК ВПЧ/ 10^5 клеток), для которой показана слабая связь с риском развития CIN и РШМ [12, 13], в группе женщин без морфологических изменений шейки матки составило 78,7%, в группе больных LSIL и HSIL — 30,1%, в группе больных РШМ — 17,2%. При этом показатель высокой клинически значимой вирусной нагрузки ($>3 \lg$ ДНК ВПЧ/ 10^5 клеток), для которого установлена связь с риском возникновения CIN и РШМ, у женщин без морфологических изменений шейки матки составил 21,6%, в группе больных LSIL и HSIL — 69,3% ($p = 3,5 \cdot 10^{-16}$), у больных РШМ — 82,8% ($p_1 = 7 \cdot 10^{-29}$, $p_2 = 9,2 \cdot 10^{-9}$) (табл. 2). Среди больных CIN III по сравнению с большими CIN I частота высокой вирусной нагрузки увеличивалась с 30 до 87%. По данному показателю каждая последующая степень дисплазии статистически значимо отличалась от предыдущей. Частота высокой вирусной нагрузки также увеличивалась среди больных РШМ III—IV стадии по сравнению с пациентками с I—II стадией, однако не отличалась от частоты высокой вирусной нагрузки среди больных LSIL и HSIL.

Для определения эписомальной, смешанной и интегрированной форм ВПЧ были обследованы 148 женщин с моноинфекцией ВПЧ 16: 30 пациенток без морфологических изменений шейки матки, 6 пациенток с LSIL,

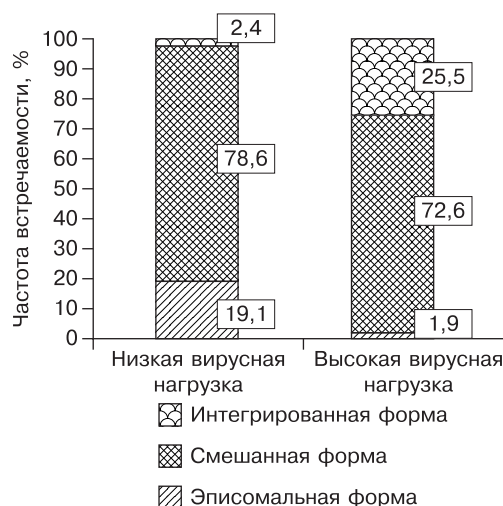


Рис. 2. Распределение частот эписомальной, смешанной и интегрированной форм ВПЧ 16 в группах пациенток с высокой и низкой вирусной нагрузкой.

Таблица 2

Вирусная нагрузка у женщин без морфологических изменений шейки матки и пациенток с дисплазией и РШМ

ВПЧ-положительные пациентки (n = 489)	Низкая вирусная нагрузка, n (%)	Высокая вирусная нагрузка, n (%)	p	OR (95% CI)
Пациентки без морфологических изменений шейки матки (n = 122)	96 (78,7)	26 (21,3)	Нет	Нет
Больные LSIL (CIN I) (n = 30)	21 (70,0)	9 (30,0)	То же	То же
Больные HSIL CIN II (n = 56)	19 (33,9)	37 (66,1)	$p_1 = 1,12 \cdot 10^{-8}$ $p_2 = 0,001$	7,19 (3,56—14,52) 4,54 (1,75—11,83)
CIN III (n = 77)	10 (13,0)	67 (87,0)	$p_1 = 9,5 \cdot 10^{-21}$ $p_2 = 2,1 \cdot 10^{-8}$ $p_3 = 0,005$	24,7 (11,19—54,69) 15,63 (5,6—43,59) 3,44 (1,45—8,17)
Все больные CIN I—III (n = 163)	50 (30,1)	113 (69,3)	$p_1 = 3,5 \cdot 10^{-16}$ $p_2 = 0,00007$ $p_4 = 0,003$	8,34 (4,83—14,41) 5,27 (2,26—12,22) 0,33 (0,16—0,7)
Больные РШМ I—II (n = 79)	20 (25,3)	59 (74,7)	$p_1 = 4,4 \cdot 10^{-14}$ $p_2 = 0,00002$	10,89 (5,59—21,22) 6,88 (2,71—17,47)
Больные РШМ III—IV (n = 125)	15 (12,0)	110 (88,0)	$p_1 = 7,8 \cdot 10^{-28}$ $p_2 = 5,9 \cdot 10^{-10}$ $p_3 = 0,0008$ $p_5 = 0,0001$ $p_6 = 0,02$	27,08 (13,56—54,09) 17,11 (6,62—44,2) 3,77 (1,74—8,16) 3,25 (1,72—6,12) 2,49 (1,19—5,2)
Все больные РШМ I—IV (n = 204)	35 (17,2)	169 (82,8)	$p_1 = 7,1 \cdot 10^{-29}$ $p_2 = 9,2 \cdot 10^{-9}$ $p_3 = 0,008$ $p_5 = 0,002$	17,83 (10,12—31,4) 11,27 (4,76—26,67) 2,47 (1,28—4,8) 2,14 (1,3—3,5)

Примечание. p_1 — различия статистически значимы по сравнению с группой пациенток без морфологических изменений шейки матки, p_2 — с группой CIN I, p_3 — с группой CIN II, p_4 — с группой CIN III, p_5 — с группой ΣCIN I—III, p_6 — с группой РШМ I—II.

47 с HSIL и 65 больных РШМ. Установлено, что среди ВПЧ 16-положительных обследованных частота интегрированной и смешанной форм ВПЧ увеличивалась по мере утяжеления морфологической перестройки эпителия шейки матки. Частота эписомальной формы ВПЧ снижалась до нуля в группе больных РШМ (рис. 1). Сравнение распределения частот всех трех форм ВПЧ между больными РШМ и пациентками без морфологических изменений шейки матки в таблице 2 × 3 (тест хи-квадрат http://gen-exp.ru/calculator_or.php) показало статистическую значимость различий на уровне $p = 0,006$.

Далее было проверено предположение о том, что первоначально большое число копий генома ВПЧ увеличивает вероятность интеграции вирусной ДНК в геном хозяина и развития заболевания [14]. Для этого исследовали связь частоты интеграции ДНК вируса в геном клетки-хозяина с высокой вирусной нагрузкой. Оценивали распределение форм ВПЧ в группах с высокой и низкой вирусной нагрузкой вне зависимости от диагноза. Все обследованные с моноинфекцией ВПЧ 16 были

разделены на 2 группы: пациентки с высокой вирусной нагрузкой (n = 106, средний возраст 42,1 ± 1,3 года) и пациентки с низкой вирусной нагрузкой (n = 42, средний возраст 36,6 ± 0,4 года). Установлено статистически значимое различие в распределении частот всех трех форм ВПЧ (эписомальной, смешанной и интегрированной) между больными с высокой и низкой вирусной нагрузкой в таблице 2 × 3 ($p = 2 \cdot 10^{-5}$) (рис. 2).

В группе с высокой вирусной нагрузкой вне зависимости от диагноза резко увеличивалась частота интегрированной формы и падала практически до нуля частота эписомальной формы ВПЧ, что свидетельствует о повышении вероятности интеграции вирусной ДНК в геном клетки-хозяина при большом числе копий генома ВПЧ и соответствует высказанным ранее предположениям.

Обсуждение

Поскольку сам факт инфицирования ВПЧ даже высокого онкогенного риска не позволяет в полной мере судить о вероятности возникновения рака, необходимо учитывать другие показатели ВПЧ-инфекции, которые коррелируют с тяжестью патологического процесса и позволяют оценивать риск злокачественной трансформации у каждой пациентки. Одним из таких показателей онкогенности вируса является вирусная нагрузка. Было показано, что при патологиях шейки матки высокая вирусная нагрузка представляет собой фактор риска развития дисплазии тяжелой степени и РШМ [15].

На основании полученных нами результатов, касающихся определения вирусной нагрузки, можно предположить, что она действительно может быть использована в качестве прогностического фактора риска развития HSIL и РШМ, но ее прогностическая значимость коррелирует с типом ВПЧ и в настоящий момент перспективна только для ВПЧ 16 [16]. Наши результаты соответствуют данным литературы: М. Moberg и соавт. [14], исследуя связь между количеством копий ДНК ВПЧ 16 и степенью дисплазии, также пришли к выводу, что прогрессирование заболевания тесно связано с вирусной нагрузкой. Авторы высказали предположение о том, что первоначально большое число копий генома ВПЧ увеличивает вероятность интеграции вирусной ДНК в геном клетки-хозяина и как следствие риск развития заболевания. Это предположение было убедительно доказано в нашем исследовании.

В настоящее время известно, что в 90% случаев ВПЧ-инфекция в течение нескольких месяцев может быть спонтанно элиминирована из организма носителя [17]. Возможность элиминации вируса из клетки-хозяина определяется совокупностью многих факторов, особую роль при этом играет состояние физического статуса ДНК ВПЧ, т. е. наличие его в эписомальной, интегрированной или смешанной формах. Несмотря на то что риск заражения женщин ВПЧ в течение жизни достаточно высок [18], выявление эписомальной формы ВПЧ не является прогностически неблагоприятным фактором, так как у большей части па-

циенток происходит ее элиминация [19]. Предполагается, что интегрированная форма вируса дольше сохраняется, благодаря чему обнаруживается при эпителиальных дисплазиях высокой степени и РШМ, вызывает пролиферативные процессы в клетках, геномную нестабильность и формирование мутаций [18, 20, 21]. Таким образом, интеграция ДНК ВПЧ в геном клетки-хозяина является ключевым событием в трансформации эпителиальных клеток.

Заключение

Высокая вирусная нагрузка ВПЧ типа 16 увеличивает вероятность его интеграции в геном клетки-хозяина и определяет значимость трансформирующего воздействия ВПЧ на эти клетки. В этой связи раннее выявление физического статуса вируса и вирусной нагрузки позволит более объективно формировать группы повышенного риска злокачественной трансформации среди больных CIN.

Финансирование. Работа поддержана грантом РФФИ 15-34-20568 «Изменение генетического ландшафта дисплазии в процессе злокачественной трансформации» и программой повышения конкурентоспособности Национального исследовательского Томского государственного университета.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1, 2, 4, 5, 7, 9, 12, 14—17, 20—21 см. REFERENCES)

- Ershov V.V., Chirskiy A.V., Vyazovaya A.A., Narvskaya O.V., Lisyanskaya A.S. Активность процессов пролиферации и апоптоза при интеграции ДНК вируса папилломы человека 16-го типа в цервикальный эпителий. *Архив патологии.* 2013; 75(2): 16—9.
- Роговская С.И. Папилломавирусная инфекция у женщин и патология шейки матки: в помощь практикующему врачу. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2008.
- Коломиец Л.А., Чуруксаева О.Н., Шпилева О.В., Уразова Л.Н., Родичева Н.С. Особенности распространения различных типов вирусов папилломы человека (ВПЧ) у пациенток с цервикальными неоплазиями и раком шейки матки в г. Томске. *Сибирский онкологический журнал.* 2012; (3): 41—5.
- Афанасьева Л.Н., Игнатьева М.Е., Лялина Л.В., Саввина Н.В., Сметанина В.Д. Региональный опыт профилактики рака шейки матки в республике Саха (Якутия). *Инфекция и иммунитет.* 2014; 4(2): 137—42.
- Роик Е.Е., Баранов А.Н., Трещева Н.Д. Эпидемиологические особенности папилломавирусной инфекции. *Экология человека.* 2015; (5): 21—6.
- Новик В.И. Скрининг рака шейки матки. *Практическая онкология.* 2010; 11(2): 66—73.
- Качалина О.В., Конторщикова К.Н., Андосова Л.Д. Современные представления о роли вируса папилломы человека в генезе цервикального рака (обзор). *Медицинский альманах.* 2011; (5): 116—20.
- Назарова Н.М., Прилепская В.Н., Суламанидзе Л.А., Мзарелуа Г.М., Бестаева Н.В. Папилломавирусная инфекция: распространенность, диагностика и лечение (обзор литературы). *Лечащий врач.* 2013; (11): 15—9.
- Tungteakkhun S.S., Duerksen-Hughes P.J. Cellular binding partners of the human papillomavirus E6 protein. *Archiv. Virol.* 2008; 153(3): 397—408.
- Ershov V.V., Chirskiy A.V., Vyazovaya A.A., Narvskaya O.V., Lisyanskaya A.S. Active proliferation and apoptosis in the integration of the DNA of human papilloma virus type 16 in cervical epithelium. *Arkhiv patologii.* 2013; 75(2): 16—9. (in Russian)
- Apgar B.S., Zoschnick L., Wright Jr T.C. The 2001 Bethesda System terminology. *Am. Fam. Physician.* 2003; 68(10): 1992—8.
- Jiang M.R., Baseman J.G., Koutsky L.A. Sequence variation of human papillomavirus type 16 and measurement of viral integration by quantitative PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47(3): 521—6.
- Rogovskaya S.I. *HPV Infection in Women and Cervical Pathology: to Help the Practitioner [Papillomavirusnaya infektsiya u zhenshchin i patologiya sheyki matki: v pomoshch' praktikuyushchemu vrachu]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2008. (in Russian)
- Bruni L., Diaz M., Castellsagué M., Ferrer E., Bosch F.X., de Sanjosé S. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *J. Infect. Dis.* 2010; 202(12): 1789—99.
- Kolomiets L.A., Churuksaeva O.N., Shpileva O.V., Urazova L.N., Rodicheva N.S. Distribution characteristics of different types of human papillomavirus (HPV) in patients with cervical neoplasia and cervical cancer in the city of Tomsk. *Sibirskiy onkologicheskij zhurnal.* 2012; (3): 41—5. (in Russian)
- Munoz N.N., Bosch F.X. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N. Engl. J. Med.* 2003; 348(6): 518—27.
- Afanasyeva L.N., Ignatyeva M.E., Lyalina L.V., Savvina N.V., Smetanina V.D. Regional experience of cervical cancer prevention in the republic of Sakha (Yakutia). *Infektsiya i immunitet.* 2014; 4(2): 137—42. (in Russian)
- Roik E.E., Baranov A.N., Treshcheva N.D. Epidemiological features of human papilloma viral infection. *Ekologiya cheloveka.* 2015; (5): 21—6. (in Russian)
- Sasieni P., Castanon A., Cuzick J. Effectiveness of cervical screening with age: population based case-control study of prospectively recorded data. *BMJ.* 2009; 339: b2968.
- Novik V.I. Cervical cancer screening. *Prakticheskaya onkologiya.* 2010; 11(2): 66—73.
- Moberg M., Gustavsson I., Wilander E., Gyllensten U. High viral loads of human papillomavirus predict risk of invasive cervical carcinoma. *Br. J. Cancer.* 2005; 92(5): 891—4.
- Peirson L., Fitzpatrick-Lewis D., Ciliska D., Warren R., Elit L. *Screening for Cervical Cancer.* Ottawa, ON: Canadian Task Force on Preventive Health Care; 2012.
- Clavel C., Masure M., Bory J., Putaud I., Mangeonjean C., Lorenzato M. Human papillomavirus testing in primary screening for the detection of high-grade cervical lesions: a study of 7932 women. *Br. J. Cancer.* 2001; 84(12): 1616—23.
- Stanley M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecol. Oncol.* 2010; 117(2): S5-10.
- Kachalina O.V., Kontorshchikova K.N., Andosova L.D. Modern ideas about the role of human papillomavirus in the genesis of cervical cancer (Review). *Meditsinskiy al'manakh.* 2011; (5): 116—20. (in Russian)
- Nazarova N.M., Prilepskaya V.N., Sulamanidze L.A., Mzarelua G.M., Bestaeva N.V. Human papillomavirus infection: incidence, diagnosis and treatment (review). *Lechashchiy vrach.* 2013; (11): 15—9. (in Russian)
- Vink M.A., Bogaards J.A., Meijer C.J. Clinical progression of high-grade cervical intraepithelial neoplasia: estimating the time to pre-clinical cervical cancer from doubly censored national registry data. *Am. J. Epidemiol.* 2013; 178(7): 1161—9.
- Hu Z., Zhu D., Wang W., Li W., Jia W., Zeng X. Genome-wide profiling of HPV integration in cervical cancer identifies clustered genomic hot spots and a potential microhomology-mediated integration mechanism. *Nat. Genet.* 2015; 47(2): 158—63.

