

**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 (на базе 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 *Л. В. Кузнецова*

Верстка *Е. М. Архипова*

Сдано в набор 10.01.2017.

Подписано в печать 06.02.2017.

Формат 60 × 88%.

Печать офсетная.

Печ. л. 6,00.

Усл. печ. л. 5,88.

Уч.-изд. л. 6,36.

Заказ 124.

Отпечатано в типографии ООО

«Подольская Периодика»,

142110, г. Подольск, ул. Кирова, 15

ISSN 0507-4088. *Вопр. вирусологии.* 2017.

Т. 62. № 2. 49-96

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

ДВУХМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Основан в 1956 г.

2

Том 62 · 2017

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., член-корр. РАН)**

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., проф.)

Карганова Г.Г. (д.б.н., проф.)

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)

Юминова Н.В. (д.б.н., проф.)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Акимкин В.Г. (д.м.н., проф., акад. 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)

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 ГЧС"; 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)

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., проф., чл.-кор. РАН; 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, M.Sc.; 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 62 • 2 • 2017

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,
corresponding member of RAS

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.; **Ershev 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, Prof.; **Karganova G.G.** – Doctor of Biological Sciences, Prof.; **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; **Yuminova N.V.** – Doctor of Biological Sciences, Prof.

Editorial council

Akimkin V.G. – MD, PhD, DSc, Prof., Academician 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)

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)

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, Prof., corr. member of RAS (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)

Advisory Board

Yashkulov K.B. – MD, PhD (Elista)

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

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

- Костина Л.В., Забережный А.Д., Гребенникова Т.В., Антипова Н.В., Алипер Т.И., Непоклонов Е.А.** Вакцины против гриппа птиц в птицеводстве 53
- Сизикова Т.Е., Лебедев В.Н., Пантюхов В.Б., Борисевич С.В.** Острая лихорадка с тромбоцитопеническим синдромом: заболевание, вызываемое новым флебовирусом 60

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Жирнов О.П.** Активация парамиксовирусов протеазами в культурах нормальных и раковых клеток 65
- Ворович М.Ф., Майкова Г.Б., Чернохаева Л.Л., Романенко В.В., Анкудинова А.В., Халпчиев Ю.Х., Крганова Г.Г., Ишмухаметов А.А., Дроздов С.Г.** Иммунологическая эффективность и безопасность вакцины «Клещ-Э-Вак»: «взрослая» форма 73
- Еремян А.А., Львов Д.К., Щетинин А.М., Дерябин П.Г., Аристова В.А., Гительман А.К., Ботиков А.Г., Альховский С.В.** Генетическое разнообразие вирусов вида *Chenuda virus* (*Orbivirus*, Reoviridae), циркулирующих в Средней Азии 81
- Никитина А.В., Помелова В.Г., Осин Н.С., Марданлы С.Г.** Мультиплексный иммуноанализ для выявления иммуноглобулинов G к вирусам простого герпеса 1-го и 2-го типов и цитомегаловирусу на основе технологии ФОСФАН 87
- Морозова О.В., Сашина Т.А., Новикова Н.А.** Обнаружение и молекулярная характеристика реассортантных DS-1-подобных G1P[8] штаммов ротавируса группы A 91

ЮБИЛЕЙ

- Василий Андреевич Лашкевич (к 90-летию со дня рождения) 3-я пол. обл.

CONTENTS

REVIEWS

- Kostina L.V., Zaberezhnyy A.D., Grebennikova T.V., Antipova N.V., Aliper T.I., Nepoklonov E.A.** Vaccines against avian influenza in poultry 53
- Sizikova T.E., Lebedev V.N., Pantukhov V.B., Borisevich S.V.** Severe fever with thrombocytopenia syndrome: the disease, caused by the novel phlebovirus 60

ORIGINAL RESEARCH

- Zhirnov O.P.** Paramyxoviruses activation by host proteases in cultures of normal and cancer cells 65
- Vorovitch M.F., Maikova G.B., Chernokhaeva L.L., Romanenko V.V., Ankudinova A.V., Khapchaev Yu.Kh., Karganova G.G., Ishmukhametov A.A., Drozdov S.G.** Immunogenicity and safety of the adult tbe vaccine «tick-e-vac» 73
- Eremyan A.A., Lvov D.K., Shchetinin A.M., Deryabin P.G., Aristova V.A., Gitelman A.K., Botikov A.G., Alkhovsky S.V.** Genetic diversity of viruses of *Chenuda virus* species (*Orbivirus*, Reoviridae) circulating in Central Asia 81
- Nikitina A.V., Pomelova V.G., Osin N.S., Mardanly S.G.** Multiplex immunoassay for detection of immunoglobulin G to herpes simplex virus types 1, 2 and cytomegalovirus based on PHOSPHAN technology 87
- Morozova O.V., Sashina T.A., Novikova N.A.** Detection and molecular characterization of reassortant DS-1-like G1P [8] strains of rotavirus A 91

ANNIVERSARY

- Vasiliy Andreevich Lashkevich (to the 90th anniversary)

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, 2017

УДК 615.371:578.832.1:636.6

Костина Л.В.¹, Забережный А.Д.^{1,2}, Гребенникова Т.В.¹, Антипова Н.В.³, Алипер Т.И.^{1,2}, Непоклонов Е.А.⁴

ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ГРИППА ПТИЦ В ПТИЦЕВОДСТВЕ

¹ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва;

²Всероссийский НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.П. Коваленко» ФАНО России, 109428, г. Москва;

³Медицинский институт Российского университета дружбы народов, 117198, г. Москва;

⁴Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору (Россельхознадзор), 107139, г. Москва

В обзоре представлены актуальные данные о видах используемых и разрабатываемых вакцин против гриппа птиц. Рассмотрены инактивированные цельновирионные вакцины, живые векторные вакцины, а также экспериментальные вакцины, полученные с использованием современных генно-инженерных методов (субъединичные вакцины, вакцины на основе вирусоподобных частиц, ДНК-вакцины). Отмечена эффективность использования технологии обратной генетики вирусов гриппа для усовершенствования процесса получения прототипных вирусных штаммов для инактивированных и живых аттенуированных вакцин.

Ключевые слова: *грипп птиц; вакцины; обратная генетика вируса гриппа.*

Для цитирования: Костина Л.В., Забережный А.Д., Гребенникова Т.В., Антипова Н.В., Алипер Т.И., Непоклонов Е.А. Вакцины против гриппа птиц в птицеводстве. *Вопросы вирусологии.* 2017; 62 (2): 53-60.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-2-53-60>

Kostina L.V.¹, Zaberezhnyy A.D.^{1,2}, Grebennikova T.V.¹, Antipova N.V.³, Aliper T.I.^{1,2}, Nepoklonov E.A.⁴

VACCINES AGAINST AVIAN INFLUENZA IN POULTRY

¹Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russian Federation;

²Y.R. Kovalenko All-Russian Scientific Research Institute of Experimental Veterinary, Moscow, 109428, Russian Federation;

³Institute for Medicine, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, 117198, Russian Federation;

⁴Federal Service for Veterinary and Phytosanitary Surveillance (Rosselkhoznadzor), Moscow, 107139, Russian Federation

The review presents the latest data about the types of vaccines against avian influenza that are used in current medical practice or are under development. Inactivated whole virion vaccines, live vector vaccines, as well as experimental vaccines developed using genetic engineering techniques (e.g. subunit vaccines, VLP vaccines, DNA vaccines) were considered. The efficiency of influenza reverse genetic technology for the development of prototype vaccine strains was noted.

Key words: *avian influenza; vaccines; reverse genetics of influenza virus.*

For citation: Kostina L.V., Zaberezhnyy A.D., Grebennikova T.V., Antipova N.V., Aliper T.I., Nepoklonov E.A. Vaccines against avian influenza in poultry. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal).* 2017; 62(2): 53-60. (In Russ.)

DOI: [http://dx.doi.org/ 10.18821/0507-4088-2017-62-2-53-60](http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-2-53-60)

For correspondence: Lyudmila V. Kostina, PhD in biology, Senior research scientist, Applied virology and biotechnology laboratory, Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russian Federation. E-mail: lvkostina@mail.ru

Information about authors:

Grebennikova T.V., <http://orcid.org/0000-0002-6141-9361>

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

Received 28 September 2016

Accepted 11 October 2016

Грипп птиц является экономически значимым вирусным заболеванием с широким спектром проявлений от асимптоматической инфекции до острого заболевания со смертностью среди кур до 100%.

Вирусы гриппа относятся к семейству Orthomyxoviridae и делятся на 3 рода: *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B* и *Influenzavirus C*. Геном вируса гриппа представлен сегментированной одноцепочечной (-)РНК. Восемь

Для корреспонденции: Костина Людмила Владимировна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. прикладной вирусологии и биотехнологии ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва. E-mail: lvkostina@mail.ru

РНК-сегментов генома вирусов гриппа А и В кодируют вирусные белки PB1, PB2, PA, HA, NP, NA, M и NS.

Грипп птиц вызывает вирус гриппа А, который подразделяется на подтипы на основании антигенных различий двух типов поверхностных гликопротеинов: гемагглютинина (HA) и нейраминидазы (NA). На сегодняшний день идентифицировано 18 подтипов HA и 11 подтипов NA. Из них вирусы гриппа А с подтипом HA1–HA16 и NA1–NA9 были выделены от водоплавающих птиц [1].

Стратегия борьбы с высокопатогенным гриппом птиц (ВПГП) традиционно включает мероприятия по недопущению распространения инфекции и в случае возникновения вспышки полную депопуляцию больных и подопытных по заболеваемости птиц (стратегия «stamping-out»), выполнение строгих ветеринарно-санитарных мер по уничтожению вируса во внешней среде и предотвращению распространения его на соседние территории [2].

С момента открытия в 1955 г. этиологического агента заболевания в мире произошло более 30 эпизоотий ВПГП. Наиболее крупной из них является панзоотия ВПГП H5N1, возникновение которой изменило ситуацию с использованием вакцинации для борьбы с заболеванием. Вспышка ВПГП H5N1 началась в Китае в 1996 г. и распространилась в течение 2003 г. за его пределы в Азию, а затем в 2006 г. в Европу и Африку. К 2007 г. 64 страны были неблагополучны по ВПГП H5N1, а количество погибшей от данного заболевания домашней и дикой птицы превысило 250 млн [3]. Тактика тотальной депопуляции при возникших множественных вспышках в ряде стран Юго-Восточной Азии в 2003–2004 гг. оказалась недостаточно эффективной для борьбы с эпизоотией. Вакцинацию против ВПГП H5N1 проводили сначала в Гонконге (2002), затем в Индонезии (2003), Китае (2004), Индии (2006), Пакистане (2006), Вьетнаме (2005), России (2005) и Египте (2006) [4].

В настоящее время в большинстве неблагополучных по гриппу птиц стран вакцинация против данного заболевания запрещена или не проводится. Вакцины применяются преимущественно в некоторых развивающихся странах и странах с переходной экономикой, но в меньшей степени в развитых странах [5].

За период 2004–2010 гг. самое большое количество доз вакцин против ВПГП H5N1 в птицеводстве использовали 4 страны, принявшие программу вакцинации: Китай (91%), Индонезия (2,3%), Вьетнам (1,4%) и Египет (4,7%). Менее 1% от общего количества доз вакцин против ВПГП H5N1 время от времени использовали ряд других стран: Кот-д'Ивуар, Франция, Казахстан, Монголия, Пакистан, Нидерланды, Судан и Россия. Вакцины против ВПГП с подтипом HA H7 использовались в Пакистане (1995), КНДР (2005) и Мексике (2012) [5].

В России в соответствии с «Правилами по борьбе с гриппом птиц», утвержденными приказом Минсельхоза РФ от 06.07.06 № 195, среди мероприятий по ликвидации гриппа птиц принята вынужденная (в некоторых случаях профилактическая) вакцинация. Основаниями для проведения обязательной вакцинации являются тенденция к дальнейшему распространению инфекции; защита ценной племенной продукции; защита редких и ценных птиц; создание защитной зоны вокруг промышленных птицеводческих организаций, в которой вся содержащаяся выгульным способом птица подвергается вакцинации; возникновение стационарно неблагополучных пунктов по маршрутам миграции диких перелетных птиц [2].

Несмотря на относительно ограниченное (географи-

чески) использование вакцин для борьбы с ВПГП среди домашней птицы, в научных публикациях постоянно появляются сообщения о новых подходах и платформах в разработке вакцин против гриппа птиц. Целью настоящего обзора является представление актуальной информации о вакцинации птиц против гриппа с освещением таких аспектов, как виды используемых и разрабатываемых вакцин, стратегии вакцинации.

Основными стратегиями вакцинации против гриппа птиц являются рутинная вакцинация в неблагополучных регионах; эмерджентная (вынужденная) вакцинация в случае возникновения вспышки; превентивная (профилактическая) вакцинация при высоком риске заноса ВПГП в поголовье [6].

Идеальная вакцина против гриппа должна защищать птицу от заболевания, стимулируя протективный иммунный ответ, а также предотвращать ее инфицирование [4]. Однако существующие на данный момент коммерческие гриппозные вакцины не способны предотвратить инфицирование и обеспечить стерильный иммунитет. Тем не менее лабораторные и полевые исследования показали, что использование вакцин против гриппа у птиц может помочь достичь ряда целей: защитить птицу от проявления клинических признаков и смерти; снизить выделение полевого вируса в окружающую среду в случае инфицирования вакцинированной птицы; предотвратить горизонтальную передачу (контактным путем) полевого вируса; увеличить порог вирусной инфекции; повысить устойчивость птицы к вирусам гриппа птиц. Все вышеперечисленное определяется термином «защита» в случае применения вакцин против гриппа у птиц [6, 7].

Эффективность гриппозных вакцин зависит от антигенных характеристик вакцинного штамма, технологии изготовления, используемого адьюванта, количества антигена в составе вакцины, способа введения вакцины, возраста и вида птицы, а также кратности вакцинации и длительности поствакцинального иммунитета [4].

Антигенное соответствие между HA вакцинного и полевого вирусов гриппа является одним из основных факторов эффективности гриппозных вакцин. Выбор вирусного штамма, который будет включен в состав вакцин для птиц, должен осуществляться на основе сравнительного анализа циркулирующих полевых штаммов со штаммами, входящими в состав лицензированных вакцин. Чем выше идентичность генов HA у вакцинного и полевого штаммов, тем более эффективно вакцинация снижает размножение вируса гриппа в респираторном тракте и выделение его в окружающую среду в случае заражения. Использование вакцин с низкой степенью гомологии по отношению к циркулирующему вирусу может привести к клиническому заболеванию и усилить экскрецию вируса во внешнюю среду у вакцинированного поголовья при заражении [4].

Вакцины против гриппа птиц А могут быть подразделены на 4 основные категории [4, 8]:

- инактивированные цельновирионные вакцины;
- вакцины на основе белка HA (либо потенциально других белков вируса гриппа), полученного в системе экспрессии *in vivo* (живые векторные вакцины);
- вакцины на основе белка HA (либо потенциально других белков вируса гриппа), полученного в системе экспрессии *in vitro*;
- вакцины на основе нуклеиновых кислот (преимущественно ДНК-вакцины).

Все они имеют свои достоинства и недостатки.

В птицеводстве на данный момент используется 2 основных типа вакцин против гриппа птиц (инактивированные цельновирионные и живые векторные вакцины), протективная эффективность которых основана на продукции нейтрализующих антител к определенному подтипу НА вируса гриппа птиц.

Инактивированные цельновирионные вакцины

Большинство противогриппозных вакцин, применяемых в птицеводстве, являются инактивированными, изготовленными с использованием вирусов гриппа птиц с подтипами НА H5, H7 и H9 [9, 10].

Более 30 лет данный вид вакцин был единственным и производился на основе низкопатогенных вариантов вируса гриппа, изолированных во время вспышек среди поголовья домашней птицы либо от диких/одомашненных птиц. Инактивированные вакцины бывают гомологичными и гетерологичными в зависимости от используемого вирусного штамма. Гомологичный вид вакцины готовится из эпизоотических изолятов или стандартных штаммов, у которых подтипы НА и NA совпадают с циркулирующим полевым вирусом. Гетерологичный вид вакцины готовится на основе вируса со схожим с диким вирусом подтипом НА, но отличающимся подтипом NA. Использование гетерологичных инактивированных вакцин делает возможным применение подхода DIVA (Differentiation of Infected from Vaccinated Animals), при использовании которого можно дифференцировать вакцинированную и зараженную птицу [11].

Инактивированные вакцины производятся с использованием куриных эмбрионов, инфицированная аллантоисная жидкость от которых инактивируется физическими или химическими методами. Для инактивации используется формалин, β -пропиолактон, этиленамин. В отличие от субъединичных вакцин, используемых для профилактики гриппа у людей, вакцины для птицеводства, как правило, не очищаются и не концентрируются. Инактивированная аллантоисная жидкость в дальнейшем эмульгируется с адьювантом [12].

Инактивированные цельновирионные вакцины лицензированы для парентерального введения (подкожного или внутримышечного) и особенно подходят для защиты взрослых кур, индеек и других птиц в эмерджентной ситуации, в частности при проведении круговой вакцинации в очаге инфекции. Применять вакцины такого типа у цыплят наиболее эффективно в возрасте 2–3 нед [13].

Основным недостатком инактивированных вакцин является то, что у вакцинированной птицы образуются антитела не только к протективным эпитопам белков НА и NA, но и к внутренним белкам M1 и NP. Как следствие, используя традиционные иммунологические методы анализа, невозможно отличить вакцинированную птицу от инфицированной [14].

Изначально при возникновении эпизоотии ВППП H5N1 инактивированные вакцины, используемые в Азии, Африке и Европе, готовили с использованием 4 “классических” низкопатогенных вакцинных штаммов: A/chicken/Hidalgo (Mexico)/1994 H5N2 (Mex/94), A/turkey/England/N28/1973 H5N3 (England/73), A/turkey/Wisconsin/68 (H5N9) и A/chicken/Italy/22A/1998 (H5N9). Позднее для получения инактивированных вакцин стали использовать еще 2 высокопатогенных штамма: A/chicken/Legok (Indonesia)/2003 (H5N1) (clade 2.1.1) и A/duck/Novosibirsk/02/2005 (H5N1) (clade 2.2) [8, 15].

Стремительное развитие технологий обратной генетики вируса гриппа революционно изменило возможности создания прототипных вирусных штаммов для инактивированных и живых аттенуированных вакцин. В 1999 г. двумя независимыми группами ученых впервые были получены рекомбинантные вирусы гриппа [16, 17]. Суть метода состояла в том, что отдельные молекулы кДНК, кодирующие 8 сегментов РНК вируса гриппа А, были клонированы в плазмиду между промотором и терминатором клеточной РНК-полимеразы I. Полученные 8 плазмид затем трансфицировали в клетки эукариот, в ядре которых транскрибировалась вирусная РНК (вРНК). При этом белки полимеразного комплекса (РА, РВ1, РВ2) и белок NP, необходимые для сборки рибонуклеопротеинового комплекса и начала жизненного цикла вируса, были получены из экспрессионных плазмид, которые также трансфицировали в клетки. В 2000 г. E. Hoffmann и соавт. [18] модифицировали метод, предложив так называемую систему РНК-полимеразы I/II. Основой является плазида pHW2000, имеющая в своем составе промотор и терминатор клеточной РНК-полимеразы I; промотор полимеразы II цитомегаловируса человека и сайт полиаденилирования бычьего гормона роста. Таким образом, синтез вРНК и вирусной матричной РНК (мРНК) происходит с одной матрицы кДНК.

Метод обратной генетики, примененный для вируса гриппа, позволяет создавать инактивированные вакцины с любым необходимым подтипом НА или NA. При этом существует возможность получения новых вакцинных штаммов с требуемыми антигенными характеристиками, со сниженной вирулентностью и повышенной пролиферативной активностью.

Для аттенуации вируса метод обратной генетики является более эффективным и универсальным по сравнению с традиционным способом, при котором для снижения вирулентности необходимо провести множество пассажей вируса гриппа на куриных эмбрионах. Аттенуация может быть проведена путем либо введения мутаций во внутренние гены вируса, либо удаления факторов вирулентности высокопатогенных штаммов вируса гриппа. Так, мутации в двух генах, кодирующих полимеразные белки РВ1 и РВ2 вируса гриппа птиц A/guinea fowl/Hong Kong/WF10199 (H9N2), приводят к утрате патогенности вируса для кур [19]. При делеции неструктурного белка NS1 либо при внесении мутаций в белок M2, необходимый для формирования ионного канала, также происходит аттенуация вируса гриппа А [20, 21]. Изменение последовательности аминокислот в сайте нарезания НА или полное удаление этого сайта у ВПВГ при помощи направленного мутагенеза приводит к приобретению им характеристик низкопатогенных вирусов [22].

В ветеринарии с помощью метода обратной генетики были разработаны вакцины против вируса гриппа для использования у лошадей [23], свиней [24] и птиц [22, 25, 26]. Такие вакцины относятся к традиционным, но полученным альтернативным методом.

В 2006 г. в Китае был создан рекомбинантный вирус Re-1, в котором ген НА H5 и ген NA N1 были получены от штамма вируса гриппа птиц A/goose/Guangdong/1996 (clade 0), а остальные 7 генов – от A/PuertoRico/8/1934 (PR8) [27]. Из перечисленных 7 производственных штаммов вируса гриппа в качестве вакцинных в период 2002–2008 гг. наиболее широко использовались 2 штамма (Mex/94 и Re-1). Штамм Re-1 производился в Китае для внутреннего использования, а также для экспорта в Гон-

конг, Египет и Индонезию. Позднее он был замещен более эффективными реассортантными штаммами Re-5 (с генами HA и NA от вируса гриппа A/duck/Anhui/1/2006, clade 2.3.4) и Re-6 (с генами HA и NA от вируса гриппа A/duck/Guangdong/S1322/2010, 2.3.2 clade). Для направленного использования в НИИ в Харбине (Китай) методом обратной генетики были получены еще 2 вакцинных штамма: Re-4 (гены HA и NA были получены от изолята A/chicken/Shanxi/2/2006 (clade 7), который использовался только в двух провинциях Китая (Шаньси и Нинся) в 2006–2007 гг.; Re-Egy (гены HA и NA были получены от египетского изолята A/chicken/Egypt/18-H/2008 (clade 2.2.1), который использовался только в Египте в 2011 г. [28].

В России на данный момент в птицеводстве применяются инактивированные гомологичные гриппозные вакцины. Тем не менее с помощью метода обратной генетики вируса гриппа также создаются прототипные вакцинные штаммы-кандидаты. Так, в лаборатории прикладной вирусологии и биотехнологии ФГБУ “ФНИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи” был создан прототипный штамм гесPR8-H5N1, имеющий ген HA от высокопатогенного вируса гриппа птиц A/Курган/05/2005 (H5N1), выделенного на территории России, а остальные гены – от высокопродуктивного штамма A/Puerto Rico/8/34 (H1N1). Установлено, что новый штамм гесPR8-H5N1 не вызывает болезнь у птицы, имеет требуемую антигенную специфичность и накапливается с высокой эффективностью при культивировании. Кроме того, опытная инактивированная эмульгированная вакцина, изготовленная в лаборатории на основе штамма гесPR8-H5N1, защищала 1,5-месячных цыплят при проведении контрольного заражения высокопатогенным вирусом A/Курган/05/2005 (H5N1) [25].

В 2014 г. получен мутантный вариант HA вируса A/chicken/Kurgan/5/05 (H5N1) с заменой 58Lys→Ile в малой HA2-субъединице, порог pH-активации которого снижен, а стабильность увеличена как в кислой среде, так и при повышенной температуре. Показано, что вирусоны, содержащие мутантный HA, устойчивы к расщеплению трипсином. Повышенная стабильность вирионов мутантного HA коррелирует с увеличением его продукции как антигена в вакцинном препарате. Предложена гипотеза, в соответствии с которой низкая конформационная стабильность HA высокопатогенных штаммов вируса гриппа птиц определяет низкий выход иммунокомпетентного HA в вакцинных препаратах этих вирусов и, возможно, их низкую иммуногенность [29].

Вакцины на основе белка HA (либо потенциально других белков вируса гриппа), полученного в системе экспрессии *in vivo*

Преимуществом вакцин, полученных в системе экспрессии *in vivo*, являются стимуляция как гуморального, так и клеточного иммунного ответа при парентеральном использовании, а также небольшие производственные затраты при получении протективного антигена.

Живые вирусные векторные вакцины

В сравнении с инактивированными вакцинами живые векторные гриппозные вакцины способны индуцировать более сбалансированный Th1- и Th2-иммунный ответ и, как правило, имеют в своем составе, кроме гена HA, антиген другого вируса и обеспечивают защиту сразу от двух вирусных заболеваний. Протективные антигены вируса гриппа могут синтезироваться *in vivo* в составе бактериальных и вирусных векторов [1].

Вирусные векторы представляют собой рекомбинант-

ные вирусы, в геном которых встроены целевой ген с набором регуляторных элементов. Имеются сообщения о разработке векторных вакцин против ВППП H5N1 с использованием таких вирусных векторов, как вирус оспы кур (rFPV), герпесвирус индеек (rHVT), вирус болезни Ньюкасла (rNDV), вирус инфекционного ларинготрахеита (rILT), вирус лейкоза птиц (rALV) и др. В качестве бактериальных векторов для создания гриппозных вакцин могут использоваться аттенуированные штаммы таких бактерий, как *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri* и прочие [1, 4, 30, 31].

На данный момент только 2 живые векторные вакцины против гриппа птиц лицензированы для применения в птицеводстве. Это вакцины на основе рекомбинантного вируса оспы птиц (rFPV-AIV-H5) и на основе вируса болезни Ньюкасла (rNDV-AIV-H5) [11].

Преимуществами этих двух векторных систем являются:

- индукция обширного иммунитета, включая гуморальный, клеточный и местный (при использовании вектора rNDV) иммунитет;

- отсутствие синтеза белков NP и M вируса гриппа позволяет использовать тест-системы на основе иммуноферментного анализа для обнаружения антител к белку NP и, следовательно, дифференцировать вакцинированных птиц от зараженных;

- развитие иммунного ответа в короткие сроки, кроме того, поскольку рекомбинантный вирус реплицируется в органах и тканях птицы, он обеспечивает лучшее развитие иммунного ответа при меньших по сравнению с инактивированными вакцинами дозах антигена;

- бивалентность вакцин [30, 31].

Вакцина на основе рекомбинантного вируса оспы птиц (rFPV)

Одна из первых векторных вакцин против гриппа птиц была разработана в 1988 г. на основе вирусного вектора rFPV [32]. Имеется множество экспериментальных данных об эффективности ее применения у кур. Была продемонстрирована возможность использования вакцин данного типа против вирусов гриппа птиц с подтипом HA H5 [33–38] и H7 [34, 39] при разных путях введения [40] и разных схемах иммунизации [35, 41].

Векторная вакцина rFPV-AIV-H5 может применяться у однодневных цыплят в инкубаториях. Вакцинация в инкубаториях имеет много преимуществ по сравнению с вакцинацией на птицефабриках, а именно:

- более высокий уровень биобезопасности;

- возможность использования автоматических и полуавтоматических (*in ovo*, подкожно или аэрозольно) методов введения вакцины;

- количество инкубаториев меньше, чем количество птицефабрик, что позволяет улучшить контроль за проведением вакцинации на отдельно взятой территории;

- птица вакцинирована и защищена от гриппа в более раннем возрасте, чем птица в птицеводческих хозяйствах [13, 30].

Показана эффективность использования вакцины rFPV-AIV-H5 при первичной вакцинации однодневных цыплят с последующей вакцинацией инактивированной гриппозной вакциной через 10–21 день (“prime-boost”-вакцинация) [41].

Установлено, что векторная гриппозная вакцина на основе rFPV обеспечивает защиту довольно быстро (1 нед), а продолжительность иммунного ответа при

этом составляет 20 и 40 нед после вакцинации с rFPV-H5 и rFPV-H5N1 соответственно [42, 43].

Тем не менее использование векторной вакцины на основе rFPV-H5 имеет ряд недостатков [1]:

- предшествующий активный иммунитет у птицы, вызванный инфицированием вирусом оспы птиц или вакцинацией традиционной вакциной против данного заболевания, а также наличие материнских антител значительно снижают эффективность вакцины rFPV-AIV-H5;

- требуются большие трудозатраты при использовании вакцины в птицеводческих хозяйствах из-за необходимости ее индивидуального введения каждой птице подкожно или в подкрыльцовую вену;

- векторная вакцина rFPV-AIV-H5 лицензирована для применения только у кур;

- нет преимущества использования такой вакцины у бройлеров, поскольку в их вакцинации против оспы кур нет необходимости.

Две живые векторные вакцины на основе rFPV, лицензированные для применения в Азии, имеют в своем составе следующие гены вируса гриппа: ген H5 вируса гриппа A/turkey/Ireland/83; гены H5 и N1 вируса гриппа A/goose/Guangdong/96. В обоих случаях ген HA высокопатогенного вируса с помощью направленного мутагенеза был изменен на характерный для низкопатогенного вируса гриппа [8]. Еще одна вакцина на основе вектора rFPV со встроенным геном HA H5 вируса гриппа A/bar-headed goose/Qinghai/3/2005 (H5N1) была лицензирована для использования в Китае и Мексике [44].

Вакцина на основе рекомбинантного вируса болезни Ньюкасла (rNDV)

Первоначальные попытки использовать NDV в качестве вектора для создания противогриппозных вакцин не были успешны [30]. D.E. Swayne и соавт. [45] на основе сильно аттенуированного штамма NDV B1 сконструировали рекомбинантный вирус rNDV-AIV-H7, экспрессирующий ген HA H7 вируса гриппа A/chicken/NY/13142-5/94 (H7N2). Было показано, что вакцина на основе полученного штамма rNDV-AIV-H7 обеспечивала неполную защиту привитой птицы (40%) при контрольном заражении высокопатогенными вирусами болезни Ньюкасла и гриппа птиц. При этом у птицы после однократной вакцинации наблюдался лишь слабый гуморальный ответ против HA H7 [1, 45]. Недавние исследования, выполненные на модели вируса гриппа с подтипом HA H5, дали более обнадеживающие результаты, которые в итоге позволили получить 2 коммерческие вакцины, лицензированные для использования в Китае и Мексике. При этом рекомбинантные rNDV-AIV-H5-вакцины, сконструированные на основе штамма LaSota или его производных (clone 30), обеспечивали полную защиту привитой птицы от контрольного заражения как вирусом NDV, так и гомологичными/гетерологичными вирусами гриппа подтипа H5N1 [46–48].

Широкое географическое распространение нового вируса H7N9, который унес уже сотни человеческих жизней, привлекло внимание к векторным вакцинам. Q. Liu и соавт. [49] получили новый кандидатный вакцинный штамм NDV-H7, в котором ген эктодомена HA H7 вируса A/Anhui/1/2013 (H7N9) вставлен между генами P и M вакцинного штамма NDV LaSota. Проведенные исследования показывают, что векторная вакцина на основе полученного штамма NDV-H7 полностью защищает кур от контрольного заражения вирусом H7N9 независимо от путей иммунизации.

Преимуществом вакцин на основе rNDV является возможность их массового использования (аэрозольно, добавлением в питьевую воду) с применением уже существующих технологий вакцинации против NDV. Кроме того, векторную вакцину rNDV-AIV-H5 можно использовать как у кур, так и у индеек [4]. Необходима оптимизация схемы вакцинации в соответствии с уровнем материнских антител, которые снижают эффективность вакцинации [1].

Вакцины на основе белка HA, полученные в системе экспрессии *in vitro*

Для производства экспериментальных вакцин в разные годы был осуществлен синтез рекомбинантного белка HA с использованием культур клеток растений и животных, дрожжей, бактерий (*E. coli*) и вирусов (вируса осповакцины, некоторых нереплицирующихся аденовирусов, вируса Венесуэльского энцефаломиелиита лошадей, ретровируса, бакуловируса). Данные высокотехнологичные вакцины предназначены для индивидуального применения, несмотря на их эффективность, они не внедрены в практику из экономических соображений [1, 4].

Вакцины на основе вирусоподобных частиц

Одним из альтернативных способов создания противогриппозных вакцин является получение вакцин на основе гриппозных вирусоподобных частиц (ВПЧ), которые могут продуцироваться в различных экспрессионных системах (клетках насекомых, млекопитающих и растений).

ВПЧ вируса гриппа представляют собой оригинальную структуру, подобную вирусным частицам, содержащую липидную оболочку и связанные с мембраной поверхностные гликопротеины (HA, NA) в нативной конформации. В отличие от вируса дикого типа ВПЧ не содержат вирусную нуклеиновую кислоту и поэтому являются неинфекционными [50].

Данный тип вакцин стимулирует развитие гуморального и клеточного иммунного ответа. Тем не менее ВПЧ-вакцины в отличие от живых аттенуированных вакцин менее эффективно индуцируют пролиферацию цитотоксических CD8 Т-лимфоцитов и хелперных CD4 Т-лимфоцитов, так как ВПЧ не реплицируются. Для улучшения иммуногенности и протективной эффективности гриппозных ВПЧ B.Z. Wang и соавт. [51] использовали флагеллин в качестве молекулярного адьюванта для улучшения клеточного и гуморального иммунного ответа [51].

В последние несколько лет разработано некоторое количество кандидатных гриппозных вакцин на основе ВПЧ для применения в ветеринарии, включая ВПЧ для вирусов гриппа птиц подтипов H5N3, H9N2 и ВПГП H5N1. При этом все они были получены с использованием бакуловирусной системы экспрессии в клетках насекомых и эмульгированы с масляным адьювантом [50].

Одна из последних работ в этой области посвящена разработке вакцин на основе химерных ВПЧ. Получена бивалентная вакцина на основе ВПЧ, состоящих из белков HA и M1 высокопатогенного вируса гриппа H5N1 и химерного белка F/HA, в котором эктодомен белка сливной (F) NDV слит с трансмембранными и цитоплазматическими доменами (ТМ/КТ) белка HA ВПГП. Полученная химерная вакцина защищает цыплят от контрольного заражения, способствуя образованию высоких титров антител к вирусам H5N1 и NDV [52].

Сокращение временных затрат для производства ВПЧ-вакцин (в пределах 1 мес), отсутствие необходимости использования куриных эмбрионов и работы с высокопатогенными штаммами вируса гриппа в технологическом процессе, а также возможность быстрого его масштабирования являются основными достоинствами ВПЧ-вакцин по сравнению с традиционными современными гриппозными вакцинами [53].

Вакцины на основе нуклеиновых кислот (ДНК-вакцины)

Безопасность и эффективность ДНК-вакцин показана на многих моделях, тем не менее только некоторые из них применяются на практике. В отличие от вирусных и бактериальных векторов ДНК-векторы не являются иммуногенными. Обычно гриппозные ДНК-вакцины – это бактериальные плазмиды, содержащие в своем составе кДНК вируса гриппа под контролем промотора гена млекопитающих. Выполнено множество исследований с использованием плазмидной ДНК в качестве вектора для доставки генов вируса гриппа на мышах [54], хорьках [55], курах [56, 57], лошадях и свиньях [30]. При исследовании эффективности экспериментальных ДНК-вакцин были достигнуты различные уровни защиты от вируса гриппа в зависимости от используемого промотора, гена, встроенного в состав вектора, присутствия адьюванта, совместного использования плазмиды, экспрессирующей иммуномодулятор, метода и пути введения вакцины, а также модели контрольного заражения [58].

