

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

**ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ**

Тел./факс +7-495-678-64-84

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

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

Редактор *Е.П. Мороз*

Художественный редактор  
*А. В. Минаичев*

Технический редактор  
*Л. В. Зюкина*

Корректор *М. В. Козлова*

Верстка *Е. М. Архипова*

Сдано в набор 14.03.2017.  
Подписано в печать 06.04.2017.  
Формат 60 × 88%.

Печать офсетная.

Печ. л. 6,00.

Усл. печ. л. 5,88.

Уч.-изд. л. 6,36.

Заказ 271.

Отпечатано в типографии ООО

«Подольская Периодика»,

142110, г. Подольск, ул. Кирова, 15

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

Т. 62. № 3. 97-144

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.

**3**

**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.; чл.-корр. РАН, 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.-корр. РАН; Москва, Россия)

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

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

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

**Покровский А.Г.** (д.м.н., проф., чл.-корр. РАН; Новосибирск, 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)

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

**Тутельян А.В.** (д.м.н., проф., чл.-корр. РАН; Москва, Россия)

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

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

**Щелканов М.Ю.** (д.б.н., проф.; Владивосток, 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.-корр. НАН Беларуси, акад. РАН; Минск, Республика Беларусь)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**Volume 62 • 3 • 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., corr. member of RAS (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 A.G.** – MD, PhD, DSc, Prof., corr. member of RAS (Novosibirsk)

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

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

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

**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)

**Shchelkanov M.Yu.** – Sc.D, Prof. (Vladivostok)

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

**Yashkulov K.B.** – MD, PhD (Elista)

**Advisory Board**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**Hoenen T.** – PhD (Hamilton, USA)

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

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

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

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

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

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

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

**Oxford J.** – DSc (London, UK)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**Webby R.** – PhD (Memphis, USA)

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

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



Izdatel'stvo Meditsina

## СОДЕРЖАНИЕ

### ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Зайкова О.Н., Гребенникова Т.В., Гулюкин А.М., Шабейкин А.А., Полякова И.В., Метлин А.Е.** Молекулярно-генетическая характеристика полевых изолятов вируса бешенства, выявленных на территории Владимирской, Московской, Тверской, Нижегородской и Рязанской областей. . . . . 101
- Мукашева Е.А., Николаева Л.И., Махновский П.И., Кириллова Е.С., Колобухина Л.В., Меркулова Л.Н., Кружкова И.С., Малышев Н.А., Бурцева Е.И.** Диагностические возможности определения специфических антител к пандемическому вирусу гриппа А(H1N1)pdm09. . . . . 109
- Олейник А.Ф., Фазылов В.Х.** Влияние длительности инфицирования ВИЧ до начала антиретровирусной терапии на развитие иммунологической неэффективности лечения. . . . . 114
- Коноплева М.В., Соколова М.В., Шеелягина Н.В., Баженов А.И., Фельдшерова А.А., Крымский М.А., Борисова В.Н., Семенов Т.А., Нестеренко В.Г., Суслов А.П.** Морфологический анализ вируса гепатита В с эскейп-мутациями в S-гене G145R и S143L. . . . . 119
- Смирнов В.С., Петленко С.В.** Влияние имихимода на продукцию интерферона и развитие экспериментальной инфекции, вызванной вирусами простого герпеса. . . . . 128
- Колосов А.В., Терновой В.А., Швалов А.Н., Моисеева А.А., Сафатов А.С., Михеев В.Н.** Адаптация вируса одиночно-капсидного ядерного полиэдроса американской хлопковой совки (*Helicoverpa zea* SNPV) для контроля популяции хлопковой совки (*Helicoverpa armigera*) . . . . . 134

### В ПОМОЩЬ ВИРУСОЛОГУ

- Колпаков С.А., Колпакова Е.П.** Адаптация штаммов ротавируса человека группы А к репродукции на перевиваемых культурах клеток. . . . . 138

### ЮБИЛЕИ

- Галегов Георгий Артемьевич (к 85-летию со дня рождения) . . . . . 143
- Баринский Игорь Феликсович (к 80-летию со дня рождения) . . . . . 144