REFERENCES

- Bosch F.X. Human papillomavirus: science and technologies for the elimination of cervical cancer. *Expert. Opin. Pharmacother.* 2011; 12(14): 2189—204.

Поступила 09.02.16

Принята в печать 29.03.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.22-006.04-022:578.827.1]-078:575.08

Дворянинова О.Ю.¹, Никитина Е.Г.^{1,2}, Бычков В.А.¹, Литвяков Н.В.^{1,2}

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ В ОПУХОЛЕВОЙ И ПРИЛЕЖАЮЩЕЙ ТКАНИ БОЛЬНЫХ ПЛОСКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ГОРТАНИ

¹ ФГБНУ «Томский НИИ онкологии», 634050, г. Томск;² ФГАОУ ВПО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», 634050, г. Томск

В статье рассмотрены методы определения вируса папилломы человека (ВПЧ) в опухолевой и прилежащей (морфологически неизменной) ткани больных плоскоклеточным раком гортани (ПРГ) в аспекте вирусного патогенеза. Проведена сравнительная оценка принципов и техники детекции ВПЧ. Рассмотрены преимущества и недостатки методов его определения. Обосновано применение подходов к определению ДНК и онкопротеинов E6—E7 ВПЧ. Приведены результаты собственных исследований по качественному и количественному выявлению ВПЧ в опухолевой и прилежащей ткани больных ПРГ, выполненных на коммерческих тест-системах АмплиСенс ВПЧ ВКР скрин-титр-FL и АмплиСенс ВПЧ ВКР генотип-FL. На основе полученных данных разработан алгоритм определения ВПЧ в образцах опухолевой ткани больных ПРГ. На обсуждение вынесен вопрос о необходимости типирования ВПЧ-позитивных образцов ткани с низкой концентрацией ДНК ВПЧ.

Ключевые слова: плоскоклеточный рак гортани; опухолевая и прилежащая ткань; вирус папилломы человека; коммерческие тест-системы АмплиСенс ВПЧ ВКР скрин-титр-FL и АмплиСенс ВПЧ ВКР генотип-FL; молекулярно-генетические методы определения ВПЧ.

Для цитирования: Дворянинова О.Ю., Никитина Е.Г., Бычков В.А., Литвяков Н.В. Генетические аспекты определения папилломавирусной инфекции в опухолевой и прилежащей ткани больных плоскоклеточным раком гортани. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61(6):275-279.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2016-61-6-275-279>Dvoryaninova O.Yu.¹, Nikitina E.G.^{1,2}, Bychkov V.A.¹, Litviakov N.V.^{1,2}

GENETIC ASPECTS OF HPV INFECTION DETECTION IN TUMOR AND ADJACENT TISSUES OF PATIENTS WITH LARYNGEAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA

¹ Tomsk Cancer Research Institute, Tomsk, 634050, Russian Federation;² National Research Tomsk State University, Tomsk, 634050, Russian Federation

The article describes methods for the human papillomavirus (HPV) detection in tumor and adjacent (morphologically intact) tissues of patients with laryngeal squamous cell carcinoma (LSSC) in terms of viral pathogenesis. Comparative evaluation of the principles and techniques for HPV detection was performed. Advantages and disadvantages of the HPV detection methods are described. Approaches for DNA and HPV oncoproteins E6-E7 identification are substantiated. The results of our research into the qualitative and quantitative detection of HPV in the tumor and adjacent tissues of patients with LSSC are described. The research was conducted using commercial test systems AmpliSens HPV HR screen-titre-FL and AmpliSens HPV HR genotype-FL. Based on these results we developed the algorithm of HPV detection in samples of tumor tissue of patients with LSSC. The need for typing HPV-positive tissue samples with low concentration of HPV DNA was discussed.

Key words: laryngeal squamous cell carcinoma; tumor and adjacent tissue; human papillomavirus; commercial test system AmpliSens HPV HR screen-titre-FL and AmpliSens HPV HR genotype-FL; molecular-genetic methods for HPV detection.

For citation: Dvoryaninova O.Yu., Nikitina E.G., Bychkov V.A., Litviakov N.V. Genetic aspects of HPV infection detection in tumor and adjacent tissues of patients with laryngeal squamous cell carcinoma. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2016; 61(6): 275-279. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2016-61-6-275-279>

For correspondence: Vyacheslav A. Bychkov, Candidate of Medical Sciences, Senior research scientist, Laboratory of oncovirology, Tomsk Cancer Research Institute, Tomsk, 634050, Russian Federation. E-mail: va.bych@gmail.com

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

Received 06 April 2016

Accepted 24 May 2016

Введение

Для построения корректного дизайна исследования по определению вируса папилломы человека (ВПЧ) в образцах опухолевой и прилежащей ткани необходимо иметь четкое

представление о целях проводимой работы: планируем ли решить задачи исключительно научного/фундаментального или клинического аспекта. Последнее подразумевает не только констатацию факта наличия — отсутствия ДНК ВПЧ у па-

Для корреспонденции: Бычков Вячеслав Алексеевич, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаб. онковирусологии, ФГБНУ «Томский НИИ онкологии», 634050, г. Томск. E-mail: va.bych@gmail.com

циента, но и определение типа вируса, оценку вирусной нагрузки, проведение дифференциальной диагностики между литической/латентной инфекцией, эписомальной/интегрированной формой вирусного генома, что в свою очередь требует применения соответствующих методов исследования. На сегодняшний момент вышеперечисленным требованиям удовлетворяют методы амплификации вирусных нуклеотидных последовательностей (RT-PCR, nested ПЦР, NASBA, ПЦР-RFLP, bDNA (branched DNA)), оценки уровня экспрессии вирусного генома (ТМА — transcription-mediated amplification, АРОТ — amplification of papillomavirus oncogene transcript), а также отечественные и зарубежные коммерческие тест-системы, основанные на данных техниках.

В странах Европы и США разработаны и запатентованы коммерческие наборы для определения ДНК ВПЧ в соскобах цервикального канала (ЦК) пациенток с патологией шейки матки (ШМ). «Золотым стандартом» признана тест-система Hybrid capture («Digene»), направленная на выявление специфических фрагментов ДНК ВПЧ в соскобах. Однако в России данный тест не получил широкого распространения вследствие высокой стоимости. Аналогами данной техники в России являются тест-системы, предложенные отечественными фирмами «АмплиСенс», «Вектор-Бест», «Литех» и «ДНК-технология», которые позволяют определить присутствие вируса, а также провести количественное определение ДНК ВПЧ в соскобах ЦК [1, 2]. На образцах ткани, полученных из ЦК, было показано, что вирусная нагрузка менее 1000 геномов ВПЧ (3 lg ВПЧ на 100 000 клеток) является клинически малозначимой в отношении риска развития рака шейки матки (РШМ), тогда как 100 000 геномов (более 5 lg ВПЧ на 100 000 клеток) свидетельствует о высоком риске развития дисплазии и РШМ [1].

Между тем экстраполяция данных результатов в отношении образцов опухолевой и прилегающей ткани, полученных от больных плоскоклеточным раком области головы и шеи (ПР ОГШ), в частности гортани, некорректна вследствие отсутствия в доступных литературных источниках информации о связи между типом ВПЧ, уровнем вирусной нагрузки и риском развития злокачественной патологии гортани.

В связи с этим целью настоящего исследования явилась разработка алгоритма определения ВПЧ в опухолевой и прилегающей ткани больных ПРГ с помощью наборов АмплиСенс ВПЧ ВКР скрин-титр-FL и АмплиСенс ВПЧ ВКР генотип-FL для адекватной/корректной оценки присутствия вируса в исследуемой ткани в соответствии со специфической локализацией опухоли.

Материал и методы

В исследование включены образцы опухолевой ($n = 100$) и прилегающей ($n = 100$) ткани, полученные от больных ПРГ III и IV стадии, проходивших лечение на базе отделения опухолей головы и шеи Томского НИИ онкологии в период 2010—2015 гг. В 46% случаев верифицирован ороговевающий (кератинизированный) рак. Экстракция ДНК проведена хлороформно-фенольным методом. Изучение частоты встречаемости, типирование и определение вирусной нагрузки ВПЧ проведено с наборами реагентов АмплиСенс ВПЧ ВКР скрин-титр-FL и АмплиСенс ВПЧ ВКР генотип-FL с применением сопроводительных программ Amplisens FRT HR HPV Screen RG4x и Amplisens FRT HR HPV Genotype RG4x (амплификатор Rotor-Gene 6000 фирмы «Corbett Research» (Австралия)).

Результаты

Набор АмплиСенс ВПЧ ВКР скрин-титр-FL предусматривает одновременную амплификацию и детекцию в режиме реального времени участков ДНК E1—E2-генов ВПЧ и участка β -глобинового гена (внутренний контроль).

Для количественного определения ВПЧ параллельно с постановкой ПЦР с ДНК образца ткани ставится реакция амплификации с ДНК-калибраторами — образцами с известной концентрацией ДНК ВПЧ, выстраивается калибровочная кривая, по которой определяется концентрация ДНК вируса в образцах. Концентрация ДНК вируса в свою очередь нормируется по концентрации геномной ДНК [1].

Набор АмплиСенс ВПЧ ВКР генотип-FL применяется для одновременной амплификации участка гена E6 ВПЧ и участка β -глобинового гена. Данный набор обладает большей специфичностью по сравнению с АмплиСенс ВПЧ ВКР скрин-титр-FL, что обусловлено использованием разных типов праймеров: в наборе АмплиСенс скрин — вырожденных праймеров, тогда как в АмплиСенс генотип — типоспецифичных. Каждый тип ВПЧ регистрируется на специфическом канале флюоресценции, что позволяет определить генотип ВПЧ.

Несмотря на отработанные условия протоколов наборов АмплиСенс, сотрудники лаборатории онковирусологии Томского НИИ онкологии столкнулись с проблемой потери данных, или гиподиагностикой, что, вероятно, обусловлено спецификой анализируемых образцов ткани — низкой концентрацией ДНК ВПЧ. Это обстоятельство продиктовало необходимость разработки алгоритма оценки и интерпретации данных, полученных при изучении образцов опухолевой и прилегающей ткани, полученных от больных ПРГ.

На первом этапе исследования определена чувствительность набора АмплиСенс ВПЧ ВКР скрин-титр FL с использованием в качестве ДНК-матрицы плазмидной ДНК ВПЧ с известным количеством копий (от 10 до 5000). Каждая реакция ставится пятикратно (табл. 1). Результат стабильно (100%) воспроизводился при наличии 50 и более копий плазмидной ДНК вируса на реакцию по всем каналам флюоресценции. При количестве 10 копий на реакцию эффективность детекции варьировала в зависимости от канала флюоресценции. Наибольшее число позитивных результатов получено по каналу Green (внутренний контроль) — 80%, минимальное (40%) — по каналу Orange.

Вследствие методических особенностей провести проверку для определения уровня чувствительности набора АмплиСенс ВПЧ ВКР генотип-FL не представилось возможным.

Для верификации результатов и типирования ВПЧ была проведена реакция амплификации с набором АмплиСенс ВПЧ ВКР генотип-FL. Образцы ткани, определенные набором АмплиСенс ВПЧ ВКР скрин-титр-FL как вирусопозитивные, но в которых тип вируса не был определен с помощью набора АмплиСенс ВПЧ ВКР генотип-FL, считали вируснегативными. Результат был подтвержден лишь в 49% (25/51) ВПЧ-позитивных случаев (табл. 2).

На втором этапе исследования были проанализированы образцы опухолевой и прилегающей ткани, полученные от больных ПРГ, при помощи набора АмплиСенс ВПЧ ВКР скрин-титр-FL.