Экспериментальные ДНК-вакцины со встроенным геном НА вызывают у кур протективный иммунный ответ против различных высокопатогенных вирусов гриппа с подтипами НА Н5 и Н7. Такие вакцины продуцируют антиген *in situ*, стимулируя тем самым адаптивный гуморальный и клеточный иммунный ответ, сходный с формируемым при естественном заражении или вакцинации. Эксперименты на млекопитающих показали, что ДНК-вакцины, экспрессирующие гены НА, дают более эффективную защиту от различных антигенных вариантов вируса гриппа, чем инактивированные вакцины. Однако на птичьей модели (в том числе на курах) защита, вызываемая ДНК-вакцинами, оказалась менее стойкой, чем при использовании инактивированных и субъединичных вакцин, в которых ген НА экспрессируется *in vitro* и *in vivo* [58].

Для обеспечения протективного иммунного ответа у птицы необходимы большое количество плазмидной ДНК на 1 дозу вакцины и многократная вакцинация (3 и более раз). Эти факторы ограничивают использование ДНК-вакцин в птицеводстве в настоящее время [4].

Заключение

До середины 90-х годов прошлого века гриппозные вакцины в птицеводстве использовались редко, а экспериментальных данных об их качестве и эффективности было немного. В первой декаде XXI века ситуация изменилась и производство гриппозных вакцин существенно выросло. Так, если в 2002 г. в списке Международного эпизоотического бюро было только 2 производителя противогриппозных вакцин с подтипом НА Н5 и Н7, к 2006–2007 гг. в нем насчитывалось уже 38 производителей из Китая, Франции, Германии, Италии, Мексики, Нидерландов, Пакистана и США. При этом в FAO (Продовольственная и сельскохозяйственная организация

ООН) была зарегистрирована 41 гриппозная вакцина против ВППП с подтипом НА Н5 и Н7, и этот список расширяется [4]. Стратегии вакцинации, используемые в разных странах, и подходы к применению вакцин против ВППП H5N1 варьируют от полного неприятия вакцин до попыток вакцинировать 100% поголовья [5]. Вакцинация против гриппа птиц позволяет защитить их от проявлений клинических признаков и смерти, а также повысить уровень общей резистентности поголовья к инфекции и уменьшить экскрецию вируса в окружающую среду. Однако при возникновении эпизоотии ВППП для ее элиминации одной вакцинации недостаточно. Необходимо соблюдать строгие меры биобезопасности [7].

Кроме классических инактивированных вакцин против гриппа птиц, которые используются в птицеводстве наиболее широко, живые векторные вакцины (rFPV-AIV-H5, rNDV-AIV-H5) также разрешены к применению в некоторых странах [9, 11]. Среди современных технологий получения вакцин против гриппа птиц, представленных в данном обзоре, метод обратной генетики занимает особое место. Спустя 16 лет после получения первого рекомбинантного вируса этот метод стал необычайно эффективным и универсальным инструментом, используемым для изучения вируса гриппа. Кроме того, с его помощью можно не только создавать вакцины против гриппа (в том числе вируса гриппа А птиц) с требуемой антигенной специфичностью, но и модифицировать их в случае изменения антигенных свойств циркулирующих полевых штаммов [59].

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 3–9, 11–24, 26–28, 30–52, 54–59 см. REFERENCES)

- Приказ Минсельхоза РФ № 90 “Об утверждении правил по борьбе с гриппом птиц”. М.; 2006.
- Львов Д.К., Алипер Т.И., Дерябин П.Г., Забережный А.Д., Гребенникова Т.В., Сергеев В.А. и др. Вакцина против гриппа птиц инактивированная эмульгированная ФЛУ ПРОТЕКТ Н5 и способ профилактики гриппа птиц. Патент РФ № 2350350; 2009.
- Забережный А.Д., Гребенникова Т.В., Воркунова Г.К., Южак А.Г., Костина Л.В., Норкина С.Н. и др. Получение нового штамма-реассортанта вируса гриппа А/Н5N1 методом обратной генетики и анализ его биологических свойств. *Вопросы вирусологии*. 2014; (6): 23–7.
- Сергеева М.В., Крохин А., Матросович М., Матросович Т., Волшек М., Киселев О.И. и др. Влияние конформационной стабильности гемагглютинаина вируса гриппа на качество инактивированных вакцин H5N1. *Microbiology Independent Research Journal*. 2014; (1): 1–11.
- Петухова Н.В., Иванов П.А., Мигунов А.И. Вирусоподобные частицы – новая стратегия для создания противогриппозных вакцин. *Вопросы вирусологии*. 2013; (2): 10–4.

REFERENCES

- Li C., Bu Z., Chen H. Avian influenza vaccines against H5N1 ‘bird flu’. *Trends Biotechnol.* 2014; 32 (3): 147–56.
- Order of the Ministry of Agriculture of the Russian Federation № 90 “On approval of rules for combating avian influenza”. Moscow; 2006. (in Russian)
- Von Dobschuetz S., Siembieda J., Kim M., Pinto J., Newman S. Highly Pathogenic Avian Influenza. *EMPRES Transboundary Animal Diseases Bulletin*. 2011; (37): 21–9.
- Swayne D.E., Kapczynski D. Vaccines, vaccination and immunology for avian influenza viruses in poultry. In: Swayne D.E., ed. *Avian Influenza*. Ames, Iowa: Blackwell Publishers; 2008: 407–52.

5. Swayne D.E., Pavade G., Hamilton K., Vallat B., Miyagishima K. Assessment of national strategies for control of high-pathogenicity avian influenza and low-pathogenicity notifiable avian influenza in poultry, with emphasis on vaccines and vaccination. *Rev. Sci. Tech.* 2011; 30 (3): 839–70.
6. Swayne D.E. Principles for vaccine protection in chickens and domestic waterfowl against avian influenza: Emphasis on Asian H5N1 high pathogenicity avian influenza. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2006; 1081: 174–81.
7. Council for Agricultural Science and Technology (CAST). *Avian Influenza Vaccination: A Commentary Focusing on H5N1 High Pathogenicity Avian Influenza. CAST Commentary QTA2007-3.* Ames, Iowa: CAST; 2007.
8. Swayne D.E. Avian influenza vaccines and therapies for poultry. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2009; 32 (4): 351–63.
9. Avian influenza vaccine producers and suppliers for poultry (June 2009). Available at: <http://www.fao.org/3/a-ai326e.pdf>
10. L'vov D.K., Aliper T.I., Deryabin P.G., Zaberezhnyy A.D., Grebennikova T.V., Sergeev V.A. et al. The vaccine against avian influenza emulsified inactivated FLU Protect H5 avian influenza, and the way of prevention. Patent RF № 2350350; 2009. (in Russian)
11. Peyre M., Fusheng G., Desvaux S., Roger F. Avian influenza vaccines: a practical review in relation to their application in the field with a focus on the Asian experience. *Epidemiol. Infect.* 2009; 137 (1): 1–21.
12. FAD PRoP/NAHEMS Guidelines: Vaccination for contagious diseases/Appendix C: Vaccination for high pathogenicity avian influenza (August 2015). Available at: <https://www.aphis.usda.gov/aphis/ourfocus/animalhealth/emergency>
13. Bublot M., Pritchard N., Swayne D.E., Selleck P., Karaca K., Suarez D.L. et al. Development and use of fowlpox vectored vaccines for avian influenza. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2006; 1081: 193–201.
14. Suarez D.L., Schultz-Cherr S. Immunology of avian influenza virus: a review. *Dev. Comp. Immunol.* 2000; 24 (2–3): 269–83.
15. Swayne D.E., Kapczynski D. Strategies and challenges for eliciting immunity against avian influenza virus in birds. *Immunol. Rev.* 2008; 225: 314–31.
16. Neumann G., Watanabe T., Ito H., Watanabe S., Goto H., Gao P. et al. Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999; 96 (16): 9345–50.
17. Fodor E., Devenish L., Engelhardt O.G., Palese P., Brownlee G.G., Garcia-Sastre A. Rescue of influenza A virus from recombinant DNA. *J. Virol.* 1999; 73 (11): 9679–82.
18. Hoffmann E., Neumann G., Kawaoka Y., Hobom G., Webster R.G. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000; 97 (11): 6108–13.
19. Song H., Nieto G., Perez D. A new generation of modified live-attenuated avian influenza viruses using a two-strategy combination as potential vaccine candidates. *J. Virol.* 2007; 81 (17): 9238–48.
20. Steel J., Lowen A.C., Pena L., Angel M., Solórzano A., Albrecht R. et al. Live attenuated influenza viruses containing NS1 truncations as vaccine candidates against H5N1 highly pathogenic avian influenza. *J. Virol.* 2009; 83 (4): 1742–53.
21. Watanabe T., Watanabe S., Hyun Kim J., Hatta M., Kawaoka Y. Novel Approach to the Development of Effective H5N1 Influenza A Virus Vaccines: Use of M2 Cytoplasmic Tail Mutants. *J. Virol.* 2008; 82 (5): 2486–92.
22. Uchida Y., Takemae N., Saito T. Application of reverse genetics for producing attenuated vaccine strains against highly pathogenic avian influenza viruses. *J. Vet. Med. Sci.* 2014; 76 (8): 1111–7.
23. Chambers T.M., Quinlivan M., Sturgill T., Cullinane A., Horohov D.W., Zamarin D. et al. Influenza A viruses with truncated NS1 as modified live virus vaccines: Pilot studies of safety and efficacy in horses. *Equine Vet. J.* 2009; 41 (1): 87–92.
24. Richt J.A., Lekcharoensuk P., Lager K.M., Vincent A.L., Loiacono C.M., Janke B.H. et al. Vaccination of pigs against swine influenza viruses by using an NS1-truncated modified live-virus vaccine. *J. Virol.* 2006; 80 (22): 11 009–18.
25. Zaberezhnyy A.D., Grebennikova T.V., Vorkunova G.K., Yuzhakov A.G., Kostina L.V., Norkina S.N. et al. Getting a new-reassortant strain of influenza virus A/H5N1 by reverse genetics and analysis of its biological properties. *Voprosy virusologii.* 2014; (6): 23–7. (in Russian)
26. Webster R.G., Webby R.J., Hoffmann E., Rodenberg J., Kumar M., Chu H.J. et al. The immunogenicity and efficacy against H5N1 challenge of reverse genetics-derived H5N3 influenza vaccine in ducks and chickens. *Virology.* 2006; 351 (2): 303–11.
27. Tian G., Zhang S., Li Y., Bu Z., Liu P., Zhou J. et al. Protective efficacy in chickens, geese and ducks of an H5N1-inactivated vaccine developed by reverse genetics. *Virology.* 2005; 341 (1): 153–62.
28. Chen H. Avian influenza vaccination: the experience in China. *Rev. Sci. Tech.* 2009; 28 (1): 267–74.
29. Sergeeva M.V., Krokhin A., Matrosovich M., Matrosovich T., Volshek M., Kiselev O.I. et al. Influence of conformational stability of influenza virus hemagglutinin on the quality of inactivated H5N1 vaccine. *Microbiology Independent Research Journal.* 2014; (1): 1–11. (in Russian)
30. van den Berg T., Lambrecht B., Marché S., Steensels M., Van Borm S., Bublot M. Influenza vaccines and vaccination strategies in birds. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2008; 31 (2–3): 121–65.
31. Spackman E., Swayne D.E. Vaccination of gallinaceous poultry for H5N1 highly pathogenic avian influenza: Current questions and new technology. *Virus Res.* 2013; 178 (1): 121–32.
32. Taylor J., Weinberg R., Kawaoka Y., Webster R.G., Paoletti E. Protective immunity against avian influenza induced by a fowlpox virus recombinant. *Vaccine.* 1988; 6 (6): 504–8.
33. Qiao C., Jiang Y., Tian G., Wang X., Li C., Xin X. et al. Recombinant fowlpox virus vector-based vaccine completely protects chickens from H5N1 avian influenza virus. *Antiviral Res.* 2009; 81 (3): 234–8.
34. Qiao C.L., Yu K.Z., Jiang Y.P., Jia Y.Q., Tian G.B., Liu M. et al. Protection of chickens against highly lethal H5N1 and H7N1 avian influenza viruses with a recombinant fowlpox virus co-expressing H5 haemagglutinin and N1 neuraminidase genes. *Avian Pathol.* 2003; 32 (1): 25–32.
35. Swayne D.E., Beck J.R., Kinney N. Failure of a recombinant fowl poxvirus vaccine containing an avian influenza hemagglutinin gene to provide consistent protection against influenza in chickens preimmunized with a fowl pox vaccine. *Avian Dis.* 2000; 44 (1): 132–7.
36. Swayne D.E., Garcia M., Beck J.R., Kinney N., Suarez D.L. Protection against diverse highly pathogenic H5 avian influenza viruses in chickens immunized with a recombinant fowlpox vaccine containing an H5 avian influenza hemagglutinin gene insert. *Vaccine.* 2000; 18 (11–12): 1088–95.
37. Swayne D.E., Perdue M.L., Beck J.R., Garcia M., Suarez D.L. Vaccines protect chickens against H5 highly pathogenic avian influenza in the face of genetic changes in field viruses over multiple years. *Vet. Microbiol.* 2000; 74 (1–2): 165–72.
38. Webster R.G., Taylor J., Pearson J., Rivera E., Paoletti E. Immunity to Mexican H5N2 avian influenza viruses induced by a fowlpox-H5 recombinant. *Avian Dis.* 1996; 40 (2): 461–5.
39. Boyle D.B., Selleck P., Heine H.G. Vaccinating chickens against avian influenza with fowlpox recombinants expressing the H7 haemagglutinin. *Aust. Vet. J.* 2000; 78 (1): 44–8.
40. Beard C.W., Schnitzlein W.M., Tripathy D.N. Effect of route of administration on the efficacy of a recombinant fowlpox virus against H5N2 avian influenza. *Avian Dis.* 1992; 36 (4): 1052–5.
41. Steensels M., Bublot M., Van Borm S., De Vriese J., Lambrecht B., Richard-Mazet A. et al. Prime-boost vaccination with a fowlpox vector and an inactivated avian influenza vaccine is highly immunogenic in Pekin ducks challenged with Asian H5N1 HPAI. *Vaccine.* 2009; 27 (5): 646–54.
42. Swayne D.E., Beck J.R., Mickle T.R. Efficacy of recombinant fowl poxvirus vaccine in protecting chickens against a highly pathogenic Mexican-origin H5N2 avian influenza virus. *Avian Dis.* 1997; 41 (4): 910–22.
43. Qiao C., Yu K., Jiang Y., Li C., Tian G., Wang X. et al. Development of a recombinant fowlpox virus vector-based vaccine of H5N1 subtype avian influenza. *Dev. Biol. (Basel).* 2006; 124: 127–32.
44. Lozano B., Soto E., Sarfati D., Castro F., Gay M., Antillon A. A novel engineered live viral vaccine against Newcastle disease and avian influenza subtype H5. In: Capua I., ed. *Proceedings of the FAO/OIE Conference on Vaccination: a Tool for the Control of Avian Influenza.* Verona, Italy; 2007.
45. Swayne D.E., Suarez D.L., Schultz-Cherry S., Tumpey T.M., King D.J., Nakaya T. et al. Recombinant paramyxovirus type 1-avian influenza-H7 virus as a vaccine for protection of chickens against influenza and Newcastle disease. *Avian Dis.* 2003; 47 (Suppl.3): 1047–50.

46. Park M.S., Steel J., García-Sastre A., Swayne D., Palese P. Engineered viral vaccine constructs with dual specificity: avian influenza and Newcastle disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006; 103 (21): 8203–8.
47. Ge J., Deng G., Wen Z., Tian G., Wang Y., Shi J. et al. Newcastle disease virus-based live attenuated vaccine completely protects chickens and mice from lethal challenge of homologous and heterologous H5N1 avian influenza viruses. *J. Virol.* 2007; 81 (1): 150–8.
48. Nayak B., Rout S.N., Kumar S., Khalil M.S., Fouda M.M., Ahmed L.E. et al. Immunization of chickens with Newcastle disease virus expressing H5 hemagglutinin protects against highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses. 2009. Available at: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0006509>
49. Liu Q., Mena I., Ma J., Bawa B., Krammer F., Lyoo Y.S. et al. Newcastle Disease Virus-Vectored H7 and H5 Live Vaccines Protect Chickens from Challenge with H7N9 or H5N1 Avian Influenza Viruses. *J. Virol.* 2015; 89 (14): 7401–8.
50. Lee D.H., Park J.K., Song C.S. Progress and hurdles in the development of influenza virus-like particle vaccines for veterinary use. *Clin. Exp. Vaccine Res.* 2014; 3 (2): 133–9.
51. Wang B.Z., Quan F.S., Kang S.M., Bozja J., Skountzou I., Compans R.W. Incorporation of membrane-anchored flagellin into influenza virus-like particles enhances the breadth of immune responses. *J. Virol.* 2008; 82 (23): 11 813–23.
52. Noh J.Y., Park J.K., Lee D.H., Yuk S.S., Kwon J.H., Lee S.W. et al. Chimeric Bivalent Virus-Like Particle Vaccine for H5N1 HPAI and ND Confers Protection against a Lethal Challenge in Chickens and Allows a Strategy of Differentiating Infected from Vaccinated Animals (DIVA). *PLoS One*. 2016; 11 (9): e0162946.
53. Petukhova N.V., Ivanov P.A., Migunov A.I. Virus-like particles – a new strategy for creating vaccines. *Voprosy virusologii*. 2013; (2): 10–4. (in Russian)
54. Qiu M., Fang F., Chen Y., Wang H., Chen Q., Chang H. et al. Protection against avian influenza H9N2 virus challenge by immunization with hemagglutinin- or neuraminidase-expressing DNA in BALB/c mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006; 343 (4): 1124–31.
55. Ljungberg K., Kolmskog C., Wahren B., van Amerongen G., Baars M., Osterhaus A. et al. DNA vaccination of ferrets with chimeric influenza A virus hemagglutinin (H3) genes. *Vaccine*. 2002; 20 (16): 2045–52.
56. Gall-Reculé G. Le, Cherbonnel M., Pelotte N., Blanchard P., Morin Y., Jestin V. Importance of a prime-boost DNA/protein vaccination to protect chickens against low-pathogenicity H7 avian influenza infection. *Avian Dis.* 2007; 51 (Suppl. 1): 490–4.
57. Cherbonnel M., Rousset J., Jestin V. Strategies to improve protection against low-pathogenicity H7 avian influenza virus infection using DNA vaccines. *Avian Dis.* 2003; 47 (Suppl. 3): 1181–6.
58. Ullah S., Riaz N., Umar S., Shah M.A.A. DNA Vaccines against Avian Influenza: current research and future prospects. *World Poultry Sci. J.* 2013; 69 (1): 125–34.
59. Neumann G., Horimoto T., Kawaoka Y. Reverse Genetics of Influenza Viruses – Applications in Research and Vaccine Design. In: Klenk H.D., Matrosovich M.N., Stech J., eds. *Avian Influenza*. Monographs in virology. Vol. 27. Basel: Karger; 2008: 118–33.

Поступила 28.09.16

Принята в печать 11.10.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616-092:612.56]-036.11-06:616.155.294]-022:578.833.1

Сизикова Т.Е., Лебедев В.Н., Пантюхов В.Б., Борисевич С.В.

ОСТРАЯ ЛИХОРАДКА С ТРОМБОЦИТОПЕНИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ: ЗАБОЛЕВАНИЕ, ВЫЗЫВАЕМОЕ НОВЫМ ФЛЕБОВИРУСОМ

ФГБУ «48 Центральный НИИ» Министерства обороны Российской Федерации, 141306, г. Сергиев Посад-6

Острая лихорадка с тромбоцитопеническим синдромом (SFTS) – новое инфекционное вирусное заболевание, эндемичное для центральной и северо-восточных частей Китайской Народной Республики. Природным хозяином вируса SFTS, который относится к роду *Phlebovirus* семейства *Bunyaviridae*, являются клещи видов *Haemaphysalis longicornis* и *Rhipicephalus microplus*. В КНР вирус SFTS обнаружен у многих видов домашних животных, у которых заболевание протекает инapparantly. Заболевание характеризуется лихорадкой, тромбоцитопенией, лейкоцитопенией, синдромами поражения желудочно-кишечного тракта и нервной системы, проявлениями геморрагического синдрома. Летальность при SFTS составляет от 6 до 30%. Возможна передача вируса от человека к человеку вследствие контакта с кровью больного. В обзоре рассмотрены данные клинического и эпидемиологического изучения инфекции, эволюционный и молекулярно-биологический анализ возбудителя, случаи заболевания за пределами КНР, передача вируса SFTS от человека к человеку, факторы риска при заболевании, вызываемом новым флебовирусом.

Ключевые слова: острая лихорадка с тромбоцитопеническим синдромом; вирус SFTS; клиническое и эпидемиологическое изучение; клещи; домашние животные; факторы риска трансмиссии SFTS.

Для цитирования: Сизикова Т.Е., Лебедев В.Н., Пантюхов В.Б., Борисевич С.В. Острая лихорадка с тромбоцитопеническим синдромом: заболевание, вызываемое новым флебовирусом. *Вопросы вирусологии*. 2017; 62 (2): 60–65.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-2-60-65>

Sizikova T.E., Lebedev V.N., Pantukhov V.B., Borisevich S.V.

SEVERE FEVER WITH THROMBOCYTOPENIA SYNDROME: THE DISEASE, CAUSED BY THE NOVEL PHLEBOVIRUS

48th Central Scientific Research Institute, Sergiev Posad, 141306, Russian Federation

Severe fever with thrombocytopenia syndrome (SFTS) is an emerging infectious disease caused by a new virus (SFTS virus) reported to be endemic to central and northeastern parts of China. SFTS virus, which is classified into the genus *Phlebovirus* (the *Bunyaviridae* family), is suspected to be a tick-borne virus owing to evidence in two species of ticks: *Haemaphysalis longicornis* and *Rhipicephalus microplus*. SFTS virus is detected among

Для корреспонденции: Борисевич Сергей Владимирович, д-р биол. наук, профессор, начальник ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, 141306, г. Сергиев Посад-6. E-mail: 48cnii@mil.ru

many species of domestic animals in China. The clinical symptoms of SFTS include fever, thrombocytopenia, leucocytopenia, gastrointestinal symptoms, neural symptoms, bleeding tendency. The fatality rate of SFTS is 6-30%. Person-to-person transmission of SFTS virus is possible through blood contact.

Clinical and epidemiological studies of SFTS, the cases of SFTS outside China, person-to-person transmission of SFTS virus, evolutionary and molecular analysis of the emergent SFTS virus, and risk assessment of human infection with a novel phlebovirus are considered in this review.

Key words: *severe fever with thrombocytopenia syndrome; severe fever with thrombocytopenia syndrome virus; clinical and epidemiological study; ticks; domestic animals; risk factors transmission of SFTS infection.*

For citation: Sizikova T.E., Lebedev V.N., Pantukhov V.B., Borisevich S.V. Severe fever with thrombocytopenia syndrome: the disease, caused by the novel phlebovirus. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2017; 62(2): 60-65. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-2-60-65>

For correspondence: Sergey V. Borisevich, Dr. Biol. Sci., Professor, Head of the 48th Central Scientific Research Institute, Sergiev Posad, 141306, Russian Federation. E-mail: 48cnii@mil.ru

Information about authors:

Sizikova T.E., <http://orsid.org/0000-0002-1817-0126>

Pantukhov V.B., <http://orsid.org/0000-0002-1313-2059>

Lebedev V.N., <http://orsid.org/0000-0002-6552-4599>

Borisevich S.V., <http://orsid.org/0000-0002-5742-3919>

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

Received 10 June 2016
Accepted 11 October 2016

В период с марта по июль 2009 г. в сельских районах провинций Хубэй и Хэнань Центрального Китая было выявлено новое заболевание, характеризующееся выраженной лихорадкой (38°C и выше), тромбоцитопенией (концентрация тромбоцитов менее $1 \cdot 10^5 \cdot \text{мл}^{-1}$), лейкоцитопенией, симптомами поражения желудочно-кишечного тракта, в 30% случаев заканчивающееся гибелью больных [1]. На начальном этапе признаки заболевания были характерны для анаплазмоза, однако проведенные исследования позволили выявить специфические антитела к возбудителю анаплазмоза (*Anaplasma phagocytophilum*) только в 24 из 285 обследованных сывороток крови реконвалесцентов [2].

Начиная с марта 2010 г. стали поступать сообщения о новых случаях заболевания в центральных и северо-восточных районах Китая со сходными клиническими признаками. Заболевание получило название “острая лихорадка с тромбоцитопеническим синдромом” (англ. Severe fever with thrombocytopenia syndrome (SFTS)).

Этиология. В результате лабораторных исследований из биоматериала, полученного от 42-летнего больного мужчины, проживавшего в провинции Хэнань, в июне 2009 г. был выделен ранее неизвестный вирус, по результатам генотипирования отнесенный к роду *Phlebovirus* семейства Bunyaviridae. Выделенный изолят вируса получил название “штамм DBM”. В последующем из биопроб, полученных от других больных, было выделено еще 11 штаммов вируса SFTS [1, 2]. Этот же возбудитель в литературе также встречается под другим наименованием “вирус лихорадки Хэнань”, который был выделен от других больных, а впоследствии и от клещей [1–4].

С помощью электронной микроскопии установлено, что вирионы вируса SFTS имеют сферическую форму с диаметром 80–100 нм. В инфицированных клетках вирионы можно наблюдать внутри вакуолей, главным образом в аппарате Гольджи [5].

Все штаммы, включая DBM, по нуклеотидной последовательности генома являлись близкородственными, уровень гомологии по всем сегментам генома составлял 96%. Концевые участки всех трех сегментов генома были сходны с таковыми других флебовирусов.

Строение генома вируса SFTS соответствует геному других представителей рода *Phlebovirus* семейства Бу-

nyaviridae. Геном состоит из трех сегментов (L, M и S) “минус” РНК. L-сегмент генома состоит из 6368 нуклеотидов и содержит одну открытую рамку считывания, кодирующую 2084 аминокислоты. M-сегмент генома состоит из 3378 нуклеотидов и содержит одну открытую рамку считывания, кодирующую 1073 аминокислоты (предшественник гликопротеинов Gn и Gc). S-сегмент генома состоит из 1744 нуклеотидов РНК, характеризуется амбисенсной стратегией кодирования двух белков (N и NSs) и содержит две рамки считывания, разделенные внутрисегментным регионом из 62 нуклеотидов. Белок NSs играет важную роль в патогенезе, подавляя синтез интерферона в инфицированных клетках [6]. Полные последовательности L-, M- и S-сегментов генома депонированы в GenBank (№ KF358691, KF358692 и KF358693 соответственно) [7].

Филогенетический анализ, проведенный путем определения полноразмерных последовательностей сегментов L, M и S штаммов DBM, HN6 и HB29 вируса SFTS, показал, что данный возбудитель занимает промежуточное положение между двумя другими группами рода *Phlebovirus* (группа Сицилийской москитной лихорадки, в которую, кроме одноименного вируса, входят вирусы лихорадки долины Рифт (ЛДР), Пунта-Тора, Тоскана и Массила и группа вируса Укуниеме). Следовательно, вирус SFTS является прототипным возбудителем третьей группы рода *Phlebovirus*. По структуре генома вирус SFTS наиболее близок к вирусу Укуниеме (уровень гомологии по сегментам L, M и S геномной РНК составляет 34, 24 и 29% соответственно) [2]. Эти данные нашли подтверждение при сравнительном анализе аминокислотных последовательностей структурных белков вируса SFTS, а также других белков флебовирусов. Важно отметить, что РНК-зависимая РНК-полимераза и гликопротеины вируса SFTS наиболее близкородственными соответствующим белкам вируса Укуниеме, однако белок нуклеокапсида вируса SFTS более близок соответствующему структурному белку вируса ЛДР (уровень гомологии 41,4%). Наиболее уникальной структурой характеризуется белок NSs, для которого уровень гомологии с другими флебовирусами находится на низком уровне от 11,2 до 16%.

При анализе геномных последовательностей изолятов

вируса SFTS, выделенных в КНР в 2009–2011 гг., специалисты установили циркуляцию двух основных линий возбудителя [3]. Если учесть характер выявленных различий между данными линиями, они являются продуктом гомологичной рекомбинации (но не реассортации) в процессе молекулярной эволюции вируса SFTS. При реконструкции эпидемиологической истории вируса SFTS высказано предположение, что данный возбудитель появился всего 50–150 лет назад [3].

Эпидемиология. В 2011–2012 гг. в КНР зарегистрировано 2047 случаев SFTS (у 46,65% мужчин и у 53,35% женщин), из которых 129 (у 55,04% мужчин и 44,96% женщин) завершились летально. Средний возраст умерших составлял 64 года (диапазон варьирования от 38 до 86 лет). Средняя продолжительность заболевания до гибели (при летальных случаях) составляла 9 сут. Из всех летальных случаев заболевания гибель в 75,97% случаев наступала в первые 14 сут от начала заболевания. При этом большая часть (74,89%) случаев заболевания была зарегистрирована в период с мая по август. Наибольшее количество случаев зафиксировано в провинциях Хэнань (48,22%), Хубэй (21,89%) и Шаньдун [8, 9].

Группа риска включает рабочих, занятых в сельском хозяйстве, и пожилых женщин, проживающих в сельских районах [7, 10].

Возраст больных колебался от 39 до 83 лет, 115 (75%) из 154 больных были старше 50 лет. Большинство заболевших (81,4%) сельскохозяйственные рабочие, проживающие в лесной холмистой местности и работавшие в полях непосредственно перед началом заболевания. Женщины составляли 56% от общего количества всех заболевших.

Результаты исследований, направленных на поиск возможного переносчика инфекции, показали, что в комарах, отловленных в районе проживания больных (данные получены при исследовании 5900 особей), при анализе с помощью ОТ-ПЦР не была обнаружена РНК вируса SFTS. В то же время у 10 из 186 исследованных клещей вида *Haemaphysalis longicornis*, собранных с домашних животных в районе проживания больных, была выявлена РНК вируса SFTS [11, 12]. Следует отметить, что у 14,9% заболевших наблюдались укусы клещей в 14-дневный период, предшествующий началу заболевания [8].

Клещи *Haemaphysalis longicornis* широко распространены на материковой части Китая и на Корейском полуострове. Первично заражение человека происходит вследствие укусов инфицированных клещей данного вида. Именно возможный контакт с инфицированными клещами следует рассматривать как основной фактор риска заражения SFTS. В дальнейшем вирус SFTS был выделен от клещей *Rhipicephalus microplus* [1, 12].

Наиболее вероятно, что естественным резервуаром вируса в природе являются клещи, у которых в этом случае происходит вертикальная передача вируса. С учетом возможности распространения клещей данного вида с перелетными птицами не исключено расширение ареала распространения инфекции [13].

Для изучения возможных хозяев вируса SFTS провели исследования сывороток крови домашнего скота в провинции Цзянсу, КНР [14]. При обследовании внешне здоровых животных специфические антитела к данному возбудителю были выявлены у 57% коз, 32% крупного рогатого скота, 5% собак и 1% кур.

В ходе исследований сывороток крови домашних коз в

провинции Шаньдун у 111 (83%) из 134 обследованных с помощью ИФА были выявлены специфические антитела к вирусу SFTS. В то же время только в 2 (0,83%) из 237 сывороток здоровых людей были обнаружены специфические антитела к вирусу SFTS. В обоих случаях специфические антитела были выявлены в сыворотках крови женщин, у которых ранее не было симптомов заболевания [15]. Данный факт свидетельствует о возможности стертой формы SFTS у человека.

Важно отметить, что заболевание SFTS было зарегистрировано не только на территории КНР. Так, имеется описание первого случая заболевания у 57-летнего жителя Корейской Народно-Демократической Республики в марте 2009 г. КНДР граничит с провинцией Ляонин, в которой были выявлены случаи заболевания. Вероятным источником заражения мог послужить укус клеща [16].

Осенью 2012 г. описан первый случай заболевания SFTS в Японии [17]. Женщина в возрасте 59 лет, проживающая в префектуре Ямагути, была госпитализирована с высокой температурой (39,2°C), рвотой и признаками кишечного кровотечения. При осмотре кожных покровов признаков укуса клеща не выявлено. Лабораторные анализы показали наличие тромбоцитопении, лейкопении, повышенные уровни аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ) и креатинкиназы (КК). Спустя 3 сут после госпитализации больная умерла. Вирус SFTS был выделен из сыворотки крови больной путем инфицирования клеток Vero. Идентификация выделенного возбудителя была проведена с помощью ОТ-ПЦР. Филогенетический анализ выделенного возбудителя показал его близкое родство со штаммами вируса SFTS, выделенными в КНР. Не было выявлено влияния пространственных или временных факторов выделения возбудителя на изменение его генома.

В последующем К.Н. Kim и соавт. [7] провели идентификацию вируса SFTS, выделенного от 63-летней женщины, проживавшей в провинции Канвон (Южная Корея). Больная умерла на 10-е сутки после госпитализации от мультиорганной недостаточности. Вирус удалось выделить из пробы крови больной, хранившейся в течение 7 мес при -70 °C, путем инфицирования клеток Vero и DH82. Секвенирование геномной РНК полученного изолята показало его близкое родство со штаммами вируса, выделенными в Китае и затем в Японии. Уровень гомологии по сегментам L, M, S составлял соответственно 95,8–99,8, 94,1–99,9 и 94,8–99,7%.

Важно отметить, что в работе Yu X.J. и соавт. [1] не получено доказательств трансмиссии вируса от больного человека к здоровому. Однако в дальнейшем были получены данные, подтверждающие такую возможность [5, 18–21]. Непосредственной причиной заражения, вероятно, являлись контакты с кровью больных [19–21]. Вероятным условием вторичного заражения, видимо, является высокий уровень вирусемии у первичного больного. Кроме того, не исключена возможность аэрогенного заражения [19].

Патогенез. Размножение вируса SFTS происходит в регионарных лимфатических узлах, затем возбудитель с кровью и лимфой разносится по организму. Выраженная лейкоцитопения и тромбоцитопения на фоне массового выброса цитокинов приводят к явлениям дисфункции внутренних органов (мультиорганная недостаточность), что и является непосредственной причиной гибели заболевших [1, 9, 13, 22, 23].