## CONTENTS

### ORIGINAL RESEARCH

- Zaykova O.N., Grebennikova T.V., Gulyukin A.M., Shabaykin A.A., Polyakova I.V., Metlin A.E.** Molecular-genetic characterization of field isolates of rabies virus identified in the territory of Vladimir, Moscow, Tver, Nizhny Novgorod and Ryazan regions 101
- Mukasheva E.A., Nikolaeva L.I., Makhnovsky P.I., Kirilova E.S., Kolobukhina L.V., Merkulova L.N., Kruzhkova I.S., Malyshev N.A., Burtseva E.I.** Diagnostic capacity of detection of specific antibodies to pandemic influenza A(H1N1)pdm09 virus 109
- Oleynik A.F., Fazylov V.Kh.** The influence of HIV infection duration before antiretroviral therapy on immunological treatment failure 114
- Konopleva M.V., Sokolova M.V., Shevlyagina N.V., Bazhenov A.I., Fel'dsherova A.A., Krymskij M.A., Borisova V.N., Semenenko T.A., Nesterenko V.G., Suslov A.P.** Morphological analysis of hepatitis B virus with escape mutations in S-gene G145R and S143L 119
- Smirnov V.S., Petlenko S.V.** Influence of the imiquimod on the interferon production and treatment of the experimental herpes simplex virus infection 128
- Kolosov A.V., Ternovoy V.A., Shvalov A.N., Moiseeva A.A., Safatov A.S., Mikheev V.N.** Adaptation of the corn earworm single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus (*Helicoverpa zea* SNPV) for the control of the cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*) population 134

### TO VIROLOGIST'S AID

- Kolpakov S.A., Kolpakova E.P.** Adaptation of human rotavirus strains of group A to the reproduction in passaged cell cultures 138

### ANNIVERSARIES

- 85th Anniversary of Professor G.A. Galegov 143
- 80th Anniversary of Professor I.F. Barinsky 144

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

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 578.824.11:577.21

Зайкова О.Н.<sup>1,3</sup>, Гребенникова Т.В.<sup>1,3</sup>, Гулюкин А.М.<sup>2</sup>, Шабейкин А.А.<sup>2</sup>, Полякова И.В.<sup>2</sup>, Метлин А.Е.<sup>4</sup>

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПОЛЕВЫХ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА БЕШЕНСТВА, ВЫЯВЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ ВЛАДИМИРСКОЙ, МОСКОВСКОЙ, ТВЕРСКОЙ, НИЖЕГОРОДСКОЙ И РЯЗАНСКОЙ ОБЛАСТЕЙ

<sup>1</sup> 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;<sup>2</sup> ФГБНУ «Всероссийский НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко», 109428, г. Москва;<sup>3</sup> Медицинский институт Российского университета дружбы народов, 117198, г. Москва;<sup>4</sup> ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», 600901, г. Владимир

В статье представлено молекулярно-генетическое исследование геномов полевых изолятов вируса бешенства, выделенных на территории Владимирской, Московской, Тверской, Нижегородской и Рязанской областей, с целью проведения филогенетического анализа. Исследованы 20 образцов очищенных ПЦР-продуктов, содержащих нуклеопротеин вируса бешенства, предоставленных ветеринарной службой г. Владимира. В результате секвенирования и филогенетического анализа фрагментов гена N 12 исследуемых изолятов оказались близкими к Центральной филогенетической группе вирусов бешенства, а именно 5 изолятов из Владимирской области, 2 — из Нижегородского района, 2 — из Московской и 3 — из Тверской области. 8 исследуемых изолятов из Нижегородской и Рязанской областей были отнесены к Евразийской филогенетической группе.

Ключевые слова: бешенство; секвенирование; молекулярно-генетический анализ; филогенетический анализ геномов вируса бешенства.

*Для цитирования:* Зайкова О.Н., Гребенникова Т.В., Гулюкин А.М., Шабейкин А.А., Полякова И.В., Метлин А.Е. Молекулярно-генетическая характеристика полевых изолятов вируса бешенства, выявленных на территории Владимирской, Московской, Тверской, Нижегородской и Рязанской областей. *Вопросы вирусологии*. 2017; 62(3): 101-108.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-3-101-108>Zaykova O.N.<sup>1,3</sup>, Grebennikova T.V.<sup>1,3</sup>, Gulyukin A.M.<sup>2</sup>, Shabeykin A.A.<sup>2</sup>, Polyakova I.V.<sup>2</sup>, Metlin A.E.<sup>4</sup>

## MOLECULAR-GENETIC CHARACTERIZATION OF FIELD ISOLATES OF RABIES VIRUS IDENTIFIED IN THE TERRITORY OF VLADIMIR, MOSCOW, TVER, NIZHNY NOVGOROD AND RYAZAN REGIONS