С учетом специфики локализации и уровня чувствительности метода была выбрана тактика постановки реакции в триплете. Проанализировано 200 образцов ткани (100/100 — опухолевая/прилегающая ткань). Вирусопозитивными по набору АмплиСенс ВПЧ ВКР скрин-титр-FL считали реакции с детекцией сигнала как минимум в одной из трех пробирок триплета (см. табл. 2). Во всех случаях детекции сигнала в одной из трех пробирок триплета было отмечено незначительное содержание вирусных частиц: около 380 копий (от 1 до 12 500 — рассчитано эмпирически) ДНК вируса на 10^6 клеток. ДНК ВПЧ была обнаружена в 25,5% случаев (51/200 с набором АмплиСенс ВПЧ ВКР скрин-титр-FL) и подтверждена в 17,5% случаев (35/200 с набором АмплиСенс ВПЧ ВКР генотип-FL). В опухолевой ткани ДНК ВПЧ была обнаружена в 21% (21/100) случаев с набором АмплиСенс ВПЧ ВКР скрин-титр-FL и подтверждена в 15 образцах. В прилегающей

Таблица 1
Уровень чувствительности (в %) метода ПЦР в режиме реального времени

Число копий на реакцию	GLOBAL FAM/Green	ВПЧ 16 JOE/Yellow	ВПЧ 18 ROX/Orange	ВПЧ 51 Cy5/Red
5000	5/5* (100)	5/5 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)
500	5/5 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)
50	5/5 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)
10	4/5 (80)	3/5 (60)	2/5 (40)	3/5 (60)

Примечание. * — соотношение числа положительных реакций внутри одной постановки ПЦР и общего числа реакций по каждому каналу детекции флюоресценции.

ткани ДНК ВПЧ выявлена в 30% (30/100) случаев с набором АмплиСенс ВПЧ ВКР скрин-титр-FL и подтверждена в 20 случаях. Следовательно, ВПЧ-положительный результат был верифицирован в 69% (35/51) случаев (см. табл. 2).

Таким образом, при работе с коммерческими наборами фирмы «АмплиСенс» относительно образцов ткани, полученных от больных ПРГ, количество ложноотрицательных результатов составило 31%, что диктует необходимость постановки реакции в триплете. При увеличении количества постановок с одним и тем же образцом вероятность обнаружения ДНК ВПЧ 1 из 12 типов в случае его низкой концентрации возрастает.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что вирусопозитивными следует считать образцы, в которых был определен тип ВПЧ вне зависимости от результатов постановки реакции с набором АмплиСенс скрин. В то же время вопрос о необходимости количественного определения ДНК вируса в ВПЧ-положительных образцах ткани, полученной от больных ПРГ, остается дискуссионным.

Обсуждение

Для идентификации и верификации ВПЧ-положительных случаев ПРГ в лаборатории онковирусологии Томского НИИ онкологии разработан алгоритм определения вируса папилломы в опухолевой и прилегающей ткани коммерческими тест-системами АмплиСенс ВПЧ ВКР скрин-титр-FL и АмплиСенс ВПЧ ВКР генотип-FL. Показана необходимость постановки реакции в триплете для увеличения шанса обнаружения вируса в исследуемой ткани. Кроме того, вирусопозитивными следует считать только образцы с валидным (верифицированным) типом ВПЧ, вне зависимости от результатов постановки реакции с набором АмплиСенс скрин.

Таблица 2

Результаты ПЦР-анализа с применением наборов АмплиСенс ВПЧ ВКР скрин-титр-FL и АмплиСенс ВПЧ ВКР генотип-FL на образцах ткани больных ПРГ

Число ВПЧ-положительных образцов/число постановок реакции	Опухолевая ткань	Прилегающая ткань	Всего
0/3	0	0	149
1/3	9/3* (33)	17/7 (41)	26/10 (38)
2/3	3/3 (100)	4/4 (100)	7/7 (100)
3/3	9/9 (100)	9/9 (100)	18/18 (100)

Примечание. * — реакций, проведенных с помощью ПЦР набора АмплиСенс ВПЧ ВКР скрин-титр-FL, и числа ВПЧ-положительных случаев, подтвержденных набором АмплиСенс ВПЧ ВКР генотип-FL; в скобках — частота (в %) верифицированных ВПЧ-положительных случаев.

Полученные результаты, касающиеся применения отечественных тест-систем АмплиСенс ВПЧ ВКР скрин-титр-FL и АмплиСенс ВПЧ ВКР генотип-FL для изучения ассоциации ВПЧ с инициацией опухолевого процесса гортани, к сожалению, невозможно сравнить с другими подобными по причине отсутствия как информации о проведении данного вида исследований в России, так и непосредственно исследовательских работ в этом направлении.

Следует отметить, что, несмотря на внушительное количество проведенных экспериментальных исследований, посвященных ВПЧ-положительному ПРГ, на данный момент не существует алгоритма для определения клинически значимой вирусной нагрузки при данной патологии, в связи с чем проведение молекулярно-генетического теста по определению вирусной нагрузки у данной категории больных нецелесообразно. Поэтому вектор исследований прежде всего должен быть ориентирован на оценку частоты встречаемости типов ВПЧ, эндемичных для Томского региона или области, где проводится исследование. Вторым этапом исследования станет определение клинически значимой вирусной нагрузки для типов ВПЧ, которые с максимальной частотой будут обнаружены при ПРГ.

В рамках предложенной статьи коллектив лаборатории онковирусологии предлагает рассмотреть методы определения ВПЧ в ткани больных ПР ОГШ в контексте вирусного канцерогенеза для ориентации и помощи коллегам, которые планируют заниматься изучением ВПЧ-ассоциированной формы рака области головы и шеи.

ПЦР является широко распространенным методом определения генетической информации о ВПЧ. Теоретически для обнаружения в биологическом материале ДНК ВПЧ достаточно 30 циклов, в результате которых интересующий фрагмент вирусной ДНК будет амплифицирован до миллиарда копий. Данное преимущество позволяет выполнять диагностические манипуляции с малым количеством биологического материала (соскобы, капля крови, культура клеток, слюна, моча, образцы ткани, полученные при проведении тонкоигольной биопсии) или деградированной ДНК (архивные гистологические срезы, заключенные в парафин).

Кроме определения нуклеотидных последовательностей ВПЧ, техника ПЦР позволяет определить интеграцию вирусной ДНК в клеточный геном. Данное событие может быть детектировано по делеции генов E1—E2 либо отсутствию экспрессии E5-гена, которая является следствием делеции генов E1—E2, ведущей к пространственному разделению p97 промоторного региона и открытой рамки считывания E5-гена [3, 4]. Однако вышеперечисленные факторы не являются показательными, или маркерными, в отношении интеграции генома. Так, В.А. Van Tine и соавт. [4] в прилегающей к опухолевой морфологически неизменной ткани больных ПР ОГШ, содержащей геном ВПЧ в интегрированной и эписомальной форме, отметили низкий уровень экспрессии E5-гена. Более того, в опухолевой ткани обнаружены множественные сайты интеграции ДНК ВПЧ, тогда как в прилегающей это было ограничено лишь несколькими хромосомными локусами.

Однако даже после интеграции вирусного генома может наблюдаться частичная/полная супрессия экспрессии генов ВПЧ, или феномен «молчащей интеграции», вследствие процесса метилирования промоторных доменов вирусных генов [4, 5].

Не менее важным является и понимание того, что при встраивании ВПЧ в клеточный геном возможно образование как полноразмерных, так и сплайсированных вариантов мРНК генов E6—E7, среди которых только первые обладают онкогенной потенциальностью.

В контексте выбора метода детекции функционально активной формы ВПЧ необходимо учитывать и вероятность посттранскрипционных модификаций мРНК E6/E7 в виде сплайсинга и процесса полиаденилирования. При этом аль-

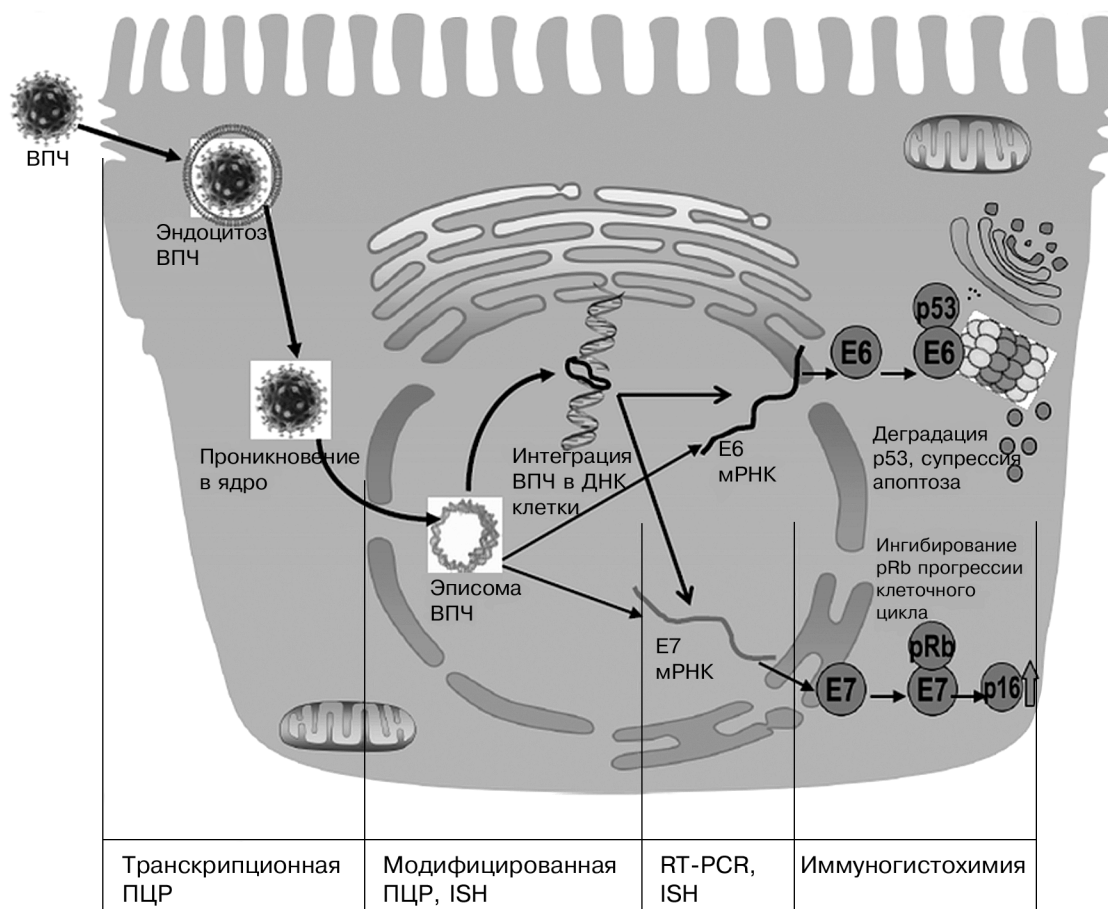


Схема инфицирования эпителиальной клетки вирусом папилломы человека и методы детекции ВПЧ.

После интервенции вириона в клетку вирус может существовать в эписомальной и интегрированной форме. Экспрессия вирусных онкопротеинов E6/E7, которая происходит с обеих форм ВПЧ-генома, инициирует деградацию белка-онкосупрессора p53 и ингибирование белка ретинобластомы pRb соответственно. Методы детекции ДНК ВПЧ, продуктов экспрессии вирусных и клеточных генов изображены в соответствии со стадией биологической активности вируса.

тернативный сплайсинг мРНК онкопротеинов приводит к трансляции преимущественно мРНК E7, тогда как трансляция мРНК E6 возможна только в его отсутствие [6]. Кроме того, при выборе в качестве маркера вирусной инфекции определение E6/E7-онкопротеинов следует акцентировать внимание на ядерной, а не на цитоплазматической локализации данных белков, поскольку именно ядерная локализация является специфичной для транскрипционно активной формы генома ВПЧ. Следует подчеркнуть, что уровень экспрессии E6/E7-генов может не зависеть ни от количества сайтов интеграции, ни от вирусной нагрузки [7].

Вместе с тем, ставя перед собой цель определения интегрированной формы ДНК ВПЧ по присутствию в клетке E6/E7-онкопротеинов, необходимо помнить, что образование мРНК данных генов может происходить как со встроенной, так и с эписомальной ДНК.

Поскольку при встраивании ДНК ВПЧ в геном клетки возможна потеря и другого гена — E6, наиболее информативным, по данным некоторых авторов, будет определение соотношения тандема генов E2/E6 [8—11]. Однако согласно данным Н.С. Mellin и соавт. [12], ген E2 ВПЧ может отсутствовать в эписомальной молекуле ДНК, что может стать причиной ложноположительных результатов.

Необходимо учитывать, что интеграция ДНК ВПЧ, возможно, не является ключевым событием на пути злокачественной трансформации слизистой оболочки респиратор-

ного тракта, как в случае РШМ. Так, при ПР ОГШ интеграция ДНК ВПЧ происходит в поздней стадии канцерогенеза, тогда как именно эписомальная форма ДНК вируса может обладать транскрипционной активностью и инициировать клеточную трансформацию, но с учетом пролонгированной персистенции в организме [3, 5, 13—16]. В связи с вышесказанным и рекомендациями некоторых зарубежных коллег для определения функционально активного генома ВПЧ приоритет должен быть отдан эписомальной форме ДНК [3, 13, 14, 17, 18].

Поскольку для инициации экспрессии генов ВПЧ одного лишь присутствия в клетке вирусной ДНК недостаточно, индикатором транскрипционно активной формы ВПЧ является уровень экспрессии мРНК E6/E7-генов, оценить который можно с помощью таких методов, как ТМА, RT-PCR, APOT, PCR-RFLP, nested PCR, основанных на амплификации транскриптов вирусных генов (см. рисунок).

Так, NASBA (nucleic acid sequence based amplification) — метод, основанный на амплификации РНК и получивший широкое распространение в научной среде, позволяет как идентифицировать ВПЧ в ткани, так и оценить уровень экспрессии онкопротеинов E6/E7.

Провести определение мРНК E6/E7 ВПЧ 16, ВПЧ 18, ВПЧ 31, ВПЧ 33, ВПЧ 35 и ВПЧ 45 позволяют также коммерческие наборы (PreTest HPVProofer/Norchip, NucliSENS EasyQ HPV/bioMerieux) [19].