Таблица 1

Клинические признаки заболевания у больных SFTS [1]

Симптом заболевания	Число (%) заболевших с проявлениями симптома	
	среди всех больных ($n = 81$)	среди погибших больных ($n = 11$)
Лихорадка	81 (100)	11 (100)
Анорексия	61 (75)	7 (64)
Слабость	53 (65)	6 (55)
Тошнота	56 (69)	5 (45)
Боли в брюшной полости	40 (69)	4 (36)
Рвота	38 (47)	4 (36)
Отсутствие аппетита*	32 (46)	7 (64)
Диарея	34 (42)	3 (27)
Лимфаденопатия*	23 (33)	2 (18)
Миалгия	22 (27)	2 (18)
Спутанность сознания	18 (22)	4 (36)
Головная боль	10 (12)	НД
Спазмы в горле	10 (12)	2 (18)
Кашель	8 (10)	2 (18)
Повреждения конъюнктивы	8 (10)	НД
Петехии*	5 (7)	3 (27)
Апатия*	6 (9)	1 (9)
Неразборчивая речь*	4 (6)	1 (9)
Кома*	4 (6)	3 (27)

Примечание. * – проявления данного признака оценивали у 69 больных; НД – нет данных.

Клинические признаки заболевания. Первым из зарегистрированных заболевших был 42-летний фермер, у которого наблюдалась лихорадка (температура от 39,2 до 39,7°C), слабость, поражение конъюнктив, диарея, боли в брюшной полости, лейкоцитопения, тромбоцитопения, протеинурия и гематурия [1].

Проведен анализ клинических признаков заболевания госпитализированных пациентов с диагнозом SFTS [1], результаты которого (табл. 1) свидетельствуют о том, что основные симптомы SFTS являются неспецифическими, т. е. поставить точный диагноз только по клинической картине заболевания не представляется возможным.

Диагностика. Результаты лабораторных исследований госпитализированных больных SFTS приведены в табл. 2 [1].

Результаты оценки биохимических и гематологических показателей в ходе лабораторной диагностики SFTS свидетельствуют о том, что наиболее распространенными отклонениями при лабораторном тестировании являются тромбоцитопения (95%) и лейкоцитопения (86%). В большинстве случаев у больных развивается мультиорганная недостаточность, на что указывают повышенные уровни АЛТ, АСТ, КК и лактатдегидрогеназы. Также часто наблюдали протеинурию (84%) и гематурию (59%). Летальность среди заболевших составила 12% (21 из 171). Эти результаты согласуются с данными, полученными при анализе значений тех же параметров, но на более представительной по численному составу группе (238 больных) [1].

Таблица 2

Оценка биохимических и гематологических показателей в ходе лабораторной диагностики SFTS [1]

Показатель	Доля показателя, n/n (%)		
	норма	повышенный уровень	пониженный уровень
Тромбоциты	4/73 (5)	0/73 (0)	69/73 (95)
Лейкоциты	8/74 (11)	2/74 (3)	64/74 (86)
Нейтрофилы	0/12 (0)	0/12 (0)	12/12 (100)
Лимфоциты	2/12 (17)	0/12 (0)	10/12 (83)
АЛТ	11/64 (17)	53/64 (83)	0/64 (0)
АСТ	4/63 (6)	59/63 (94)	0/63 (0)
Доля альбуминов в глобулинах	11/63 (17)	0/63 (0)	52/63 (83)
Щелочная фосфатаза	39/53 (74)	3/53 (6)	11/53 (21)
Лактатдегидрогеназа	1/51 (2)	49/51 (96)	1/51 (2)
КК	21/49 (43)	25/49 (51)	3/49 (6)
КК, фракция МВ	19/47 (40)	28/47 (60)	0/47 (0)
Время свертывания крови	7/12 (58)	5/12 (42)	0/12 (0)
Протеинурия	7/43 (16)	36/43 (84)	0/43 (0)
Гематурия	19/46 (41)	27/46 (59)	0/46 (0)
Мелена	15/19 (79)	4/19 (21)	0/19 (0)

Также проведено определение зависимости между возрастом заболевших, продолжительностью госпитализации после начала заболевания, патогенетическими признаками SFTS и исходом заболевания. Проанализировано 49 случаев заболевания, из которых 8 с летальным исходом [24]. По всем параметрам были зарегистрированы статистически достоверные различия ($p < 0,05$) между группами с летальным и нелетальным исходом заболевания.

Результаты определения различий в уровнях накопления возбудителя и биохимическими показателями между группами с летальным и нелетальным исходом заболевания (табл. 3) свидетельствуют о том, что по всем сравниваемым показателям различия между группами здоровых людей и нелетальных случаев заболевания, а также нелетальных и летальных случаев заболевания являются статистически достоверными.

В последующем было установлено, что у больных SFTS наблюдали аномально высокие величины цитокинов ИЛ-1RA, ИЛ-6, ИЛ-10, Г-КСФ, IP-10, MCP-1 и сниженные величины цитокинов PDGF-BB и RANTES [23]. После выздоровления эти показатели приходили в норму. В то же время содержание цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-8, MIP-1 α MIP-1 β увеличивалось только у больных, погибших от SFTS, но не у пациентов, заболевание которых закончилось выздоровлением. Сделан вывод о том, что летальные случаи заболевания при SFTS обусловлены высоким уровнем репродукции вируса в организме, вызывающим массовый выброс цитокинов и приводящим к повреждениям внутренних органов. Ранее подобная зависимость установлена при заболевании людей Крымской-Конго геморрагической лихорадкой [6].

Специфическую диагностику проводят с помощью ОТ-ПЦР и/или серологических методов [25].

Уровни накопления возбудителя и биохимические показатели в группах с летальным и нелетальным исходами SFTS [24]

Показатель	Значение показателя для здоровых людей, Me , ($X_{min}-X_{max}$) (группа 1)	Значение показателя для нелетальных случаев, Me , ($X_{min}-X_{max}$) (группа 2)	Значение показателя для группы летальных случаев, Me , ($X_{min}-X_{max}$) (группа 3)	Достоверность различий p между группами 1 и 2, 2 и 3
Вирусемия, геном-эквиваленты РНК/мл, Ig	–	3,1 (2,2–4,3)	5,6 (5,2–7,2)	–/0,001
ИЛ-6, пкг/мл	Не определяется	22,9 (2,8–45,0)	143,8 (80,5–397,8)	0,001/0,001
ИЛ-8, пкг/мл	38,6 (35,1–63,6)	8,3 (2,9–33,5)	80,2 (38,5–198,4)	0,015/0,002
ИЛ-10, пкг/мл	Не определяется	0,3 (0,3–24,9)	86,3 (35,4–121,2)	0,001/0,001
Г-КСФ, пкг/мл	То же	19,9 (3,6–57,2)	98,4 (47,1–248,2)	0,001/0,005
Интерферон γ , пкг/мл	" "	3,7 (3,7–68,2)	331,5 (31,0–479,0)	0,001/0,002
Фибриноген, мг/мл	1,8 (1,4–2,0)	12,1 (6,0–213,6)	298,3 (67,3–371,6)	0,001/0,021
Гепсидин, мкг/мл	120 (59–172)	2617 (525–3649)	3704 (3191–3815)	0,001/0,024
Фосфолипаза A2, нг/мл	154 (126–173)	509 (168–2175)	10886 (839–37443)	0,001/0,005

Примечание. Me , X_{min} , X_{max} – медиана, минимальная и максимальная величина признака; различия статистически достоверны при $p < 0,05$; ИЛ – интерлейкин; Г-КСФ – гранулоцитарный колоннестимулирующий фактор.

По мнению зарубежных специалистов [5], критическими показателями, позволяющими дать прогноз исхода заболевания (как при первичном, так и при вторичных случаях), являются концентрация АЛТ, АСТ, уровень лейкопении, а также выраженность гематурии и протеинурии.

Лечение. Лечение SFTS симптоматическое, направленное на устранение последствий интоксикации и тромбоцитопенического синдрома. Z. Gai и соавт. [19] проанализировали данные о течении заболевания 41 больного, проходившего лечение в госпитале инфекционных заболеваний при университете г. Шаньдун, КНР. У 9 (22%) больных заболевание завершилось летально.

Китайскими специалистами был опробован курс лечения рибавирином (препарат, который является эффективным при лечении заболеваний, вызванных представителями семейства Bunyaviridae, в том числе представителями рода *Phlebovirus* вируса ЛДР) [19]. Однако полученные данные не дают возможность говорить об эффективности рибавирина при лечении SFTS (различия между сравниваемыми группами статистически недостоверны).

Таким образом, анализ доступной информации о заболевании, вызываемом новым флебовирусом SFTS, свидетельствует о том, что оно представляет серьезную потенциальную опасность для здравоохранения РФ. Это обусловлено наличием эпидемических очагов SFTS в сопредельных с Дальневосточным регионом РФ территориях, широким ареалом распространения клещей видов *Haemaphysalis longicornis* и *Rhipicephalus microplus*, являющихся вектором передачи инфекции, высокой летальностью заболевания, сложностью его диагностирования по клинической картине, а также отсутствием средств диагностики, профилактики и лечения.

При диагностике SFTS необходимо обращать внимание на температуру тела выше 38,2°C, симптомы заболевания желудочно-кишечного тракта (тошнота, рвота, боли в брюшной полости, диарея и признаки кишечного кровотечения), тромбоцитопению (концентрацию тромбоцитов менее $100 \cdot 10^9 \cdot \text{л}^{-1}$), лейкопению (концентрацию лейкоцитов менее $4 \cdot 10^9 \cdot \text{л}^{-1}$), повышенные уровни АЛТ, АСТ и лактатдегидрогеназы.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Yu X.J., Liang M.F., Zhang S.Y., Liu Y., Li J.D., Sun Y.L. et al. Fever with thrombocytopenia associated with a novel Bunyavirus in China. *N. Engl. J. Med.* 2011; 364 (16): 1523–32.
2. Xu B., Liu L., Huang X., Ma H., Zhang Y., Du Y. et al. Metagenomic analysis of fever, thrombocytopenia and leucopenia syndrome (FTLS) in Henan province, China: Discovery of a new Bunyavirus. *PLoS Pathogens.* 2011; 7 (11): 1–10.
3. Lam T.T., Liu W., Bowden T.A., Cui N., Zhuang L., Liu K. et al. Evolutionary and molecular analysis of the emergent severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. *Epidemics.* 2013; 5 (1): 1–10.
4. Zhang Y.Z., Zhou D.J., Xiong Y., Chen X.P., He Y.W., Sun Q. et al. Hemorrhagic fever caused by a novel tick-borne Bunyavirus in Huaiyangshan, China. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi.* 2011; 32 (3): 209–20.
5. Chen H., Hu K., Zou J., Xiao J. A cluster of cases of human-to-human transmission caused by severe fever with thrombocytopenia syndrome bunyavirus. *Int. J. Infect. Dis.* 2013; 17 (3): 206–8.
6. Qu B., Qi X., Wu X., Liang M., Li C., Cardona C.J. et al. Suppression of the interferon and NF- κ B responses by severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. *J. Virol.* 2012; 86 (16): 8388–401.
7. Kim K.H., Yi J., Kim G., Choi S.J., Jun K.I., Kim N.H. et al. Severe fever with thrombocytopenia syndrome, South Korea, 2012. *Emerg. Infect. Dis.* 2013; 19 (11): 1892–4.
8. Ding F., Guan X.H., Kang K., Ding S.J., Huang L.Y., Xing X.S. et al. Risk factors for bunyavirus-associated severe fever with thrombocytopenia syndrome, China. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2014; 8 (10): e3267.
9. Ding F., Zhang W., Wang L., Hu W., Soares Magalhaes R.J., Sun H. et al. Epidemiologic features of severe fever with thrombocytopenia syndrome in China, 2011–2012. *Clin. Infect. Dis.* 2015; 56 (11): 1682–3.
10. Xiong W., Feng Z., Matsui T., Foxwell A.R. Risk assessment of human infection with a novel bunyavirus in China. *WPSAR.* 2012; 3 (4): 1–6.
11. Jiang X.L., Wang X.J., Li J.D., Ding S.J., Zhang Q.F., Qu J. et al. Isolation, identification and characterization of SFTS bunyavirus from ticks collected on the surface of domestic animals in China. *Bing Du Xue Bao.* 2012; 28 (3): 252–7. (in Chinese)
12. Zhang Y.Z., Zhou D.J., Qin X.C., Tian J.H., Xiong Y., Wang J.B. et al. The ecology, genetic diversity, and phylogeny of Huaiyangshan virus in China. *J. Virol.* 2012; 86 (5): 2864–8.

13. Lee K.H., Medlock J.M., Heo S.T. Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, and migratory birds. *J. Bacteriol. Virol.* 2013; 43 (4): 235–43.
14. Zhang W.S., Zeng X.Y., Zhou M.H., Jiao Y.J., Wen T., Guo X.L. et al. Seroepidemiology of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in Jiangsu Province. *Disease Surveillance.* 2011; 26: 676–8.
15. Zhao L., Zhai S., Wen H., Cui F., Chi Y., Wang L. et al. Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus, Shandong province, China. *Emerg. Infect. Dis.* 2012; 18 (6): 963–5.
16. Denic S., Janbeih J., Nair S., Conca W., Tarig W.U.Z., Al-Salam S. Acute thrombocytopenia, leucopenia, and multiorgan dysfunction: the first case of SFTS Bunyavirus outside China? *Case Rep. Infect. Dis.* 2011; 2011: 204056.
17. Takahashi T., Maeda K., Suzuki T., Ishido A., Shigeoka T., Tominaga T. et al. The first identification and retrospective study of severe fever with thrombocytopenia syndrome in Japan. *J. Infect. Dis.* 2014; 209 (6): 816–27.
18. Bao C., Guo X., Qi X., Hu J., Zhou M., Varma J.K. et al. A family cluster of infections by a newly recognized bunyavirus in eastern China, 2007: further evidence of person-to-person transmission. *Clin. Infect. Dis.* 2011; 53 (12): 1208–14.
19. Gai Z., Liang M., Zhang Y., Zhang S., Jin C., Wang S.W. et al. Person-to-person transmission of severe fever with thrombocytopenia syndrome bunyavirus through blood contact. *Clin. Infect. Dis.* 2012; 54 (2): 249–52.
20. Liu Y., Li Q., Hu W., Wu J., Wang Y., Mei L. et al. Person-to-person transmission of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2012; 12 (2): 156–60.
21. Tang X., Wu W., Wang H., Du Y., Liu L., Kang K. et al. Human-to-human transmission of severe fever with thrombocytopenia syndrome bunyavirus through contact with infectious blood. *J. Infect. Dis.* 2013; 207 (5): 736–9.
22. Cui F., Cao H., Wang L., Zhang S.F., Ding S.J., Yu X.J. et al. Clinical and epidemiological study on severe fever with thrombocytopenia syndrome in Yiyuan country, Shandong province, China. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2013; 88 (3): 510–2.
23. Sun Y., Jin C., Zhan F., Wang X., Liang M., Zhang Q. et al. Host cytokine storm is associated with disease severity of severe fever with thrombocytopenia syndrome. *J. Infect. Dis.* 2012; 206 (7): 1085–125.
24. Zhang Y.Z., He Y.W., Dai Y.A., Xiong Y., Zheng H., Zhou D.J. et al. Hemorrhagic fever caused by a novel Bunyavirus in China: pathogenesis and correlates of fatal outcome. *Clin. Inf. Dis.* 2012; 54 (4): 527–33.
25. The Korea Centers for Disease Control and Prevention. Prevention of severe fever with thrombocytopenia syndrome. (in Korean) Available at: <http://www.cdc.go.kr/CDC/notice/CdcKrIntro0201.jsp?menuId=HOME001>

Поступила 10.06.16

Принята в печать 11.10.16

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© ЖИРНОВ О.П., 2017
УДК 578.831.1:578.23].083.2

Жирнов О.П.

АКТИВАЦИЯ ПАРАМИКСОВИРУСОВ ПРОТЕАЗАМИ В КУЛЬТУРАХ НОРМАЛЬНЫХ И РАКОВЫХ КЛЕТОК

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

Изучали размножение парамиксовирусов Сендай и болезни Ньюкасла (ВБН) в культурах нормальных и раковых клеток. В культуре клеток почки собаки MDCK и ее дериватов с тетрациклинрегулируемой экспрессией трансмембранных протеаз HAT и TMPRSS2 наблюдалось образование неинфекционных вирионов с нерасщепленным белком F0. Тетрациклиновая индукция протеаз HAT и TMPRSS2 в инфицированных клетках приводила к протеолизу F0 → F1 + F2 и образованию высокоинфекционного вируса. При расщеплении протеазой HAT, помимо F0 (м. м. 65 кД), F1 (50 кД) и F2 (15 кД), у вируса Сендай выявлялся дополнительный фрагмент F3 с м. м. 38 кД, что указывало на наличие второго сайта расщепления в молекуле F1, чувствительного к протеазе HAT. При размножении вируса Сендай и ВБН в культуре раковых клеток Сасо-2 и H1299 синтезировался инфекционный вирус, содержащий часть молекул в расщепленной форме F1 + F2. В культуре H1299 в вирусе Сендай наряду с F0, F1 и F2 обнаруживался также фрагмент 38К. Количество расщепленного белка F1 + F2 и инфекционного вируса в раковых культурах Сасо-2 и H1299 значительно возрастало на поздних сроках инфекции, что указывало на индукцию клеточных вирусактивирующих протеаз в раковых клетках при вирусной инфекции. ВБН вызывал значительно более быструю гибель раковых клеток Сасо-2 по сравнению с вирусом Сендай. Полученные данные показывают, что раковые клетки в отличие от нормальных клеток могут синтезировать протеазы, активирующие инфекционность парамиксовирусов, и по этой причине они становятся более уязвимыми для парамиксовирусной инфекции по сравнению с нормальными клетками.

Ключевые слова: парамиксовирусы; протеолитическая активация; протеазы; HAT; TMPRSS2; апоптоз; клеточный лизис; вирусные онколитики.

Для цитирования: Жирнов О.П. Активация парамиксовирусов протеазами в культурах нормальных и раковых клеток. *Вопросы вирусологии.* 2017; 62 (2): 65–72.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-2-65-72>

Для корреспонденции: Жирнов Олег Петрович, д-р биол. наук, профессор, зав. лаб. вирусного патогенеза Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва. E-mail: zhirnov@inbox.ru

Zhironov O.P.

PARAMYXOVIRUSES ACTIVATION BY HOST PROTEASES IN CULTURES OF NORMAL AND CANCER CELLS

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

Multiplication of paramyxovirus Sendai and Newcastle disease virus (NDV) was studied in cultures of normal and tumor cells. Production of noninfectious virus with uncleaved F0 was observed in canine kidney cell line MDCK (line H) and its derivatives carrying tetracycline-regulated expression of transmembrane protease HAT or TMPRSS2 with trypsin-like cleavage specificity. Under tetracycline induction, a cleavage F0 (65 kD)→F1 (50 kD)+F2(15 kD) and production of infectious virus were observed in these cell cultures. Under tetracycline induction, the additional subunit 38K (m.w. 38 kDa) of the F protein was detected both in infected MDCK-HAT cells and in newly synthesized Sendai virus in addition to F0, F1 and F2, indicating thereby a second HAT-sensitive proteolytic site in the F0 molecule. Highly infectious virus containing cleaved F1+F2 was produced in cultures of cancer cells Caco-2 and H1299. Virus Sendai synthesized in H1299 cells contained 38 K subunit indicating a cleavage of the F0 at a second site by H1299 host cell proteases. Levels of cleaved F1+F2 and infectious virions were higher at the late stage of infection in cancer cells, suggesting thus the induction of virus-activating proteases in Caco-2 and H1299 cells under infection with paramyxoviruses. NDV virus was found to induce more rapid death of cancer cells Caco-2 than Sendai virus. Cooperatively, the obtained data show that cancer cells in distinction to nonmalignant cells can synthesize protease(s) activating infectivity of paramyxoviruses. Thus, they are more vulnerable to paramyxovirus infection than normal cells.

Key words: paramyxoviruses; proteolytic activation; proteases; HAT; TMPRSS2; apoptosis; cell lysis; viral oncolytics.

For citation: Zhironov O.P. Paramyxoviruses activation by host proteases in cultures of normal and cancer cells. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2017; 62(2): 65-72. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-2-65-72>

For correspondence: Oleg P. Zhironov, Dr. Biol. Sci., Professor, Head of the Laboratory of Viral Pathogenesis, D.I. Ivanovsky Institute of Virology, Federal State Budgetary Institution «Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation. E-mail: zhironov@inbox.ru

Acknowledgements. This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (Grants Nos. 17-04-01726 and 17-04-01934). The study of the apoptosis of malignant cells was supported by the Russian Science Foundation and the German Research Foundation (DFG) (Collaboration project No. 18-44-04028). The study of the paramyxovirus reproduction was supported by the Russian Science Foundation (Grant No. №14-15-01073).

The author is grateful to E. Böttcher-Friebertshäuser and Prof. H. D. Klenk (Institute of Virology, Philipps University, Marburg, Germany) for the MDCK cell cultures used for HAT and TMPRSS2 protease expression. The author is grateful to Prof. P.M. Chumakov (V.A. Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia) and Prof. S. Ludwig (Institute of Molecular Virology, Münster, Germany) for helpful discussion.

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

Received 07 July 2016

Accepted 11 October 2016

Введение

Парамиксовирусы относятся к оболочечным вирусам, содержащим одноцепочечную РНК негативной полярности. В вирусном геноме закодировано 6 основных генов: NP – P – M – F – HN – L, которые экспрессируются один за другим по механизму старт – стоп с образованием соответствующих 6 основных структурных полипептидов [1]. В гене P закодированы дополнительные уникальные антиинтерфероновые белки V и С, которые образуются по механизму сдвига рамки трансляции вирусной мРНК [2, 3]. Известно, что белок F, выполняющий функцию слияния вирусной и клеточной мембраны, претерпевает точечное разрезание клеточными протеазами на 2 фрагмента F1 и F2. У различных штаммов парамиксовирусов участок расщепления F0 имеет либо единственный остаток Arg↓, либо полиаргининовый сайт с мотивом Arg – X – Arg/Lys – Arg↓, который расщепляется протеазами трипсинового и фуринового типа соответственно [4, 5]. Протеолитическое разрезание активирует сливающую функцию белка F и повышает способность вируса заражать клетки-мишени [4–6].

В инфицированных клетках вновь синтезированные вирусные белки формируют вирусное потомство и затем индуцируют цитопатогенное действие, которое приводит к отсроченной гибели клеток после завершения репродукции вируса. В последние годы наблюдается повышенный интерес к изучению механизмов вирусной

гибели клеток, что связано с развитием нового направления в химиотерапии раковых опухолей с помощью вирусов – так называемых вирусных онколитиков [7–9]. Одними из наиболее перспективных кандидатов на роль онколитического агента рассматриваются парамиксовирус Сендай и вирус болезни Ньюкасла (ВБН), которые имеют высокую тропность к инфекциям клеток человека и высокий литический потенциал [10].

Механизмы размножения вируса и гибели клеток имеют двоякую зависимость как от свойств вируса, так и от природы клеток. В частности, вызывает интерес изучение регуляции протеолитической активации вируса клеточными протеазами в нормальных и раковых клетках. В этом сравнении важное значение приобретает тот факт, что раковые клетки имеют дефекты в системе интерферона, что делает их наиболее уязвимыми для вирусов. С другой стороны, возникает вопрос, какие свойства вируса и какие вирусные белки вовлечены в регуляцию размножения вирусов различных семейств в процессе лизиса клеток.

В настоящей работе изучали размножение парамиксовирусов Сендай и ВБН в клеточных культурах, которые различались уровнем экспрессии протеаз, способных расщеплять вирусный белок слияния F0 (м. м. 68 кД) → F1 (50 кД) + F2 (15 кД) и активировать инфекционность вируса. Сравнивали зависимость механизма гибели клеток от интенсивности разрезания белка F0 →

F1 в клетках различного происхождения. Оказалось, что интенсивность разрезания вирусного белка F0 → F1 значительно усилена в опухолевых клетках и это коррелирует с повышением продукции инфекционного вируса и усилением вирусиндуцированного клеточного слияния и формирования гигантских симпластов на поздних сроках инфекции. Таким образом, полученные данные указывают на то, что раковые клетки более уязвимы для парамиксовирусной инфекции по сравнению с нормальными клетками.

Материал и методы

Клетки. Культуры эпителиальных клеток MDCK-N (эпителиальная линия почки собаки MDCK-N), Caco-2 (линия аденокарциномы толстого кишечника), H1299 (эпителиальная линия легочной карциномы) культивировали в минимальной среде Дульбеко (DMEM) с добавлением 10% фетальной сыворотки коров («Gibco BRL») и антибиотиков гентамицина (25 мкг/мл), пенициллина (50 Ед/мл), стрептомицина (50 мкг/мл) [11]. Культуру клеток MDCK-N, содержащую интегрированный ген протеазы human airway trypsin (HAT) (MDCK-HAT) либо ген протеазы transmembrane protease serin S2 (TMPRSS2) (MDCK-SS2) под тетрациклинрегулируемым промотором, культивировали в среде DMEM, содержащей 10% фетальной сыворотки коров, или с добавлением в среду 0,5 мкг/мл доксициклина для индукции соответствующих протеаз [12]. Все клеточные линии получены из коллекции клеточных культур Института вирусологии Марбурга (Германия).

Вирусы. Вирус Сендай (штамм 960/Z) и ВБН (штамм LaSota) размножали в аллантаисной полости 10-дневных безлейкозных куриных эмбрионов в течение 72 ч при 36°C при множественности заражения около 10⁴ фокусобразующих единиц (ФОЕ) на эмбрион. Вирусосодержащую аллантаисную жидкость эмбрионов отбирали, аликвотили и хранили при -80°C.

Определение инфекционности вируса методом вирусных фокусов в клеточной культуре. 2-дневную культуру клеток MDCK-N инкубировали в течение 1 ч при 37°C с разведениями исследуемых вирусов, приготовленными на среде DMEM. Через 7–8 ч клеточные культуры фиксировали 4% параформальдегидом и последовательно инкубировали с антителами, специфичными для вируса Сендай или ВБН и антивидовым конъюгатом пероксидазы хрена. Единичные инфицированные клетки (вирусные центры) окрашивали тетраметилбензидиновым субстратом «True Blue» (KPL). Центры инфекции (ЦОЕ – центробразующие единицы) подсчитывали на 1 мл исследуемой суспензии в световом микроскопе при 75-кратном увеличении [13].

Анализ апоптозного профиля хроматиновой ДНК. Осадки клеток суспендировали в 50 мкл фосфатного буфера (ФБ) и смешивали с 250 мкл буфера, содержащего 0,6% додецилсульфата натрия (ДСН), 10 мМ ЭДТА и 15 мМ Трис-НСl (рН 8,0), к полученной суспензии добавляли 70 мкл 5 М NaCl. Полученную смесь оставляли на ночь при 4°C и центрифугировали при 14 000 об/мин в течение 20 мин для удаления агломератов хроматина. Супернатант последовательно обрабатывали РНКазой А (0,1 мг/мл) и протеиназой К (0,5 мг/мл) при 37°C по 30 мин каждой. Суспензию смешивали с тремя объемами 96% этанола, инкубировали при -20°C в течение 2 ч, сформированные преципитаты ДНК осаждали при 14 000 об/мин 20 мин, растворяли в 10 мМ Трис-НСl (рН

8,0) и анализировали в 1% агарозном геле, как описано ранее [14].

Электрофорез в полиакриламидном геле и вестерн-блот-анализ (ВБ). Полипептиды зараженных клеток фракционировали в полиакриламидном геле (ПААГ), содержащем ДСН, и из геля белки переносили на нитроцеллюлозную бумагу Protran 0,45 мк («Schleicher & Schull») полусухим методом [15]. Мембрану промывали в ФБ, инкубировали 2 ч в 3% обезжиренном молоке и далее в течение 2 ч в ФБ, содержащем 0,5% бычьего сывороточного альбумина («Sigma») и специфические антивирусные антитела. В работе использовали антитела к очищенному белку F0 вируса Сендай и ВБН, цыплячьую сыворотку против цельного ВБН («Нарвак», Россия). Затем мембрану промывали ФБ и обрабатывали видоспецифическим конъюгатом пероксидазы хрена («Dako») с последующей усиленной идентификацией позитивных компонентов с помощью усиленной хемилюминесценции (ECL) с суперсубстратом («Pierce») [14].

Электрофорез в полиакриламидном геле и окраска гелей. Полипептиды вирусных проб фракционировали в ПААГ и после электрофореза гели фиксировали в растворе, содержащем смесь этанола, уксусной кислоты и воды в соотношении 5:1:5 по объему. После фиксации гели окрашивали Кумаси голубым G-350 и несвязавшуюся краску отмывали раствором, содержащим 5 и 7% этанола и уксусной кислоты соответственно [16, 17].

Результаты

В первой части работы исследовали протеолиз вирусного белка F0 → F1 и уровень продукции инфекционного вируса при размножении вируса Сендай и штамма LaSota ВБН в к MDCK (линия Н) и ее производных линиях, содержащих гены трансмембранных протеаз HAT и TMPRSS2 под контролем тетрациклинового промотора [12], а также 2 линии раковых клеток человека Caco-2 (линия эпителиальных клеток аденокарциномы кишечника человека) и H1299 (линия эпителиальных клеток карциномы респираторного тракта человека). Как видно на рис. 1, вирус Сендай, выращенный в клетках MDCK-SS2 (см. рис. 1, а) и MDCK-HAT (см. рис. 1, б) без индукции доксициклином, содержал нерасщепленный белок F0 (м. м. 60 кД). Такой вирус имел низкую инфекционность, которая заметно возрастала в 1000 раз и более после обработки трипсином (табл. 1). Аналогичные данные получены с вирусом Сендай в культуре клеток MDCK-N (не показано). При размножении вируса в культурах клеток MDCK-HAT и MDCK-SS2 в присутствии доксициклина, индуцирующего синтез протеаз HAT и TMPRSS2, вирусное потомство имело расщепленный белок F1 (м. м. 50 кД) (см. рис. 1, а, б; дорожки 2 и 4). Количественная оценка, выполненная на основании сканирования гелей, показала, что около 40–70% белка F0 в вирусе, синтезируемом в клетках с доксициклином, переходило в расщепленную форму F1. Такой вирус имел высокую инфекционность, которая не возрастала после обработки трипсином (см. табл. 1).

В вирусе Сендай, продуцируемом в клетках MDCK-HAT при индукции протеазы HAT, помимо F0 (м. м. 65 кД) и F1 (50 кД) выявлялся дополнительный фрагмент 38К с м. м. 38 кД (см. рис. 1, б; дорожки 2, 4). Для доказательства того, что фрагмент 38К является продуктом белка F, проводили вестерн-блот-анализ с применением анти-F-антител. Как видно на рис. 2, фрагмент 38К реагировал с анти-F-антителами наряду с F0- и F1-белками,

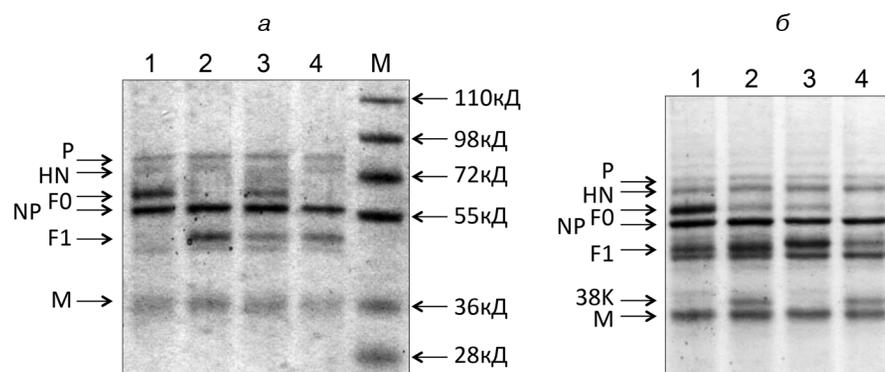


Рис. 1. Белковый профиль вируса Сендай, выращенного в клеточных культурах.

Культуру клеток MDCK-SS2 (а) и MDCK-HAT (б) инкубировали в среде без (дорожки 1, 2) и с доксициклином (3, 4), заражали вирусом Сендай и через 20 ч после заражения собирали культуральную жидкость. Образцы культуральной жидкости делили на 2 части, одну из которых не обрабатывали (1, 3), а вторую обрабатывали трипсином (2, 4) и выделяли вирус. Белки вируса анализировали с помощью электрофореза в ПААГ с последующей окраской геля Кумаси голубым R-350. Здесь и на рис. 3: справа показана дорожка с маркерами (М), м. м. указана справа в килодальтонах (кД).

что доказывало его происхождение из белка F0. Эти данные подтверждают наличие второго сайта расщепления в молекуле F1, чувствительного к протеазе НАТ.

38К-фрагмент, как следует из рис. 1, б, и 2, выявлялся в составе вируса, указывая на сохранение его связи с молекулой F1 в вирусной частице.

При изучении размножения ВБН в клетках MDCK получены сходные данные (табл. 2). Без индукции доксициклином в клетках MDCK-SS2 и MDCK-HAT синтезировался вирус с низкой инфекционностью, которая возрастала более чем в 100 раз после обработки трипсином. При размножении ВБН в культурах MDCK-SS2 и MDCK-HAT в присутствии доксициклина синтезировался высокоинфекционный ВБН, который после обработки трипсином практически не увеличивал свою инфекционную активность.

В культуре опухолевых клеток Сасо-2 и Н1299 синтезировался высокоинфекционный вирус Сендай, содержащий белок F0 наряду с F1. При этом было установлено, что содержание F1 возрастало в вирусе на поздних сроках инфекции (20–42 ч после заражения) по сравнению с вирусом на ранних сроках инфекции (3–20 ч после заражения) (рис. 3). Это наблюдалось как в культуре клеток Н1299, так и в культуре Сасо-2 (не показано).

Таблица 1
Инфекционная активность вируса Сендай при размножении в клеточных культурах MDCK

Культура клеток	Обработка клеток доксициклином	Инфекционность, ФОЕ/мл*	
		без обработки трипсином	с предобработкой трипсином
MDCK-H	-	$1,6 \pm 0,3 \cdot 10^3$	$3,2 \pm 0,4 \cdot 10^7$
	+	$2,1 \pm 0,3 \cdot 10^7$	$3,3 \pm 0,6 \cdot 10^7$
MDCK-HAT	-	$1,4 \pm 0,3 \cdot 10^3$	$4,3 \pm 0,6 \cdot 10^6$
	+	$1,7 \pm 0,4 \cdot 10^6$	$2,3 \pm 0,6 \cdot 10^6$
MDCK-SS2	-	$1,4 \pm 0,3 \cdot 10^2$	$4,3 \pm 0,6 \cdot 10^5$
	+	$1,5 \pm 0,4 \cdot 10^6$	$2,3 \pm 0,6 \cdot 10^6$

Примечание. * – Культуры клеток почки собаки заражали вирусом Сендай с множественностью около 1 ФОЕ на клетку. Культуральную жидкость в клетках отбирали через 28 ч после заражения и определяли инфекционность вируса методом фокусов в культуре клеток MDCK-H с предварительной обработкой трипсином и без нее, как описано в разделе «Материал и методы».