<sup>1</sup> D.I. Ivanovsky Institute of Virology, Federal State Budgetary Institution «Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation;<sup>2</sup> Y.R. Kovalenko All-Russian Scientific Research Institute of Experimental Veterinary, Moscow, 109428, Russian Federation;<sup>3</sup> Institute for Medicine, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, 117198, Russian Federation;<sup>4</sup> Federal Center for Animal Health, Vladimir, 600901, Russian Federation

The article presents a molecular genetic study of genomes of field isolates of rabies virus isolated in the Vladimir, Moscow, Tver, Nizhny Novgorod and Ryazan regions, with the aim of carrying out phylogenetic analysis. We studied 20 samples of purified PCR products containing the rabies virus nucleoprotein. The samples were provided by the Vladimir veterinary service. Sequencing and phylogenetic analysis of the gene showed that 12 fragments of isolates under study were close to the Central phylogenetic group of the rabies virus; namely – 5 isolates from the Vladimir region, 2 from the Nizhny Novgorod region, 2 from the Moscow region, and 3 from the Tver region. Eight studied isolates from the Nizhny Novgorod and Ryazan regions were attributed to the Eurasian phylogenetic group.

Key words: rabies; sequencing; molecular genetic analysis; phylogenetic analysis of rabies virus genomes.

*For citation:* Zaykova O.N., Grebennikova T.V., Gulyukin A.M., Shabeykin A.A., Polyakova I.V., Metlin A.E. Molecular-genetic characterization of field isolates of rabies virus identified in the territory of Vladimir, Moscow, Tver, Nizhny Novgorod and Ryazan regions. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2017; 62(3): 101-108. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-3-101-108>

*For correspondence:* Ol'ga N. Zaykova, graduate student, researcher at the D.I. Ivanovsky Institute of Virology, Federal State Budgetary Institution «Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation. E-mail: [zaykova\\_o\\_n@mail.ru](mailto:zaykova_o_n@mail.ru)

*Для корреспонденции:* Ольга Николаевна Зайкова, мл. науч. сотр., аспирант 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: [zaykova\\_o\\_n@mail.ru](mailto:zaykova_o_n@mail.ru)

**Information about authors:**Grebennikova T.V., <http://orcid.org/0000-0002-6141-9361>Gulyukin A.M., <http://orcid.org/0000-0001-8730-723X>Metlin A.E., <http://orcid.org/0000-0002-4283-0171>**Acknowledgments.** This work was supported by the State Budget funding.**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 01 December 2016

Accepted 13 December 2016

**Введение**

Бешенство — инфекционное заболевание, возбудителем которого является вирус *Rabies virus* рода *Lyssavirus* семейства *Rhabdoviridae*. Вирус бешенства вызывает специфический энцефалит (воспаление головного мозга) и является единственным из царства *Vira*, поражающим всех теплокровных животных, в том числе человека, со 100% летальностью. Вирионы вируса бешенства пулевидной формы длиной в среднем 180 нм, диаметром 75 нм и состоят из несегментированного генома, представленного одной молекулой спиралеобразно скрученной негативной РНК и 5 структурных белков: нуклеопротеина (N), фосфопротеина (P), матричного белка (M), гликопротеина (G) и РНК-зависимой РНК-полимеразы, или большого белка (L — large protein). Геномная РНК не инфекционна [1, 2].

По оценке ВОЗ, бешенство входит в пятерку инфекционных болезней, наносящих наибольший социальный и экономический ущерб. Среди зооантропонозных заболеваний, регистрирующихся в настоящее время в нашей стране, бешенство животных занимает лидирующие позиции по числу ежегодно выявляемых неблагополучных пунктов. На протяжении многих лет бешенство в Российской Федерации регистрировалось на стабильно высоком уровне, охватывая значительную часть территории [3, 4].

По данным Россельхознадзора и лаборатории эпизоотологии ВИЭВ им. Я.Р. Коваленко, в течение 2014 г. зафиксировано 2096 очагов бешенства, заболело 2315 животных. Наибольшее число неблагополучных пунктов зарегистрировано в Белгородской (125), Липецкой (119), Саратовской (124) областях и Республике Татарстан (118) [5]. В 2015 г. по сравнению с 2014 г. количество случаев бешенства животных по стране увеличилось в 1,8 раза. В I квартале 2016 г. зарегистрировано 634 неблагополучных по бешенству пункта, в которых заболело и пало 718 животных; во II квартале 2016 г. зафиксировано 490 очагов бешенства, заболело и пало 551 животное, в том числе 287 (52%) диких животных, 213 (39%) домашних плотоядных, 51 (9%) сельскохозяйственное животное. Наибольшее (158) число неблагополучных пунктов за 6 мес 2016 г. зарегистрировано в Московской области. Большую часть заболевших животных составили дикие и домашние плотоядные. По данным исследований, эпизоотии носят циклический, сезонный характер [6].