Для получения амплифицированных транскриптов генов E6/E7 стоит рассмотреть метод ТМА [7, 20].

АРТМА HPV-тест позволяет определить мРНК E6/E7 14 (16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/66/68) типов ВПЧ. Данная тест-система основана на ТМА-технике с использованием магнитных микрочастиц для выделения транскриптов генов, находящихся в образце ткани, с последующим созданием ДНК-копии с мРНК (при помощи обратной транскриптазы) и копии РНК-ампликона с ДНК-матрицы (при помощи T7-РНК-полимеразы) [21].

Менее распространен в научной среде вследствие его трудоемкости метод АРОТ, который позволяет провести дифференциальную диагностику между транскриптами, экспрессируемыми с интегрированной и эписомальной форм [7, 20, 22].

Заключение

Таким образом, при выборе стратегии и дизайна исследования следует учитывать специфичность технических и аналитических характеристик каждого из методов детекции ВПЧ. Несмотря на широкое распространение RT-PCR как стандартного метода определения продуктов транскрипции E6/E7-генов ВПЧ, основным лимитирующим условием RT-PCR (как, впрочем, и всех методов, основанных на определении РНК) является низкая стабильность РНК. Кроме того, отмечена прямая корреляция между чувствительностью метода — временем забора/фиксации образца ткани — и условиями хранения [23]. Поэтому большинство специалистов в области изучения ВПЧ-позитивного ПРГ рекомендуют в комплексе с RT-PCR-методом проводить иммуногистохимическое исследование или ISH-анализ уровня экспрессии клеточного протеина p16 как маркера стабильной экспрессии мРНК E6/E7-генов ВПЧ.

В Томском НИИ онкологии при диагностике высокоонкогенных ВПЧ в опухолевой и прилежащей ткани больных раком гортани с помощью коммерческих наборов АмплиСенс ВПЧ ВКР сотрудники обнаружили факт гиподиагностики, что, вероятно, обусловлено спецификой анализируемых образцов ткани — низкой концентрацией ДНК ВПЧ в исследуемой ткани. В связи с этим был разработан алгоритм оценки и интерпретации данных, основанный на постановке реакции ПЦР в триplete, поскольку при увеличении количества постановок с одним и тем же образцом вероятность обнаружения ДНК ВПЧ 1 из 12 типов в случае его низкой концентрации возрастает.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 2—25 см. REFERENCES)

1. Кувяда Д.А., Шипулина О.Ю. Количественный подход в диагностике папилломавирусной инфекции. *Практическая онкология*. 2006; 7(3): 135—41.

REFERENCES

1. Kuevda D.A., Shipulina O.Yu. The quantitative approach in diagnostic of HPV-infection. *Prakticheskaya onkologiya*. 2006; 7(3): 135—41. (in Russian)
2. Meijer C.J., Snijers P.J., Castle P.E. Clinical utility of HPV genotyping. *Gynecol. Oncol.* 2006; 103 (1): 12—7.
3. Hafner N., Driesch C., Gajda M., Jansen L., Kirchmayr R., Runnebaum I.B. et al. Integration of the HPV16 genome does not invariably result in high levels of viral oncogene transcripts. *Oncogene*. 2008; 27: 1610—7.
4. Van Tine B.A., Kappes J.C., Banerjee N.S., Knops J., Lai L., Syeenbergen R.D. et al. Clonal selection for transcriptionally active onco-

- genes during progression to cancer. *J. Virol.* 2004; 78(20): 11172—86.
5. Briolat J., Dalstein V., Saunier M., Joseph K., Caudroy S., Pre J.L. HPV prevalence, viral load and physical state of HPV-16 in cervical smears of patients with different grades of CIN. *Int. J. Cancer*. 2007; 121: 2198—204.
6. Zheng Z.M., Baker C.C. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front. Biosci.* 2006; 11: 2286—302.
7. Olthof N.C., Huebbers C.U., Kolligs J., Henfling M., Ramaekers F.C., Cornet I. et al. Viral load, gene expression and mapping of viral integration sites in HPV16-associated HNSCC cell lines. *Int. J. Cancer*. 2015; 136(5): 207—18.
8. Jung A.C., Briolat J., Millon R., de Reyniès A., Rickman D., Thomas E. et al. Biological and clinical relevance of transcriptionally active human papillomavirus (HPV) infection in oropharynx squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer*. 2010; 126(8): 1882—94.
9. De Marco L., Gillio-Tos A., Bonello L., Ghisetti V., Ronco G., Merletti F. Detection of human papillomavirus type 16 integration in pre-neoplastic cervical lesions and confirmation by DIPS-PCR and sequencing. *J. Clin. Virol.* 2007; 38(1): 7—13.
10. Peitsaro P., Johanson B., Syrjanen S. Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(3): 886—91.
11. Klaes R., Woerner S.M., Ridder R., Wentzensen N., Duerst M., Schneider A. et al. Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes. *Cancer Res.* 1999; 59(24): 6132—6.
12. Mellin H., Dahlgren L., Munck-Wikland E., Lindholm J., Rabbani H., Kalantari M. et al. Human/papillomavirus type 16 is episomal and a high viral load may be correlated to better prognosis in tonsillar cancer. *Int. J. Cancer*. 2002; 102(2): 152—8.
13. Wiest T., Schwarz E., Enders C., Flechtenmacher C., Bosch F.X. Involvement of intact HPV16 E6/E7 gene expression in head and neck cancers with unaltered p53 status and perturbed pRb cell cycle control. *Oncogene*. 2002; 21: 1510—7.
14. Bechtold V., Beard P., Raj K. Human papillomavirus type 16 E2 protein has no effect on transcription from episomal viral DNA. *J. Virol.* 2003; 77: 2021—8.
15. Ragin C.C., Reshmi S.C., Gullin S.M. Mapping and analysis of HPV16 integration sites in a head and neck cancer cell line. *Int. J. Cancer*. 2004; 110: 701—9.
16. Zaravinos A., Mammias I.N., Sourvinos G., Spandidos D.A. Molecular detection methods of human papillomavirus (HPV). *Int. J. Biol. Markers*. 2009; 24(4): 215—22.
17. Sehr P., Muller M., Höpfl R., Widschwendter A., Pawlita M. HPV antibody detection by ELISA with capsid protein L1 fused to glutathione S-transferase. *J. Virol. Methods*. 2002; 106(1): 61—70.
18. Wentzensen N., Vinokurova S., von Knebel Doeberitz M. Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. *Cancer Res.* 2004; 64(11): 3878—84.
19. Molden T., Kraus I., Karlsen F., Skomedal H., Nygård J.F., Hagmar B. Comparison of Human Papillomavirus messenger RNA an DNA detection: a cross-sectional study of 4,136 women >30 years of age with a 2 year follow-up of high-grade squamous intraepithelial lesion. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2005; 14(2): 367—72.
20. Chaiwongkot A., Pientong C., Ekalaksananan T., Vinokurova S., Kongyingyoes B., Chumworathayi B. et al. Detection of the human papillomavirus 58 physical state using the amplification of papillomavirus oncogene transcripts assay. *J. Virol. Methods*. 2013; 189(2): 290—8.
21. Hill C.S. Molecular diagnostic testing for infectious diseases using TMA technology. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2001; 1(4): 445—55.
22. Bogusiak K., Kobos J. The role of human papillomavirus infection in the head and neck region and methods for its detection. *Pol. J. Pathol.* 2014; 65(1): 1—14.
23. Iftner T., Villa L.L. Human papillomavirus technologies. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* 2003; (31): 80—8.

Поступила 06.04.16

Принята в печать 24.05.16

Ярославцева Н.Г., Игнатова Е.Н., Романова Т.Ю., Тихомиров Д.С., Туполева Т.А.

ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ ВИРУСОВ ГЕПАТИТОВ В И С ПРИ СОЧЕТАННОМ ИНФИЦИРОВАНИИ РЕЦИПИЕНТОВ МНОЖЕСТВЕННЫХ ТРАНСФУЗИЙ

ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, 125167, г. Москва

Инфицирование одной клетки несколькими вирусами приводит к их взаимодействию между собой и клеткой, известному как интерференция вирусов. Лица с заболеваниями системы крови как реципиенты множественных трансфузий относятся к группе с высокой вероятностью инфицирования вирусами гепатитов В (HBV) и С (HCV). Материалом для исследования служили результаты лабораторного тестирования 339 образцов крови пациентов ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России (ГНЦ), из которых 153 имели маркеры сочетанной HBV- и HCV-инфекции, 76 — моноинфекции HBV и 110 — моноинфекции HCV. У подавляющего большинства пациентов с сочетанной инфекцией в крови выявлялась HBV-ДНК, причем статистически значимо чаще у пациентов без поверхностного антигена HBV (HBsAg) (100 против 82,8%; $p = 0,0005$). У лиц с заболеваниями системы крови с сочетанной инфекцией при низкой репликативной активности HBV (с концентрацией ДНК в крови от 150 до 10^3 МЕ/мл) и отсутствии HBsAg наблюдалось снижение вирусной нагрузки HCV на 2—3 порядка вплоть до полного ее исчезновения. Результатом интерференции вирусов стало снижение в крови концентраций нуклеиновой кислоты вирусов при сочетанной инфекции по сравнению с HBV- и HCV-моноинфекцией, поэтому диагностика у реципиентов множественных трансфузий должна включать не только скрининговые (исследование на HBsAg, анти-HCV), но и молекулярные методы (исследование на HBV-ДНК, HCV-РНК), а также тестирование на расширенный спектр серологических маркеров HBV.

Ключевые слова: вирусы гепатитов В и С; сочетанная инфекция; интерференция вирусов; лица с заболеваниями системы крови.

Для цитирования: Ярославцева Н.Г., Игнатова Е.Н., Романова Т.Ю., Тихомиров Д.С., Туполева Т.А. Интерференция вирусов гепатитов В и С при сочетанном инфицировании реципиентов множественных трансфузий. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61(6): 280-284. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2016-61-6-280-284>

Yaroslavtseva N.G., Ignatova E.N., Romanova T.Yu., Tikhomirov D.S., Tupoleva T.A.

HEPATITIS B AND C VIRUSES INTERFERENCE IN COINFECTED MULTITRANSFUSED RECIPIENTS

National Research Center for Hematology, Moscow, 125167, Russian Federation

Data on hepatitis B (HBV) and C (HCV) viruses interference in hematological patients are described. Patients with a hematological malignancy are at high risk of HBV and HCV infection as recipients of multiple transfusions. Results of the laboratory testing of 339 blood samples of patients treated at the National Research Center for Hematology, Russian Federation, were studied. Among these patients, HBV/HCV coinfection markers were observed in 153 patients; HBV markers only, in 76 patients; HCV markers only, in 110 patients. The vast majority of coinfecting patients had HBV DNA in blood (significantly more in HBsAg-negative patients: 100% vs. 82.8%, $p = 0.0005$). HBsAg-negative coinfecting patients had low HBV DNA levels (102-103ME/ml) and reduced (or completely absent) HCV RNA levels. The virus interference leads to a decrease in the viral nucleic acid concentrations. Thus, virus detection should include implementation of high sensitive molecular techniques (such as real-time PCR), and an enhanced set of serological HBV markers along with routine screening methods (HBsAg, anti-HCV).

Key words: hepatitis B virus; hepatitis C virus; coinfection; viral interference; patients with blood diseases.

For citation: Yaroslavtseva N.G., Ignatova E.N., Romanova T.Yu., Tikhomirov D.S., Tupoleva T.A. Hepatitis B and C viruses interference in coinfecting multitransfused recipients. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2016; 61(6):280-284. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2016-61-6-280-284>

For correspondence: Natal'ya G. Yaroslavtseva, PhD, Senior research scientist, National Research Center for Hematology, Moscow, 125167, Russian Federation. E-mail: ngyar@yandex.ru

Information about authors:

Yaroslavtseva N.G., <http://orcid.org/0000-0001-8198-7326>

Tikhomirov D.S., <http://orcid.org/0000-0002-2553-6579>

Tupoleva T.A., <http://orcid.org/0000-0003-4668-9379>

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

Received 04 March 2016

Accepted 29 March 2016

Сочетанная инфекция вирусами гепатитов В и С (HBV и HCV), если учесть сходные пути передачи, нередко встречается среди людей, проживающих в регионах с высоким уровнем распространения этих вирусов, и у лиц с риском парентеральной передачи [1]. Маркеры HCV обнаруживали

у 10—20% больных хроническим вирусным гепатитом В в Юго-Восточной Азии и Европе (Италия, Испания), в то время как поверхностный антиген HBV (HBsAg) выявляли у 2—10% позитивных по антителам к HCV (анти-HCV) лиц [1, 2]. Помимо пациентов с заболеваниями печени одновре-

Для корреспонденции: Ярославцева Наталья Гургеновна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Научной лаборатории вирусной безопасности трансфузий крови и ее компонентов ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, 125167, г. Москва. E-mail: ngyar@yandex.ru

менное наличие маркеров HBV и HCV детектировали у 66% ВИЧ-инфицированных лиц [3], 42,5% потребителей инъекционных наркотиков [4], 14,3% больных гемобластомами [5, 6], 10% больных β -талассемией [7], 8% реципиентов солидных органов [8] и 3,7% пациентов отделений гемодиализа [9]. Доказано, что ведущим фактором риска инфицирования HBV и HCV лиц с заболеваниями системы крови является уровень трансфузионной нагрузки [10]. Вероятность положительных тестов на специфические маркеры HBV и HCV при высокой трансфузионной нагрузке в 2,3—2,5 раза выше. Больные гемофилией в течение жизни получают заместительную терапию плазменными факторами свертывания крови и поэтому относятся к группе риска. Показано, что сочетанная HBV- и HCV-инфекция обнаруживается в 3 раза чаще у больных гемофилией по сравнению с больными гемобластомами [5, 6, 11].