Таблица 2
Инфекционная активность вируса Сендай при размножении в культуре раковых клеток

Культура клеток	Период вирусного сбора, ч после заражения	Инфекционность, ФОЕ/мл*	
		без обработки трипсином	с предобработкой трипсином
Сасо-2	3–36	$1,6 \pm 0,3 \cdot 10^5$	$3,2 \pm 0,4 \cdot 10^6$
	36–72	$2,1 \pm 0,3 \cdot 10^7$	$3,3 \pm 0,6 \cdot 10^7$
Н1299	3–22	$1,2 \pm 0,3 \cdot 10^4$	$4,3 \pm 0,6 \cdot 10^6$
	22–45	$1,3 \pm 0,4 \cdot 10^5$	$2,3 \pm 0,6 \cdot 10^6$

Примечание. * – Культуру клеток заражали вирусом Сендай с множественностью около 1 ФОЕ на клетку. Культуральную жидкость в клетках Сасо-2 и Н1299 отбирали через 22 и 36 ч после заражения соответственно, определяли инфекционность вируса методом фокусов в культуре клеток MDCK с предварительной обработкой трипсином и без нее, как описано в разделе «Материал и методы».

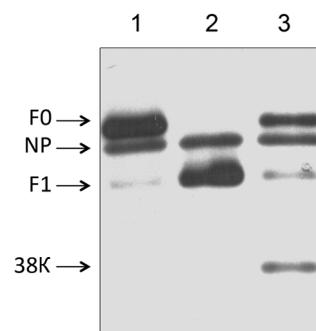


Рис. 2. Вестерн-блот-анализ белкового профиля вируса Сендай с анти-F-антителами.

Вирус Сендай выращивали в культуре клеток MDCK-HAT без индукции (дорожка 1) и с индукцией тетрациклином (3) синтеза протеазы НАТ. Вирус из культуральной жидкости подвергали электрофорезу и последующей идентификации белка F методом ВБ с использованием специфических антител к белку F. Дорожка 2 – вирус, продуцируемый в культуре без индукции тетрациклином и обработанный трипсином.

Таблица 3

Инфекционная активность ВБН при размножении в культурах нормальных и раковых клеток

Культура клеток	Культивирование клеток с доксициклином	Инфекционность, ФОЕ/мл*	
		без обработки трипсином	с предобработкой трипсином
MDCK-H	-	1,6±0,3·10 ³	3,2±0,4·10 ⁷
MDCK-NAT	-	1,4±0,3·10 ³	4,3±0,6·10 ⁶
	+	1,7±0,4·10 ⁶	2,3±0,6·10 ⁶
Caco-2	-	1,7±0,5·10 ⁵	3,4±0,4·10 ⁶
H1299	-	1,5±0,2·10 ⁴	4,3±0,5·10 ⁵

Примечание. Культуры нормальных немалигнизированных (MDCK) и раковых (H1299 и Caco-2) клеток заражали ВБН (ЛаСота) с множественностью около 1 ФОЕ на клетку. Культуру клеток инкубировали с доксициклином и без него. Культуральную жидкость в клетках отбирали через 25 ч после заражения и определяли инфекционность вируса методом фокусов в культуре клеток MDCK-H с предварительной обработкой трипсином и без нее, как описано в разделе «Материал и методы».

Параллельно с увеличением содержания F1 в вирусе на поздних сроках инфекции возрастала инфекционность такого вируса (табл. 3). Из этого следует, что инфекция парамиксовирусом Сендай опухолевых клеток приводила к индукции эндогенных протеаз, участвующих в расщеплении белка F0 → F1, и усилению инфекционности *de novo* синтезируемого вируса.

В следующей части изучали гибель клеток при инфекции вирусом Сендай и ВБН. При морфологическом исследовании с помощью светового микроскопа в культуре клеток MDCK-H выявляли типичные признаки апоптоза в виде сморщенных клеток и характерных апоптотных фрагментов (апоптотных телец), напоминающих гроздь клеточных фрагментов (рис. 4; показаны стрелкой). В культуре клеток MDCK-NAT и MDCK-SS2, инфицированных в присутствии тетрациклина, выявлялись сходные изменения с той разницей, что обнаруживались гигантские многоядерные клетки (рис. 5; показано

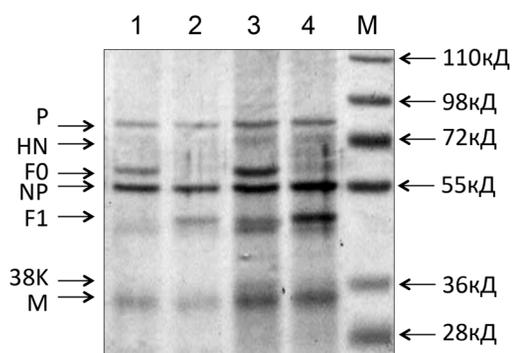


Рис. 3. Белковый профиль вируса Сендай, выращенного в культуре H1299.

Культуру раковых клеток легкого человека H1299 заражали вирусом Сендай и далее инкубировали в среде DMEM без сыворотки. Среду меняли через 20 и 40 ч после заражения, образцы культуральной жидкости, собранной через 20 ч (дорожки 1, 2) и 40 ч (3, 4) после заражения, делили на 2 части, одну из которых не обрабатывали (1, 3), а вторую обрабатывали трипсином (2, 4). Из культуральной жидкости выделяли вирус, и белки анализировали с помощью электрофореза в ПААГ с последующей окраской геля Кумаси голубым R-350.

стрелкой), представляющие собой слившиеся соседние клетки (так называемые симпласты). Появление симпластов обусловлено протеолизом и активацией F0→F1, который вызывал слияние плазматических мембран и объединение соседних клеток. Активирующий протеолиз белка F0 – F1 + F2 происходил под действием индуцируемой протеазы NAT или TMRSS2. В отсутствие доксициклина образования клеточных симпластов в культурах, зараженных вирусом Сендай и ВБН, не обнаруживалось.

В культурах опухолевых клеток выявлялись вирусзависимые вариации клеточной гибели при заражении вирусами. Во-первых, в культуре Caco-2 значительно более быстрое и сильное цитодеструктивное действие развивалось при инфекции ВБН в сравнении с вирусом Сендай. Явные признаки гибели при заражении ВБН появлялись уже к 20 ч после заражения, тогда как при инфекции вирусом Сендай даже через 120 ч не обнаруживалось заметного цитопатического действия (ЦПД) в культуре инфицированных клеток и сохранялась продукция вируса (см. рис. 4). Во-вторых, оба вируса вызывали образование многоядерных симпластов в клеточной культуре Caco-2, что коррелировало с расщеплением вирусного белка F0 → F1 в этой культуре (рис. 5, б). В-третьих, в зараженных клетках Caco-2 не обнаруживалось формирование апоптотной ДНК-лестницы на поздних сроках инфекции как вирусом Сендай, так и ВБН, что указыва-

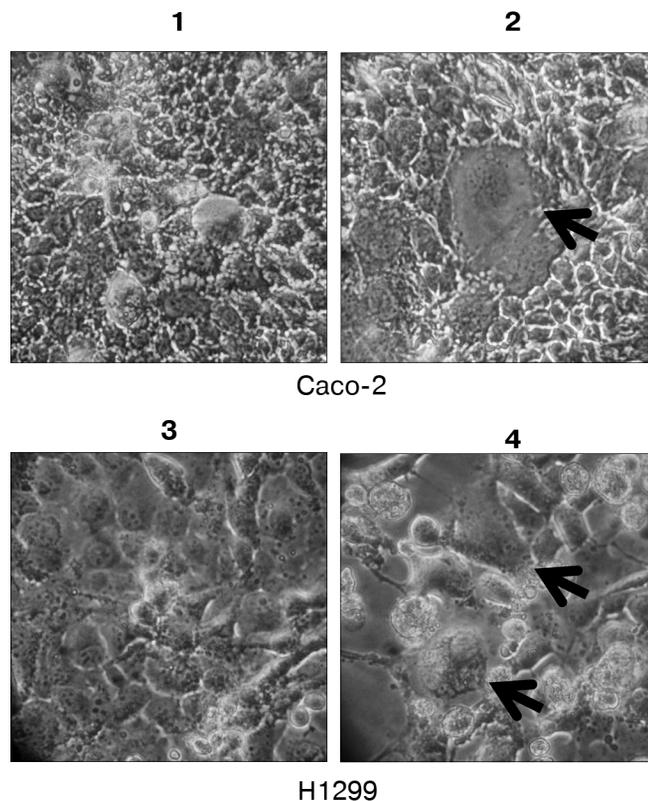


Рис. 4. Образование симпластов в культурах клеток H1299 и Caco-2 под действием вируса Сендай.

Культуру раковых клеток кишечника Caco-2 (1, 2) и легкого H1299 (3, 4) человека заражали вирусом Сендай и далее инкубировали в среде DMEM без сыворотки. Незараженные (1, 3) и зараженные через 25 ч (2; Caco-2) и 48 ч (4; H1299) клеточные культуры фотографировали в световом микроскопе в видимом свете при ув. 250.

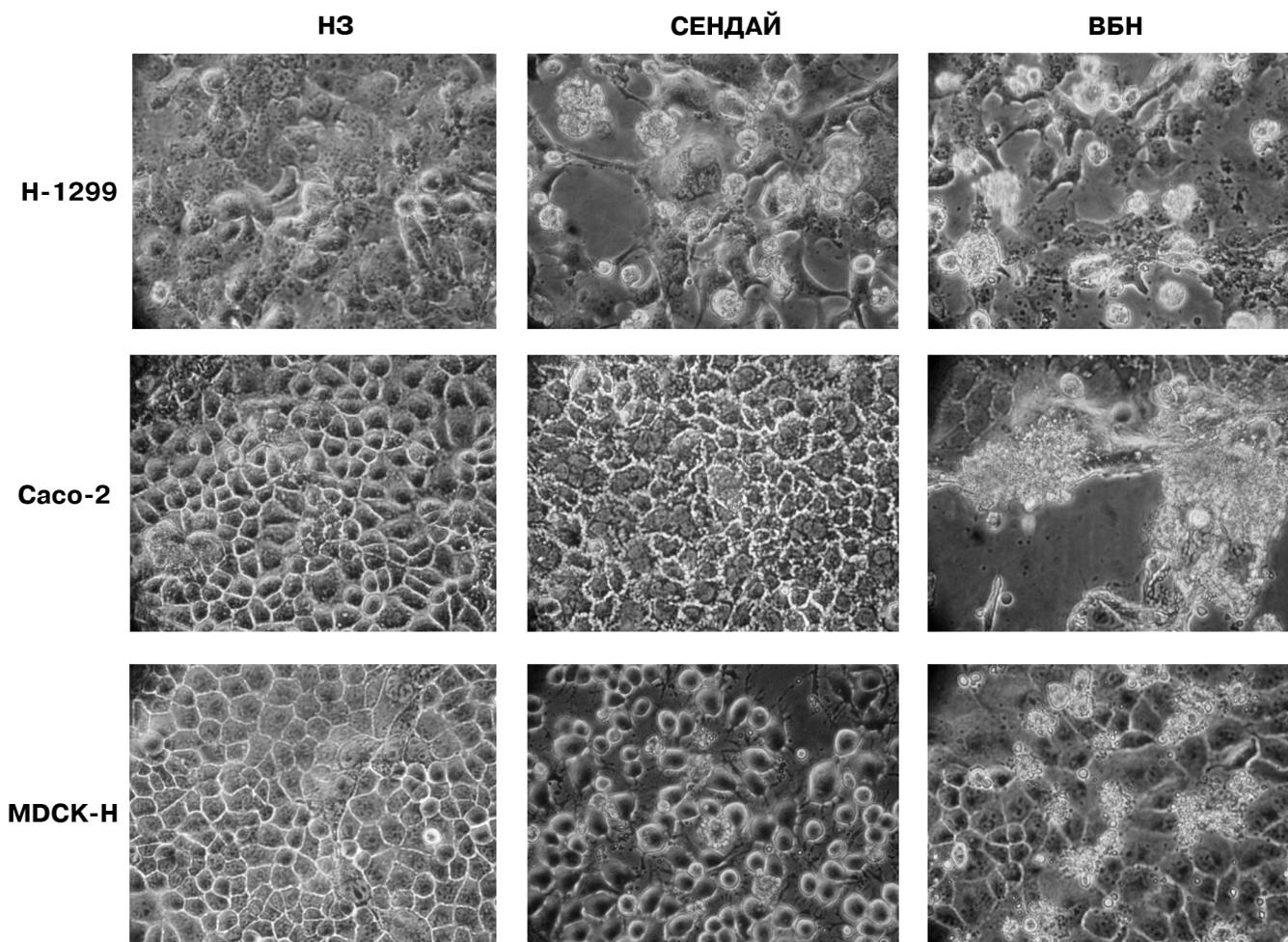


Рис. 5. Цитодеструктивное действие вируса Сендай и ВБН в культурах немалигнизированных и раковых клеток. Культуры немалигнизированных (MDCK) и раковых (H-1299 и Caco-2) клеток заражали вирусом Сендай или ВБН с множественностью около 1 БОЕ на клетку. Через 27 ч после заражения клетки исследовали в световом микроскопе и фотографировали при ув. 250.

ло на некротический тип гибели клеток (рис. 6, дорожки 1–4). В-четвертых, при инфекции раковых клеток H1299 вирусом Сендай и ВБН выявлялись явные отличия признаков гибели от наблюдаемых в культуре Caco-2, поскольку обнаруживалась ступенчатая деградация хромосомной ДНК, указывающая на апоптозный механизм гибели опухолевых клеток под действием как вируса Сендай, так и ВБН (рис. 6; дорожки 6, 7). В-пятых, в отличие от клеток Caco-2 интенсивность и скорость гибели клеток H1299 были сходные при заражении вирусом Сендай и ВБН, при этом явные признаки апоптоза в обоих случаях развивалось уже к 20-му часу после заражения (рис. 5). Эти данные указывают на то, что механизм и интенсивность гибели клеток могут зависеть как от вируса, так и от типа опухолевых клеток.

Обсуждение

Известно, что для парамиксовирусов характерен феномен активации инфекционности вириона, реализуемый посредством точечного протеолитического расщепления поверхностного гликопротеида F0 (м. м. ~ 65 кД) на 2 фрагмента – F1 (50 кД) и F2 (15 кД). Такое расщепление происходит после остатка Арг в определенном участке (протеолитическом сайте) молекулы F0 после остатка

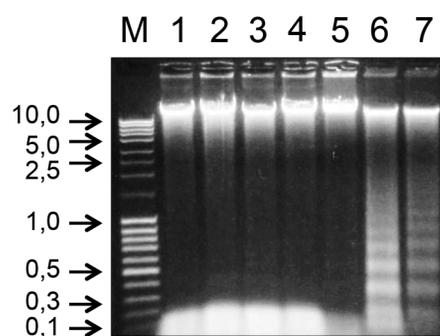


Рис. 6. Профиль клеточной ДНК в клетках Caco-2 и H1299, инфицированных вирусом Сендай и ВБН.

Культуру клеток Caco-2 инфицировали вирусом Сендай (дорожки 2, 3) и ВБН (4) и инкубировали 45 ч (2, 4) и 98 (3) после заражения. Незараженные клетки инкубировали параллельно (1). Клетки H1299 заражали вирусом Сендай (8) и ВБН (9) и инкубировали в течение 45 ч после заражения. Дорожка 5 – незараженные клетки H1299. Из клеток выделяли ДНК и фракционировали с помощью электрофореза в 1% агарозном геле. Дорожка 1 – маркерные ДНК с м. м. 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2,5, 2, 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1 тыс. пар оснований соответственно (показано стрелками слева).

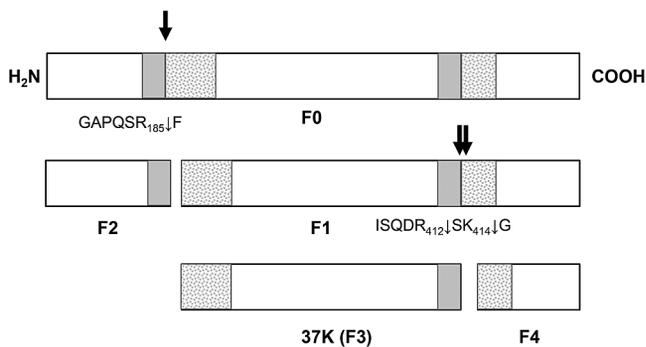


Рис. 7. Схема двухступенчатого протеолиза белка F0 вируса Сендай.

Показана локализация доменов в белке F0 вируса Сендай. Стрелками указаны участки предполагаемого расщепления трипсиноподобной протеазой НАТ. Серым цветом заштрихованы участки распознавания протеазой в протеолитическом сайте F0 при расщеплении на субъединицы F1, F2 и F3, F4; снизу приведены последовательности аминокислот в сайте расщепления (протеолитическом сайте). Гидрофобные участки (так называемые фузионные пептиды) заштрихованы точками.

Арг [4–6]. Существуют 2 типа протеолитического сайта: с единственным остатком Арг (моноаргининовый сайт) и с двумя и более остатками Арг (полиаргининовый сайт) [6]. Для первой группы штаммов активирующими протеазами служат протеазы трипсиновой специфичности, так называемые трипсиноподобные протеазы, тогда как для второй группы роль активирующих протеаз выполняют фурин, кексин, РЕХ6 и подобные протеазы [4–6].

Вирус Сендай и ВБН (штамм ЛаСота) имеют белок F0 с моноаргининовым сайтом разрезания. Расщепление такого участка может происходить под действием трипсина или протеаз со сходной специфичностью. В настоящей работе установлено, что трансмембранные протеазы НАТ и TMPRSS2 обладают способностью расщеплять белок F0 вируса Сендай и ВБН/ЛаСота и активировать его симпластообразующую функцию и инфекционность вирионов. Протеазы НАТ и TMPRSS2 относятся к классу сериновых трансмембранных протеаз типа I, расщепляющих белки-субстраты преимущественно по остатку Арг [18, 19]. Эти протеазы являются гликопротеидами, которые синтезируются в клетках на мембранах и транспортируются на клеточную поверхность, как и вирусный гликопротеид F0. В ходе совместного транспорта протеазы НАТ и TMPRSS2 претерпевают собственный точечный протеолиз для своей активации и после этого способны расщеплять F0 → F1 + F2 на этапе транспорта к плазматической мембране или на ее поверхности.

Важная особенность протеолиза F0 обнаружена в опухолевых клетках H1299 и Сасо-2, которая заключалась в его заметном усилении в клетках на поздних сроках инфекции. Следует подчеркнуть, что протеолиз F0 и активация вируса Сендай и ВБН не развивались в немалигнизированных (нормальных) клеточных линиях, таких как MDCK и CV1. Эти наблюдения говорят о том, что инфекция парамиксовирусами опухолевых клеток приводит к индукции протеаз, способных расщеплять белок F0. В результате такой индукции клеточных протеаз вирус стимулирует собственную активацию инфекционности и симпластообразования и способствует распространению вирусной инфекции в раковых клеточных культурах.

В настоящей работе обнаружено, что протеаза НАТ способна расщеплять белок F0 вируса Сендай не только в каноническом сайте, но и в дополнительном участке, что приводит к образованию нового фрагмента F3 с м. м. около 37К (м.м. 37 кД). Этот вывод подтверждается наблюдениями о сходном расщеплении F0 в клетках MDCK-НАТ при индукции протеазы НАТ, но не в клетках, экспрессирующих TMPRSS2. Рассмотрение первичной структуры гена F0 свидетельствует о том, что таким дополнительным протеолитическим сайтом может служить остаток R (Arg)-412 или K (Lys)-414 в участке SQDR↓SK↓G, имеющем сходство с каноническим сайтом расщепления Arg-185 в участке APQSR↓F. Пока не ясно, имеет ли такое расщепление функциональное значение, например для усиления фузионной функции белка F за счет второго N-концевого пептида, возникающего в субъединице F3 и состоящего из гидрофобных аминокислот (рис. 7). В этом случае вирус Сендай может обладать двумя доменами слияния в субъединицах F1 и 37K (F3) и иметь повышенную способность к образованию клеточных симпластов в различных тканях, включая раковые ткани, характеризующиеся повышенным уровнем протеазы НАТ. Примечательно, что расщепление во втором сайте F1 → F3 + F4 наблюдалось в раковых клетках Сасо-2. Из этого вытекает предположение о том, что в этой линии опухолевых клеток экспрессируется протеаза НАТ (или ее аналоги), вызывающая двухступенчатое расщепление белка F вируса Сендай, F0 → F1 + F2 и F1 → F3 + F4. Важно отметить, что протеолиз F0 и активация вируса Сендай не наблюдались в нетуморогенных (нормальных) клеточных линиях, таких как MDCK и CV1.

Результаты настоящей работы указывают на вариабельность механизмов клеточной гибели, индуцированной вирусом Сендай и ВБН (ЛаСота) в различных клеточных системах. Использованные вирусы Сендай и ВБН вызывали гибель нормальных (немалигнизированных) клеток CV1 и MDCK с явными признаками апоптоза и ступенчатой деградацией хроматиновой ДНК (так называемой ДНК-лестницей). В раковых клетках Сасо-2 и H1299 вирусное цитодеструктивное действие кардинально различалось. Во-первых, гибель одних раковых клеток, таких как Сасо-2, не имела характерного апоптозного профиля деградации хроматиновой ДНК, тогда как в других раковых клетках типа H1299 гибель сопровождалась признаками апоптоза. Во-вторых, вирус Сендай и ВБН вызывали гибель раковых клеток с разной интенсивностью. ВБН вызывал быструю гибель клеточного монослоя, тогда как вирус Сендай вызывал быструю деструкцию клеток H1299 и слабое цитопатическое действие без видимой гибели клеточного монослоя в культуре Сасо-2. Эти данные говорят о том, что механизмы, лежащие в основе вирусиндуцированной гибели раковых клеток, имеют двоякую реципрокную зависимость как от типа опухолевых повреждений клеточного метаболизма, так и от вирусных факторов, воздействующих на биохимические пути апоптоза в клетках. Этот вывод имеет важное значение для стратегии выбора вирусного штамма в онколитическом лечении различных типов опухолей.

Интересно, что раковые клетки характеризуются повреждением биохимических путей, участвующих в регуляции пролиферации и гибели клеток (апоптоза), таких как система интерферона, дефекты факторов транскрипции p53, NFκB и т. п. [20–25]. При заражении различными

цитолитическими вирусами в раковых культурах будет формироваться специфическое соотношение вирусных факторов и клеточного метаболизма, характерного для типа опухоли, которое будет порождать особый фенотип гибели клеток. Из этого следует, что для уничтожения определенного вида опухоли необходим селективный вирус-онколитик, который способен преодолеть онкогенный дефект раковых клеток и вызывать их апоптоз или некроз. В настоящей работе показано, что раковые клетки H1299 обладают высокой чувствительностью к гибели, вызванной как ВБН, так и вирусом Сендай. Напротив, линия клеток из опухоли кишечника человека Сасо-2 имела высокую резистентность к вирусам Сендай и гриппа [26], и только ВБН вызывал быструю деградацию и гибель клеток данного типа. Дальнейшее изучение и понимание механизмов вирусного поражения опухолей позволят выработать принципы такого выбора вирус-онколитиков и создать их банк.

Благодарность. Автор благодарит Е. Böttcher-Friebertshäuser и prof. H.D. Klenk из Института вирусологии Университета Филиппа г. Марбурга (Германия) за предоставление культур клеток МДСК, экспрессирующих протеазы НАГ и TMPRSS2, а также проф. П.М. Чумакова из Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН и prof. S. Ludwig из Института молекулярной вирусологии Университета г. Мюнстера (Германия) за полезное и конструктивное обсуждение темы исследований.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты 17-04-01726, 17-04-01934). Исследования апоптоза малигнизированных клеток проведены при поддержке совместного проекта Российского научного фонда и немецкого фонда DFG № 18-44-04028. Исследования репродукции парамиксовирусов проведены в рамках гранта РФФИ № 14-15-01073.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1–15, 17–26 см. REFERENCES)

16. Жирнов О.П., Букринская А.Г. Изучение белков вируса Сендай: протеолитическая активность в составе вирусных частиц. *Вопросы вирусологии.* 1977; (5): 571–8.

REFERENCES

- Lamb R.A., Parks G.D. Paramyxoviridae: their viruses and their replication. In: Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M., eds. *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia, USA: Wolters Kluwer and Lippincott Williams and Wilkins; 2007.
- Huang Z., Krishnamurthy S., Panda A., Samal S.K. Newcastle disease virus V protein is associated with viral pathogenesis and functions as an alpha interferon antagonist. *J. Virol.* 2003; 77 (16): 8676–85.
- Park M.S., Garcia-Sastre A., Cros J.F., Basler C.F., Palese P. Newcastle disease virus V protein is a determinant of host range restriction. *J. Virol.* 2003; 77 (17): 9522–32.
- de Leeuw O.S., Koch G., Hartog L., Ravenshorst N., Peeters B.P. Virulence of Newcastle disease virus is determined by the cleavage site of the fusion protein and by both the stem region and globular head of the haemagglutinin-neuraminidase protein. *J. Gen. Virol.* 2005; 86 (Pt. 6): 1759–69.
- Morrison T.G. Structure and function of a paramyxovirus fusion protein. *Biochim. Biophys. Acta.* 2003; 1614 (1): 73–84.
- Nagai Y., Inocencio N.M., Gotoh B. Paramyxovirus tropism dependent on host proteases activating the viral fusion glycoprotein. *Behring. Inst. Mitt.* 1991; (89): 35–45.
- Tayeb S., Zakay-Rones Z., Panet A. Therapeutic potential of oncolytic Newcastle disease virus a critical review. *Oncolytic. Virother.* 2015; 4: 49–62.
- Matveeva O.V., Guo Z.S., Senin V.M., Senina A.V., Shabalina S.A., Chumakov P.M. Oncolysis by paramyxoviruses: preclinical and clinical studies. *Mol. Ther. Oncolytics.* 2015; 2.
- Ring C.J. Cytolytic viruses as potential anti-cancer agents. *J. Gen. Virol.* 2002; 83 (Pt. 3): 491–502.
- Cuadrado-Castano S., Sanchez-Aparicio M.T., Garcia-Sastre A., Villar E. Therapeutic effect of death: Newcastle disease virus and its antitumor potential. *Virus. Res.* 2015; 209: 56–66.
- Zhirnov O.P., Vorobjeva I.V., Saphonova O.A., Poyarkov S.V., Ovcharenko A.V., Anhlan D. et al. Structural and evolutionary characteristics of HA, NA, NS and M genes of clinical influenza A/H3N2 viruses passaged in human and canine cells. *J. Clin. Virol.* 2009; 45 (4): 322–33.
- Böttcher-Friebertshäuser E., Lu Y., Meyer D., Sielaff F., Steinmetzer T., Klenk H.D. et al. Hemagglutinin activating host cell proteases provide promising drug targets for the treatment of influenza A and B virus infections. *Vaccine.* 2012; 30 (51): 7374–80.
- Zhirnov O.P., Matrosovich T.Y., Matrosovich M.N., Klenk H.D. Aprotinin, a protease inhibitor, suppresses proteolytic activation of pandemic H1N1v influenza virus. *Antivir. Chem. Chemother.* 2011; 21 (4): 169–74.
- Zhirnov O.P., Konakova T.E., Wolff T., Klenk H.D. NS1 protein of influenza A virus down-regulates apoptosis. *J. Virol.* 2002; 76 (4): 1617–25.
- Zhirnov O. P., Ikizler M. R., Wright P. Cleavage of influenza A virus hemagglutinin in human respiratory epithelium is cell-associated and sensitive to exogenous antiproteases. *J. Virol.* 2002; 76 (17): 8682–9.
- Zhirnov O.P., Bukrinskaya A.G. Study on Sendai virus proteins: proteolytic activity within virus particles. *Voprosy virusologii.* 1977; (5): 571–8. (in Russian)
- Zhirnov O.P., Ovcharenko A.G., Bukrinskaya A.G. Myxovirus replication in chicken embryos can be suppressed by aprotinin due to the blockage of viral glycoprotein cleavage. *J. Gen. Virol.* 1985; 66 (Pt. 7): 1633–8.
- Szabo R., Bugge T.H. Membrane-anchored serine proteases in vertebrate cell and developmental biology. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 2011; 27: 213–35.
- Murray A.S., Varela F.A., List K. Type II transmembrane serine proteases as potential targets for cancer therapy. *Biol. Chem.* 2016; 397 (9): 815–26.
- Naik S., Russell S.J. Engineering oncolytic viruses to exploit tumor specific defects in innate immune signaling pathways. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 2009; 9 (9): 1163–76.
- Linge C., Gewert D., Rossmann C., Bishop J.A., Crowe J.S. Interferon system defects in human malignant melanoma. *Cancer Res.* 1995; 55 (18): 4099–104.
- Abd-Elrahman I., Hershko K., Neuman T., Nachmias B., Perlman R., Ben-Yehuda D. The inhibitor of apoptosis protein Livin (ML-IAP) plays a dual role in tumorigenicity. *Cancer Res.* 2009; 69 (13): 5475–80.
- Gurpinar E., Vousden K.H. Hitting cancers' weak spots: vulnerabilities imposed by p53 mutation. *Trends Cell. Biol.* 2015; 25 (8): 486–95.
- Goldar S., Khaniani M.S., Derakhshan S.M., Baradaran B. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian. Pac. J. Cancer Prev.* 2015; 16 (6): 2129–44.
- Xu D.W., Zhang G.Q., Wang Z.W., Xu X.Y., Liu T.X. Autophagy in tumorigenesis and cancer treatment. *Asian. Pac. J. Cancer Prev.* 2015; 16 (6): 2167–75.
- Zhirnov O.P., Klenk H.D. Human influenza viruses are proteolytically activated and do not induce apoptosis in CACO-2 cells. *Virology.* 2003; 313 (1): 198–212.

Поступила 07.07.16

Принята в печать 11.10.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017
УДК 615.371:578.833.26].036.8

*Ворович М.Ф.¹, Майкова Г.Б.¹, Чернохаева Л.Л.¹, Романенко В.В.², Анкудинова А.В.², Хапчаев Ю.Х.¹,
Карганова Г.Г.¹, Ишмухаметов А.А.¹, Дроздов С.Г.¹*

ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ И БЕЗОПАСНОСТЬ ВАКЦИНЫ «КЛЕЩ-Э-ВАК»: «ВЗРОСЛАЯ» ФОРМА

¹ФГБНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН», 108819, г. Москва;

²ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Свердловской области», 620078, г. Екатеринбург

В настоящее время в Российской Федерации ежегодно регистрируется около 3000 случаев клещевого вирусного энцефалита (КВЭ). Основным средством борьбы с заболеваемостью КВЭ является профилактическая иммунизация. Для сравнительного исследования реактогенности и иммуногенности новой вакцины «Клещ-Э-Вак» добровольцев в возрасте от 16 лет двукратно иммунизировали вакцинами «Клещ-Э-Вак» и «ЭнцеВир», полученными на основе штаммов дальневосточного подтипа вируса КЭ, по стандартной и экстренной схемам. Проводили клиническое рандомизированное сравнительное слепое контролируемое исследование. У реципиентов регистрировали частоту возникновения, интенсивность, время появления и длительность местных и общих реакций. Для оценки иммунологической эффективности вакцинации определяли титры противовирусных антител методом иммуноферментного анализа. По результатам клинического исследования выраженность местных и общих реакций у исходно серонегативных реципиентов была слабой или умеренной. Симптомы обычно проявлялись в течение 1–2 сут после инъекции, сохранялись не более 4 сут и проходили самостоятельно. Не было выявлено статистически достоверных различий в реактогенности вакцин после первой и второй инъекции, а также зависимости реактогенности от пола реципиентов. После первой иммунизации уровень серопротекции составлял не менее 43%, средний геометрический титр антител (СГТА) – не менее 1:200, после второй инъекции уровень серопротекции достигал 90 – 100%, СГТА – не менее 1:500. Данные о реактогенности и иммуногенности у исходно серопозитивных реципиентов значительно не отличались от данных у исходно серонегативных реципиентов. Полученные данные свидетельствуют о слабой реактогенности вакцин «Клещ-Э-Вак» и «ЭнцеВир». Двукратная вакцинация с интервалом 14 или 30 дней приводит к формированию выраженного иммунного ответа, при этом различия в уровне серопротекции и титрах противовирусных антител при стандартной и экстренной схемах вакцинации статистически недостоверны. Корреляции между развитием у реципиентов местных и общих симптомов и иммунологической эффективностью вакцин выявлено не было.

Ключевые слова: вакцина «Клещ-Э-Вак»; вакцина против клещевого энцефалита; вирус клещевого энцефалита; реактогенность; иммуногенность; схема иммунизации.

Для цитирования: Ворович М.Ф., Майкова Г.Б., Чернохаева Л.Л., Романенко В.В., Анкудинова А.В., Хапчаев Ю.Х., Карганова Г.Г., Ишмухаметов А.А., Дроздов С.Г. Иммунологическая эффективность и безопасность вакцины «Клещ-Э-Вак»: «взрослая» форма. *Вопросы вирусологии.* 2017; 62 (2): 73-80.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-2-73-80>

Vorovitch M.F.¹, Maikova G.B.¹, Chernokhaeva L.L.¹, Romanenko V.V.², Ankudinova A.V.², Khapchaev Yu.Kh.¹, Karganova G.G.¹, Ishmukhametov A.A.¹, Drozdov S.G.¹

IMMUNOGENICITY AND SAFETY OF THE ADULT TBE VACCINE «TICK-E-VAC»

¹Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences, Moscow, 142782, Russian Federation;

²Center for Hygiene and Epidemiology in the Sverdlovsk Region, Yekaterinburg, 620078, Russian Federation

About 3,000 cases of TBE are registered annually in the Russian Federation. Vaccination is the main way to prevent the tick-borne encephalitis disease. Comparative study of the reactogenicity and immunogenicity of a new vaccine «Tick-E-Vac» was held. Volunteers aged from 16 years old were twice immunized with the vaccines «Tick-E-Vac» or «Encevir» derived from strains of Far East subtype of TBE virus, according to standard and emergency schemes. The clinical study was randomized, comparative, blind, and controlled. The frequency, intensity, time of occurrence, and duration of local and general reactions had been recorded. The titers of antiviral antibodies in ELISA had been determined to assess the immunological efficacy of vaccination.

According to the results of the clinical study, the severity of local and general reactions in initial seronegative recipients was weak or moderate. The symptoms were usually manifested within 1-2 days after injection and persisted for not more than 4 days, after which time the symptoms disappeared. There was no statistically significant difference in the reactogenicity of the vaccines after the first and after the second injection. The reactogenicity also did not depend on the gender of recipients. After the first immunization, the level of seroprotection was not less than 43%; the average geometric titer of antibodies (GTA), not less than 1:200. After the second injection, the level of seroprotection reached 90-100%; GTA, not less than 1:500. The data on the reactogenicity and immunogenicity to the original seropositive recipients is not significantly different from the data for the initial seronegative recipients. The data indicate weak reactogenicity of the vaccines «Tick-E-Vac» and «Encevir». Double vaccination with an interval of 14 or 30 days leads to the formation of expressed immune response. Thus, differences in the level of

Для корреспонденции: Ворович Михаил Фридрихович, канд. биол. наук, зам. директора по науке и технологии ФГБНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН», 108819, г. Москва. E-mail: vorovich_mf@chumakovs.ru

seroprotection and in antiviral titers in the cases of the standard and emergency vaccination schedules are not statistically significant. The correlation between the development in recipients of local and general symptoms and the immunological efficacy of the vaccines has not been identified.