Основные резервуарные хозяева вируса бешенства в природе — дикие плотоядные, особенно псовые, а также рукокрылые млекопитающие [7, 8]. Лиссавирусы летучих мышей представляют особый интерес для изучения и разработки мер профилактики, так как генетически существенно отличаются от вируса бешенства генотипа 1.

Главную опасность для человека представляет так называемое городское бешенство, поддерживаемое в популяции безнадзорных животных, а также отсутствие вакцинопрофилактики у домашних животных. Вирус передается главным образом со слюной при укусе боль-

ным животным. Диагностика бешенства, как правило, проводится посмертно. Эффективное лечение до сих пор отсутствует.

Предупреждение распространения бешенства включает контроль численности основных носителей вируса в природе и бездомных домашних животных, а также их иммунизацию с целью создания зоны, свободной от вируса [9].

Для контроля антирабических мероприятий и профилактики бешенства необходимо исследовать случаи этого заболевания на неблагополучных по нему территориях и на территориях, где проводилась оральная иммунизация, исследовать первичную структуру геномов полевых изолятов вируса бешенства [10, 11].

Целью нашей работы была молекулярно-генетическая характеристика изолятов вируса бешенства, выявленных на территории Владимирской, Московской, Тверской, Нижегородской и Рязанской областей.

**Материал и методы**

Материалом для исследования послужили очищенные ПЦР-продукты, содержащие ген N вируса бешенства, 20 образцов от животных из Владимирской, Московской, Тверской, Нижегородской и Рязанской областей, любезно предоставленные нам ветеринарной службой г. Владимир (см. таблицу). Для сравнительного анализа были использованы нуклеотидные последовательности гена N штаммов вируса бешенства, содержащиеся в базе данных NCBI.

Для секвенирования ампликонов использовали те же праймеры, что и в ПЦР. В работе применяли набор BigDye Terminator Cycle Sequencing kit («Applied Biosystems», США) и капиллярный ДНК-секвенатор ABI Prism 3100 («Applied Biosystems», США). Для выравнивания нуклеотидных последовательностей и проведения филогенетического анализа применяли пакет программ DNASTAR v 3.12 («Lasergene Inc.», США) и Bio Edit 7.0.1. Для оценки достоверности топологии филогенетической дендрограммы был проведен bootstrap-анализ с привлечением 1000 псевдореплик.

**Результаты**

Была определена первичная структура гена N вируса бешенства для 20 изолятов из Московской, Тверской, Нижегородской и Рязанской областей. На основании полученных нуклеотидных последовательностей и материалов, опубликованных в базе данных GenBank, была построена филогенетическая дендрограмма и проведен филогенетический анализ (рис. 1).

Для филогенетического анализа использовали вакцинные штаммы RV-97, ERA, штамм RABV AY95319, выделенный из слюны реципиента после трансплантации органов зараженного (Иран), а также 77 штаммов, выделенных ранее на территории России и Европы.

Размер исследуемого фрагмента составил 1110 нуклеотидных остатков (н. о.) (370 аминокислот), положение в геноме 100—1210. На рис. 2 показаны предсказанные