При инфицировании одной клетки несколькими вирусами между всеми участниками этого процесса происходит взаимодействие, результатом которого может быть подавление репродукции одного либо обоих вирусов. Данный феномен получил название «интерференция вирусов» [12]. У пациентов с сочетанной HBV- и HCV-инфекцией концентрации вирусных нуклеиновых кислот (НК) в гепатоцитах были меньше, чем при моноинфекциях [13]. В многочисленных исследованиях показано снижение репликации HBV в присутствии HCV при остром и хроническом гепатите [14—19]. У пациентов с хроническим вирусным гепатитом С нередко встречается HBV-инфекция в скрытой форме с низким уровнем HBV-ДНК в сыворотке и/или ткани печени при отсутствии детектируемого HBsAg в крови [13]. При переходе к хронической фазе HCV-инфекции происходит ингибирование репликации HBV вплоть до полного ее подавления посредством клеточных эпигенетических механизмов [20]. В таком случае HCV становится единственной причиной поражения печени. Существует мнение, что соге-белок HCV может вызывать супрессию энхансеров 1 и 2 HBV, снижая продукцию последнего, причем влияние соге-белка HCV генотипа 1 сильнее по сравнению с соге-белком генотипа 3а [1, 21]. В литературе встречается противоположная точка зрения, согласно которой в присутствии HBV снижается уровень репликации HCV [1, 22]. При одновременном обнаружении HBV и HCV в одном гепатоците помимо возможного участия иммунного ответа хозяина в подавлении репликации вирусов обсуждается и вопрос о прямом взаимном ингибировании вирусов [13].

Ранее было показано, что в случаях как хронического, так и острого гепатита В, сопровождающегося репликацией вирусной ДНК, HBsAg в образцах крови может не выявляться [11]. Исследование интерференции HBV и HCV проводилось преимущественно у лиц с HBs-антигемией, в то время как у пациентов с HBsAg-негативной формой гепатита данная проблема изучена недостаточно.

Цель настоящей работы — оценить интерференцию HCV и HBV при сочетанной инфекции у лиц с заболеваниями системы крови.

Материал и методы

Материалом для исследования служили результаты лабораторного тестирования 339 образцов крови пациентов ГНЦ, из которых 153 имели маркеры сочетанной HBV- и HCV-инфекции и 186 — моноинфекции.

В период с 1999 по 2006 г. 117 пациентов ГНЦ были однократно обследованы на наличие маркеров HBV и HCV методами иммуноферментного анализа (ИФА) в формате стандартного скрининга и полимеразной цепной реакции (ПЦР) в качественном формате. Критериями включения в исследование считали наличие нуклеиновой кислоты (НК) хотя бы одного вируса одновременно с маркерами другого вируса: НК и/или HBsAg и/или анти-HCV.

С 2013 по 2014 г. 222 пациента ГНЦ были однократно обследованы на наличие маркеров HBV и HCV методами ИФА и ПЦР. Количественно охарактеризованы уровни виремии HBV и HCV в образцах плазмы крови пациентов с репликативными формами HBV- и HCV-инфекции. Критериями включения в исследование считали присутствие НК хотя бы одного вируса и отсутствие маркеров другого — моноинфекцию, наличие НК одного вируса и молекулярных или серологических маркеров другого вируса — сочетанную инфекцию.

Методом ИФА в образцах сыворотки крови определяли HBsAg, антитела к ядерному белку HBV (анти-HBcore), антитела к е-антигену HBV (анти-HBe) и анти-HCV. Были использованы коммерческие ИФА-тесты зарубежного и отечественного производства.

Методом ПЦР в образцах плазмы крови в качественном и количественном форматах выявляли HBV-ДНК и HCV-РНК. В положительных по HCV-РНК-образцах определяли генотип вируса. Использовали наборы реагентов ООО «ИнтерЛабСервис».

Аmplификацию НК проводили в приборах Perkin-Elmer 2400 («Perkin-Elmer Corporation», США) с последующим анализом в 2% агарозном геле методом электрофореза; RG-3000 («Corbett Research», Австралия) и Rotor-Gene Q («Qiagen», Голландия) с регистрацией продуктов амплификации в режиме реального времени.

Для статистических расчетов критериев Пирсона (χ^2) или точного критерия Фишера использовали пакет программ EPI5 версии 5.0. Доверительный интервал статистически значимых различий составлял 5% ($p = 0,05$).

Результаты

Для анализа результаты тестирования были разделены на 2 группы: группу 1 ($n = 83$) — образцы крови пациентов с гемобластомами, лимфопролиферативными и аутоиммунными заболеваниями; группу 2 ($n = 34$) — больных гемофилией А и В. Результаты представлены в табл. 1.

Одновременно НК HBV и HCV были зафиксированы в 45 (38,5%) случаях из 117, в 68 (58,1%) пробах выявлена активная репликация HBV, в 4 (3,4%) — HCV. В образцах крови пациентов обеих групп HBV-ДНК превалировала (81 из 83, 97,6%, и 32 из 34, 94,1%). В группе 1 в 52 (62,7%) из 83 образцов крови она была выявлена в комбинации с серологическими маркерами HCV и в 29 (34,9%) из 83 — с HCV-РНК. В группе 2 HBV-ДНК зарегистрирована с одинаковой частотой в сочетании как с HCV-РНК, так и с анти-HCV (16 из 34, 47,1%). Маркер активной репликации только HCV в пробах пациентов обеих групп встречался редко: в 2 (2,4%) из 83 и в 2 (5,8%) из 34 случаев соответственно. Статистически значимых различий в превалентности НК HBV и HCV между группами 1 и 2 выявлено не было, поэтому в последующем образцы анализировали как единую группу.

При анализе серологических маркеров у всех 117 пациентов с сочетанной инфекцией были обнаружены анти-HCV, HBsAg — у 23 (19,7%). Данные представлены в табл. 2.

Все HBsAg-отрицательные образцы крови ($n = 94$) сохранили HBV-ДНК: в комбинации с анти-HCV в 58 (61,7%)

Таблица 1

Выявление маркеров HBV и HCV в образцах крови пациентов с заболеваниями системы крови при сочетанной инфекции в обследованных группах

Группа	HBV-ДНК + HCV-РНК, n (%)	HBV-ДНК, n (%)	HCV-РНК, n (%)
1 ($n = 83$)	29 (34,9)	52 (62,7)	2 (2,4)
2 ($n = 34$)	16 (47,1)	16 (47,1)	2 (5,8)
p	0,311	0,178	0,705

случаев, с HCV-РНК — в 36 (38,3%) из 94 случаев. Среди HBsAg-позитивных образцов одновременно НК обоих вирусов регистрировали в 9 (39,1%) из 23 случаев, в 10 (43,5%) образцах была зафиксирована HBV-ДНК и в 4 (17,4%) — HCV-РНК.

При исследовании 222 образцов крови пациентов с заболеваниями системы крови в период с 2013 по 2014 г. моноинфекция HCV была выявлена у 110 (49,5%), моноинфекция HBV — у 76 (34,2%), активная форма сочетанной инфекции — у 33 (14,9%) пациентов и у 3 (1,4%) лиц отмечены положительные реакции по анти-НВсоре и анти-НВе без маркеров активной HBV-инфекции и высокие концентрации HCV-РНК. Все образцы крови пациентов с активной формой сочетанной инфекции ($n = 33$) содержали анти-HCV и 18 (54,5%) — HBsAg (табл. 3).

HBsAg-положительные образцы крови пациентов с сочетанной инфекцией в 88,9% были позитивны по HBV-ДНК и 66,7% — по HCV-РНК, причем в 11,1% случаев — только по HCV-РНК. Все HBsAg-негативные пробы крови содержали HBV-ДНК, в 60% случаев — в комбинации с HCV-РНК.

С целью изучения интерференции вирусов оценивали уровень виремии HBV и HCV при моно- и сочетанной инфекции (табл. 4).

При моноинфекции HBV ($n = 76$) у лиц с заболеваниями системы крови концентрация ДНК существенно выше в HBsAg-положительных образцах (от 10^3 до $>10^8$ МЕ/мл), чем в HBsAg-отрицательных (от <150 до $1,6 \cdot 10^3$ МЕ/мл). При моноинфекции HCV ($n = 110$) вирусная нагрузка была максимальной и находилась в интервале от $1,1 \cdot 10^4$ до $2,5 \cdot 10^8$ МЕ/мл, при этом наблюдали весь спектр наиболее распространенных генотипов HCV.

В 3 случаях отмечены высокие концентрации HCV-РНК ($8,7 \cdot 10^6$ — $2,7 \cdot 10^7$ МЕ/мл) на фоне наличия анти-НВсоре и анти-НВе без маркеров активной HBV-инфекции.

При сочетанной форме инфекции, но в отсутствие HCV-РНК, высокая концентрация HBV-ДНК напрямую коррелировала с наличием HBs-антигенемии (от $9 \cdot 10^2$ до $>10^8$ МЕ/мл), в то время как в отсутствие поверхностного антигена колебалась от <150 до 900 МЕ/мл. Концентрация HCV-РНК при наличии HBsAg и отсутствии HBV-ДНК составила $1,6 \cdot 10^3$ и $5 \cdot 10^6$ МЕ/мл. При положительном результате теста на HBsAg и одновременной репликации обоих вирусов верхняя граница концентрации НК HCV и HBV была 10^8 МЕ/мл, а нижняя — 10^2 и <150 МЕ/мл соответственно. В отсутствие HBsAg концентрация HCV-РНК составила $2,7 \cdot 10^5$ МЕ/мл, при этом виремия HBV была минимальной (от <150 до 200 МЕ/мл).

Обсуждение

При анализе полученных результатов статистически значимых различий в превалентности НК HBV и HCV между группами пациентов с гемобластозами, лимфопролиферативными, аутоиммунными заболеваниями и больных гемофилией А и В выявлено не было. В образцах крови пациентов, наблюдавшихся в ГНЦ в период с 1999 по 2006 г., одновременное присутствие НК обоих вирусов было выявлено в ~40% вне зависимости от наличия HBsAg. Превалировала доля проб, содержащих

HBV-ДНК, статистически значимо отличаясь от наличия и отсутствия HBsAg (82,8 и 100% соответственно; $p = 0,0005$). Вероятно, это свидетельствует о скрытом гепатите В, не выявленном при рутинном обследовании. Примечательно, что среди HBsAg-отрицательных проб HCV-РНК не встречалась без HBV-ДНК, что статистически значимо отличалось от результатов для HBsAg-положительных образцов ($p = 0,0005$).

В период с 2013 по 2014 г. доля HBsAg-положительных образцов крови пациентов с сочетанной инфекцией статистически значимо увеличилась с 19,6 до 54,5% по сравнению с данными, полученными с 1999 по 2006 г. ($p = 0,00018$; $\chi^2 = 14,07$). Все HBsAg-негативные пробы крови содержали HBV-ДНК, в 60% — в комбинации с HCV-РНК. Аналогично полученным данным в период с 1999 по 2006 г. среди HBsAg-отрицательных проб HCV-РНК не встречалась без HBV-ДНК, что, по-видимому, является тенденцией и, возможно, объясняется интерференцией вирусов.

Известно, что концентрация HBV-ДНК в крови при скрытом гепатите В, как правило, понижена и лежит в пределах до 10^3 — 10^4 копий/мл [6, 23]. Полученные данные подтверждают это. Так, при отсутствии HBsAg в случае моноинфекции HBV у лиц с заболеваниями системы крови концентрация ДНК была существенно ниже по сравнению с концентрацией ДНК в HBsAg-положительных образцах. В случае наличия анти-НВсоре и анти-НВе без маркеров активной HBV-инфекции были обнаружены высокие концентрации HCV-РНК. Полу-

Таблица 2

Выявление HBV-ДНК и HCV-РНК в период с 1999 по 2006 г.

Параметр	HBV-ДНК + HCV-РНК, n (%)	HBV-ДНК, n (%)	Все случаи HBV-ДНК, n (%)	HCV-РНК, n (%)	Все случаи HCV-РНК, n (%)
HBsAg (–) ($n = 94$)	36 (38,3)	58 (61,7)	94 (100)	0	36 (38,3)
HBsAg (+) ($n = 23$)	9 (39,1)	10 (43,5)	19 (82,6)	4 (17,4)	13 (56,5)
p	$>0,05$	$>0,05$	0,0005	0,0005	$>0,05$

Таблица 3

Выявление HBV-ДНК и HCV-РНК в период с 2013 по 2014 г.

Параметр	HBV-ДНК + HCV РНК, n (%)	HBV-ДНК, n (%)	Все случаи HBV-ДНК, n (%)	HCV- РНК, n (%)	Все случаи HCV- РНК, n (%)
HBsAg (–) ($n = 15$)	9 (60,0)	6 (40,0)	15 (100)	0	9 (60,0)
HBsAg (+) ($n = 18$)	10 (55,6)	6 (33,3)	16 (88,9)	2 (11,1)	12 (66,7)
p	$>0,05$	$>0,05$	$>0,05$	$>0,05$	$>0,05$

Таблица 4

Значения концентраций HCV-РНК и HBV-ДНК при моно- и сочетанной инфекции

Число образцов	HCV-РНК, МЕ/мл	анти-HCV	Генотип HCV	HBV-ДНК, МЕ/мл	HBsAg
21	–	–	–	<150 — $1,6 \cdot 10^3$	–
55	–	–	–	10^3 — $>10^8$	+
6	–	+	–	<150 —900	–
6	–	+	–	$9 \cdot 10^2$ — $>10^8$	+
9	10^2 — $2,7 \cdot 10^5$	+	1b	<150 —200	–
10	10^2 — $1,6 \cdot 10^7$	+	1b, 2, 3a	<150 — $>10^8$	+
2	$1,6 \cdot 10^3$; $5 \cdot 10^6$	+	1b, 2	–	+
3*	$8,7 \cdot 10^6$ — $2,7 \cdot 10^7$	+	1b, 3a	–	–
110	$1,1 \cdot 10^4$ — $2,5 \cdot 10^8$	+	1a, 1b, 2, 3a	–	–
Итого: 222	134	146	134	107	73

Примечание. * — в образцах крови обнаружены анти-НВсоре и анти-НВе.

ченные результаты коррелируют с данными других авторов, согласно которым при становлении хронической фазы HCV-инфекции происходит подавление репликации HBV, что описано и другими исследователями [13].