Key words: «Tick-E-Vac» vaccine; TBE vaccine; TBEV; reactogenicity; immunogenicity; immunization schedule.

For citation: Vorovitch M.F., Maikova G.B., Chernokhaeva L.L., Romanenko V.V., Ankudinova A.V., Khapchayev Yu.Kh., Karganova G.G., Ishmukhametov A.A., Drozdov S.G. Immunogenicity and safety of the adult the vaccine «tick-e-vac». *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2017; 62(2): 73-80. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-2-73-80>

For correspondence: Mikhael F. Vorovitch, Ph.D., Deputy Director of Science and Technology of the Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences, Moscow, 142782, Russian Federation. E-mail: vorovich_mf@chumakovs.ru

Information about authors:

Vorovitch M.F.; <http://orcid.org/0000-0002-7367-6357>

Maikova G. B.; <http://orcid.org/0000-0002-7673-0339>

Chernokhaeva L.L.; <http://orcid.org/0000-0002-6888-6691>

Karganova G. G.; <http://orcid.org/0000-0002-8901-6206>

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

Received 29 September 2016

Accepted 11 October 2016

Введение

Клещевой энцефалит (КЭ) (в соответствии с МКБ-10 клещевой вирусный энцефалит (КВЭ)) широко распространен в Северной Евразии. В Российской Федерации на территориях, эндемичных по КВЭ, проживает более 61 млн человек [1], и в настоящее время ежегодно регистрируется около 3000 случаев заболевания. Возбудителем заболевания является вирус КЭ, входящий в группу переносимых клещами флавивирусов млекопитающих. Филогенетически вирус КЭ подразделяют на 3 подтипа [2]: дальневосточный, европейский и сибирский.

Основным средством борьбы с заболеваемостью КВЭ является профилактическая вакцинация. В последние 2 десятилетия в связи с существенным увеличением количества вакцинируемых, изменением и расширением контингента лиц, прививаемых против КВЭ (дети в возрасте от 1 года, лица старшего возраста) значительное внимание уделяется реактогенности вакцин против КЭ [3–5]. При разработке новых вакцин против КЭ основной задачей исследователей является снижение реактогенности препаратов при сохранении высокой иммунологической эффективности.

Наиболее массово используемой в РФ является универсальная лиофилизированная «московская» вакцина КЭ, которая производится ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» на основе штамма Софьин и предназначена для вакцинации лиц от 3 лет [6]. В 2009 г. в ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» была разработана новая жидкая сорбированная вакцина «Клещ-Э-Вак». Препарат предназначен для вакцинации детей в возрасте от 1 года до 16 лет в дозе 0,25 мл и лиц от 16 лет в дозе 0,5 мл. Клиническое исследование нового препарата было проведено в 2010–2011 гг. на территории Свердловской области [7, 8]. В качестве препарата сравнения для «взрослой» формы вакцины «Клещ-Э-Вак» была выбрана вакцина «ЭнцеВир» на основе штамма 205 дальневосточного подтипа вируса КЭ.

Основной целью исследования являлось изучение реактогенности и иммуногенности вакцин, полученных на основе штаммов дальневосточного подтипа вируса КЭ, при введении лицам старше 16 лет по стандартной и экстренной схемам.

Материал и методы

Вакцины. Для вакцинации использовали вакцину «Клещ-Э-Вак» (доза 0,5 мл, серия № 3.2009ж), представ-

ляющую собой очищенную концентрированную суспензию инактивированного формалином вируса КЭ, сорбированного на алюминии гидроксиде. Действующим началом вакцины является специфический антиген штамма Софьин вируса КЭ (GenBank KC806252) [9]. Содержание белка Е в дозе вакцины составляет 0,90±0,15 мкг. В качестве препарата сравнения использовали коммерческую вакцину «ЭнцеВир», полученную на основе штамма 205 (доза 0,5 мл, серия № 500809, производство НПО «Микроген», Томск).

Вакцинация. Изучение иммуногенности и реактогенности вакцин «Клещ-Э-Вак» и «ЭнцеВир» проводили в условиях клинического исследования при иммунизации добровольцев старше 16 лет на базе исследовательского центра МУ «Центральная городская больница № 7» Екатеринбург. Протокол исследования, форма информированного согласия и другие документы, требующие предварительного рассмотрения, были одобрены Комитетом по этике при Минздрава РФ и локальным этическим комитетом МУ «Центральная городская больница № 7». Было проведено рандомизированное сравнительное слепое контролируемое исследование в соответствии с принципами Хельсинкской декларации (редакция 1996 г.), качественной клинической практики и Федерального законом № 86 «О лекарственных средствах».

Вакцинация являлась добровольной. Для иммунизации были отобраны здоровые лица обоего пола старше 16 лет, не болевшие КВЭ, не прививавшиеся ранее против данной инфекции, не имевшие противопоказаний, предусмотренных инструкциями по применению вакцин, и подписавшие информированное согласие на участие в исследовании. Участники на момент исследования не проходили системную терапию, в том числе не применяли средства гормональной контрацепции.

Вакцины вводили внутримышечно в область дельтовидной мышцы плеча двукратно с интервалом между прививками 30 дней (стандартная схема) или 14 дней (экстренная схема).

Реактогенность. За всеми привитыми было установлено медицинское наблюдение в течение 7 сут после каждой инъекции. Учитывали и регистрировали местные реакции – зуд, жжение, болезненность, покраснение, отек, гиперемия в месте введения; общие реакции – подъем температуры (измерение 2 раза в сутки), нарушение сна, ощущение физического дискомфорта.

Таблица 1

Демографические и антропологические характеристики участников клинического исследования вакцины «Клещ-Э-Вак» и вакцины сравнения «ЭнцеВир»

Характеристика	Параметр или категория	Стандартная схема		Экстренная схема	
		"Клещ-Э-Вак"	"ЭнцеВир"	"Клещ-Э-Вак"	"ЭнцеВир"
Количество участников	Общее число – 83	23	19	20	21
Пол	Ж/М	18/5	16/3	9/11	5/16
Возраст, годы	Интервал	17–52	17–59	18–59	18–60
	Среднее	24,8±2,3	26,2±3,1	37,5±3,2	38,8±3,5
Рост, см	Интервал	155–182	161–181	155–190	152–186
	Среднее	167,0±1,4	167,7±1,4	172,1±2,3	172,9±1,5
Масса тела, кг	Интервал	46–93	52–90	48–100	47–95
	Среднее	62,8±2,3	63,4±2,7	73,2±3,7	75,6±2,5

Для определения интенсивности объективных и субъективных симптомов применяли систему балльных оценок: отсутствие симптома – 0 баллов, легкий симптом – 1 балл, умеренный симптом – 2 балла, тяжелый симптом – 3 балла. Течение поствакцинального периода оценивали как гладкое или осложненное. При гладком течении общие и местные поствакцинальные реакции разделяли на следующие категории: слабые (1 балл) – общие и местные реакции, повышение температуры тела до 37°C; средней силы (2 балла) – общие и местные реакции, повышение температуры тела 37–37,5°C; сильные (3 балла) – общие и местные реакции, повышение температуры тела 37,6°C и более. Процесс считали бессимптомным, если у реципиента не регистрировались местные и общие реакции и не отмечалось повышение температуры тела.

Также фиксировали развитие у реципиента нежелательных явлений, определяемых как новое неблагоприятное для пациента состояние или усугубление имевшегося у него состояния/заболевания, развившееся после первой прививки или в период до 30 дней после второй прививки. Оценивали выраженность нежелательных явлений: слабые – недомогание, не ограничивающее обычную повседневную активность; умеренные – недомогание, ограничивающее или влияющее на обычную повседневную активность; тяжелые – невозможность выполнять повседневную деятельность; очень тяжелые – значительное нарушение возможностей пациента, несмотря на симптоматическую терапию.

Сыворотки. Забор венозной крови для получения сыворотки осуществляли в 0-й день – до начала вакцинации; через 14 или 30 дней после первой вакцинации; через 14 дней и через 30 дней после второй вакцинации. До постановки иммуноферментного анализа (ИФА) полученные сыворотки хранили при температуре от 2 до 8°C не более 5 сут.

Иммуногенность. Титры антител в сыворотках реципиентов определяли методом ИФА с использованием набора реагентов «ВектоВКЭ-IgG» D-1156 (ЗАО «ВекторБест», Новосибирск) в соответствии с инструкцией по применению.

Статистическая обработка. Статистическую обработку полученных результатов проводили общепринятыми методами вариационной статистики с помощью программы Excel и пакета программ Origin 8. Достоверность различий между показателями определяли с использованием критерия Манна–Уитни (КМ-У) и точного критерия Фишера (ТКФ) при уровне значимости не более 0,05.

Результаты

1. Демографические и антропометрические данные участников клинического исследования

По результатам первичного скрининга были отобраны 128 человек, не прививавшихся ранее против данной инфекции и не имевших в анамнезе КВЭ. Исследование проходило в 2 этапа: 1-й этап – вакцинация 61 человека по стандартной схеме, 2-й этап – вакцинация 67 человек по экстренной схеме. На каждом этапе методом случайных чисел участники эксперимента были разделены на

2 группы. Реципиенты в группах были привиты либо вакциной «Клещ-Э-Вак», либо вакциной «ЭнцеВир». Добровольцы, не завершившие клиническое исследование в полном объеме (9 человек), были исключены из анализа данных.

При определении титров антител к вирусу КЭ в сыворотках, полученных до начала курса иммунизации, у ряда реципиентов были выявлены противовирусные антитела в титре 1:100 или более. Такие реципиенты были выделены в отдельную группу. Данные анализа иммуногенности и безопасности при вакцинации этой группы представлены в разделе 6.

Таким образом, первоначально была проведена оценка реактогенности и иммуногенности вакцин на основе данных, полученных для 83 реципиентов, исходно не имевших защитных титров антител к вирусу КЭ. Все эти реципиенты принадлежали к европеоидной расе. 43 человека были привиты вакциной «Клещ-Э-Вак» (23 человека по стандартной схеме, 20 человек по экстренной) и 40 человек – вакциной «ЭнцеВир» (19 человек по стандартной схеме и 21 по экстренной). Основные демографические и антропометрические характеристики участников исследования представлены в табл. 1.

Между группами привитых по стандартной и экстренной схемам были выявлены достоверные различия по полу ($p < 0,009$, ТКФ) и возрасту ($p < 0,01$, КМ-У).

В то же время не было выявлено достоверных различий по демографическим и антропометрическим характеристикам между группой реципиентов, привитых вакциной «Клещ-Э-Вак», и группой привитых вакциной «ЭнцеВир» по стандартной схеме, экстренной схеме и суммарно по двум схемам.

2. Реактогенность вакцин «Клещ-Э-Вак» и «ЭнцеВир»

При использовании обеих вакцин у изначально серонегативных реципиентов были зарегистрированы местные и общие реакции (табл. 2). После первой инъекции вакцин «Клещ-Э-Вак» и «ЭнцеВир» реакции развились у 5 и 6 реципиентов соответственно, итого суммарно у 11 (13,3%) реципиентов, после второй инъекции реакции были суммарно зарегистрированы у 9 (10,8%) реципиентов. Всего реакции на введение вакцины «Клещ-Э-Вак» были зарегистрированы у 8 (9,6%) реципиентов, на вакцину «ЭнцеВир» – у 12 (14,5%). Различия в частоте возникновения местных и общих реакций между исследуемыми препаратами были статистически недостовер-

Таблица 2

Суммарные местные и общие реакции у реципиентов вакцины «Клещ-Э-Вак» и вакцины сравнения «ЭнцеВир», привитых по стандартной и экстренной схемам

Схема вакцинации	"Клещ-Э-Вак"			"ЭнцеВир"		
	N	n	%	N	n	%
Реакции после первой инъекции						
Стандартная	23	1	4,3	19	1	5,3
Экстренная	20	4	20,0	21	5	23,8
Всего по обеим схемам...	43	5	11,6	40	6	15,0
Реакции после второй инъекции						
Стандартная	23	2	8,7	19	1	5,3
Экстренная	20	1	5,0	21	5	23,8
Всего по обеим схемам...	43	3	7,0	40	6	15,0
Число реципиентов с реакциями после первой и второй инъекции						
Стандартная	23	2	8,7	19	1	5,3
Экстренная	20	4	20,0	21	7	33,3
Всего по обеим схемам...	43	6	14,0	40	8	20,0

Примечание. N – общее число реципиентов; n – число реципиентов, у которых отмечены реакции.

ны, как и различия в реактогенности вакцин при первом и втором введении.

Реакции на первое и второе введение препаратов часто развивались у одного и того же лица. Суммарно при стандартной схеме введения препаратов местные и общие реакции зарегистрированы у 3 реципиентов, при экстренной схеме введения – у 11 реципиентов, т. е. в 16,9% случаев применения вакцин. Реакции возникали у реципиентов в возрасте от 19 лет до 51 года (у 8 женщин и у 6 мужчин).

В табл. 3 представлены развернутые данные о характере поствакцинальных реакций у реципиентов. При стандартной схеме иммунизации общие и местные реакции на первое введение вакцины «Клещ-Э-Вак» были зарегистрированы только у 1 реципиента, на второе введение – у 2 реципиентов. В группе лиц, привитых вакциной «ЭнцеВир», были зарегистрированы только общие реакции у 1 реципиента как на первое, так и на второе введение.

При экстренной схеме на первое введение вакцины «Клещ-Э-Вак» у 3 реципиентов наблюдали сочетание местных и общих реакций, у 1 реципиента развились только местные реакции. Местные и общие реакции на второе введение препарата «Клещ-Э-Вак» были зарегистрированы у 1 реципиента. На первое введение вакцины «ЭнцеВир» по экстренной схеме общие реакции были зарегистрированы у 1 реципиента, сочетание местных и общих реакций – у 4 реципиентов. На второе введение препарата «ЭнцеВир» только местные реакции отмечены у 1 реципиента, сочетание местных и общих реакций – у 4 реципиентов. Суммарно было зарегистрировано 52 симптома – 22 местные реакции и 30 общих. Для вакцины «Клещ-Э-Вак» зарегистрировано развитие 20 симптомов, для вакцины «ЭнцеВир» – 32 симптома. На первое введение препаратов суммарно был зарегистрирован 31 симптом, на второе – 21 симптом. Симптомы составили следующий ряд по частоте встречаемости: зуд, жжение, болезненность в месте введения 28,8%;

физический дискомфорт 26,9%; лихорадка 17,3%; отек, гиперемия и нарушение сна 13,5%.

Все зарегистрированные реакции по степени выраженности были расценены как легкие или умеренные симптомы и в основном развивались в течение 1–2 сут после инъекции, продолжительность реакций составляла не более 4 сут. Все пациенты с местными и общими симптомами были осмотрены врачом, признаков серьезности нежелательных явлений выявлено не было. Все обнаруженные симптомы прошли самопроизвольно без приема лекарственных препаратов.

3. Иммунологическая эффективность вакцин «Клещ-Э-Вак» и «ЭнцеВир»

Для оценки иммуногенности вакцин определяли титры противовирусных антител в сыворотках реципиентов методом ИФА. Результаты представлены в табл. 4.

После первой инъекции препаратов уровень серопротекции превысил 43%, среднегеометрических титров антител (СГТА) более 1:240 (2,39 lg). После второй прививки уровень серопротекции повысился до 90–100%, СГТА более 1:500 (2,71 lg).

Различия в уровне серопротекции (ТКФ) и титрах противовирусных антител (КМ-У) между группами реципиентов, привитых вакцинами «Клещ-Э-Вак» и «ЭнцеВир» как по стандартной, так и по экстренной схемам, на всех временных этапах исследования сывороток были статистически недостоверны.

4. Анализ влияния реактогенности вакцин на показатели иммунологической эффективности

Для оценки влияния реактогенности препаратов на их иммунологическую эффективность мы сравнили уровень серопротекции и значения СГТА в объединенной группе реципиентов с выраженными местными и общими реакциями и в объединенной группе реципиентов без реакций после первого и второго введения препаратов суммарно по двум схемам иммунизации (табл. 5). После первой инъекции уровень серопротекции в группе реципиентов с зарегистрированными симптомами статистически достоверно (ТКФ) не отличался от уровня серопротекции в группе реципиентов без симптомов, однако различия в уровне серопротекции после второй инъекции были статистически достоверны ($p < 0,05$, ТКФ). При этом не было выявлено различий между сравниваемыми группами в величине титра противовирусных антител (КМ-У).

6. Безопасность и иммуногенность вакцин «Клещ-Э-Вак» и «ЭнцеВир» у реципиентов, имевших антитела к вирусу КЭ до вакцинации

Мы также проанализировали данные о реактогенности и иммуногенности вакцин против КЭ для исходно серопозитивных реципиентов. Было установлено, что 36 реципиентов (19 женщин и 17 мужчин) в возрасте от 17 до 60 лет имели антитела к вирусу КЭ до начала исследования. Титр антител варьировал от 1:100 до 1:3200, СГТА – 1:466 (2,67 lg). Как и следовало ожидать, уже после первого введения любой из вакцин титр противовирусных антител значительно увеличивался (СГТА 1:1540) и оставался таким же высоким после второго введения препаратов как по стандартной, так и по экстренной схеме (табл. 6). Различия в титрах противовирусных антител между группами привитых вакциной «Клещ-Э-Вак» и вакциной «ЭнцеВир», группами привитых по стандартной и экстренной схемам, группами реципиентов, привитых однократно и двукратно, на всех временных этапах исследования были статистически недостоверны (КМ-У).

После первой инъекции вакцин суммарно местные и

Таблица 3

Характеристика местных и общих реакций у лиц, привитых вакцинами «Клещ-Э-Вак» и «ЭнцеВир»

Инъекция	Реакции	Препарат (К, Э)	Число/%	Выраженность, баллы	Время появления	Длительность
Стандартная схема						
Первая	Зуд, жжение, болезненность	К	–	–		
		Э	–	–		
	Отек, гиперемия	К	1/4,3	1	Часы	2–3 сут
		Э	–	–	–	–
	Нарушение сна	К	–	–	–	–
		Э	–	–	–	–
	Физический дискомфорт	К	1/4,3	1	Часы	1–2 сут
		Э	–	–	–	–
	Лихорадка	К	–	–	–	–
		Э	1/5,3	1	3–5 сут	1–2 сут
Вторая	Зуд, жжение, болезненность	К	1/4,3	1	Часы	2–3 сут
		Э	–	–	–	–
	Отек, гиперемия	К	–	–	–	–
		Э	–	–	–	–
	Нарушение сна	К	–	–	–	–
		Э	–	–	–	–
	Физический дискомфорт	К	1/4,3	1	Часы	3 сут и более
		Э	–	–	–	–
	Лихорадка	К	1/4,3	2	1–2 сут	1–2 сут
		Э	1/5,3	1	6–7 сут	1–2 сут
Экстренная схема						
Первая	Зуд, жжение, болезненность	К	4/20	1	1/часы** 3/1–2 сут	1/часы** 2/2–3 сут 1/4 сут и более
		Э	4/21	1	2/часы 1/1–2 сут 1/3–5 сут	2/2–3 сут 2/4 сут и более
	Отек, гиперемия	К	3/15	1	1/часы 2/1–2 сут	2/2–3 сут 1/4 сут и более
		Э	2/9,5	1	1–2 сут	1/2–3 сут 1/4 сут и более
	Нарушение сна	К	3/15	1	Часы	2/часы 1/1–2 сут
		Э	2/9,5	1	1/часы 1/1–2 сут	1/часы 1/1–2 сут
	Физический дискомфорт	К	3/15	2/1*	1/часы 2/1–2 сут	2/2 сут 1/3 сут и более
		Э	4/19	1	3/часы 1/5 сут	2/2 сут 2/3 сут и более
	Лихорадка	К	–	–	–	–
		Э	3/14,3	1/1 балл 2/2 балла	3/часы	3/часы
Вторая	Зуд, жжение, болезненность	К	1/4,3	1	1–2 сут	2–3 сут
		Э	5/23,8	1	1/часы 4/1–2	2/часы 3/2–3 сут
	Отек, гиперемия	К	–	–	–	–
		Э	1/4,8	1	1–2 сут	2–3 сут
	Нарушение сна	К	–	–	–	–
		Э	2/9,5	1	1–2 сут	1/1–2 сут 1/3 сут и более
	Физический дискомфорт	К	1/4,3	1	1–2 сут	1–2 сут
		Э	4/19	1	1/часы 3/1–2 сут	3/1–2 сут 1/3 сут и более
	Лихорадка	К	–	–	–	–
		Э	3/14,3	1/1 балл 2/2 балла	2/часы 1/1–2 сут	2/часы 1/1–2 сут

Примечание. К – «Клещ-Э-Вак»; Э – «ЭнцеВир»; * – в числителе указано число реципиентов вакцин с данным симптомом, в знаменателе – выраженность в баллах (см. «Материалы и методы»); ** – в числителе указано число реципиентов вакцин с данным симптомом, в знаменателе – время его появления или длительность.

Таблица 4

Количество серопозитивных реципиентов и СГТА IgG-антител к вирусу КЭ у привитых вакцинами «Клещ-Э-Вак» и «ЭнцеВир» по стандартной и экстренной схемам

Схема иммунизации	Срок забора крови	"Клещ-Э-Вак"				"ЭнцеВир"			
		N	серопротекция		СГТА, Ig	N	серопротекция		СГТА, Ig
			n	%			n	%	
Стандартная	Через 30 дней после первой прививки	23	10	43,5	2,39±0,18	19	9	47,4	2,57±0,23
	Через 14 дней после второй прививки	23	23	100	3,01±0,06	19	18	94,7	2,92±0,09
	Через 30 дней после второй прививки	23	23	100	3,01±0,06	19	19	100	2,95±0,09
Экстренная	Через 14 дней после первой прививки	20	9	45	2,94±0,11	21	11	52,4	3,01±0,06
	Через 14 дней после второй прививки	20	19	95	2,76±0,12	21	19	90,5	2,84±0,11
	Через 30 дней после второй прививки	20	19	95	2,76±0,09	21	19	90,5	2,71±0,09

Примечание. N – общее число участников в группах; n, % – число и процент реципиентов с титром антител к вирусу КЭ более 2 Ig. СГТА – IgG к вирусу КЭ для серопозитивных реципиентов.

общие реакции развивались у 8 (22,2%) реципиентов, после второй – у 3 (8,3%), при этом реакции на введение вакцины «Клещ-Э-Вак» регистрировались у 3 (8,3%) реципиентов, на вакцину «ЭнцеВир» – у 5 (13,8%) реципиентов. Различия в частоте возникновения местных и общих реакций на первое и второе введение вакцин, а также между исследуемыми препаратами были статистически недостоверны (ТКФ). Суммарно у данной группы реципиентов при стандартной схеме введения вакцин местные и общие реакции регистрировались у 5 реципиентов, при экстренной схеме – у 3. Реакции были зарегистрированы у реципиентов в возрасте от 17 лет до 51 года у 4 женщин и 4 мужчин. Всего было зарегистрировано 17 симптомов – 10 местных и 7 общих реакций: при первом введении препаратов 12 симптомов, при втором – 5 симптомов; при введении вакцины «Клещ-Э-Вак» 7 симптомов, вакцины «ЭнцеВир» 10 симптомов. Симптомы составили следующий ряд по частоте встречаемости: отек, гиперемия 35,3%; зуд, жжение, болезненность в месте введения 23,5%; лихорадка 17,6%; физический дискомфорт 11,8% и нарушение сна 11,8%. По степени выраженности все зарегистрированные реакции были расценены как легкие или умеренные симптомы и развивались в течение 1–2 сут после инъекции, продолжительность реакций составляла не более 4 сут. Все пациенты с симптомами были осмотрены врачом, признаков серьезности нежелательных явлений выявлено не было, симптомы прошли самопроизвольно без приема лекарственных препаратов.

Обсуждение

Основной задачей при разработке вакцины «Клещ-Э-Вак» являлось обеспечение низкой реактогенности

вакцины при сохранении высокой иммунологической эффективности.

Ранее изучение реактогенности и иммуногенности цельновирионных концентрированных инактивированных вакцин против КЭ проводилось неоднократно [10–16], однако в большинстве этих исследований представлены данные испытания вакцин при использовании либо только стандартной [12–14], либо экстренной [15, 16] схемы введения препаратов. Данные сравнительного изучения стандартной и экстренной схем по показателям реактогенности и иммуногенности в одном эксперименте при вакцинации одной и той же серией вакцины против КЭ крайне ограничены [17, 18].

В РФ в соответствии с этическими критериями проведения клинических исследований обычно реципиентами препаратов являются лица, проживающие на территориях, эндемичных по КЭ. В ряде работ показано, что уровень естественного проэпидемичивания в таких регионах может превышать 20% [14, 19]. При проведении исследования мы также выявили значительное число серопозитивных к вирусу КЭ лиц в возрасте от 17 лет (30,3%, СГТА 1:466), не имеющих в анамнезе данных о вакцинации против КЭ или заболевании КЭ. Сформированный высокий уровень естественного иммунитета у реципиентов может значительно искажать данные клинических исследований относительно реактогенности и иммуногенности вакцин против КЭ [20]. Поэтому в данной работе основное внимание было уделено анализу результатов, полученных для реципиентов, не имевших противовирусных антител до иммунизации.

В проведенном клиническом исследовании вакцин «Клещ-Э-Вак» и «ЭнцеВир» степень выраженности местных и общих реакций у взрослых, привитых вакцинами против КЭ на основе штаммов дальневосточного подтипа вируса КЭ, была слабой или умеренной. Местные и общие реакции обычно проявлялись в течение 1–2 сут после инъекции и сохранялись не более 4 сут. Наиболее часто у реципиентов наблюдались зуд, жжение, болезненность в месте введения и физический дискомфорт. Симптомы проходили самостоятельно и не требовали приема лекарственных препаратов. Реактогенность вакцин не зависела от пола реципиентов, не было выявлено статистически достоверных различий в реактогенности препаратов после первой и второй инъекции. Следует также отметить, что при наличии местных и общих реакций на вторую прививку у этих же

Таблица 5

Влияние реактогенности вакцин «Клещ-Э-Вак» и «ЭнцеВир» на показатели иммунологической эффективности

Реципиенты	Число	Уровень серопротекции, %/СГТА, Ig		
		после первой иммунизации	после второй иммунизации	
			через 14 дней	через 30 дней
С реакциями	14	57,1/2,700,20	78,6/2,90±0,15*	85,7/2,90±0,13*
Без реакций	69	44,9/2,70,10	98,6/2,88±0,05*	98,6/2,86±0,05*

Примечание. * – Указаны значения, разница между которыми достоверна (ТКФ).

Таблица 6

СГТА у исходно серопозитивных реципиентов

Схема иммунизации	Вакцина	Число реципиентов	СГТА, Ig			
			до иммунизации	после первой инъекции	после второй инъекции	
					14 дней	30 дней
Стандартная	"Клещ-Э-Вак"	6	2,90±0,40	3,25±0,10	3,15±0,24	3,05±0,20
	"ЭнцеВир"	8	2,64±0,28	3,13±0,33	2,87±0,28	3,17±0,26
Экстренная	"Клещ-Э-Вак"	13	2,58±0,28	3,18±0,05	3,25±0,17	3,11±0,12
	"ЭнцеВир"	9	2,67±0,34	3,20±0,14	3,37±0,10	3,17±0,15
Суммарно		36	2,67±0,16	3,19±0,08	3,18±0,11	3,13±0,09

реципиентов в 55,6% случаев регистрировались реакции и на первое введение препаратов. У вакцины «ЭнцеВир» наблюдали более высокий уровень реактогенности при экстренной схеме введения, который, возможно, связан с разницей в возрасте в группах реципиентов, привитых по стандартной и экстренной схемам.

Для оценки эффективности иммунизации мы использовали общепринятый для КВЭ показатель уровня серопротекции, т. е. наличие противовирусных антител в ИФА в титре более 1:100¹. Уже на 14-й день после первого введения вакцин КЭ достигается практически 50 % уровень серопротекции с показателем СГТА не менее 1:240. На 14-е сутки после второй инъекции у обеих вакцин уровень серопротекции достигает 90–100%, СГТА не менее 1:500, т. е. формируется выраженный иммунный ответ и индуцируется образование противовирусных антител в защитном титре, который сохраняется и на 30-й день после иммунизации.

Мы не выявили статистически достоверных различий в уровне серопротекции и титрах противовирусных антител при стандартной и экстренной схемах первичной вакцинации, что позволяет начать обсуждение вопроса о переходе к единой схеме первичной вакцинации против КЭ – 0–14 дней. Однако необходимо провести оценку поствакцинального иммунитета у привитых в отдаленные сроки после иммунизации.

Г.Н. Леонова и соавт. [21] ранее сообщили о возможной корреляции высоких титров антител к вирусу КЭ у привитых с уровнем и выраженностью местных и общих реакций на вакцины против КВЭ. В нашей работе при сравнении объединенной группы реципиентов с выраженными местными и общими реакциями и объединенной группы реципиентов без реакций в различные временные интервалы после первой и второй инъекции вакцин было показано, что уровень серопротекции после второго введения препаратов несколько выше у группы реципиентов без реакций, однако следует отметить, что сравнимые группы существенно различались по количеству участников (14 и 69 реципиентов соответственно). При этом не было выявлено достоверных различий между группами в титрах противовирусных антител на всех временных этапах исследования.

Как отмечено выше, основным объектом для анализа данных в работе были реципиенты, не имевшие антител

к КВЭ до начала вакцинации. Тем не менее мы оценили также реактогенность и иммуногенность препаратов для реципиентов с исходным защитным уровнем противовирусных антител. Не было выявлено статистически достоверных различий между группой исходно серонегативных и группой исходно серопозитивных реципиентов по показателям реактогенности – частоте возникновения симптомов, их выраженности, сроках появления и длительности. Всего у исходно серонегативных реципиентов было зарегистрировано 52 местных и общих симптомов, у исходно серопозитивных – 17 симптомов. Отек и гиперемия на введение вакцин достоверно чаще развивались у исходно серопозитивных реципиентов, различия в частоте возникновения других симптомов были статистически недостоверны. Как и следовало ожидать, в группе исходно серопозитивных реципиентов СГТА были несколько выше на всех временных этапах исследования в сравнении с группой исходно серонегативных реципиентов, что особенно заметно при сравнении СГТА после первой инъекции вакцин.

Таким образом, полученные в клиническом исследовании данные о частоте выявления, выраженности и длительности общих и местных реакций у взрослых реципиентов, впервые привитых по стандартной или экстренной схеме вакцинами «Клещ-Э-Вак» и «ЭнцеВир», свидетельствуют о слабой реактогенности данных препаратов. Было показано, что двукратная вакцинация по обеим схемам является иммунологически эффективной, приводит к формированию выраженного иммунного ответа и индуцирует образование противовирусных антител в защитном титре.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2, 4–6, 9, 10, 13, 17, 18 см. REFERENCES)

- Чернохаева Л.Л., Холодилов И.С., Пакскина Н.Д. Современный ареал клещевого вирусного энцефалита в Российской Федерации. *Медицинская вирусология*. 2016; 30 (1): 6–22.
- Афонина О.С., Ладыженская И.П., Бархалева О.А., Щербинина М.С., Озерецковский Н.А., Воробьева М.С. и др. Анализ поствакцинальных нежелательных реакций у привитых против клещевого энцефалита вакциной ЭнцеВир в эпидсезон клещевого энцефалита 2010–2011 гг. *Биопрепараты. Профилактика. Диагностика. Лечение*. 2012; (1): 28–35.
- Ворович М.Ф., Киктенко А.В., Хапчаев Ю.Х., Грачев В.П. Новые инактивированные вакцины против вируса КЭ. *Журнал инфекционной патологии*. 2012; 19 (3): 13.
- Анкудинова А.В., Романенко В.В., Ворович М.Ф., Ковтун О.П., Есюнина М.С., Киктенко А.В. и др. Результаты клинического исследования по оценке безопасности и иммуногенности вакцины «Клещ-Э-Вак» в объеме 0,25 мл (детская доза). *Вестник уральской медицинской академической науки*. 2014; (5): 64–9.
- Павлова Л.И., Горбунов М.А., Воробьева М.С., Караванов А.С., Грачев В.П., Ладыженская И.П. и др. Изучение культуральной концентрированной инактивированной вакцины против клещевого энцефалита при иммунизации детей и подростков. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 1999; (6): 50–3.
- Павленко Е.В., Леонова Г.Н., Майстровская О.С. Сравнительное изучение иммуногенности вакцин против клещевого энцефали-

¹Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.1.3.2352-08 "Профилактика клещевого вирусного энцефалита" (утв. постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 7 марта 2008 г. № 19).