Вариант инфекции, при котором отсутствовала репликация HCV, в случае HBs-антигемии сопровождался более высокой концентрацией HBV-ДНК, чем в отсутствие поверхностного антигена. В то же время вирусемия HCV при наличии HBsAg и отсутствии HBV-ДНК была на 2 и более порядков ниже. При положительном результате теста на HBsAg и одновременной репликации обоих вирусов верхние границы пределов концентрации НК HCV и HBV были аналогичны наблюдаемым при моноинфекциях, а минимальные пределы снижались на 2 порядка. В отсутствие HBsAg наблюдалось снижение концентрации HCV-РНК на 2—3 порядка по сравнению с моноинфекцией, и одновременно фиксировались низкие уровни HBV-ДНК. Следовательно, у пациентов со скрытым гепатитом В при стандартном ИФА-скрининге без дополнительного ПЦР-исследования будет выявлена моноинфекция HCV. Такая форма гепатита В может быть результатом интерференции вирусов или инфицирования мутантным по S-гену штаммом вируса. Суммируя вышесказанное, в случае активной HCV-инфекции в присутствии HBsAg зарегистрирован широкий диапазон концентраций HBV-ДНК (от 0 до $>10^8$ МЕ/мл). На фоне низкой вирусемии HBV при отсутствии HBsAg концентрация HCV-РНК снижалась на 2 порядка. Анализ генотипов HCV при сочетанной инфекции показал, что генотип 1b остается наиболее распространенным, как и было установлено ранее при моноинфекции [24].

Выводы

1. Результатом интерференции вирусов было снижение в крови концентраций НК вирусов при сочетанной инфекции по сравнению с HBV- и HCV-моноинфекцией.

2. У подавляющего большинства пациентов в крови при сочетанной инфекции выявлялась HBV-ДНК, причем статистически значимо чаще у пациентов без HBsAg (100 против 82,8%; $p = 0,0005$).

3. У пациентов с сочетанной инфекцией при низкой репликативной активности HBV (от 150 до 10^3 МЕ/мл) и отсутствии HBsAg наблюдалось снижение вирусемии HCV на 2—3 порядка вплоть до полного ее исчезновения.

4. Вследствие интерференции вирусов гепатитов В и С их диагностика у реципиентов множественных трансфузий должна включать не только скрининговые методы (HBsAg, анти-HCV), но и молекулярные (HBV-ДНК, HCV-РНК) методы, а также тестирование на расширенный спектр серологических маркеров HBV.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1—4, 7—9, 13—15, 17, 21—23 см. REFERENCES)

5. Ярославцева Н.Г., Грумбкова Л.О., Туполева Т.А., Игнатова Е.Н., Сомова А.В., Гуляева А.А. и др. Обеспечивают ли принятые лабораторные методы выбраковки донорской крови по гепатитам В и С вирусную безопасность гемотрансфузий. *Гематология и трансфузиология*. 2006; 51(2): 22—6.
6. Гармаева Т.Ц., Куликов С.М., Михайлова Е.А., Шматова Т.Ф., Игла Р.Е., Гемдзян Э.Г. и др. Динамика инфицирования вирусами гепатитов В и С больных с заболеваниями системы крови. *Гематология и трансфузиология*. 2009; 54(5): 16—23.
10. Гармаева Т.Ц., Куликов С.М., Карякин А.В., Терентьева Л.А., Туполева Т.А., Грумбкова Л.О. и др. Мониторинг факторов риска и индикаторов инфицирования вирусами гепатитов В и С у гематологических больных. *Гематология и трансфузиология*. 2006; 51(1): 23—7.
11. Ярославцева Н.Г., Грумбкова Л.О., Игнатова Е.Н., Романова

- Т.Ю., Сомова А.В., Туполева Т.А. и др. HBsAg-отрицательные варианты вируса гепатита В у гематологических больных, получающих активную заместительную терапию. *Вестник службы крови России*. 2007; (4): 19—23.
12. Гиляров М.С., Бабаев А.А., Винберг Г.Г., Заварзин Г.А. и др. *Биологический энциклопедический словарь*. 2-е издание. М.: Советская Энциклопедия; 1986.
16. Горбачев В.В., Хазанов А.И., Блохина Н.П., Маев И.В., Румянцев О.Н., Тордия Н.Л. и др. Естественное течение сочетанных вирусных гепатитов В и С. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2001; 3(3): 209—14.
18. Шкурко Т.В., Чешик С.Г., Брагинский М. Острый гепатит С на фоне хронической HBV-инфекции. *Вопросы вирусологии*. 2002; 47(1): 12—5.
19. Шкурко Т.В., Чешик С.Г. Острый гепатит В у анти-HCV-положительных пациентов. *Вопросы вирусологии*. 2000; 45(3): 32—5.
20. Киселева Н.П., Киселев Ф.Л. Эпигенетическая регуляция экспрессии генов в вирус-ассоциированных опухолях человека. *Успехи молекулярной онкологии*. 2014; (1): 48—55.
24. Игнатова Е.Н., Ярославцева Н.Г., Туполева Т.А., Романова Т.Ю., Тихомиров Д.С., Филатов Ф.П. Исследование профиля субтипов вируса гепатита С у реципиентов компонентов донорской крови. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2015; (4): 39—43.

REFERENCES

1. Liu Z., Hou J. Hepatitis B virus (HBV) and hepatitis C virus (HCV) dual infection. *Int. J. Med. Sci.* 2006; 3(2): 57—62.
2. Gaeta G.B., Stomaiuolo G., Precone D.F., Lobello S., Chiaramonte M., Stroffolini T. et al. Epidemiological and clinical burden of chronic hepatitis B virus/hepatitis C virus infection. A multicenter Italian study. *J. Hepatol.* 2003; 39(6): 1036—41.
3. Kalinowska-Nowak A., Bociaga-Jasik M., Garlicki A., Skwara P. Prevalence of hepatotropic viruses HBV and HCV in HIV-infected patients from Southern region of Poland. *Acta Virol.* 2000; 44: 23—8.
4. Pallas J.R., Farinas-Alvarez C., Prieto D., Delgado-Rodriguez M. Coinfection by HIV, hepatitis B and hepatitis C in imprisoned injecting drug users. *Eur. J. Epidemiol.* 1999; 15: 699—704.
5. Yaroslavtseva N.G., Grumbkova L.O., Tupoleva T.A., Ignatova E.N., Somova A.V., Gulyaeva A.A. et al. Is routine screening for HBsAg and a-HCV in donor's blood enough for viral safety of blood products. *Gematologiya i transfuziologiya*. 2006; 51(2): 22—6. (in Russian)
6. Garmaeva T.Ts., Kulikov S.M., Mikhaylova E.A., Shmatova T.F., Iglar R.E., Gemdzhyan E.G. et al. The Hepatitis B and C viruses monitoring in patients with blood diseases. *Gematologiya i transfuziologiya*. 2009; 54(5): 16—23. (in Russian)
7. Irshad M., Peter S. Spectrum of viral hepatitis in thalassemic children receiving multiple blood transfusions. *Indian J. Gastroenterol.* 2002; 21(5): 183—4.
8. Aroldi A., Lampertico P., Montagnino G., Passerini P., Villa M., Campise M.R. et al. Natural history of hepatitis B and C in renal allograft recipients. *Transplantation*. 2005; 79(9): 1132—9.
9. Reddy G.A., Dakshinamurthy K.V., Neelaprasad P., Gangadhar T., Lakshmi V. Prevalence of HBV and HCV dual infection in patients on haemodialysis. *Indian J. Med. Microbiol.* 2005; 23(1): 41—3.
10. Garmaeva T.Ts., Kulikov S.M., Karyakin A.V., Terent'eva L.A., Tupoleva T.A., Grumbkova L.O. et al. Monitoring of the risk of infection by hepatitis B and C viruses in hematological patients. *Gematologiya i transfuziologiya*. 2006; 51(1): 23—7. (in Russian)
11. Yaroslavtseva N.G., Grumbkova L.O., Ignatova E.N., Romanova T.Yu., Somova A.V., Tupoleva T.A. et al. HBsAg-negative variants of hepatitis B virus in hematological patients receiving blood transfusion therapy. *Vestnik sluzhby krovi Rossii*. 2007; (4): 19—23. (in Russian)
12. Gilyarov M.S., Babaev A.A., Vinberg G.G., Zavarzin G.A. et al. *Biological Encyclopedic Dictionary [Biologicheskii entsiklopedicheskii slovar']*. 2nd ed. Moscow: Sovetskaya Entsiklopediya; 1986. (in Russian)
13. Rodriguez-Inigo E., Bartolome J., Ortiz-Movilla N., Platero C., Lopez-Alcorocho J.M., Pardo M. et al. Hepatitis C virus (HCV) and Hepatitis B virus (HBV) can coinfect the same hepatocyte in the liver of patients with chronic HCV and occult HBV infection. *J. Virol.* 2005; 79(24): 15578—81.

14. Sagnelli E., Coppola N., Scolastico C., Filippini P., Santantonio T., Stroffolini T. et al. Virologic and clinical expressions of reciprocal inhibitory effect of hepatitis B, C, and delta viruses in patients with chronic hepatitis. *Hepatology*. 2000; 32(5): 1106—10.
15. Liaw Y.F., Chen Y.C., Sheen I.S., Chien R.N., Yeh C.T., Chu C.M. Impact of acute hepatitis C virus superinfection in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Gastroenterology*. 2004; 126(4): 1024—9.
16. Gorbakov V.V., Khazanov A.I., Blokhina N.P., Maev I.V., Rummyantsev O.N., Tordiya N.L. et al. The natural course of hepatitis B and C viruses coinfection. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2001; 3(3): 209—14. (in Russian)
17. Sagnelli E., Coppola N., Messina V., Caprio D., Marrocco C., Marotta A. et al. HBV superinfection in hepatitis C virus chronic carriers, viral interaction, and clinical course. *Hepatology*. 2002; 36(5): 1285—91.
18. Shkurko T.V., Cheshik S.G., Braginskiy M. Acute hepatitis C in patient with chronic HBV. *Voprosy virusologii*. 2002; 47(1): 12—5. (in Russian)
19. Shkurko T.V., Cheshik S.G. Acute hepatitis B in anti-HCV-positive patients. *Voprosy virusologii*. 2000; 45(3): 32—5. (in Russian)
20. Kiseleva N.P., Kiselev F.L. Epigenetic regulation of gene expression in the virus-associated human tumors. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii*. 2014; (1): 48—55. (in Russian)
21. Shin C.M., Lo S.J., Miyamura T., Chen S.Y., Lee Y.H. Suppression of hepatitis B virus expression and replication by hepatitis C virus core protein in HuH-7 cells. *J. Virol.* 1993; 67(10): 5823—32.
22. Zarsky J.P., Bohn B., Bastie A., Pawlotsky J.M., Baud M., Bost-Bezeaux F. et al. Characteristics of patients with dual infection by hepatitis B and C viruses. *J. Hepatol.* 1998; 28(1): 27—33.
23. Hollinger F.B., Habibollahi P., Deneshmand A., Alavian S.M. Occult hepatitis B infection in chronic hemodialysis patients: current concepts and strategy. *Hepat. Mon.* 2010; 10(3): 199—204.
24. Ignatova E.N., Yaroslavtseva N.G., Tupoleva T.A., Romanova T.Yu., Tikhomirov D.S., Filatov F.P. Investigation of the profile of hepatitis C virus subtypes in recipients of donor blood components. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni. Aktual'nye voprosy*. 2015; (4): 39—43. (in Russian)

Поступила 04.03.16

Принята к печати 29.03.16

В ПОМОЩЬ ВИРУСОЛОГУ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 617.721.6-006.81-078

*Саакян С.В., Мякошина Е.Б., Кричевская Г.И., Слепова О.С., Пантелеева О.Г., Андрюшин А.Е.,
Хорошилова И.П., Захарова Г.П.*

ОБСЛЕДОВАНИЕ БОЛЬНЫХ УВЕАЛЬНОЙ МЕЛАНОМОЙ НА НАЛИЧИЕ ГЕРПЕСВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

ФГБУ «Московский НИИ глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава России, 105062, г. Москва

В статье представлены результаты исследования сывороток крови 38 больных увеальной меланомой (УМ) в иммуноферментном анализе на наличие IgM-, IgA-, IgG-антител к вирусу простого герпеса 1-го и 2-го типа (ВПГ-1, ВПГ-2), цитомегаловирусу (ЦМВ), вирусу Эпштейна-Барр (ВЭБ), вирусу герпеса человека 6-го и 8-го типа (ВГЧ-6, ВГЧ-8), хламидии трахоматис; в полимеразной цепной реакции определяли наличие ДНК этих патогенов в биоптатах опухоли, стекловидном теле 10 энуклеированных глаз, а также в плазме крови. Число позитивных сывороток против исследованных патогенов соответствовало их распространенности среди населения РФ. IgG-антитела к ВПГ и ЦМВ выявлены у 100%, к ядерному антигену ВЭБ — у 95%, к ВГЧ-6 — у 50%, к ВГЧ-8 — у 5,3% пациентов. Среди 16 пациентов со средними и далеко зашедшими стадиями УМ выявили антитела, свидетельствующие о реактивации ВЭБ (1,2—3,3 Δ ОП) в 6 случаях.

Инфекционные ДНК присутствовали в опухолевой ткани при УМ достаточно редко (2 из 10). В обоих биоптатах обнаружен геном хламидии трахоматис, а в одном из них — в сочетании с ДНК ВЭБ и ЦМВ. Биоптаты с выявленными инфекционными возбудителями относились только к веретенноклеточному АВ-гистологическому типу УМ. При этом в плазме крови геномы возбудителей не определяли. Полученные результаты свидетельствуют о наличии инфекционных возбудителей у больных УМ и требуют дальнейшего изучения патогенетической роли инфекций в патогенезе УМ.

Ключевые слова: увеальная меланома; цитомегаловирус; вирус простого герпеса 6-го и 8-го типа; вирус Эпштейна-Барр; хламидия трахоматис; полимеразная цепная реакция.

Для цитирования: Саакян С.В., Мякошина Е.Б., Кричевская Г.И., Слепова О.С., Пантелеева О.Г., Андрюшин А.Е., Хорошилова И.П., Захарова Г.П. Обследование больных увеальной меланомой на наличие герпесвирусных инфекций. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61(6): 284-287.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2016-61-6-284-287>

**Saakyan S.V., Myakoshina E.B., Krichevskaya G.I., Slepova O.S., Panteleeva O.G., Andryushin A.E.,
Khoroshilova I.P., Zakharova G.P.**

TESTING PATIENTS WITH UVEAL MELANOMA FOR HERPESVIRUS INFECTIONS

Helmholtz Moscow Research Institute of Eye Diseases, Moscow, 105062, Russian Federation

Для корреспонденции: Мякошина Елена Борисовна, канд. мед. наук, науч. сотр. отдела офтальмоонкологии и радиологии ФГБУ «Московский НИИ глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава России, 105062, г. Москва. E-mail: myakoshina@mail.ru

Results of comprehensive ELISA tests of blood serum for the presence of IgM-, IgA-, and IgG-antibodies to herpes simplex virus types 1 and 2, cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, human herpesvirus 6, human herpes virus 8 type, Chlamydia trachomatis in 38 patients with uveal melanoma are presented. The polymerase chain reaction was used to detect DNA of these pathogens in tumor biopsies, vitreous body of 10 enucleated eyes, as well as in plasma IgG-antibodies to HHV 6 were revealed in 50% of patients; IgG-antibodies to HHV 8, in 5.3% of patients. Among the 16 patients with uveal melanoma at advanced stages, 6 patients had antibodies indicative of EBV reactivation (1.2-3.3). Chlamydia trachomatis genome was detected in both biopsies; in one of them, in conjunction with EBV and CMV DNA. Tissue samples from the identified infectious agents were related only to the spindle-cell histologic type AB of uveal melanoma. In plasma, genomes of pathogens were not determined. The results indicate the presence of infectious agents in patients with uveal melanoma and require further study of the pathogenetic role of infections in the pathogenesis of uveal melanoma.

Key words: uveal melanoma; cytomegalovirus; herpes simplex virus type 6 and 8; Epstein-Barr virus; chlamydia trachomatis; polymerase chain reaction.

For citation: Saakyan S.V., Myakoshina E.B., Krichevskaya G.I., Slepova O.S., Panteleeva O.G., Andryushin A.E., Khoroshilova I.P., Zakharova G.P. Testing patients with uveal melanoma for herpesvirus infections. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2016; 61(6): 284-287. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2016-61-6-284-287>

For correspondence: Elena B. Myakoshina, PhD, Researcher at the Department of radiology and ophthalmocology, Helmholtz Moscow Research Institute of Eye Diseases, Moscow, 105062, Russian Federation. E-mail: myakoshina@mail.ru

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

Received 12 April 2016
Accepted 24 May 2016

Введение

Уvealная меланома (УМ) — злокачественная опухоль, склонная к раннему метастазированию. Лечение УМ направлено на сохранение глаза и зрительных функций и зависит от размеров и локализации новообразования. Ликвидационное лечение — энуклеацию проводят только при далеко зашедших стадиях [1, 2].

В последние годы множество работ посвящено изучению причин возникновения УМ: генетических, иммунологических и эндокринологических аспектов ее патогенеза [3—18]. Так, особое внимание уделяется мутациям в генах при УМ. Доказана ассоциация генов *UVM1* и *UVM2* с развитием УМ, а также гена *BAP1* с предрасположенностью к опухолям. Показана высокая частота мутаций в генах *GNAQ/GNA11*, отвечающих за регуляцию пути MAP-киназы, и др. Эти изменения могут влиять на патогенез УМ. Однако частота мутаций при УМ достигает 60% [3]. Следовательно, не все больные УМ являются носителями генной мутации. Возникает вопрос: не являются ли триггерными факторами, индуцирующими развитие опухоли, инфекционные агенты.

Офтальмотропные возбудители (в частности, герпесвирусы) хронических персистирующих инфекций играют роль в этиопатогенезе воспалительных заболеваний глаз [5]. Однако имеются только единичные сообщения о связи этих патогенов с возникновением онкологических процессов в тканях глаза [4, 6—18].

Широко исследуется влияние вируса Эпштейна-Барр (ВЭБ), вируса герпеса человека 6, 7 и 8-го типа (ВГЧ-6, ВГЧ-7 и ВГЧ-8), цитомегаловируса (ЦМВ) на возникновение опухолей экстраокулярной локализации. Герпесвирусы обнаружены при В-клеточных, Т-клеточных лимфомах, назофарингеальных опухолях, раке желудка, опухоли мозга, саркоме Капоши [6—18]. Однако наличие ДНК герпесвирусов и других инфекционных агентов в плазме крови, биоптате ткани и стекловидном теле, а также специфических сывороточных антител при УМ ранее не исследовали.

Цель работы — изучить частоту выявления ДНК вируса простого герпеса (ВПГ) 1-го и 2-го типа (ВПГ-1 и ВПГ-2), ВЭБ, ЦМВ, ВГЧ-6, ВГЧ-8, хламидии трахоматис (ХТ) в плазме крови, стекловидном теле и биоптатах УМ и специ-

фических антител к вышеперечисленным возбудителям в сыворотке крови.

Материал и методы

Обследованы 38 пациентов с УМ в возрасте от 35 до 63 лет (в среднем $54 \pm 2,7$ года). Больным проводили офтальмологические исследования, включающие инструментальные (ультразвуковое исследование, флуоресцентную ангиографию и оптическую когерентную томографию).

Пациентов разделили на 2 группы:

- 1-я группа — 22 больных (22 глаза) с начальной стадией (T1N0M0) УМ;
- 2-я группа — 16 пациентов (6 глаз — T2N0M0, 10 глаз — T3N0M0) со средней и далеко зашедшей стадией УМ.

Стадию УМ определяли по проминенции и диаметру основания, выявленным с помощью ультразвукового исследования.

Эхографически уровень проминенции начальной меланомы составил в среднем $2,7 \pm 0,9$ мм, диаметр основания — $8,7 \pm 0,6$ мм, опухоли средних размеров — $4,3 \pm 0,5$ и $12,6 \pm 0,3$ мм и больших — $6,4 \pm 0,4$ и $14,7 \pm 0,3$ мм соответственно.

Ангиографически все начальные УМ были аваскулярны. Оптическая когерентная томография опухоли стадии T1M0N0 показала наличие интра- и субретинальной жидкости у 11 из 22 больных начальной УМ.

При далеко зашедших стадиях проведена энуклеация 10 больным, и УМ подтверждена гистологически во всех случаях. Диагностировали эпителиоидноклеточный, веретенчатый, смешанноклеточный типы УМ.

Сыворотку крови всех пациентов исследовали в иммуноферментном анализе (ИФА) на IgM-, IgA-, IgG-антитела к ВПГ-1, ВПГ-2, ВЭБ, ЦМВ, ВГЧ-6, ВГЧ-8, ХТ. По результатам серологического анализа определяли наличие и стадию инфекции (первичная, хроническая, реактивация хронической). Активность ВЭБ оценивали по особенностям серологического ответа на ядерный, ранний и капсидный антигены вируса в соответствии с рекомендациями производителя тест-системы. Для вы-

Результаты ПЦР-анализа плазмы крови, биоптатов опухолей, стекловидного тела и гистологического типа опухоли у пациентов с УМ

Больной глаз и возраст пациента, годы	Наличие ДНК возбудителей в			Гистологический тип УМ
	плазме	биоптате опухоли	стекловидном теле	
1. Больная А., OD, 64	Отр.	Отр.	—	Э
2. Больная А., OS, 63	Отр.	Отр.	Отр.	В
3. Больной В., OD, 35	Отр.	Отр.	—	Э
4. Больная Г., OD, 58	Отр.	ХТ	Отр.	В
5. Больной З., OD, 53	—	Отр.	Отр.	С
6. Больная Т., OD, 40	—	Отр.	—	Э
7. Больной П., OD, 53	—	ХТ, ВЭБ, ЦМВ	—	В
8. Больной Р., OS, 53	Отр.	Отр.	Отр.	С
9. Больная Р., OS, 48	Отр.	Отр.	—	В
10. Больной Т., OD, 57	—	Отр.	Отр.	С
Всего ...	0/6	2/10	0/5	—

Примечание. Отр. — ДНК не выявлена; «—» — исследование не проводили; В — веретенчатый АВ — гистологический тип УМ; С — смешанноклеточный гистологический тип УМ; Э — эпителиоидноклеточный гистологический тип УМ.

явления реактивации ВПГ-1, ВПГ-2 и ЦМВ определяли титр IgG-антител к ранним антигенам ВПГ и предранним — ЦМВ.

В полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени в 10 биоптатах УМ, плазме передней камеры, стекловидном теле и плазме крови исследовали наличие геномов ВПГ-1, ВПГ-2, ВЭБ, ЦМВ, ВГЧ-6, ВГЧ-8, ХТ.

В ИФА и ПЦР использовали коммерческие сертифицированные наборы реагентов производства ЗАО «Вектор-Бест», Кольцово.

Результаты

Офтальмоскопически начальные УМ представляли собой проминирующий фокус аспидного цвета с нечеткими неровными границами, гладкой поверхностью, полями оранжевого пигмента (рис. 1, см. 2-ю полосу обложки).

Клинически опухоли средних и далеко зашедших стадий характеризовались проминирующим очагом серо-аспидного цвета с неровными нечеткими границами, вторичной притуморальной отслойкой сетчатки, собственными сосудами опухоли с неравномерным просветом (рис. 2, см. 2-ю полосу обложки).

После энуклеации проводили патогистологическое исследование (рис. 3, см. 2-ю полосу обложки) и выявили веретенчатый АВ (4), эпителиоидноклеточный (3), смешанноклеточный (3) гистологические типы УМ.

IgG-антитела к поздним антигенам ВПГ и ЦМВ обнаружены у 100%, IgG-антитела к ядерному антигену ВЭБ — у 94,7% обследованных, что свидетельствует о хроническом инфицировании этих пациентов герпесвирусами. Частота инфицированности пациентов с УМ ВГЧ соответствует распространенности этих возбудителей в популяции. IgG-антитела к ВГЧ-6 имели 50% больных, IgG-антитела к ВГЧ-8 выявлены всего у 5,3% пациентов. Низкая прослойка ВГЧ-8-серопозитивных лиц в

популяции является отличительной особенностью этого герпесвируса [13].

Серологические маркеры реактивации герпесвирусов обнаружены у 16 из 22 (72,7%) пациентов с начальной УМ: реактивация ВПГ-1 (IgG-антитела к ранним антигенам) отмечена у 16, ВПГ-2 — у 3, ЦМВ (IgG-антитела к сверхранним антигенам) — у 7 обследованных. Реактивацию ВПГ-2 и ЦМВ наблюдали только в сочетании с активацией ВПГ-1. Реактивации ВЭБ у пациентов с начальной УМ не выявлено.

По мере прогрессирования УМ появлялись антитела, свидетельствующие о реактивации ВЭБ (1,2—3,3 Δ ОП) в 6 из 16 случаев со средней и далеко зашедшей стадией УМ.

Результаты ПЦР показали, что ДНК ХТ присутствовали в ткани опухоли двух пациентов с УМ, у одного из них в сочетании с геномами ВЭБ и ЦМВ. При этом в обоих случаях выявления инфекционных возбудителей в ткани опухоли диагностировали веретенчатый АВ-гистологический тип УМ (см. таблицу). У одного больного (№ 4) результаты ПЦР плазмы крови на наличие ДНК инфекционных агентов оказались отрицательными.

Обсуждение

Роль инфекционных агентов в возникновении и росте опухолей широко обсуждается в литературе. С одной стороны, существование для РНК- и ДНК-содержащих опухолеродных вирусов механизма им-мортализации трансформированных клеток обеспечивает первую инициаторную стадию их малигнизации. С другой стороны, многие инфекционные агенты могут размножаться в раковых клетках, которые являются благоприятной средой для их роста. Эти вирусы-«пассажиры» можно выделить из ткани опухоли. Однако присутствие вируса в опухоли имеет значение, вирус может резко ускорять рост ее ткани. В то же время наличие вируса не необходимо для роста новообразования. Некоторым исследователям удавалось с помощью ряда методов освободить от инфекционного агента инфицированные опухоли, и их злокачественные свойства при этом не утрачивались [6].

В последние годы обсуждается возможная роль уреоплазмы, микоплазмы и ХТ в генезе опухолей урогенитального тракта у взрослых. Вместе с тем имеющиеся результаты весьма противоречивы. По данным М.А. Yow и соавт. [18], в парафиновых срезах гистологически подтвержденного рака простаты ДНК уреоплазмы встречалась исключительно редко, а геном хламидий не был обнаружен.

Заключение

Среди обследованных нами 16 пациентов со средними и далеко зашедшими стадиями УМ выявлены антитела, свидетельствующие о реактивации ВЭБ (1,2—3,3 Δ ОП) в 6 случаях. Повышение частоты реактивации антител к инфекционным возбудителям у больных с далеко зашедшими стадиями УМ может, с одной стороны, указывать на иммуносупрессивное воздействие опухоли на организм пациента, а с другой — способствовать более агрессивному течению новообразования.