- та. *Дальневосточный журнал инфекционной патологии*. 2007; (11): 56–62.
14. Шутова Н.А., Шкуратова О.В., Рузавина Е.В., Власова Н.М., Ставицкая Н.Х., Воробьева М.С. и др. Изучение иммунологической активности и реактогенности вакцины «ЭнцеВир» при иммунизации взрослых по экспресс-схеме. *Сибирский медицинский журнал (Томск)*. 2009; 24 (2–2): 30–3.
 15. Воробьева М.С., Ладыженская И.П., Бархалева О.А., Ставицкая Н.Х., Соляник Р.Г., Шкуратова О.В. Иммунный ответ при экспресс-иммунизации против клещевого энцефалита вакциной ЭнцеВир (Россия) и ФСМЕ-ИММУН (Австрия). *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2009; (5): 61–5.
 16. Леонова Г.Н., Павленко Е.В., Крылова Н.В., Майстровская О.С., Ковальчук Н.В. Зависимость специфического иммунного ответа от возраста и пола у лиц, привитых вакциной против клещевого энцефалита. *Медицинская иммунология*. 2006; 8 (1): 73–80.
 19. Лучинина С.В. Показатели иммунитета у населения в природном очаге КЭ. *Российский иммунологический журнал*. 2013; 7 (2–3): 62–3.
 20. Леонова Г.Н. *Клещевой энцефалит: актуальные аспекты*. М.: Издатель И.В. Балабанов; 2009.
 21. Леонова Г.Н., Крылова Н.В., Павленко Е.В., Майстровская О.С. Влияние реактогенности вакцин против клещевого энцефалита на иммунный ответ у вакцинированных людей. *Бюллетень сибирской медицины*. 2006; 5 (S1): 72–8.
 9. Vorovitch M.F., Kozlovskaya L.I., Romanova L.I., Chernokhaeva L.L., Ishmukhametov A.A., Karganova G.G. Genetic description of a tick-borne encephalitis virus strain Sofjin with the longest history as a vaccine strain. *Springerplus*. 2015; 4: 761.
 10. Loew-Baselli A., Poellabauer E.M., Pavlova B.G., Fritsch S., Firth C., Petermann R. et al. Prevention of tick-borne encephalitis by FSME-IMMUN vaccines: Review of a clinical development programme. *Vaccine*. 2011; 29 (43): 7307–19.
 11. Pavlova L.I., Gorbunov M.A., Vorob'eva M.S., Karavanov A.S., Grachev V.P., Ladyzhenskaya I.P. et al. A cultured concentrated inactivated vaccine against tick-borne encephalitis studied during the immunization of children and adolescents. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 1999; (6): 50–3. (in Russian)
 12. Pavlenko E.V., Leonova G.N., Maystrovskaya O.S. A comparative study of the immunogenicity of vaccines against tick-borne encephalitis. *Dal'nevostochnyy zhurnal infektsionnoy patologii*. 2007; (11): 56–62. (in Russian)
 13. Morozova O.V., Bakhvalova V.N., Potapova O.F., Grishechkin A.E., Isaeva E.I., Aldarov K.V. et al. Evaluation of immune response and protective effect of four vaccines against the tick-borne encephalitis virus. *Vaccine*. 2014; 32 (25): 3101–6.
 14. Shutova N.A., Shkuratova O.V., Ruzavina E.V., Vlasova N.M., Stavitskaya N.Kh., Vorob'eva M.S. et al. Studying immunologic activity and reactogenicity "EnceVir" vaccine immunization using express-scheme. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal (Tomsk)*. 2009; 24 (2–2): 30–3. (in Russian)
 15. Vorob'eva M.S., Ladyzhenskaya I.P., Barkhaleva O.A., Stavitskaya N.Kh., Solyanik R.G., Shkuratova O.V. Immune response during rapid immunization against tick-borne encephalitis vaccines EnceVir (Russia) and FSME-IMMUNE (Austria). *Epidemiologiya i vaksino-profilaktika*. 2009; (5): 61–5. (in Russian)
 16. Leonova G.N., Pavlenko E.V., Krylova N.V., Maystrovskaya O.S., Koval'chuk N.V. The dependence of the specific immune response by age and gender in individuals vaccinated against tick-borne encephalitis. *Meditsinskaya immunologiya*. 2006; 8 (1): 73–80. (in Russian)
 17. Lindblom P., Wilhelmsson P., Fryland L., Matussek A., Haglund M., Sjöwall J. et al. Factors determining immunological response to vaccination against tick-borne encephalitis virus in older individuals. *PLoS One*. 2014; 9 (6): e100860.
 18. Domnich A., Panatto D., Arbutova E.K., Signori A., Avio U, Gasparini R. et al. Immunogenicity against Far Eastern and Siberian subtypes of tick-borne encephalitis (TBE) virus elicited by the currently available vaccines based on European subtype: Systematic review and meta-analysis. *Hum. Vaccin. Immunother*. 2014; 10 (10): 2819–33.
 19. Luchinina S.V. Indicators of population immunity in the natural focus of TBE. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal*. 2013; 7 (2–3): 62–3. (in Russian)
 20. Leonova G.N. *Tick-Borne Encephalitis: Current Aspects [Kleshchevoy entsefalit: aktual'nye aspekty]*. Moscow: Izdatel' I.V. Balabanov; 2009. (in Russian)
 21. Leonova G.N., Krylova N.V., Pavlenko E.V., Maystrovskaya O.S. Influence of the reactogenicity of the tick-borne encephalitis vaccines on the immune response in vaccinated people. *Byulleten' sibirskoy meditsiny*. 2006; 5 (S1): 72–8. (in Russian)
 1. Chernokhaeva L.L., Kholodilov I.S., Paksina N.D. Present distribution area of tick-borne encephalitis in the Russian Federation. *Meditsinskaya virusologiya*. 2016; 30 (1): 6–22. (in Russian)
 2. King A.M.Q., Lefkowitz E., Adams M.J., Carstens E.B. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Elsevier; 2012.
 3. Afonina O.S., Ladyzhenskaya I.P., Barkhaleva O.A., Shcherbinina M.S., Ozeretskovskiy N.A., Vorob'eva M.S. et al. Analysis of post-vaccination adverse reactions in patients vaccinated against tick-borne encephalitis with EnceVir vaccine during tick-borne encephalitis epidemiological season of 2010–2011. *Biopreparaty. Profilaktika. Diagnostika. Lechenie*. 2012; (1): 28–35. (in Russian)
 4. Low-Baselli A., Konior R., Pavlova B.G., Fritsch S., Pollabauer E.M., Maritsch F. et al. Safety and immunogenicity of the modified adult tick-borne encephalitis vaccine FSME-IMMUN: Results of two large phase 3 clinical studies. *Vaccine*. 2006; 24 (24): 5256–63.
 5. Pollabauer E.M., Pavlova B.G., Low-Baselli A., Fritsch S., Prymula R., Angermayr R. et al. Comparison of immunogenicity and safety between two pediatric TBE vaccines. *Vaccine*. 2010; 28 (29): 4680–5.
 6. World Health Organization (WHO). Vaccines against tick-borne encephalitis: WHO position paper. *Wkly Epidemiol. Rec*. 2011; 86 (24): 241–56.
 7. Vorovich M.F., Kiktenko A.V., Khapchaev Yu.Kh., Grachev V.P. The new inactivated vaccines against TBE virus. *Zhurnal infektsionnoy patologii*. 2012; 19 (3): 13. (in Russian)
 8. Ankudinova A.V., Romanenko V.V., Vorovich M.F., Kovtun O.P., Esyunina M.S., Kiktenko A.V. et al. Results of a clinical immunogenicity and safety trial of Tick – E – Vac 0.25 ml vaccine (pediatric dosage). *Vestnik ural'skoy meditsinskoy akademicheskoy nauki*. 2014; (5): 64–9. (in Russian)

Поступила 29.09.16

Принята в печать 11.10.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017
УДК 578.823.1/2:578.5(574/575)

Еремян А.А., Львов Д.К., Щетинин А.М., Дерябин П.Г., Аристова В.А., Гительман А.К., Ботиков А.Г., Альховский С.В.

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ВИРУСОВ ВИДА *CHENUDA VIRUS* (*ORBIVIRUS*, *REOVIRIDAE*), ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В СРЕДНЕЙ АЗИИ

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

Chenuda virus (CNUV) (*Orbivirus*, семейство *Reoviridae*) является единственным известным видом орбивирусов, экологически связанным с аргасовыми (*Argasidae*) клещами, и изучение этой группы вирусов необходимо для понимания общих закономерностей эволюции вирусов рода *Orbivirus*. Проведен сравнительный полногеномный анализ 5 различных вирусов, принадлежащих к виду *Chenuda virus*, включая штаммы вируса Баку (BAKV), и циркулирующих на относительно ограниченной территории в Центральной Азии и в Закавказье. Показано, что дивергенция генов белков VP4 (OC1) и VP6 (Hel) значительно превышает этот показатель для остальных генов. Дивергенция по белкам VP4 (OC1) и VP6 (Hel) между CNUV и BAKV составляет около 50%. Даже у близкородственных штаммов, изолированных в одном географическом регионе и обладающих высокой степенью гомологии консервативных генов (90 – 95%), дивергенция по VP4 (OC1) и VP6 (Hel) достигает значений, которые соответствуют разным серотипам (74,1 – 82,2%).

Ключевые слова: *Orbivirus*; антигенный комплекс Кемерово; арбовирусы; вирус Ченуда; вирус Баку; *Argasidae*; эволюция вирусов.

Для цитирования: Еремян А.А., Львов Д.К., Щетинин А.М., Дерябин П.Г., Аристова В.А., Гительман А.К., Ботиков А.Г., Альховский С.В. Генетическое разнообразие вирусов вида *Chenuda virus* (*Orbivirus*, *Reoviridae*), циркулирующих в Средней Азии. *Вопросы вирусологии*. 2017; 62 (2): 81-86.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-2-81-86>

Eremyan A.A., Lvov D.K., Shchetinin A.M., Deryabin P.G., Aristova V.A., Gitelman A.K., Botikov A.G., Alkhovsky S.V.

GENETIC DIVERSITY OF VIRUSES OF CHENUDA VIRUS SPECIES (*ORBIVIRUS*, *REOVIRIDAE*) CIRCULATING IN CENTRAL ASIA

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

Chenuda virus (CNUV) (*Orbivirus*, *Reoviridae*) is the only known orbivirus associated with argas (*Argasidae*) ticks. Scientific study of this group is necessary for understanding of *Orbivirus* genus evolution patterns. We conducted a comparative analysis of full genomes of five different viruses of *Chenuda virus* species, including Baku virus strains (BAKV) circulating in a rather limited area in the Central Asia and Transcaucasia. It was shown that VP4(OC1) and VP6(Hel) proteins variability greatly exceeds the variability of other proteins. The divergence between CNUV and BAKV in this proteins is about 50%. Even in closely related strains isolated from the same geographical region, the conservative genes of which are 90-95% identical, the VP4(OC1) and VP6(Hel) divergence reaches values that would usually be indicative of different serotypes (74.1-82.2%).

Keywords: *Orbivirus*; Kemerovo antigenic complex; arboviruses; *Chenuda virus*; Baku virus; *Argasidae*; virus evolution.

For citation: Eremyan A.A., Lvov D.K., Shchetinin A.M., Deryabin P.G., Aristova V.A., Gitelman A.K., Botikov A.G., Alkhovsky S.V. Genetic diversity of viruses of *Chenuda virus* species (*Orbivirus*, *Reoviridae*) circulating in Central Asia. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2017; 62(2): 81-86. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-2-81-86>

For correspondence: Sergey V. Alkhovsky, Ph.D., Head of the Laboratory of biotechnology, D.I. Ivanovsky Institute of Virology, Federal State Budgetary Institution “N.F. Gamaleya Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology”, 123098, Moscow, Russian Federation.
E-mail: salkh@ya.ru

Information about authors:

Lvov D.K., <http://orcid.org/0000-0001-8176-6582>
Deryabin P.G., <https://orcid.org/0000-0002-8522-9554>

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

Received 28 November 2016
Accepted 13 December 2016

Для корреспонденции: Альховский Сергей Владимирович, канд. биол. наук, руководитель лаборатории биотехнологии Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, Москва. E-mail: salkh@ya.ru

Введение

Род *Orbivirus* входит в семейство Reoviridae, которое объединяет вирусы с сегментированным двухцепочечным РНК-геномом (9–12 сегментов) и сложно устроенным «трехслойным» капсидом, лишенным липидной оболочки [1]. К роду *Orbivirus* принадлежат многие важные патогены сельскохозяйственных животных, среди которых вирус синего языка (*Bluetongue virus*, BTV), вирус африканской чумы лошадей (*African horse sickness virus*, AHSV), вирус перуанской болезни лошадей (*Peruvian horse sickness virus*, PHSV), вирус эпизоотической геморрагической болезни (*Epizootic hemorrhagic disease virus*, EHDV) и ряд других [2–4]. Вирусы Кемерово (KEMV), Трибеч (TRBV) и Липовник (LIPV), циркулирующие на территории России и Восточной Европы, способны вызывать лихорадочное заболевание человека, часто протекающее с явлениями поражения ЦНС [5–7].

Орбивирусы являются арбовирусами, т. е. передаются позвоночным посредством кровососущих членистоногих переносчиков, причем в зависимости от переносчика орбивирусы делятся на 3 экологические группы: передающиеся мокрецами, комарами и клещами. Согласно последнему отчету Международного комитета по таксономии вирусов (ICTV), клещевые орбивирусы представлены 4 видами (*Great Island virus*, *Wad Medani virus*, *Chenuda virus* (CNUV), и *Chobar gorge virus*), каждый из которых в свою очередь экологически связан с определенными видами иксодовых (Ixodidae) или аргасовых (Argasidae) клещей [1, 8]. Вирусы вида *Chenuda virus* экологически связаны с аргасовыми клещами и их прокормителями птицами [8]. На территории Северной Евразии несколько штаммов вируса Баку (*Baku virus*, BAKV), принадлежащего к этому виду, были изолированы от чайки (*Larus argentatus*) и клещей *Ornithodoros capensis*, собранных в колониях морских птиц на Западном и Восточном побережьях Каспийского моря [9–11]. Один штамм BAKV был изолирован от клещей *O. coniceps*, собранных в гнездах голубей в Узбекистане [12].

Геном орбивирусов представлен 10 сегментами двухцепочечной РНК (Seg-1–Seg-10), которые кодируют 12 вирусных белков [13, 14]. Помимо 7 структурных белков VP1 (RdRp), VP2 (T2), VP3 (CaP), VP4 (OC1), VP5 (OC2), VP6 (Hel), VP7 (T13), входящих в состав вириона, в инфицированных клетках обнаруживаются 5 вирусспецифических неструктурных белков NS1 (TuP), NS2 (ViP), NS3/NS3a, NS4 [15]. Гены полимеразы VP1 (RdRp), субкора VP2 (T2) и кора VP7 (T13) являются наиболее консервативными, и на их сравнительном анализе основана современная классификация орбивирусов [16–20]. В основе эволюции орбивирусов, как и других РНК-содержащих вирусов, лежит процесс формирования квазивидов, из которых под действием отбора формируются новые популяции штаммов (генетический дрейф), циркулирующие в определенных экологических условиях. Кроме того, определенное значение в эволюции орбивирусов имеет реассортация геномных сегментов (генетический сдвиг (англ. shift), присущая всем РНК-содержащим вирусам с сегментированным геномом (Bunyaviridae, Orthomyxoviridae и др.) [21, 22]. Как показано для BTV (прототипный представитель рода *Orbivirus*, передается мокрецами Heleidae, *Culicoides*), скорость изменчивости различных сегментов генома варьирует от $0,52 \cdot 10^{-4}$ до $6,0 \cdot 10^{-4}$ нуклеотидных замен на 1

сайт в год [23]. Также варьирует способность отдельных сегментов генома к участию в реассортации. Эволюционное значение столь разной изменчивости отдельных сегментов генома и их роль в формировании фенотипа орбивирусов не до конца выяснены (см. обзор [24]). При этом внутривидовая гетерогенность клещевых орбивирусов, занимающих отличную от BTV экологическую нишу, остается практически неизученной. Между клещевыми орбивирусами одного вида также возможна реассортация геномных сегментов [25, 26], хотя природные реассортанты сегодня не описаны. С целью выявления внутривидовой гетерогенности и изменчивости разных сегментов генома клещевых орбивирусов в настоящей работе проведен сравнительный полногеномный анализ 5 различных вирусов, принадлежащих к виду *Chenuda virus*. *Chenuda virus* является единственным известным на сегодняшний день видом орбивирусов, экологически связанным с аргасовыми клещами, и изучение этой группы вирусов необходимо для понимания общих закономерностей эволюции вирусов рода *Orbivirus*. Из 5 вирусов, исследованных в работе, 4 (штаммы CNUV и BAKV) являются представителями вирусных популяций, циркулирующих на относительно ограниченной территории в Центральной Азии и Закавказье. В работе показано, что даже у близкородственных штаммов клещевых орбивирусов, изолированных в одном географическом регионе и обладающих высоким сходством консервативных генов, уровень дивергенции отдельных генов (сегментов) широко варьирует и может достигать 50%.

Материал и методы

Использованные штаммы. Список использованных штаммов представлен в таблице. Штаммы были получены из Государственной коллекции вирусов Российской Федерации при ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России в виде лиофилизированной мозговой суспензии. Восстановленной суспензией (0,2 мл) проводили интрацеребральное заражение новорожденных беспородных белых мышей. После развития симптомов поражения ЦНС (2–4 сут) мышей забивали в соответствии с правилами этичного содержания и использования лабораторных животных. Осветленную суспензию мозга (10%) далее использовали для заражения клеток ВНК. После появления цитопатического действия (3–4-й день) собирали культуральную жидкость и концентрировали вирус методом ультрацентрифугирования (1 ч, 30 000 об/мин) через 20% сахарозную подушку.

Выделение РНК. Осадок вируса растворяли в 1 мл реагента ExtractRNA («Евроген», Россия) и затем проводили выделение РНК в соответствии с инструкцией производителя.

Подготовка библиотек и секвенирование. Для получения кДНК 50 нг препарата РНК фрагментировали в 15 мкл реакционной смеси для обратной транскриптазы с гексапраймером и смесью dNTP при 94 °C в течение 5 мин, после чего помещали в лед. К фрагментированной РНК добавляли 200 ед. фермента RevertAid Premium («Thermo Scientific», США) и 20 ед. ингибитора РНКаз RNasin («Promega», США). Инкубировали при 25 °C 10 мин, далее при 42 °C 60 мин. Реакцию останавливали прогреванием при 70 °C 10 мин. Синтез второй цепи кДНК проводили с использованием набора NEBNext® mRNA Second Strand Synthesis Module («NEB», США) в соответствии с инструкцией. Полученную кДНК очи-

Штаммы, использованные в работе

Вирус	Штамм	Место изоляции (год)	Источник изоляции	Биотоп	Номер депонента GenBank
BAKV	LEIV-46Azn	Азербайджан, Бакинский архипелаг (1970)	Клещи <i>O. capensis</i>	Гнезда чайки	KJ191548–57
	LEIV-2275Uz	Узбекистан, Паркент (1972)	То же	Голубятня	KY023339–48
	LEIV-2826Tur	Туркмения, залив Кара-Богаз-Гол (1973)	" "	Гнезда чайки	KY023349–58
CNUV	EgAr1170	Египет, д. Ченуда в дельте Нила (1954)	Клещи <i>A. reflexus</i>	Голубятня	–
	LEIV-7453Tur	Туркмения, водохранилище Маметкель (1973)	Комары <i>Culex modestus</i>	Колония воробьев	KP311318–26

щали с использованием набора MinElute PCR Purification Kit ("QIAGEN", Германия).

Для получения ДНК библиотек из дцДНК использовали набор TruSeq DNA Sample Prep Kits v2 ("Illumina", США) в соответствии с инструкцией. Полученные библиотеки визуализировали на станции автоматического электрофореза QIAxcel Advanced System ("QIAGEN", Германия). Молярность полученных библиотек измеряли методом ПИП в реальном времени (2x SsoFast EvaGreen Supermix ("Bio-Rad", США), прибор Bio-Rad CFX1000) согласно рекомендациям, изложенным в руководстве "Sequencing Library qPCR Quantification Guide" ("Illumina", США). Секвенирование ДНК-библиотек проводили на приборе MiSeq ("Illumina", США) с использованием набора MiSeq Reagent Kits V2 (300PE) в соответствии с инструкцией производителя.

Биоинформационный анализ. Обработку данных полногеномного секвенирования, сборку контигов и картирование ридов проводили с использованием программы CLC Genomics Workbench 5.5 («CLC bio», США). Предварительный поиск гомологичных последовательностей выполняли с помощью сервиса BLASTX (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Для подбора праймеров, множественного выравнивания, анализа нуклеотидных и аминокислотных последовательностей использовали пакет программ Lasergene Core Suite («DNASTAR», США). Выравнивание последовательностей проводили по алгоритму ClustalW. Генетическая дистанция определена по модели p-distance с попарным удалением гэпов. Филогенетический анализ проводили с использованием программ MrBayes, в которых применяется байесовское моделирование (<http://mrbayes.sourceforge.net/>). Анализ по алгоритму максимального правдоподобия (maximum likelihood) с 1000-кратным бутстреп-тестированием выполняли с использованием программы MEGA7. Дендрограммы визуализировали с помощью программы TreeGraph 2.0 (<http://treegraph.bioinfweb.info/>).

Результаты и обсуждение

В результате секвенирования для каждого штамма были определены полные последовательности кодирующих областей всех десяти сегментов генома. Полученные последовательности депонированы в базу данных GenBank (см. таблицу). Размер и структура геномных сегментов вирусов BAKV, а также прототипного штамма CNUV EgAr1170 совпадают с ранее опубликованными для *Chenuda virus* данными [9, 27]. С другими видами клещевых орбивирусов, *Great Island virus*, *Wad Medani virus* и *Chobar Gorge virus*, для которых доступны геномные данные, он имеет от 15 до 64,4% гомологии.

Результаты попарного сравнения нуклеотидных и аминокислотных последовательностей сегментов генома между изученными штаммами представлены на рис. 1.

Группа штаммов BAKV, изолированных в Средней Азии, имеет с прототипным вирусом CNUV EgAr1170 (идентичен прототипному EGY1954/01) в среднем 81,5, 88 и 87,5% гомологии по аминокислотным последовательностям белков VP1 (Pol), VP2 (T2) и VP7 (T13) соответственно. Данные значения подтверждают принадлежность BAKV к виду *Chenuda virus* согласно критериям, принятым ICTV. Между собой штаммы BAKV имеют высокий уровень сходства по данным белкам (89–99,9%), однако среди них несколько выделяется штамм LEIV-7453Tur, который изначально был классифицирован как CNUV на основе антигенных реакций (Львов Д. К., личное сообщение). Хотя штамм LEIV-7453Tur имел антигенные отличия от штаммов BAKV, генетически данный штамм более близок к BAKV, чем к CNUV, по всем сегментам генома. Два наиболее генетически близких друг другу штамма BAKV LEIV-46Azn и LEIV-2826Tur, изолированные от клещей *O. capensis* в одном географическом регионе (побережье Каспийского моря), имеют высокий уровень сходства (96,9–99,9%) по консервативным генам. Штамм LEIV-2275Uz, изолированный от клещей *O. coniceps* в Узбекистане (в другой экологической системе), по генам VP1 (Pol), VP2 (T2) и VP7 (T13) имеет 95,3–97,9% идентичности с указанными выше штаммами.

VP1 (Pol) представляет собой вирусную РНК-зависимую РНК-полимеразу и является одним из наиболее консервативных белков у вирусов семейства Reoviridae [1]. Между тем уровень идентичности белка VP1 (Pol) в рассматриваемой группе штаммов BAKV несколько ниже (89–95%), чем структурного белка VP2 (T2) (94,5–98%). Согласно полученным данным, к консервативным внутри данного вида генам можно также отнести гены минорного белка кэппирующего фермента VP3 (CaP), белка внешнего капсида VP5 (OC2) и неструктурных белков NS1 (TuP), NS2 (ViP) и NS3, уровень идентичности которых у исследованных штаммов лишь незначительно ниже, чем VP1 (Pol), VP2 (T2) и VP7 (T13) во всех парных группах сравнения (см. рис. 1). С другой стороны, уровень дивергенции последовательностей белков внешнего капсида VP4 (OC1) и хеликазы VP6 (Hel) и NS4 значительно превышает показатели, полученные для консервативных генов. Уровень идентичности аминокислотной последовательности белка VP4 (OC1) у различных штаммов BAKV составляет 70,9–76,2%, а между BAKV и CNUV – 47–48,3%. По белку VP6 (Hel) штаммы BAKV имеют 49,8–52% сходства с CNUV. У различных штаммов BAKV уровень гомологии VP6 (Hel) варьирует от 70,1% (при сравнении с LEIV-7453Tur) до 82,2% идентичных аминокислотных остатков. Кроме белка VP6 (Hel), в сегменте 9 орбивирусов была обнаружена дополнительная непрерывная открытая рамка считывания (ORF), предположительно

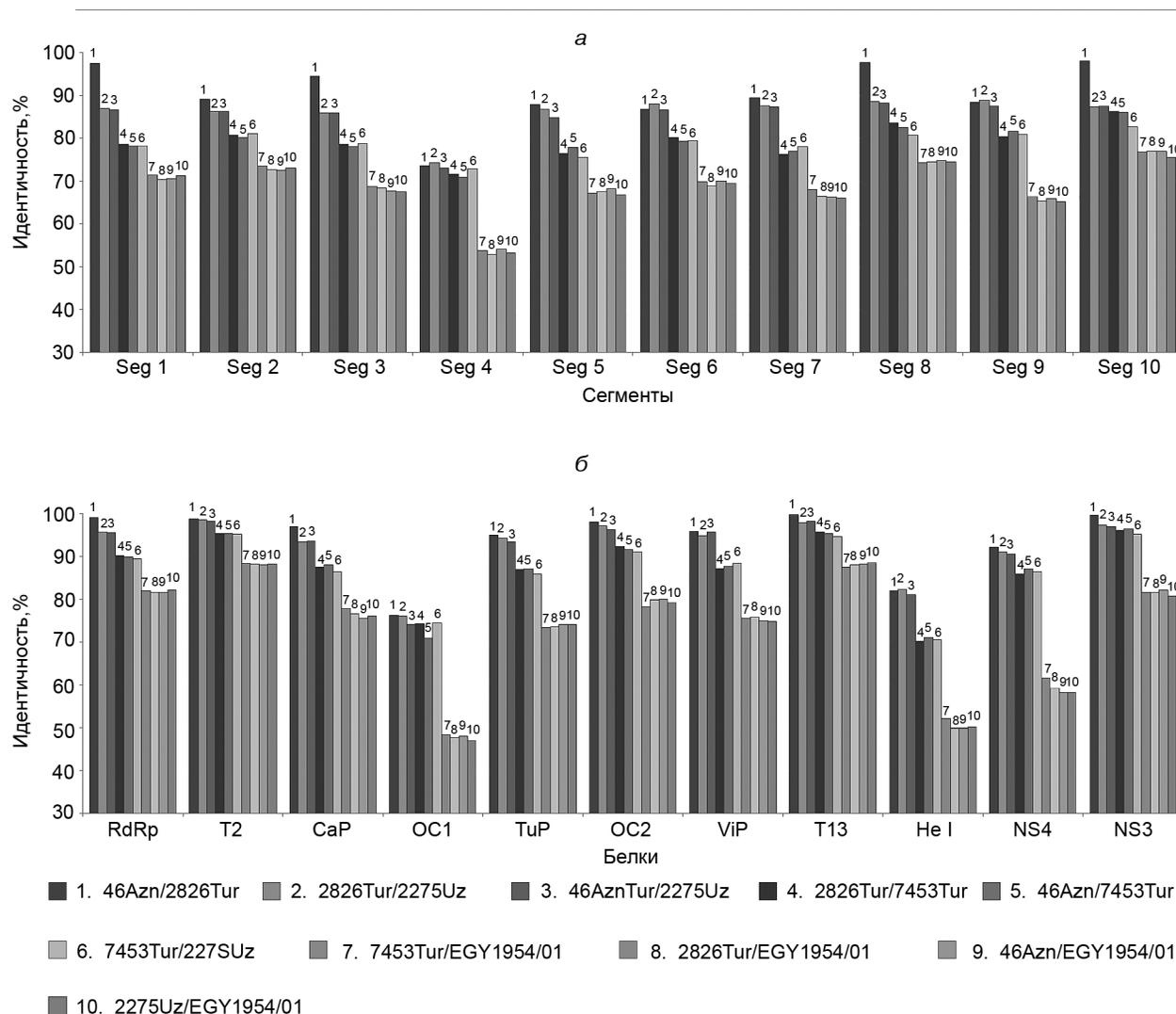


Рис. 1. Графическое представление результатов попарного сравнения нуклеотидных (а) и аминокислотных (б) последовательностей генома различных изолятов CNUV и BAKV. Для каждого сегмента/белка (ось абсцисс) представлены значения идентичности (%), ось ординат) для пар штаммов в следующей последовательности: LEIV-46Azn/ LEIV-2826Tur; LEIV-2826Tur/ LEIV-2275Uz; LEIV-46Azn/ LEIV-2275Uz; LEIV-2816Tur/ LEIV-7453Tur; LEIV-46Azn/ LEIV-7453Tur; LEIV-46Azn/ LEIV-2275Uz; LEIV-7453Tur/ EGY1954; LEIV-2826Tur/ EGY1954; LEIV-46Azn/ EGY1954; LEIV-2275Uz/ EGY1954

кодирующая белок, функция которого пока неизвестна, обозначаемого как VP6a или NS4. При этом длина ОРС у передающихся клещами орбивирусов почти в 2 раза больше, чем у передающихся мокрецами или комарами [28]. Уровень идентичности аминокислотной последовательности белка NS4 между близкими штаммами BAKV составляет 90,4–92,1%, тогда как между BAKV и CNUV – только 58,2%, причем уровень консервативности белка NS4 в любой паре сравнения превышает уровень консервативности белка VP6 (Hel).

Результаты филогенетического анализа представлены на рис. 2. Штаммы BAKV вместе с CNUV формируют самостоятельную ветвь в составе клещевых орбивирусов. Можно отметить, что топология дендрограмм, построенных на основе сравнения консервативных белков VP1 (RdRp) и VP7 (T13) (см. рис. 2, а, б), отражает экологические и географические особенности источников изоляции штаммов. Относительно штаммов BAKV из

Средней Азии прототипный штамм CNUV EgAr1170 занимает внешнее положение. Штаммы BAKV формируют 2 группы, одна из которых представлена штаммами LEIV-46Azn, LEIV-2826Tur и LEIV-2275Uz, а вторая – штаммом LEIV-7453Tur. Топология дендрограмм, построенных на основе сравнения дивергентных генов VP4 (OC1) и VP6 (Hel) (см. рис. 2, в, г), в целом совпадает с дендрограммами, построенными на основе консервативных генов, за исключением взаимного расположения штаммов BAKV внутри своей ветви. Так, в отличие от консервативных генов по белку VP4 (OC1) штамм LEIV-7453Tur группируется вместе со штаммами LEIV-2275Uz и LEIV-2826Tur, тогда как LEIV-46Azn занимает внешнее по отношению к ним положение (см. рис. 2, в). Штаммы LEIV-7453Tur, LEIV-46Azn и LEIV-2826Tur изолированы в одной географической локации, и топология дендрограммы позволяет предположить, что в их эволюционной истории произошла реассортация по сегменту 4.

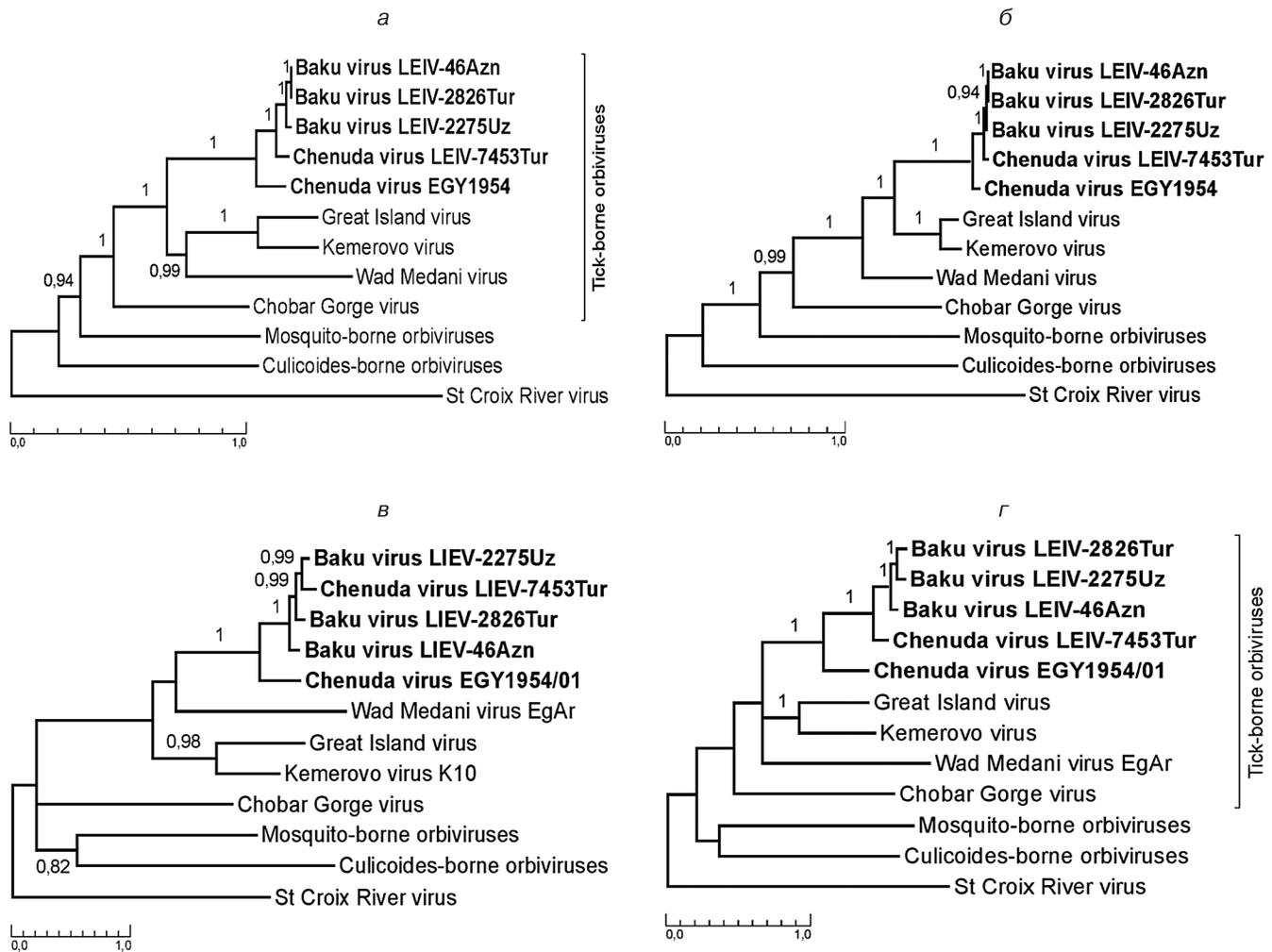


Рис. 2. Дендрогаммы, построенные с использованием алгоритма байесовского моделирования на основе сравнения полных аминокислотных последовательностей белков VP1 (RdRp) (а); VP7 (T13) (б); VP4 (OC1) (в); VP6 (Hel) (г).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что у клещевых вирусов вида *Chenuda virus* рода *Orbivirus* изменчивость генов белков VP4 (OC1) и VP6 (Hel) значительно превышает изменчивость остальных генов. Дивергенция по белкам VP4 (OC1) и VP6 (Hel) между BAKV и CNUV составляет около 50%, что соответствует разным видам, хотя эти два вируса рассматриваются как серотипы одного вида *Chenuda virus*. Даже у генетически близких штаммов BAKV LEIV-46Azn и LEIV-2826Tur, которые имеют 97,9–99,6% идентичности по консервативным белкам, дивергенция по VP4 (OC1) и VP6 (Hel) достигает значений, которые соответствуют разным серотипам (74,1–82,2%). Белок VP4 (OC1) является одним из двух белков внешнего капсида и несет на себе основные вируснейтрализующие, видо- и серотипопределяющие антигенные эпитопы. Кроме того, VP4 (OC1) является рецепторсвязывающим белком и обладает гемагглютинирующей активностью [29, 30]. Высокий уровень изменчивости белка VP4 (OC1) можно объяснить давлением иммунной системы позвоночных хозяев. Белок VP6 (Hel) наряду с VP1 (RdRp) и VP3 (CaP) участвует в образовании транскриптазного ферментативного комплекса, который осуществляет репликацию

геномной РНК [31]. VP6 (Hel) обладает хеликазной и РНК-зависимой АТФазной активностью, необходимой для транскрипции вирусных генов, а также, вероятно, участвует в упаковке геномной РНК в вирион [32, 33]. Белок VP6 (Hel) является неструктурным, его высокая степень изменчивости не связана с давлением иммунной системы. При этом нужно отметить, что белок NS4, кодируемый альтернативной ORC того же сегмента генома (Seg-9), более консервативен, чем VP6 (Hel). Это свидетельствует о действии разных селективных факторов на отдельные вирусные гены.

Таким образом, в геноме орбивирусов, экологически связанных с аргасовыми клещами, можно выделить пул относительно консервативных генов, дивергенция которых между вирусами, принадлежащими к одному виду, не превышает 12–18%. Вместе с тем даже у близкородственных штаммов, изолированных в одном географическом регионе и обладающих высоким сходством консервативных генов, дивергенция отдельных генов (сегментов) широко варьирует и может достигать 25%.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 2, 5–8, 13–33 см. REFERENCES)

3. Львов Д.К. *Вирусы и вирусные инфекции человека и животных: руководство по вирусологии*. М.: МИА; 2013.
4. Урываев Л.В., Львов Д.К. Реовирусы. В кн.: Львов Д.К., ред. *Медицинская вирусология*. М.: МИА; 2008: 202–6.
9. Альховский С.В., Львов Д.К., Щелканов М.Ю., Щетинин А.М., Дерябин П.Г., Гительман А.К. и др. Таксономия вируса Баку (Baku virus, BAKV; Reoviridae, Orbivirus), изолированного из облигатных паразитов птиц – агаровых клещей (Acari: Argasidae) в Азербайджане, Туркменистане и Узбекистане. *Вопросы вирусологии*. 2013; 58 (6): 22–6.
10. Андреев В.Л., Громашевский В.Л., Веселовская О.В. Изоляция вируса Баку в Западной части Туркменской ССР. *Экология вирусов*. 1973; (1): 96–103.
11. Львов Д.К., Громашевский В.Л., Сидорова Г.А., Тучкин Ю.М. Выделение нового арбовируса Баку группы Кемерово из агаровых клещей *Ornithodoros capensis* в Азербайджане. *Вопросы вирусологии*. 1971; (4): 434–7.
12. Сидорова Г.А., Жмаева З.М., Громашевский В.Л. Изоляция вируса Баку от клещей *Ornithodoros coniceps*, собранных в гнездовых голубей в Ташкентской области. *Экология вирусов*. 1974; (2): 102–5.

REFERENCES

1. Attoui H., Mertens P.P.C., Becnel J., Belaganahalli S., Bergoin M., Brussaard C.P. et al. Family Reoviridae. In: King A.M., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J., eds. *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee of Taxonomy of Viruses*. London: Elsevier; 2012: 541–637.
2. Attoui H., Mohd Jaafar F. Zoonotic and emerging orbivirus infections. *Rev. Sci. Tech.* 2015; 34 (2): 353–61.
3. L'vov D.K. *Viruses and Viral Infections of Humans and Animals: a Guide to Virology [Virusy i virusnye infektsii cheloveka i zhivotnykh: rukovodstvo po virusologii]*. Moscow: MIA; 2013. (in Russian)
4. Uryvaev L.V., L'vov D.K. Reovirus. In: L'vov D.K., ed. *Medical Virology*. Moscow: MIA; 2008: 202–6. (in Russian)
5. Libikova H., Heinz F., Ujhazyova D., Stunzner D. Orbiviruses of the Kemerovo complex and neurological diseases. *Med. Microbiol. Immunol.* 1978; 166 (1–4): 255–63.
6. Chumakov M.P., Sarmanova E.S., Bychkova M.V., Bannova G.G., Pivanova G.P., Karpovich L.G. et al. Identification of Kemerovo Tick-Borne Fever Virus and Its Antigenic Independence. *Fed. Proc. Transl. Suppl.* 1964; 23: 852–4.
7. L'vov D.K., Shchelkanov M.Y., Alkhovskiy S.V., Deryabin P.G. *Zoonotic Viruses of Northern Eurasia: Taxonomy and Ecology*. New York, USA: Academic Press; 2014.
8. Karabatsos N., ed. *International Catalogue of Arboviruses Including Certain Other Viruses of Vertebrates*. 3rd ed. San Antonio, Texas: American Society of Tropical Medicine and Hygiene for the Subcommittee on Information Exchange of the American Committee on Arthropod-borne Viruses; 1985.
9. Al'khovskiy S.V., L'vov D.K., Shchelkanov M.Yu., Shchetinina A.M., Deryabin P.G., Gitel'man A.K. et al. Taxonomy virus Baku (Baku virus, BAKV; Reoviridae, Orbivirus), isolated from the obligate parasites of birds – aгаровых клещей (Acari: Argasidae) in Azerbaijan, Turkmenistan and Uzbekistan. *Voprosy virusologii*. 2013; 58 (6): 22–6. (in Russian)
10. Andreev V.L., Gromashevskiy V.L., Veselovskaya O.V. Isolation of the virus in the western part of Baku Turkmen SSR. *Ekologiya virusov*. 1973; 1: 96–103. (in Russian)
11. L'vov D.K., Gromashevskiy V.L., Sidorova G.A., Tuchkin Yu.M. Isolation of a new Baku arbovirus group of Kemerovo argasids *Ornithodoros capensis* in Azerbaijan. *Voprosy virusologii*. 1971; (4): 434–7. (in Russian)
12. Sidorova G.A., Zhmaeva Z.M., Gromashevskiy V.L. Isolation of the virus from Baku tick *Ornithodoros coniceps*, collected pigeons nesting in the Tashkent region. *Ekologiya virusov*. 1974; 2: 102–5. (in Russian)
13. Mertens P.P., Brown F., Sangar D.V. Assignment of the genome segments of bluetongue virus type 1 to the proteins which they encode. *Virology*. 1984; 135 (1): 207–17.
14. French T.J., Inumaru S., Roy P. Expression of two related nonstructural proteins of bluetongue virus (BTV) type 10 in insect cells by a recombinant baculovirus: production of polyclonal ascitic fluid and characterization of the gene product in BTV-infected BHK cells. *J. Virol.* 1989; 63 (8): 3270–8.
15. Roy P., Marshall J.J., French T.J. Structure of the bluetongue virus genome and its encoded proteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1990; 162: 43–87.
16. Belaganahalli M.N., Maan S., Maan N.S., Nomikou K., Pritchard I., Lunt R. et al. Full genome sequencing and genetic characterization of Eubenberg viruses identify Pata virus as a distinct species within the genus Orbivirus. *PLoS One*. 2012; 7 (3): e31911.
17. Belaganahalli M.N., Maan S., Maan N.S., Nomikou K., Guimera M., Brownlie J. et al. Full genome sequencing of Corripata virus, identifies California mosquito pool virus as a member of the Corripata virus species. *PLoS One*. 2013; 8 (8): e70779.
18. Dilcher M., Hasib L., Lechner M., Wieseke N., Middendorf M., Marz M. et al. Genetic characterization of Tribec virus and Kemerovo virus, two tick-transmitted human-pathogenic Orbiviruses. *Virology*. 2012; 423 (1): 68–76.
19. Belaganahalli M.N., Maan S., Maan N.S., Tesh R., Attoui H., Mertens P.P. Umatilla virus genome sequencing and phylogenetic analysis: identification of stretch lagoon orbivirus as a new member of the Umatilla virus species. *PLoS One*. 2011; 6 (8): e23605.
20. Belhouchet M., Mohd Jaafar F., Tesh R., Grimes J., Maan S., Mertens P.P. et al. Complete sequence of Great Island virus and comparison with the T2 and outer-capsid proteins of Kemerovo, Lipovnik and Tribec viruses (genus Orbivirus, family Reoviridae). *J. Gen. Virol.* 2010; 91 (Pt. 12): 2985–93.
21. Briese T., Calisher C.H., Higgs S. Viruses of the family Bunyaviridae: are all available isolates reassortants? *Virology*. 2013; 446 (1–2): 207–16.
22. Wensle E.A., Chanock S.J., Krata L., Fields B.N. Genetic reassortment of mammalian reoviruses in mice. *J. Virol.* 1985; 56 (2): 613–6.
23. Carpi G., Holmes E.C., Kitchen A. The evolutionary dynamics of bluetongue virus. *J. Mol. Evol.* 2010; 70 (6): 583–92.
24. Coetzee P., Van Vuuren M., Stokstad M., Myrmel M., Venter E.H. Bluetongue virus genetic and phenotypic diversity: towards identifying the molecular determinants that influence virulence and transmission potential. *Vet. Microbiol.* 2012; 161 (1–2): 1–12.
25. Brown S.E., Morrison H.G., Knudson D.L. Genetic relatedness of the Kemerovo serogroup viruses: III. RNA-RNA blot hybridization and gene reassortment in vitro of the Chenuda serocomplex. *Acta Virol.* 1989; 33 (3): 221–34.
26. Brown S.E., Morrison H.G., Knudson D.L. Genetic relatedness of the kemerovo serogroup viruses: II. RNA-RNA blot hybridization and gene reassortment in vitro of the Great Island serocomplex. *Acta Virol.* 1989; 33 (3): 206–20.
27. Belaganahalli M.N., Maan S., Maan N.S., Brownlie J., Tesh R., Attoui H. et al. Genetic characterization of the tick-borne orbiviruses. *Viruses*. 2015; 7 (5): 2185–209.
28. Belhouchet M., Mohd Jaafar F., Firth A.E., Grimes J.M., Mertens P.P., Attoui H. Detection of a fourth orbivirus non-structural protein. *PLoS One*. 2011; 6 (10): e25697.
29. Balasuriya U.B., Dobbe J.C., Heidner H.W., Smalley V.L., Navarrette A., Snijder E.J. et al. Characterization of the neutralization determinants of equine arteritis virus using recombinant chimeric viruses and site-specific mutagenesis of an infectious cDNA clone. *Virology*. 2004; 321 (2): 235–46.
30. White J.R., Boyd V., Brangwyn J.K., Duch C.J., Pritchard L.I., Melville L.F. et al. Characterisation and monitoring of neutralisation-resistant VP2 phenotypes in BTV-1 isolates from northern Australia collected over a twenty-year period. *Vet. Ital.* 2004; 40 (4): 508–12.
31. Roy P., Adachi A., Urakawa T., Booth T.F., Thomas C.P. Identification of bluetongue virus VP6 protein as a nucleic acid-binding protein and the localization of VP6 in virus-infected vertebrate cells. *J. Virol.* 1990; 64 (1): 1–8.
32. Matsuo E., Roy P. Bluetongue virus VP6 acts early in the replication cycle and can form the basis of chimeric virus formation. *J. Virol.* 2009; 83 (17): 8842–8.
33. Stauber N., Martinez-Costas J., Sutton G., Monastyrskaya K., Roy P. Bluetongue virus VP6 protein binds ATP and exhibits an RNA-dependent ATPase function and a helicase activity that catalyze the unwinding of double-stranded RNA substrates. *J. Virol.* 1997; 71 (10): 7220–6.

Поступила 28.11.16

Принята в печать 13.12.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017
УДК 616.98:578.825.11/.12]-078/33

Никитина А.В.¹, Помелова В.Г.¹, Осин Н.С.², Марданлы С.Г.³

МУЛЬТИПЛЕКСНЫЙ ИММУНОАНАЛИЗ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ G К ВИРУСАМ ПРОСТОГО ГЕРПЕСА 1-го И 2-го ТИПОВ И ЦИТОМЕГАЛОВИРУСУ НА ОСНОВЕ ТЕХНОЛОГИИ ФОСФАН

¹ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт биологического приборостроения» Федеральное медико-биологическое агентство России, 125424, г. Москва;

²Закрытое акционерное общество «Иммюноскрин», 125424, г. Москва;

³Закрытое акционерное общество «ЭКОлаб», 142530, г. Электрогорск

Разработан иммуночип для определения иммуноглобулинов G к вирусам простого герпеса 1-го и 2-го типов (ВПГ-1, ВПГ-2) и цитомегаловирусу (ЦМВ) на основе технологии ФОСФАН™. В состав иммуночипа включены рекомбинантные вирусспецифические антигены gG1 (ВПГ-1), gG2 (ВПГ-2), лизатный антиген для определения общих IgG к ВПГ обоих типов (ВПГ-1/2) и мозаичный антиген ЦМВ, содержащий иммунодоминантные последовательности белков pp150, gB, pp28 и pp52. Чувствительность и специфичность одновременного выявления IgG на иммуночипе с рекомбинантными антигенами были сопоставимы с показателями коммерческих иммуноферментных тест-систем, в том числе при анализе сывороток контрольных панелей. Лизатный антиген при сопоставимой чувствительности продемонстрировал существенно более низкую специфичность, что не позволяет рекомендовать его использование в качестве компонента мультиплексного теста. Полученные результаты могут быть положены в основу создания коммерческих мультиплексных тестов для высокопроизводительного скрининга этих и других инфекций TORCH-комплекса в клинической лаборатории.

Ключевые слова: мультиплексный иммуноанализ на основе технологии ФОСФАН; вирус простого герпеса 1-го типа; вирус простого герпеса 2-го типа; цитомегаловирус; иммуноглобулин G; серологические исследования.

Для цитирования: Никитина А.В., Помелова В.Г., Осин Н.С., Марданлы С.Г. Мультиплексный иммуноанализ для выявления иммуноглобулинов G к вирусам простого герпеса 1-го и 2-го типов и цитомегаловирусу на основе технологии ФОСФАН. *Вопросы вирусологии*. 2017; 62 (2): 87-90.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-2-87-90>

Nikitina A.V.¹, Pomelova V.G.¹, Osin N.S.², Mardarly S.G.³

MULTIPLEX IMMUNOASSAY FOR DETECTION OF IMMUNOGLOBULIN G TO HERPES SIMPLEX VIRUS TYPES 1, 2 AND CYTOMEGALOVIRUS BASED ON PHOSPHAN TECHNOLOGY

¹ State Research Institute of Biological Engineering, Moscow, 125424, Russian Federation;

² Immunoscreen, Closed Joint Stock Company, Moscow, 125424, Russian Federation;

³ Ekolab, Closed Joint Stock Company, Elektrogorsk, 142530, Russian Federation

We have developed a multiplex immunoassay test (immunochip) based on PHOSPHAN technology for the detection of immunoglobulin G to herpes simplex virus (HSV) types 1, 2 and cytomegalovirus (CMV). The immunochip consists of HSV type specific gG1 (HSV-1) and gG2 (HSV-2) recombinant antigens, the lysate antigen for detection of total IgG to both HSV types (HSV 1/2), and CMV specific chimeric recombinant antigen containing the immunodominant sequences of pp150, gB, pp28 and pp52 proteins. The sensitivity and specificity of simultaneous IgGs detection with recombinant proteins were comparable to the commercial ELISA kits regardless of the kind of investigated serum specimens (patient sera, standard serum panels). The lysate HSV antigen was as sensitive but significantly less specific, so that it could not be recommended for use as a component of the multiplex test. These results can be used as a basis for creating commercial multiplex tests intended for high-productive screening of HSV, CMV and other TORCH-infections in a clinical laboratory.

Key words: PHOSPHAN-based multiplex immunoassay; HSV-1; HSV-2; CMV; immunoglobulin G; serologic investigations.

For citation: Nikitina A.V., Pomelova V.G., Osin N.S., Mardarly S.G. Multiplex immunoassay for detection of immunoglobulin G to herpes simplex virus types 1, 2 and cytomegalovirus based on PHOSPHAN technology. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2017; 62(2): 87-90. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-2-87-90>

For correspondence: Anna V. Nikitina, Ph.D. student, Laboratory of molecular diagnostics, State Research Institute of Biological Engineering, Moscow, 125424, Russian Federation.

E-mail: an-na-nikitina@ya.ru

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

Received 15 March 2016

Accepted 11 October 2016

Для корреспонденции: Никитина Анна Викторовна, аспирант лаборатории молекулярных методов диагностики инфекционных и соматических заболеваний ФГУП «ГосНИИ биологического приборостроения» ФМБА РФ, 125424, г. Москва. E-mail: an-na-nikitina@ya.ru

Герпесвирусные инфекции, вызываемые вирусами простого герпеса 1-го и 2-го типов (ВПГ-1, ВПГ-2), занимают значительное место в структуре заболеваний, передающихся половым путем, и особенно опасны во время беременности и в неонатальном периоде. Определение иммунного статуса у женщин, планирующих беременность, лежит в основе формирования групп риска для последующего наблюдения (при негативном результате обследования на IgG) или назначения своевременного этиотропного лечения в случае выявления активной инфекции [1, 2]. Типоспецифическое (раздельное) определение IgG к ВПГ-1 и ВПГ-2 позволяет прогнозировать вероятность рецидивов и атипичных проявлений генитального герпеса, которые при ВПГ-2 наблюдаются чаще, чем при ВПГ-1 [3, 4]. Кроме того, инфекция ВПГ-1 не предотвращает заражение ВПГ-2, что определяет риск заражения сексуальных партнеров [5–7] и повышает до 30–50% риск неонатального герпеса, если заражение ВПГ-1 или ВПГ-2 произошло к концу беременности [8, 9].

Сложность создания тестов для раздельного обнаружения антител к ВПГ-1 и ВПГ-2 объясняется сходством структуры генома двух вирусов. Это выражается в близости их биологических свойств и высокой степени антигенной кросс-реактивности [10]. Гликопротеины оболочки вириона gG1 (ВПГ-1) и gG2 (ВПГ-2) – практически единственные белки, которые вследствие низкой степени гомологии аминокислотного состава (менее 30%) [11] и различной доступности распознающих антигена ключевых эпитопов [12] могут быть использованы для типоспецифического определения антител.

Для выполнения серологических исследований используются преимущественно монотесты на основе иммуноферментного анализа (ИФА). Совершенствование методов лабораторной диагностики связывают с разработкой мультиплексных технологий, позволяющих снизить трудоемкость и стоимость исследований за счет проведения анализа на несколько инфекций одновременно [13–15].

Цель наших исследований состояла в разработке иммуночипа, способного обеспечить решение трех диагностических задач одновременно: определить общие иммуноглобулины G к обоим типам ВПГ (ВПГ-1/2); провести типоспецифическую дифференциацию IgG к ВПГ-1 и ВПГ-2; определить IgG к цитомегаловирусу (ЦМВ), этот вирус наряду с ВПГ входит в комплекс так называемых TORCH-инфекций, играющих важную роль в патологии плода и новорожденного.

Для создания мультиплексного теста была применена биочип-технология ФОСФАН™ [16], эффективность которой для серологической диагностики ряда инфекций была продемонстрирована ранее [17]. Для решения поставленных задач в состав иммуночипа, помимо рекомбинантных белков gG1 и gG2, были включены лизатные антигены ВПГ и рекомбинантный мозаичный антиген ЦМВ. Оценка чувствительности и специфичности проводилась в сравнении с коммерческими иммуноферментными тест-системами.

Материал и методы

Клинический материал. В работе использованы сыворотки крови больных ($n = 250$), проходивших обследование в городской клинической инфекционной больнице № 1 г. Москвы, охарактеризованные по наличию IgG к ЦМВ, ВПГ 1-го и 2-го типов в коммерческих иммуно-

ферментных тест-системах. Из числа этих сывороток 64 (25,6%) содержали IgG только к одному из возбудителей, 106 (42,4%) – к двум и 56 (22,4%) – к трем возбудителям; в 24 (9,6%) пробах антитела не выявлены ни к одному из вирусов. Все пробы до исследования хранили в виде аликвот при -20°C . Проводили не более двух циклов замораживания и оттаивания.

Выполнение ИФА. IgG к ЦМВ, ВПГ 1-го и 2-го типов выявляли в иммуноферментных тест-системах CMV-IgG-ELISA PKS («Medac», Германия), Anti-HSV-1 ELISA (IgG), Anti-HSV-2 ELISA (IgG) («EUROIMMUN», Германия) соответственно. Положительные результаты анализа на ВПГ-1/2 получали суммированием положительных результатов раздельного тестирования на каждый тип ВПГ в соответствующей тест-системе. Результаты учитывали и анализировали в соответствии с инструкцией производителя.

Антигены для ФОСФАН. В составе иммуночипа для одновременного определения IgG использовали рекомбинантный мозаичный антиген, содержащий иммунодоминантные последовательности белков pp150, pp52, pp28 и gB ЦМВ, смесь очищенных культуральных цельновирионных антигенов ВПГ-1 и ВПГ-2, штаммы MS и G (АТСС), а также рекомбинантные антигены gG1 и gG2 ВПГ 1-го или 2-го типа соответственно (все препараты производства ЗАО «ЭКОлаб»).

Эти антигены были напечатаны на дне лунки стандартного 96-луночного полистиролового микропланшета («Нунк», Дания) с помощью наноплоттера для контактной печати (ЗАО «Иммуноскрин») по 4 микрозоны (диаметром 0,5 мм) на каждый антиген (всего 16 микрозон). Концентрация антигенов для печати 100 мкг/мл. Буфер для сорбции – 0,1 М карбонатно-бикарбонатного буфера, pH 9,6, содержащий 5% глицерина («Sigma», США). После инкубации в течение суток при $2-8^{\circ}\text{C}$ и последующей трехкратной отмывки и блокировки (1 ч при 37°C) микропланшет высушивали, помещали в пластиковый пакет и хранили до исследования в холодильнике.

Выполнение мультиплексного теста. ФОСФАН проводили по методикам, аналогичным описанным ранее [17]. Исследуемые образцы сыворотки крови, предварительно разведенные 1:100 в 0,01 М фосфатно-солевого буфера, pH 7,4, вносили по 100 мкл в лунки микропланшета с напечатанными антигенами и инкубировали 2 ч на шейкере при комнатной температуре. Затем вносили биотинилированные моноклональные антитела к IgG человека и универсальный проявляющий реагент (конъюгат стрептавидина с Pt-копропорфирином). После промывания и высушивания микропланшета регистрировали результаты анализа с помощью фосфоресцентного биочип-анализатора ИФИ-04 (ФГУП «ГосНИИБп»). Результат исследования пробы считали положительным (IgG выявлены), если коэффициент позитивности (К поз.) сыворотки с данным антигеном был выше или равен 1. Значения К поз. рассчитывали относительно порогового уровня (ПУ) интенсивности фосфоресценции, определенного предварительно в оптимизационных экспериментах, как описано ранее [17]. Значения ПУ составили 50, 30, 150 или 400 импульсов для определения IgG к ЦМВ, ВПГ-1/2, ВПГ-1 и ВПГ-2 соответственно.

Контрольные материалы. Для оценки качества измерений методом ФОСФАН использовали 2 стандартные панели положительных контрольных сывороток из 20 проб каждая с известным содержанием IgG к ЦМВ (Стан-

Таблица 1

Частота выявления положительных проб, содержащих IgG к ЦМВ, ВПГ-1 и ВПГ-2, а также суммарных антител к ВПГ обоих типов, методами ИФА и ФОСФАН

Возбудитель	Количество положительных проб в ИФА		Количество положительных проб в ФОСФАН	
	абс.	%	абс.	%
ЦМВ	191	76,4 [71,1–81,7]	185	74,0 [68,5–79,5]
ВПГ-1 и ВПГ-2	193*	77,2 [72,0–82,4]	187**	74,8 [69,4–80,2]
ВПГ-1	191	76,8 [71,5–82,1]	185	74,0 [68,5–79,5]
ВПГ-2	61	24,4 [19,1–29,8]	59	23,6 [18,3–28,9]

Примечание. В скобках указан 95% доверительный интервал показателя частоты; * – число проб, полученное суммированием положительных результатов в двух иммуноферментных тест-системах для типоспецифического определения ВПГ-1 или ВПГ-2; ** – число положительных проб с лизатным антигеном ВПГ-1/2, выявляющим суммарные IgG в ФОСФАН.

дарт AT-G (+/-) ЦМВ, ОСО42-28-360-01, ЗАО «МБС», Новосибирск и Anti-CMV Mixed Titer Performance Panel, «SeraCare Life Sciences Inc.», США) и панель из 20 сывороток, содержащих IgG к ВПГ-1, в том числе в 2 пробах, сочетавшихся с IgG к ВПГ-2 (Стандарт AT-G (+/-) ВПГ, ОСО42-28-373-04, ЗАО «МБС», Новосибирск). Эти панели включали также отрицательные контрольные сыворотки, в которых не выявлены IgG к ЦМВ ($n = 17$) или ВПГ обоих типов ($n = 16$).

Статистическая обработка результатов. Выявление статистически значимых различий выборок по качественным показателям (сравнение долей) проводили с помощью точного двустороннего критерия Фишера для уровня статистической значимости $p \leq 0,05$.

Результаты

При анализе методом ФОСФАН частота положительных проб с IgG, выявляемых с рекомбинантными антигенами ЦМВ, ВПГ-1 или ВПГ-2, составила 74% (68,5–79,5%), 74% (68,5–79,5%) и 23,6% (18,3–28,9%) соответственно (в скобках приведено значение 95% доверительного интервала показателя частоты). Близкие показатели чувствительности получены в коммерческих

Таблица 2

Результаты ФОСФАН при детекции IgG к ЦМВ, ВПГ-1 и ВПГ-2 и суммарных антител к ВПГ-1/2 в сыворотках крови пациентов ($n = 250$)

Характеристика сывороток пациентов в ИФА	Число проб	Количество положительных проб в ФОСФАН, содержащих IgG к вирусу (в %):			
		ЦМВ	ВПГ-1/2	ВПГ-1	ВПГ-2
Выявлены IgG к вирусу:					
ЦМВ	33	29	2	0	0
ВПГ-1	31	3	29	30	0
ЦМВ и ВПГ-1	101	99	99	98	0
ВПГ-1 и ВПГ-2	4	1	4	4	4
ЦМВ и ВПГ-2	1	1	0	0	1
ЦМВ, ВПГ-1 и ВПГ-2	56	56	55	53	54
Не выявлены IgG					
	24	0	1	0	0

Таблица 3

Результаты выявления IgG к ЦМВ, ВПГ-1 и ВПГ-2 в сыворотках контрольных панелей методом ФОСФАН

Характеристика контрольных сывороток в ИФА	Число проб	Количество положительных проб в ФОСФАН, содержащих IgG к вирусу (в %):			
		ЦМВ	ВПГ-1/2	ВПГ-1	ВПГ-2
Выявлены IgG к вирусу:					
ЦМВ	40	39	29	29	3
ВПГ-1 и ВПГ-2	20*	5	20	20	2
Не выявлены IgG к вирусу:					
ЦМВ	17	0	9	9	1
ВПГ-1 и ВПГ-2	16	15	3	0	0

Примечание. * – в том числе 18 проб, содержащих IgG только к ВПГ-1, и 2 пробы с IgG к ВПГ обоих типов.

иммуноферментных тест-системах, в том числе при определении суммарных антител к ВПГ обоих типов (табл. 1). Эти данные свидетельствуют о сопоставимой чувствительности мультиплексного теста, выявляющего антитела класса G к трем вирусам одновременно, и метода ИФА для отдельного определения IgG.

Наличие в сыворотках IgG к двум или трем возбудителям одновременно не влияло на чувствительность и специфичность определения IgG с гомологичным антигеном. Из общего числа проб, не содержащих IgG к ЦМВ ($n = 59$), ВПГ-1 ($n = 58$) или ВПГ-2 ($n = 189$), правильно определены 56 (94,9%), 58 (100%) и 189 (100%) проб соответственно, что свидетельствует о высокой специфичности метода ФОСФАН, предусматривающего использование рекомбинантных вирусспецифических белков. Пробы, в которых по данным ИФА антитела не выявлены ни к одному из 3 вирусов, в ФОСФАН также определены как отрицательные. Специфичность выявления суммарных антител к ВПГ с лизатным антигеном была ниже, чем с рекомбинантными белками gG1 и gG2: 94,7% против 100% (табл. 2).

Разработанный иммуночип обеспечивал правильное определение IgG к ЦМВ, ВПГ-1 и ВПГ-2 в 39 (97,5%) из 40 и в 20 (100%) из 20 положительных проб из состава контрольных панелей, содержащих антитела класса G к ЦМВ или ВПГ-1-го и 2-го типов соответственно. При анализе отрицательных проб, не содержащих IgG к ЦМВ ($n = 17$), ВПГ-1 и ВПГ-2 ($n = 16$), с рекомбинантными антигенами трех вирусов антитела не выявлены ни в одной из проб; в аналогичном исследовании с лизатным антигеном ВПГ-1/2 получено 3 ложноположительных результата (табл. 3).

Обсуждение

Иммуночип, разработанный нами на основе технологии ФОСФАН, продемонстрировал возможность правильного определения IgG одновременно к трем герпесвирусам – ЦМВ, ВПГ-1 и ВПГ-2, при этом достигнутые значения чувствительности и специфичности были сопоставимы с показателями коммерческих иммуноферментных тест-систем.

Полученные результаты подтвердили целесообразность включения в состав иммуночипа рекомбинантных антигенов gG1 и gG2 для типоспецифического определения

IgG к ВПГ 1-го и 2-го типов [11, 12], а также рекомбинантного мозаичного антигена, содержащего иммунодоминантные последовательности белков pp150, pp52, pp28 и gB, для эффективного выявления антител к ЦМВ [18].

Вопрос о целесообразности включения лизатных антигенов ВПГ-1/2 в состав иммуночипов остается дискуссионным. Скрининговые тест-системы для выявления суммарных IgG к ВПГ-1/2 по-прежнему выпускаются рядом компаний («Euroimmun», «Medac», ООО «Диагностические системы» и др.). В наших исследованиях лизатные антигены при сопоставимой чувствительности (см. табл. 1 и 3) были существенно менее специфичными (см. табл. 2 и 3). В настоящее время такие тесты не рекомендуют использовать из-за неспособности выявлять антитела к ВПГ-2 у анти- ВПГ-1-серопозитивных пациентов, ошибочной идентификации антител у пациентов, инфицированных только одним типом ВПГ, и низкой точности по сравнению с системами на основе gG1 и gG2 гликопротеинов [19, 20].

Представленные результаты могут рассматриваться как основа для создания коммерческих мультиплексных тестов для высокопроизводительного скрининга герпесвирусных и других инфекций TORCH-комплекса в клинической лаборатории.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1–17, 19, 20 см. REFERENCES)

18. Никитина А.В., Помелова В.Г., Соколова М.В., Осин Н.С., Мardanly С.Г. Выбор антигенов для определения иммуноглобулина G к цитомегаловирусу на основе технологии ФОСФАН™. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 60 (10): 36–9.

REFERENCES

1. Brown Z.A. HSV-2 specific serology should be offered routinely to antenatal patients. *Rev. Med. Virol.* 2000; 10 (3): 141–4.
2. Newton E.R. Diagnosis of perinatal TORCH infections. *Clin. Obstet. Gynecol.* 1999; 42 (1): 59–70.
3. Benedetti J.K., Corey L., Ashley R. Recurrence rates in genital herpes after symptomatic first-episode infection. *Ann. Intern. Med.* 1994; 121 (11): 847–54.
4. Koutsky L.A., Ashley R.I., Holmes K.K., Stevens C.E., Wolner-Hanssen P., Critchlow C.W. et al. The frequency of unrecognized type 2 herpes simplex virus infection among women: implications for the control of genital herpes. *Sex. Transm. Dis.* 1990; 17 (2): 90–4.
5. Sucato G., Wald A., Wakabayashi E., Vieira J., Corey L. Evidence of latency and reactivation of both herpes simplex virus (HSV-1) and HSV-2 in the genital region. *J. Infect. Dis.* 1998; 177 (4): 1069–72.
6. Kit S., Trkula D., Qavi H., Dreesman G., Kennedy R.S., Adler-Storthz

- K. et al. Sequential genital infections by herpes simplex viruses types 1 and 2: restriction nuclease analyses of viruses from recurrent infections. *Sex. Transm. Dis.* 1983; 10 (2): 67–71.
7. al Samarai A.M., Shareef A.A., Kinghorn G.R., Potter C.W. Sequential genital infections with herpes simplex virus types 1 and 2. *Genitourin Med.* 1989; 65 (1): 39–41.
8. Brown Z.A., Benedetti J., Ashley R., Burchett S., Selke S., Berry S. et al. Neonatal herpes simplex virus infection in relation to asymptomatic maternal infection at the time of labor. *N. Engl. J. Med.* 1991; 324 (18): 1247–52.
9. Brown Z.A., Selke S., Zeh J., Kopelman J., Maslow A., Ashley R.L. et al. Acquisition of herpes simplex virus during pregnancy. *N. Engl. J. Med.* 1997; 337 (8): 509–15.
10. Whitley R.J., Roizman B. Herpes simplex virus infections. *Lancet.* 2001; 357 (9267): 1513–8.
11. McGeoch D.J., Moss H.W., McNab D., Frame M.C. DNA sequence and genetic content of the HindIII I region in the short unique component of the herpes simplex virus type 2 genome: identification of the gene encoding glycoprotein G, and evolutionary comparisons. *J. Gen. Virol.* 1987; 68 (Pt.1): 19–38.
12. Tunbäck P., Bergström T., Löwhagen G.B., Høebecke J., Liljeqvist J.A. Type-specific reactivity of anti-glycoprotein G antibodies from the herpes simplex virus infected individuals is maintained by single or dual type-specific residues. *J. Gen. Virol.* 2005; 86 (Pt.2): 247–51.
13. Jiang L., Yu Z., Tang Z., Jiang T., Zhang C., Lu Z. Protein arrays based on biotin-streptavidin system for the simultaneous detection of TORCH infections. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2008; 8 (5): 2286–92.
14. Mezzasoma L., Bacarese-Hamilton T., Di Cristina M., Rossi R., Bistoni F., Crisanti A. Antigen microarrays for serodiagnosis of infectious diseases. *Clin. Chem.* 2002; 48 (1): 121–30.
15. Wu D., Wu Y., Wang L., Xu W., Zhong Q. Evaluation of a novel array-based toxoplasma, rubella, cytomegalovirus, and herpes simplex virus IgG enzyme linked immunosorbent assay and its comparison with Virion/Serion enzyme linked immunosorbent assays. *Ann. Lab. Med.* 2014; 34 (1): 38–42.
16. Osin N.S., Pomelova V.G. Multi-array immunophosphorescence technology for the detection of pathogens. In: Georgiev V.S., Western K.A., McGowan J.J., eds. *Frontiers in Research. National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH. Totowa, NJ: Humana Press; 2008.*
17. Pomelova V.G., Korenberg E.I., Kuznetsova T.I., Bychenkova T.A., Bekman N.I., Osin N.S. C6 peptide-based multiplex Phosphorescence Analysis (PHOSPHAN) for serologic confirmation of Lyme Borreliosis. *PLoS One.* 2015; 10 (7): e0130048.
18. Nikitina A.V., Pomelova V.G., Sokolova M.V., Osin N.S., Mardanly S.G. The choice of antigens for the determination of immunoglobulin G to the cytomegalovirus based PHOSPHAN™ technology. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2015; 60 (10): 36–9. (in Russian)
19. Wald A., Ashley-Morrow R. Serological testing for herpes simplex virus (HSV)-1 and HSV-2 infection. *Clin. Infect. Dis.* 2002; 35 (Suppl. 2): 173–82.
20. LeGoff J., Péré H., Bélec L. Diagnosis of genital herpes simplex virus infection in the clinical laboratory. *Virol. J.* 2014; 11: 83–99.