Из 10 исследованных биоптатов инфекционные ДНК обнаружены только при веретенчатой АВ-форме УМ (в 2 из 4 биоптатов). В обоих случаях выявлен ге-

ном ХТ, причем в одном — в сочетании с ДНК ВЭБ и ЦМВ. В плазме крови геномы возбудителей не детектировались. Полученные нами результаты позволяют предположить возможное участие (прямое или косвенное) некоторых микроорганизмов в патогенезе отдельных морфологических вариантов УМ. Необходимы дальнейшие исследования для оценки роли инфекций в генезе УМ.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 6, 8, 9, 11—15, 17, 18 см. REFERENCES)

1. Бровкина А.Ф. *Офтальмоонкология*. М.: Медицина; 2002.
2. Мякошина Е.Б. *Флюоресцентная ангиография и оптическая когерентная томография в дифференциальной диагностике начальной меланомы и невусов хориоидеи*: Дисс. ... канд. мед. наук. М.; 2007.
3. Саакян С.В., Амирян А.Г., Цыганков А.Ю., Логинов В.И., Бурденный А.М. Мутации в онкогенах GNAQ и GNA11 у больных увеальной меланомой. *Молекулярная медицина*. 2014; (2): 34—7.
4. Кричевская Г.И., Слепова О.С., Саакян С.В., Мякошина Е.Б. Влияние герпес-вирусных инфекций на уровень сывороточного интерферона-альфа и интерферона-гамма у пациентов с начальной меланомой хориоидеи. *Российский офтальмологический журнал*. 2014; 7(2): 28—32.
5. Кричевская Г.И., Анджелов В.О., Катаргина Л.А., Старикова А.В., Денисова Е.В., Звонарев А.Ю. и др. Реактивация персистентных герпесвирусных инфекций как фактор патогенеза эндогенных увеитов у детей. *Вестник офтальмологии*. 2005; (2): 10—4.
7. Белова Е.Г., Кускова Т.К. Герпесвирусы 6, 7, 8-го типов. *Лечащий врач*. 2006; (2): 15—8.
10. Светицкий П.В., Златник Е.Ю., Зыкова Т.А., Нистратов Г.П., Аединова И.В., Волкова В.Л. и др. Течение рака органов полости рта с учетом ассоциированности с вирусом Эпштейна—Барр, папилломы человека и уровня некоторых цитокинов. *Медицинские науки*. 2014; (11-1): 120—2.
16. Гурцевич В.Э. Роль вируса Эпштейна—Барр в онкогематологических заболеваниях человека. *Клиническая онкогематология*. 2010; 3(3): 222—34.
- denny A.M. Mutations in oncogenes GNA and GNA11 patients with uveal melanoma. *Molekulyarnaya meditsina*. 2014; (2): 34—7. (in Russian)
4. Krichevskaya G.I., Slepova O.S., Saakyan S.V., Myakoshina E.B. Effect of herpesvirus infections on serum levels of interferon-alpha and interferon-gamma in patients with primary choroidal melanoma. *Rossiyskiy oftal'mologicheskii zhurnal*. 2014; 7(2): 28—32. (in Russian)
5. Krichevskaya G.I., Andzhelov V.O., Katargina L.A., Starikova A.V., Denisova E.V., Zvonarev A.Yu. et al. Reactivation of persistent herpes infection as a factor in the pathogenesis of endogenous uveitis in children. *Vestnik oftal'mologii*. 2005; (2): 10—4. (in Russian)
6. Moore P.S., Chang Y. Why do viruses cause cancer? Highlights of the first century of human tumour virology. *Nat. Rev. Cancer*. 2010; 10(12): 878—89.
7. Belova E.G., Kuskova T.K. Herpesvirus 6, 7, 8th types. *Lechashchiy vrach*. 2006; (2): 15—8. (in Russian)
8. Chen X.Z., Chen H., Castro F.A., Hu J.K., Brenner H. Epstein-Barr virus infection and gastric cancer: a systematic review. *Medicine (Baltimore)*. 2015; 94(20): e792.
9. Gilley M.L. Genomic assays for Epstein-Barr virus-positive gastric adenocarcinoma. *Exp. Mol. Med*. 2015; 47(1): 134—49.
10. Svetitskiy P.V., Zlatnik E.Yu., Zykova T.A., Nistratov G.P., Aedinova I.V., Volkova V.L. et al. Current cancer of the oral cavity, taking into account of association with Epstein-Barr virus, human papillomavirus, and the levels of certain cytokines. *Meditsinskie nauki*. 2014; (11-1): 120—2. (in Russian)
11. Zhou Y., Attygalle A.D., Chuang S.S., Diss T., Ye H., Liu H. et al. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma: histological progression associates with EBV and HHV6B viral load. *Br. J. Haematol*. 2007; 138(1): 44—53.
12. Chi J., Gu B., Zhang C., Peng G., Zhou F., Chen Y. et al. Human herpesvirus 6 latent infection in patients with glioma. *J. Infect. Dis*. 2012; 206(9): 1394—8.
13. Rohner E., Wyss N., Trelle S., Mbulaiteye S.M., Egger M., Novak U. et al. HHV-8 seroprevalence: a global view. *Syst. Rev*. 2014; 3: 11.
14. Bishop R.K., Oseguera C., Spencer J.V. Human Cytomegalovirus interleukin-10 promotes proliferation and migration of MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Cell Microenviron*. 2015; 2(1): 678—80.
15. Lenze U., Pohlh F., Muhlhofer H., Lenze F., Toepfer A., Rechl H. et al. Do human tumor-associated viruses play a role in the development of synovial sarcoma? *Clin. Sarcoma Res*. 2015; 5: 11.
16. Gurtsevich V.E. The role of the Epstein Barr virus in human hematological diseases. *Klinicheskaya onkogematologiya*. 2010; 3(3): 222—34. (in Russian)
17. Gogineni E., Marshall V., Miley W., Bayat A., Whitby D., Kovacs J.A. et al. Quantitative determinations of anti-Kaposi sarcoma-associated herpesvirus antibody levels in men who have sex with men. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*. 2013; 76(1): 56—60.
18. Yow M.A., Tabrizi S.N., Severi G., Bolton D.M., Pedersen J., Longano A. et al. Detection of infectious organisms in archival prostate cancer tissues. *BMC Cancer*. 2014; 14: 579.

REFERENCES

1. Brovkina A.F. *Ophthalmooncology [Oftal'moonkologiya]*. Moscow: Meditsina; 2002. (in Russian)
2. Myakoshina E.B. *Fluorescein Angiography and Optical Coherence Tomography in the Differential Diagnosis of Primary Melanoma and Choroidal Nevus*: Diss. Moscow; 2007. (in Russian)
3. Saakyan S.V., Amiryani A.G., Tsygankov A.Yu., Loginov V.I., Bur-

Поступила 12.04.16

Принята в печать 24.05.16

УКАЗАТЕЛЬ СТАТЕЙ, ОПУБЛИКОВАННЫХ В ЖУРНАЛЕ «ВОПРОСЫ ВИРУСОЛОГИИ» В 2016 г.

ОБЗОРЫ

- Сергеев О.В., Баринский И.Ф.** Синтетические пептидные вакцины 1, 5—8
- Макаров В.В., Гулюкин М.И., Львов Д.К.** Зоопатогенные ортобуньявирусы (*Orthobunyavirus*, *Bunyaviridae*) 2, 53—58
- Глотов А.Г., Глотова Т.И., Шуляк А.Ф.** Пестивирусы жвачных животных 2, 59—62
- Дерябин П.Г.** Природные резервуары вирусов рода *Herpesvirus* семейства *Flaviviridae* 3, 101—106
- Савченкова И.П., Алексеенкова С.В., Юров К.П.** Эмбриональные стволовые клетки мыши — перспективный материал для изучения вируса инфекционной анемии лошадей *in vitro* и *in vivo* 3, 107—111
- Жирнов О.П.** Асимметричная структура вируса гриппа А и новая функция матричного белка М1 4, 149—154
- Алексеев К.П., Кальнов С.Л., Гребенникова Т.В., Алипер Т.И.** Ротавирусная инфекция человека. Стратегии вакцинопрофилактики 4, 154—159
- Борисевич С.В., Маренникова С.С., Стоеба Л.Ф., Петров А.А., Кротков В.Т., Махлай А.А.** Оспа буйволов 5, 200—204
- Щелканов М.Ю., Кириллов И.М., Шестопалов А.М., Литвин К.Е., Дерябин П.Г., Львов Д.К.** Эволюция вируса гриппа А/Н5N1 (1996—2016) 6, 245-256

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Видяева И.Г., Потапчук М.В., Репко И.А., Петров С.В., Цыбалова Л.М.** Высокопродуктивные аттенуированные реассортанты H2N2 и H7N9 на основе донора A/Гонконг/1/68/162/35 6, 257-262
- Галочкина А.В., Зарубаев В.В., Киселев О.И., Бабкин В.А., Остроухова Л.А.** Исследование противовирусной активности дигидрохлорверетина в процессе репликации вируса Коксаки В4 *in vitro* 1, 27—31
- Глуховец Б.И., Глуховец Н.Г., Белитченко Н.В., Сосунова О.А.** Иммунофлуоресцентная диагностика герпесвирусной инфекции у мертворожденных 5, 219—221
- Гулий О.И., Караваева О.А., Великов В.А., Соколов О.И., Павлий С.А., Ларионова О.С., Буров А.М., Игнатов О.В.** Исследование адсорбции бактериофага ΦAb-Sp7 на клеточной поверхности *Azospirillum brasilense* Sp7 1, 45—48
- Гурцевич В.Э., Сенюта Н.Б., Ломаев 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 5, 205—212
- Дворянинова О.Ю., Никитина Е.Г., Бычков В.А., Литвяков Н.В.** Генетические аспекты определения папилломавирусной инфекции в опухолевой и прилегающей ткани больных плоскоклеточным раком гортани 6, 275-279
- Дешева Ю.А., Смолоногина Т.А., Дорошенко Е.М., Руденко Л.Г.** Разработка квадριвалентной живой гриппозной вакцины, включающей реассортантные вирусы гриппа В антигенных линий Виктория и Ямагата 1, 16—20
- Евдокимов В.В., Науменко В.А., Тюленев Ю.А., Курило Л.Ф., Ковальк В.П., Сорокина Т.М., Лебедева А.Л., Гомберг М.А., Куц А.А.** Количественная оценка ДНК вирусов папилломы человека высокого канцерогенного риска и герпесвирусов человека у мужчин при нарушении фертильности 2, 63—68
- Завьялова Е.А., Гулюкин М.И., Карпова М.А., Богданова П.Д., Дрошнев А.Е.** Выявление вируса инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых рыб (IPNV) методом иммуноферментного анализа 1, 42—45
- Зайкова О.Н., Гребенникова Т.В., Елаков А.Л., Кочергин-Никитский К.С., Алипер Т.И., Чучалин С.Ф., Гулюкин А.М.** Молекулярно-генетическая характеристика геномов полевых изолятов вируса бешенства, циркулирующих на территории Кировской области 4, 186—192
- Замедянская А.С., Титова К.А., Сергеев Ал.А., Кабанов А.С., Булычев Л.Е., Сергеев Ар.А., Галахова Д.О., Нестеров А.Е., Носарева О.В., Шишкина Л.Н., Таранов О.С., Омигов В.В., Агафонов А.П., Сергеев А.Н.** Оценка чувствительности человека к вирусу натуральной оспы с использованием первичных культур моноцитов-макрофагов 2, 69—73
- Ибрагимова М.К., Цыганов М.М., Карабут И.В., Чуруксаева О.Н., Шпилева О.Н., Бычков В.А., Коломиец Л.А., Литвяков Н.В.** Интегративная и эписомальная формы гено типа 16 вируса папилломы человека при цервикальных интраэпителиальных неоплазиях и раке шейки матки 6, 270-274
- Иванова О.Е., Еремеева Т.П., Морозова Н.С., Шакарян А.К., Гмыль А.П., Яковенко М.Л., Короткова Е.А., Чернышевская О.П., Байкова О.Ю., Силенова О.В., Красота А.Ю., Краснопрошина Л.И., Мустафина А.Н., Козловская Л.И.** Вакциноассоциированный паралитический полиомиелит в Российской Федерации в период изменения схемы вакцинации (2006—2013 гг.) 1, 9—15
- Ильиных А.В., Поленогова О.В.** Доказательство вертикальной передачи вируса ядерного полиомиелита в ряду генераций непарного шелкопряда *lymantria dispar* (L.) 2, 85—88
- Иунихина О.В., Компанец Г.Г.** Экспериментальное изучение сохранения хантавируса в комплексах с субстратами внешней среды 1, 31—33
- Корзая Л.И., Кебурия В.В., Догадов Д.И., Лапин Б.А., Кюрегян К.К., Михайлов М.И.** Маркеры гепатита Е у населения Большого Сочи и обезьян Адлерского приматологического центра 4, 176—180
- Краснослободцев К.Г., Львов Д.К., Альховский С.В., Бурцева Е.И., Федякина И.Т., Колобухина Л.В., Кириллова Е.С., Трушакова С.В., Оскерко Т.А., Щелканов М.Ю., Дерябин П.Г.** Полиморфизм аминокислот в позиции 222 рецепторсвязывающего сайта гемагглютинина вируса гриппа А(H1N1)pdm09 у пациентов с летальной вирусной пневмонией в 2012—2014 гг. 4, 166—171
- Крылова Н.В., Леонова Г.Н.** Противовирусная активность препаратов с различным механизмом действия при экспериментальном клещевом энцефалите 3, 139—144
- 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) 5, 222—229
- Лебедев А.В., Нешумаев Д.А., Казеннова Е.В., Лаповок И.А., Лага В.Ю., Туманов А.С., Глущенко Н.В., Плотникова Ю.К., Пономарева О.А., Ярыгина Е.И., Бобкова М.Р.** Сравнительный анализ генетических вариантов ВИЧ-1, циркулировавших в Иркутской области в 1999 и 2012 гг. 3, 112—118
- Львов Д.К., Бурцева Е.И., Колобухина Л.В., Федякина И.Т., Кириллова Е.С., Трушакова С.В., Феодоритова Е.Л., Беляев А.Л., Меркулова Л.Н., Краснослободцев К.Г., Мукашева Е.А., Гарина Е.О., Оскерко Т.А., Аристова В.А., Вартанян Р.В., Кистенева Л.Б., Дерябин П.Г., Прилипов А.Г., Альховский С.В., Кружкова И.С., Базарова М.В., Девяткин А.В.** Вирусологические, эпидемиологические, клинические, молекулярно-генетические особенности эпидемии гриппа 2015—2016 гг.: доминирование вируса гриппа А(H1N1)pdm09 в России и странах Северного полушария 4, 159—166
- Майкова Г.Б., Чернохаева Л.Л., Воревич М.Ф., Рогова Ю.В., Карганова Г.Г.** Вакцины на основе дальневосточного и европейского штаммов индуцируют нейтрализующие антитела ко всем известным подтипам вируса клещевого энцефалита 3, 135—139