Поступила 15.03.16

Принята в печать 11.10.16

Морозова О.В.^{1,2}, Сашина Т.А.¹, Новикова Н.А.^{1,2}**ОБНАРУЖЕНИЕ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РЕАССОРТАНТНЫХ DS-1-ПОДОБНЫХ G1P[8]-ШТАММОВ РОТАВИРУСА ГРУППЫ А**¹ФБУН «Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, 603950, г. Нижний Новгород;²ФГБОУ «Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского», 603950, г. Нижний Новгород

В работе дана молекулярная характеристика впервые обнаруженных на территории России реассортантных DS-1-подобных G1P[8]-штаммов ротавируса группы А (РВА), которые ранее были обнаружены в Японии и Таиланде. РВА G1P[8]-генотипа с DS-1-подобным «коротким» профилем РНК-ПААГ были идентифицированы у детей, госпитализированных с гастроэнтеритом в сезон 2013–2014 гг., когда их доля составила 2,6%. Филогенетический анализ был проведен на основе установленных нуклеотидных последовательностей 4 генов (VP7, VP8* (VP4), VP6 и NSP4). Нижегородские штаммы несли аллели G1-I и G1-II гена VP7, P[8]-3 гена VP4. По гену VP6 2 нижегородских образца кластеризовались с реассортантными штаммами, изолированными на территории Японии, Таиланда и Австралии, и 2 образца, филогенетически близкие к типичным G2P[4] DS-1-подобным штаммам. По гену NSP4 реассортантные G1P[8]-штаммы кластеризовались отдельно от G3P[8] DS-1-подобных штаммов РВА, изолированных в Австралии и Таиланде. Все исследованные штаммы по анализируемому гену кластеризовались отдельно от вакцинных штаммов Rotarix и RotaTeq. На основе проведенного филогенетического анализа сделан вывод о полифилетическом происхождении реассортантных штаммов. Скорость мутаций, оцененная на основе байесовского подхода в кластерах, включающих реассортантные штаммы, составила 1.004E-3 (VP7), 1.227E-3 (VP4), 3.909E-4 (VP6), 4.014E-4 (NSP4). Анализ tMRCA показал относительную современность аллелей реассортантов: VP7 – 1998 (G1-I) и 1981 (G1-II), VP4 – 1998, VP6 – 1994, NSP4 – 1979.

Ключевые слова: ротавирус; реассортант; филогенетический анализ; байесовский анализ.

Для цитирования: Морозова О.В., Сашина Т.А., Новикова Н.А. Обнаружение и молекулярная характеристика реассортантных DS-1-подобных G1P[8] штаммов ротавируса группы А. *Вопросы вирусологии*. 2017; 62 (2): 91-96.DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-2-91-96>Morozova O.V.^{1,2}, Sashina T.A.¹, Novikova N.A.^{1,2}**DETECTION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF REASSORTANT DS-1-LIKE G1P [8] STRAINS OF ROTAVIRUS A**¹I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, 603950, Russian Federation;²Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, 603950, Russian Federation

Group A rotaviruses (RVA) are the main cause of viral gastroenteritis in children worldwide. In this study we provide the molecular characteristics of reassortant DS-1-like G1P[8] RVA strains detected in Russia for the first time. Previously, such reassortant strains were detected in Japan and Thailand. The G1P[8] RVAs with DS-1-like short electropherotype RNA-PAGE were isolated from children hospitalised with an acute gastroenteritis during the 2013-2014 period. The DS-1-like G1P[8] strains accounted for 2.6% of all RVA strains detected continuously throughout the season. A phylogenetic analysis was made on the basis of the established nucleotide sequences of genes VP7, VP8* (VP4), VP6 and NSP4. The Nizhny Novgorod strains belong to G1-I and G1-II alleles of VP7 gene and to P[8]-3 allele of VP4. According to their VP6 sequences, two Russian samples clustered with the reassortant strains isolated in Japan, Thailand and Australia and two other strains were phylogenetically close to the typical G2P[4] DS-1-like RVA. Nucleotide sequences of G1P[8] strains that belong to NSP4 gene form a separate cluster from G3P[8] DS-1-like rotaviruses detected in Thailand and Australia. The RVA alleles included in Rotarix and RotaTeq vaccine strains were clustered separately from the studied reassortant RVAs. On the grounds of phylogenetic analysis we assume a polyphyletic origin of reassortants between Wa- and DS-1-like strains. Mutation rates evaluated by Bayesian inference in clusters with reassortant RVA strains were 1.004E-3 (VP7), 1.227E-3 (VP4), 3.909E-4 (VP6), and 4.014E-4 (NSP4). Analysis of tMRCA showed relatively contemporary origin of alleles DS-1-like G1P[8] rotaviruses: VP7 – 1998 (G1-I) and 1981 (G1-II), VP4 – 1998, VP6 – 1994, NSP4 – 1979.

Key words: rotavirus; reassortant; phylogenetic analysis; Bayesian analysis.

For citation: Morozova O.V., Sashina T.A., Novikova N.A. Detection and molecular characterization of reassortant DS-1-like G1P [8] strains of rotavirus A. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2017; 62(2): 91-96. (In Russ.).DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-2-91-96>

For correspondence: Olga V. Morozova, Research assistant, Laboratory of molecular epidemiology of viral infections, I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, 603950, Russian Federation.

E-mail: olga.morozova.bsc@gmail.com

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

Received 19 September 2016

Accepted 11 October 2016

Введение

Ротавирусы группы/разновидности А (РВА), входящие в семейство Reoviridae, подсемейство Sedoreovirinae, род *Rotavirus*, являются основной причиной тяжелого гастроэнтерита у молодняка животных и детей первых лет жизни во всем мире [1]. РВА имеют геном, состоящий из 11 сегментов двунитевой РНК (днРНК), характеристики которых являются основой для современной классификации ротавирусов и слежения за эволюцией штаммов [2].

Наиболее часто встречающиеся РВА человека являются представителями Wa-подобной («длинный» электрофоретип РНК) и DS-1-подобной («короткий» электрофоретип РНК) геногрупп. Для прототипных штаммов этих геногрупп определены генотипы всех 11 сегментов днРНК: GX-P[X]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1 для Wa-подобных штаммов и G2-P[4]-I2-R2-CS-1-подобных T2-E2-H2 для DS-1-подобных штаммов [3].

Межгрупповые реассортанты РВА обнаруживаются сравнительно редко; считается, что такие варианты менее конкурентоспособны [4]. Однако в 2011–2013 гг. реассортанты Wa- и DS-1-подобных штаммов были обнаружены в Японии, Таиланде и Австралии [5–8]. В Японии была показана циркуляция G1P[8] DS-1-подобных РВА. В Австралии были обнаружены G3P[8] РВА в сочетании с остальными генами, относящимися ко второй геногруппе. В Таиланде циркулировали как G1P[8]-, так и G3P[8]-реассортанты.

В настоящее время на рынке доступны две аттенуированные вакцины: реассортантная пентавалентная вакцина RotaTeq («Merck») на базе бычьего ротавируса и моновалентная вакцина Rotarix («Glaxo Smith Kline») на базе штамма РВА человека [9, 10]. В настоящее время вакцинация против ротавирусной инфекции (РВИ) введена в национальный календарь прививок в 81 стране по всему миру [11]. В России зарегистрирована вакцина RotaTeq, применение которой регламентировано по эпидемическим показаниям¹. Чтобы оценить возможное воздействие широко проводимой во всем мире вакцинации против РВИ, необходим тщательный мониторинг циркулирующих штаммов как в довакцинальный, так и в поствакцинальный периоды.

В настоящем исследовании дана молекулярная характеристика DS-1-подобных штаммов РВА G1P[8]-генотипа, изолированных на территории Нижнего Новгорода в сезон 2013–2014 гг. На основе нуклеотидных последовательностей генов *VP7*, *VP8** (*VP4*), *VP6* и *NSP4* проведен филогенетический анализ, рассчитан уровень мутаций реассортантных штаммов и определено время ближайшего общего предка (tMRCA) аллелей изучаемых образцов.

Материал и методы

Исследовали образцы фекалий 1295 детей, госпитализированных в инфекционный стационар Нижнего Новгорода с диагнозом острого гастроэнтерита в сезон 2013–2014 гг.

Детекцию и электрофоретипирование РНК ротавирусов проводили методом РНК-ПААГ (в полиакриламидном геле) [12]. Для проведения ОТ-ПЦР РНК

ротавирусов экстрагировали из фекалий стандартным методом с использованием набора для экстракции нуклеиновых кислот «РИБО-сорб», кДНК синтезировали с помощью комплекта реагентов «Реверта» («АмплиСенс», ЦНИИЭ, Москва) согласно рекомендациям производителя. G[P]-типирование выполняли методом мультитиплексной ПЦР с набором типоспецифических праймеров для генотипов G1–G4, G9, P[4], P[6], P[9]².

Фрагмент *VP8** гена *VP4* размером 877 пар нуклеотидов (п. н.) получали с парой праймеров con2 и con3mod, предложенных ранее [13]. Участок гена *VP7* размером 1062 п.н. амплифицировали с праймерами Beg9 и End9 [14]. Полноразмерные фрагменты генов *VP6* и *NSP4* были получены с парами праймеров GEN_VP6F/GEN_VP6R и GEN_NSP4F/GEN_NSP4R соответственно [15].

Нуклеотидные последовательности фрагментов генов *VP7*, *VP4*, *VP6* и *NSP4* устанавливали в автоматическом режиме с использованием генетического анализатора Beckman Coulter CEQ8000 и набора реагентов DTCS Quick Start Kit («Beckman Coulter», США) согласно рекомендациям производителя. Полученные в данной работе последовательности нижегородских штаммов РВА представлены в базе данных GenBank под номерами KX758591–KX758606.

Обработку и выравнивание нуклеотидных последовательностей осуществляли с применением программного обеспечения MEGA 5 [16]. Выборка штаммов для филогенетического анализа была составлена из реассортантных штаммов РВА, изолированных на территории Нижнего Новгорода, Австралии, Японии и Таиланда, а также вакцинных штаммов (Rotarix и RotaTeq). Полученные наборы данных были проанализированы в BEAST [17]. В частности, процесс замещения нуклеотидов оценивали с помощью модели Хасегава–Кишино–Яно (HKY, Hasegawa–Kishino–Yano). Скорость эволюции измеряли на базе нестрогих (свободных) логнормальных молекулярных часов. Для описания демографических процессов была использована гибкая непараметрическая модель ковалесценции SkyGrid. Для достижения значений эффективного размера выборки (ESS) >>200 длина цепи Маркова (MCMC, Markov chain Monte Carlo) составила 100 млн шагов.

Результаты

Типирование РВА методом РНК-ПААГ и ОТ-ПЦР. В сезон 2013–2014 гг. при обследовании 1295 госпитализированных с острым гастроэнтеритом детей РВА были обнаружены в 24,4% случаев. Пейзаж G[P]-типов включал генотипы G1P[8], G2P[4], G3P[8], G3P[9], G3P[6], G4P[8], G9P[8], G4P[9]. На фоне доминирования вариантов G4P[8] (68,7%) в 48 (15,5%) образцах были идентифицированы РВА генотипа G1P[8]. Следует отметить, что РВА генотипа G1P[8] являются типичными Wa-подобными штаммами с «длинным» электрофоретипом РНК. Среди выявленных РВА генотипа G1P[8] в 40 случаях наблюдался «длинный» Wa-подобный профиль РНК, у 8 изолятов – «короткий», характерный для DS-1-подобных штаммов. На

¹Приказ Минздрава России от 21.03.14 № 125н "Об утверждении национального календаря профилактических прививок и календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям"

²G[P]-генотипирование ротавирусов с использованием полимеразной цепной реакции. Методические рекомендации. Н. Новгород: ФГУН "ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной" Роспотребнадзора; 2007. 16 с.

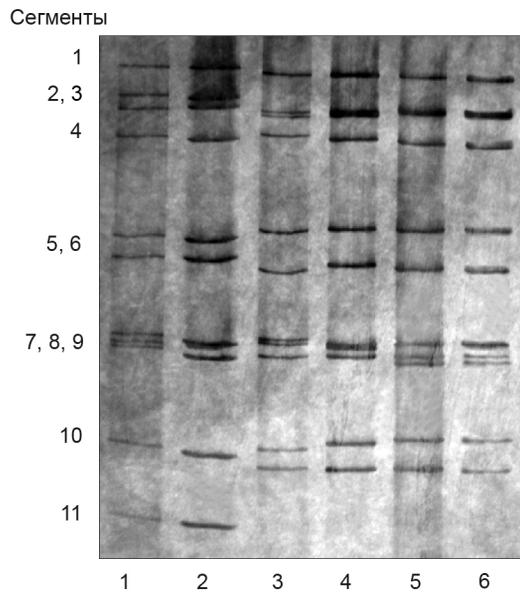


Рис. 1. Профили миграции геномных сегментов днРНК штаммов ротавирусов, изолированных на территории Нижнего Новгорода в сезон 2013–2014 гг.

Образцы 1 и 2 – типичные Wa-подобные штаммы G4P[8]- и G1P[8]-генотипа соответственно. Образцы 3 и 4 – типичные G2P[4] DS-1-подобные штаммы. Под номерами 5 и 6 представлены G1P[8] DS-1-подобные reassortantные штаммы, проанализированные в данной работе.

рис. 1 представлен ПААГ, отображающий профили миграции сегментов РНК анализируемых штаммов ротавирусов.

Четыре клинических изолята РВА G1P[8] с «коротким» электрофоретическим РНК были секвенированы по 4 генам (*VP7*, *VP8** (*VP4*), *VP6* и *NSP4*). Анализ показал их принадлежность к генотипу G1-P[8]-I2-E2. Наличие в составе генома последовательностей двух геногрупп РВА свидетельствует о reassortantном происхождении обнаруженных штаммов – данные штаммы являются двойными межгеногрупповыми reassortантами.

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей. Для изучения эволюционной динамики reassortantных штаммов мы построили филогенетические деревья для 4 сегментов генома с использованием байесовского филогенетического анализа, реализованного в пакете BEAST.

По гену *VP7* 3 из проанализированных образцов с генотипом G1-P[8]-I2-E2 несли аллель G1-I, и один принадлежал к линии G1-II. DS-1-подобные ротавирусы генотипа G1P[8], изолированные на территории Японии, принадлежат к линии G1-I, тогда как РВА, изолированные на территории Таиланда, несут аллель G1-II. Вакцинный штамм Rotarix несет в своем составе ген *VP7* генотипа G1-II, но кластеризуется отдельно от исследованных образцов. Вакцинный штамм пентавалентной вакцины RotaTeq G1P[8]-генотипа относится к линии G1-III (рис. 2, a).

Все reassortantные G1P[8]-штаммы РВА, изолированные на территории Нижнего Новгорода, по гену *VP4* принадлежат к линии P[8]-3 аналогично reassortantным штаммам, изолированным в Японии, Таиланде и Австралии. Вак-

цинные штаммы Rotarix и RotaTeq несут аллели P[8]-1 и P[8]-2 соответственно (рис. 2, б).

Нуклеотидные последовательности гена *VP6* двух нижегородских образцов (435/2014 и 439/2014) кластеризовались в группу с reassortantными РВА, изолированными в других странах, однако другие 2 образца (1034/2014 и 1091/2014) филогенетически ближе к типичным G2P[4] DS-1-подобным штаммам, выделенным в Таиланде. Нуклеотидные последовательности I2-генотипа, принадлежащие к штаммам в составе вакцины RotaTeq, кластеризовались отдельно (рис. 2, в).

Российские, тайландские и японские штаммы РВА с генотипом G1P[8] по гену *NSP4* кластеризовались отдельно от G3P[8] DS-1-подобных ротавирусов, которые были обнаружены в Австралии и Таиланде. Вакцинные штаммы RotaTeq E2-генотипа также составили отдельную группу (рис. 2, з).

Уровень мутаций и tMRCA reassortantных штаммов. В настоящем исследовании мы измерили уровни мутаций для 4 секвенированных генов. Наибольший уровень мутаций наблюдался у генов *VP7* и *VP4*, тогда как у генов *VP6* и *NSP4* скорость мутаций была ниже. Средние уровни мутаций в кластерах, содержащих РВА, выделенные от больных, не отличались от уровня мутаций всей выборки в целом по каждому гену (см. таблицу).

Используя описанные выше наборы данных для генов *VP7*, *VP4*, *VP6*, *NSP4*, вычисляли время ближайшего общего предка (tMRCA) для кластеров, в которые входили нуклеотидные последовательности reassortantных штаммов РВА, изолированных в Нижнем Новгороде (см. таблицу). Для линий G1-I и G1-II значения tMRCA составили 1998 (95% байесовский доверительный интервал (HPD, high posterior density) 1990–2004) и 1991 (95% HPD 1974–1986) соответственно. Reassortantные штаммы, несущие аллель P[8]-3, делили общего предка в 1998 г. (95% HPD 1985–2005). Для *VP6* и *NSP4* общие предковые штаммы циркулировали в 1994 г. (95% HPD 1973–2005) и 1979 г. (95% HPD 1922–2002) соответственно.

Обсуждение

Представленные результаты являются первым сообщением о появлении на территории России нового reassortantного между Wa- и DS-1-подобными штаммами варианта РВА человека. Случаи reassortации между штаммами разных геногрупп мало распространены, поскольку такие reassortанты менее устойчивы, чем штаммы, несущие сегменты одной геногруппы [18].

В нашем исследовании в популяции ротавирусов показано наличие reassortantных вариантов G1P[8] с DS-

Уровень мутаций и время ближайшего общего предка, рассчитанные на основе байесовской филогенетической реконструкции

Ген (генотип)	Средний уровень мутаций всей выборки, замены на сайт в год	Уровень мутаций в кластере reassortantных штаммов, замены на сайт в год	tMRCA кластера с reassortantными штаммами (95% HPD)
VP7 (G1)	1.004E-3	1.004E-3	1998 (G1-I) (1990--2004) 1981 (G1-II) (1974--1986)
VP4 (P[8])	1.402E-3	1.227E-3	1998 (1985--2005)
VP6 (I2)	4.022E-4	3.909E-4	1994 (1973--2005)
NSP4 (E2)	4.768E-4	4.014E-4	1979 (1922--2002)

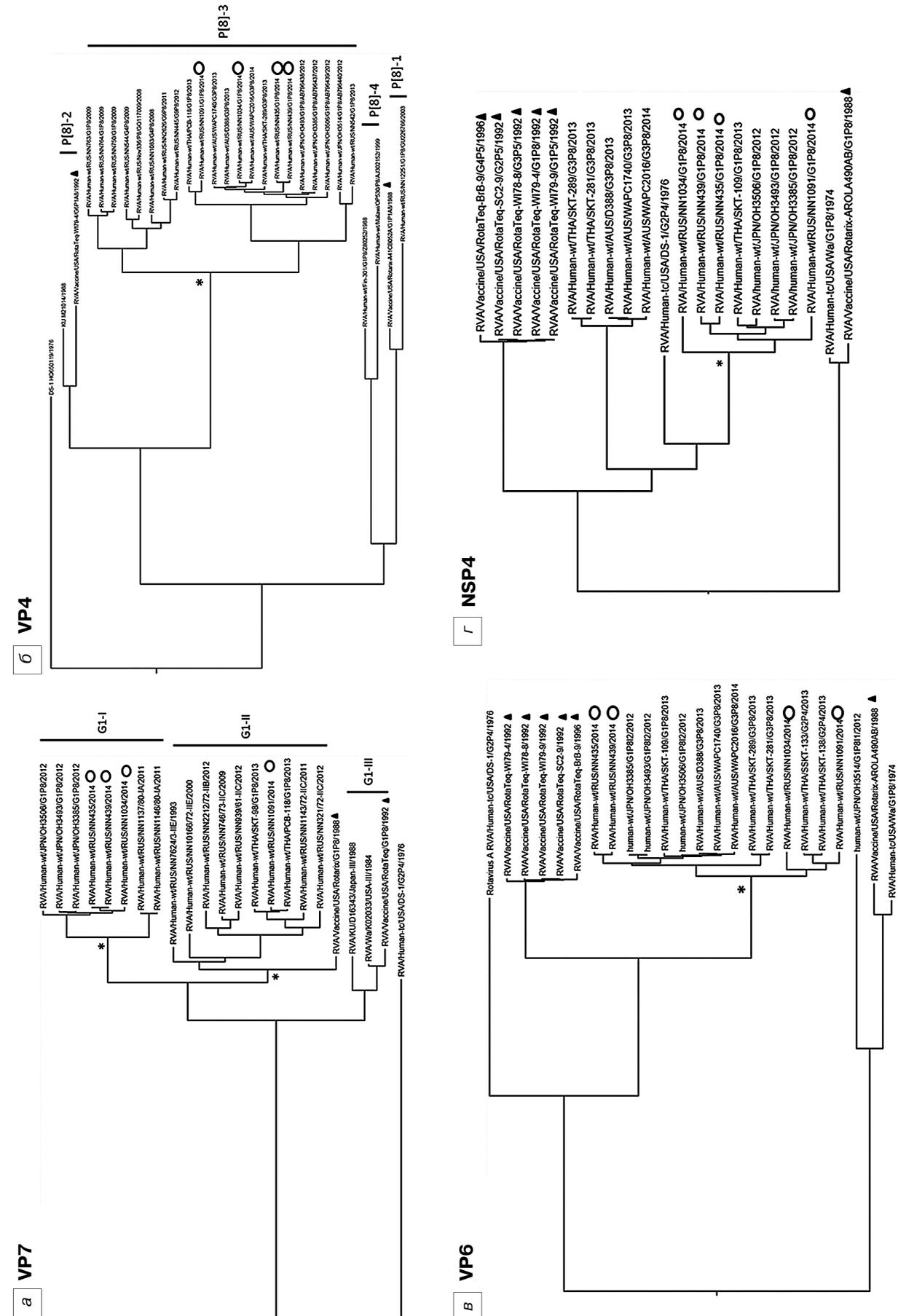


Рис. 2. Филогенетические деревья МСС (maximum clade credibility), сконструированные с использованием МСМС-подхода на основе нуклеотидных последовательностей гена VP7 (а), фрагмента гена VP4 (VP8*) (б), генов VP6 (в) и NSP4 (г).
 Нижгородские штаммы отмечены знаком о, вакцинные штаммы – ▲. Знаком * отмечены кластеры, для которых были рассчитаны скорости мутаций и tMRCa.

1-подобным профилем РНК-ПААГ на фоне снижения циркуляции типичных G1P[8] РВА [19]. Доля реассортантов между Wa- и DS-1-подобными штаммами на территории Нижнего Новгорода в 2013–2014 гг. составила 2,6%. В Таиланде «короткие» G1P[8]-штаммы также встречались в единичных вариантах. Однако на территории Японии подобные варианты широко распространились и преобладали в сезон 2012–2013 гг. в популяции РВА (46,7%), а также являлись доминирующими при вспышечной заболеваемости ротавирусным гастроэнтеритом в ряде регионов [5]. В Австралии в 2013 г. реассортантный штамм G3P[8]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2 стал доминирующим среди детей с тяжелым течением РВИ [8]. Эти исследования подтверждают динамичный характер ротавирусной популяции и иллюстрируют потенциал для возникновения новых генотипов РВА, способных к быстрому распространению.

Нижегородские штаммы РВА G1P[8]-генотипа с «коротким» профилем РНК-ПААГ несут аллели G1-I и G1-II гена VP7. При филогенетическом анализе с образцами под номерами 435/2014, 439/2014 и 1034/2014, относящимися к линии G1-I, кластеризовались японские штаммы. С образцом 1091/2014, принадлежащим к линии G1-II, кластеризовались штаммы, изолированные на территории Таиланда. Это свидетельствует о генетической разнородности штаммов с генотипом G1, циркулирующих на территории Нижнего Новгорода и мира.

Ранее в ходе многолетних наблюдений нами была показана постепенная смена аллеля внутри P[8]-генотипа с P[8]-1 на P[8]-3 [20]. Аллель P[8]-3 продолжает доминировать повсеместно. В данном исследовании все штаммы принадлежали к линии P[8]-3. Однако стоит отметить, что DS-1-подобные G1P[8]-штаммы образовали отдельный кластер от типичных Wa-подобных РВА P[8]-генотипа (см. рис. 2, б).

Филогенетический анализ на основе генов VP6 и NSP4 DS-1-подобных G1P[8]- и G3P[8]-штаммов РВА, изолированных на территории России и мира, показал неоднородность как среди нижегородской популяции ротавирусов, так и среди австралийских, японских и тайландских штаммов. По гену VP6 2 нижегородских изолята кластеризовались с реассортантными штаммами Австралии, Японии и Таиланда, а 2 – с типичными G2P[4] DS-1-подобными ротавирусами. По гену NSP4 ротавирусы G1- и G3-генотипа кластеризовались отдельно.

Таким образом, проведенный нами филогенетический анализ на основе нуклеотидных последовательностей генов VP7, VP4, VP6 и NSP4 указывает на полифилетическое происхождение реассортантов между Wa- и DS-1-подобными РВА, изолированными на территории России, Японии, Таиланда и Австралии. Причины столь широкого распространения межгрупповых реассортантов неизвестны. Возможно, это связано с широким и повсеместным проведением вакцинации против РВИ. В данном исследовании мы показали, что нуклеотидные последовательности вакцинных штаммов RotaTeq и Rotarix по большей части кластеризовались отдельно (за исключением гена VP7 вакцины Rotarix, который принадлежит к линии G1-II) и очевидно не принимали участия в эпизодах реассортации. Выводы относительно эффективности данных вакцин против инфекции, вызванной реассортантными штаммами, могут быть спекулятивными, поскольку ряд исследований показывает формирование гетеротипического иммунного ответа

[20]. Однако смена генотипа генов, кодирующих белки внутреннего капсида и неструктурные протеины, потенциально может препятствовать иммунному ответу.

Исследования, проведенные M. Zeller и соавт. [22], показали, что уровень мутаций типичных G1P[8] Wa-подобных штаммов РВА для гена VP7 (G1-генотипа) составляет $8E-4$ замены на сайт в год, для гена VP4 (P[8]-генотипа) – $7.5E-4$ [22]. Для генов VP6 и NSP4, относящихся ко второй геногруппе, такие исследования не проводились. Наш анализ на основе байесовского подхода показал сходный уровень мутаций генов VP7 и VP4, который превышал уровень мутаций VP6 и NSP4. По всей видимости, это связано с иммунологическим прессингом на белки наружного капсида, несущие на своей поверхности сайты антигенной нейтрализации [23, 24]. Стоит отметить, что средний уровень мутаций по всей выборке очень близок к уровню мутаций в кластерах, к которым относились реассортантные штаммы. Это свидетельствует об отсутствии высокой мутационной изменчивости рассматриваемых штаммов. Время наиболее близкого общего предка варьирует от 1979 г. для гена NSP4 до 1998 г. для генов VP7 (линии G1-I) и VP4, что демонстрирует относительную современность аллелей, которые несут штаммы.

Возможно, с помощью межгрупповой реассортации РВА пытаются преодолеть иммунологический прессинг и сохранить G1P[8]-генотип в популяции ротавируса, поскольку G1P[8]-штаммы, обладающие DS-1-подобными белками, могут иметь селективное преимущество. Вакцинация против РВИ не внесена в национальный календарь прививок в России, и уровень охвата прививками неизвестен, внедрение ротавирусных вакцин должно сопровождаться анализом разнообразия РВА с целью мониторинга реассортантов с вакцинными штаммами, а также оценки влияния вакцинации на эпидемический процесс.

Заключение

В этом исследовании мы дали молекулярную характеристику 4 реассортантных образцов с «коротким» профилем РНК-ПААГ, у которых гены 2 поверхностных белков (VP7 и VP4) относятся к Wa-подобным ротавирусам, тогда как гены VP6 и NSP4 принадлежат к DS-1-подобным штаммам РВА. Филогенетический анализ на основе полученных нуклеотидных последовательностей показал, что реассортантные штаммы РВА, обнаруженные на территории Нижнего Новгорода, близки к G1P[8]-штаммам, изолированным в Японии и Таиланде. Вероятно, реассортантные штаммы РВА, изолированные на территории разных стран, имеют полифилетическое происхождение. По анализируемым генам все исследованные штаммы кластеризовались отдельно от аллелей в составе вакцин Rotarix и RotaTeq. Скорость накопления мутаций по всем 4 генам в кластере, включающем реассортантные варианты ротавируса, достоверно не отличалась от скорости мутаций, рассчитанной для рассматриваемой выборки. Оцененное время до наиболее недавнего общего предка указывает на современное происхождение DS-1-подобных G1P[8]-штаммов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1–11, 13–18, 20–24
см. REFERENCES)

12. Новикова Н.А., Анцупова А.С., Епифанова Н.В., Альтова Е.Е., Троицкая М.В. Электрофоретический анализ геномной РНК ротавируса человека. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 1989; (5): 45–9.
 19. Сашина Т.А., Морозова О.В., Новикова Н.А. Генетическая структура нижегородской популяции ротавируса в 2012–2015 гг. В кн.: *Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Современные технологии в эпидемиологическом надзоре за актуальными инфекциями»*. Нижний Новгород; 2016: 92–8.
- REFERENCES
1. Parashar U.D., Burton A., Lanata C., Boschi-Pinto C., Shibuya K., Steele D. et al. Global mortality associated with rotavirus disease among children in 2004. *J. Infect. Dis.* 2009; 200 (Suppl. 1): 9–15.
 2. Estes M.K., Kapikian A.Z. Rotaviruses and their replication. In: Fields B.N., Knipe D.M., eds. *Fields Virology*. 5th ed., Lippincott, Philadelphia: Williams and Wilkins; 2007: 1917–74.
 3. Matthijnssens J., Ciarlet M., McDonald S.M., Attoui H., Banyai K., Brister J.R. et al. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch. Virol.* 2011; 156 (8): 1397–413.
 4. McDonald S.M., Matthijnssens J., McAllen J.K., Hine E., Overton L., Wang S. et al. Evolutionary dynamics of human rotaviruses: balancing reassortment with preferred genome constellations. *PLoS Pathog.* 2009; 5 (10): e1000634.
 5. Yamamoto S.P., Kaida A., Kubo H., Iritani N. Gastroenteritis Outbreaks Caused by a DS-1-like G1P[8] Rotavirus Strain, Japan, 2012–2013. *Emerg. Infect. Dis.* 2014; 20 (6): 1030–3.
 6. Kuzuya M., Fujii R., Hamano M., Kida K., Mizoguchi Y., Kanadani T. et al. Prevalence and molecular characterization of G1P[8] human rotaviruses possessing DS-1-like VP6, NSP4, and NSP5/6 in Japan. *J. Med. Virol.* 2014; 86 (6): 1056–64.
 7. Komoto S., Tacharoenmuang R., Guntapong R., Ide T., Haga K., Katayama K. et al. Emergence and Characterization of Unusual DS-1-Like G1P[8] Rotavirus Strains in Children with Diarrhea in Thailand. *PLoS One*. 2015; 10 (11): e0141739.
 8. Cowley D., Donato C.M., Roczo-Farkas S., Kirkwood C.D. Emergence of a novel equine-like G3P[8] inter-genogroup reassortant rotavirus strain associated with gastroenteritis in Australian children. *J. Gen. Virol.* 2016; 97 (2): 403–10.
 9. Ward R.L., Bernstein D.I. Rotarix: a rotavirus vaccine for the world. *Clin. Infect. Dis.* 2009; 48 (2): 222–8.
 10. Ciarlet M., Schodde F. Development of a rotavirus vaccine: clinical safety, immunogenicity, and efficacy of the pentavalent rotavirus vaccine, RotaTeq. *Vaccine*. 2009; 27 (Suppl. 6): 72–81.
 11. PATH (2011–2016). Available at: <http://sites.path.org/rotavirusvaccine/>
 12. Novikova N.A., Antsupova A.S., Epifanova N.V., Al'tova E.E., Troitskaya M.V. Electrophoretic analysis of the genomic RNA of rotaviruses. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 1989; (5): 45–9. (in Russian)
 13. Maunula L., von Bonsdorff C.H. Short sequences define genetic lineages: phylogenetic analysis of group A rotaviruses based on partial sequences of genome segments 4 and 9. *J. Gen. Virol.* 1998; 79 (2): 321–32.
 14. Gouvea V., Glass R.I., Woods P., Taniguchi K., Clark H.F., Forrester B. et al. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28 (2): 276–82.
 15. Matthijnssens J., Ciarlet M., Heiman E., Arijs I., Delbeke T., McDonald S.M. et al. Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. *J. Virol.* 2008; 82 (7): 3204–19.
 16. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 2011; 28 (10): 2731–9.
 17. Drummond A.J., Suchard M.A., Xie D., Rambaut A. Bayesian phylogenetics with BEAUTi and the BEAST 1.7. *Mol. Biol. Evol.* 2012; 29 (8): 1969–73.
 18. Iturriza-Gomara M., Isherwood B., Desselberger U., Gray J. Reassortment in vivo: Driving force for diversity of human rotavirus strains isolated in the United Kingdom between 1995 and 1999. *J. Virol.* 2001; 75 (8): 3696–705.
 19. Sashina T.A., Morozova O.V., Novikova N.A. The genetic structure of rotavirus population in Nizhny Novgorod in 2012–2015. In: *Materials of All-Russian Scientific-Practical Conference “Modern Technology in Epidemiological Surveillance for the Current Infections” [Materiály Vserossiyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii “Sovremennye tekhnologii v epidemiologicheskoy nadzore za aktual'nymi infektsiyami”]*. Nizhniy Novgorod; 2016: 92–8. (in Russian)
 20. Novikova N.A., Morozova O.V., Fedorova O.F., Epifanova N.V., Sashina T.A., Efimov E.I. Rotavirus infection in children of Nizhny Novgorod, Russia: the gradual change of the virus allele from P[8]-1 to P[8]-3 in the period 1984–2010. *Arch. Virol.* 2012; 157 (12): 2405–9.
 21. Jiang B., Wang Y., Glass R.I. Does a monovalent inactivated human rotavirus vaccine induce heterotypic immunity? Evidence from animal studies. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2013; 9 (8): 1634–7.
 22. Zeller M., Donato C., Trovao N.S., Cowley D., Heylen E., Donker N.C. et al. Genome-Wide Evolutionary Analyses of G1P[8] Strains Isolated Before and After Rotavirus Vaccine Introduction. *Genome Biol. Evol.* 2015; 7 (9): 2473–83.
 23. Aoki S.T., Settembre E.C., Trask S.D., Greenberg H.B., Harrison S.C., Dormitzer P.R. Structure of rotavirus outer-layer protein VP7 bound with a neutralizing Fab. *Science*. 2009; 324 (5933): 1444–7.
 24. Dormitzer P.R., Sun Z.Y., Wagner G., Harrison S.C. The rhesus rotavirus VP4 sialic acid binding domain has a galectin fold with a novel carbohydrate binding site. *EMBO J.* 2002; 21 (5): 885–7.

Поступила 19.09.16

Принята в печать 11.10.16