## Описание образцов для молекулярно-генетического анализа

Изолят	Вид животного	Регион
Moscow_(706_2009)	Лиса	Московская обл., Сергиево-Посадский р-н, д. Мехово
Moscow_(708_2009)	Лиса	Московская обл., Дмитровский р-н, пос. Орехово
Tver_8_2014	Енотовидная собака	Тверская область, Кесовогорский р-н, 600 м от д. Столбово
Tver_13_2014	Собака	Тверская область, Кесовогорский р-н, д. Федцово
Tver_647_2014	Енотовидная собака	Тверская область, Пеновский р-н, ур. Михайловщина
Nizhniy_267_2014	Лиса	Нижегородская обл., Сергачский р-н, с. Пица
Nizhniy_273_2014	Собака	Нижегородская обл., Павловский р-н, с. Грудцино
Nizhniy_291_2014	Лиса	Нижегородская обл., Лысковский р-н, с. Юркино
Nizhniy_927_2014	Собака	Нижегородская обл., Краснооктябрьский р-н, д. Малая Мажарка
Nizhniy_947_2014	Лиса	Нижегородская обл., Арзамаский р-н, пос. Пешелань
Vladimir_521_2014	Лиса	Владимирская обл., Гороховецкий р-н, с/п Денисовское
Vladimir_522_2014	Лиса	Владимирская обл., Вязниковский р-н, д. Б. Липки
Vladimir_523_2014	Енотовидная собака	Владимирская обл., Ковровский р-н, д. Демино
Vladimir_525_2014	Енотовидная собака	Владимирская обл., Камешковский р-н, д. Сергеиха
Vladimir_524_2014	Собака	Владимирская обл., Вязниковский р-н, г. Вязники
Ryazan_810_2014	Кот	Рязанская обл., Шиловский р-н, с. Борок
Ryazan_813_2014	КРС	Рязанская обл., Александровский р-н, д. Федцовка
Ryazan_814_2014	КРС	Рязанская обл., Кораблинский р-н, с. Никитино
Ryazan_816_2014	Собака	Рязанская обл., Сасовский р-н, с. Гавриловское
Ryazan_812_2014	КРС	Рязанская обл., Рязский р-н, г. Рязск

Примечание. КРС — крупный рогатый скот.

последовательности аминокислот всех исследуемых изолятов в сравнении с некоторыми ранее охарактеризованными и референсными штаммами вируса бешенства.

При анализе предсказанной аминокислотной последовательности было установлено, что 12 изолятов в позиции 217 содержат остаток валина, в то время как у представителей других групп в этой позиции имеется остаток изолейцина. Кроме того, изоляты Центральной группы, включая исследуемые, в позиции 95 содержат триптофан вместо лейцина.

У изолята Vladimir\_525\_2014 в позиции 50 — аминокислота серин вместо аспарагина. В позиции 106 содержится аспарагиновая кислота вместо аспарагина у представителей Северо-восточно-европейской, Арктической

групп, а также у всех представителей Евразийской группы, кроме изолятов из Омска, у 4 представителей Центральной группы и у изолята RABV AY95319.

Исследуемые изоляты из Нижегородской и Рязанской областей близки по аминокислотному составу к изолятам из Липецка и Воронежа, друг к другу. В позиции 101 у этих изолятов присутствует треонин вместо аспарагиновой кислоты, а в позиции 106 аспарагиновая кислота вместо аспарагина, как и у всех представителей Евразийской группы.

В позиции 135 отмечена замена пролина на серин у представителей Северо-восточно-европейской группы, Евразийской и некоторых изолятов Центральной группы, в том числе Tver\_13, Tver\_8, Moscow\_706, Nizhniy\_267, Nizhniy\_947, Vladimir\_521—524. Изолят Nizhniy\_927 в позиции 158 содержит аланин вместо треонина.

В позициях 172 и 179 образцы из Нижегородской и Рязанской областей содержат изолейцин и валин соответственно, как и все представители Северо-восточно-европейской и Евразийской групп. Представители Арктической группы совпадают с вышеописанными изолятами лишь в позиции 172.

В позициях 218 и 246 наблюдаем глютаминовую кислоту и изолейцин соответственно у всех исследуемых изолятов и вакцинных штаммов, кроме RV-97, который в данных позициях содержит аспарагиновую кислоту и валин.

В позиции 295 изолят Ryazan\_814 содержит глицин вместо серина. В позиции 270 изолят Vladimir\_523 имеет лизин вместо аргинина, а в позиции 319 — изолейцин вместо метионина. В позиции 320 изолят Nizhniy\_947 содержит цистин вместо глицина. В позиции 332 изолят Tver\_647 содержит треонин вместо аланина, а в позиции 347 изолят Tver\_13 содержит глютамин вместо глютаминовой кислоты.

В позициях 364 и 388 образцы из Нижегородской и Рязанской областей содержат лизин и гистидин, при этом лизин в позиции 364 имеется у всех изолятов, а гистидин — только у Евразийской группы. В позиции 377 изоляты Tver\_7574 и 7575 (последовательности взяты из базы данных NCBI) содержат аланин вместо треонина, что отличает их от других образцов, выделенных в России и Эстонии. В позиции 379 образцы из Тверской (кроме Tver\_7574 и 7575), Московской и Нижегородской областей, а также один изолят из Владимирской области имеют аланин вместо валина. Другие изоляты из Владимирской области и один из Нижегородской содержат треонин в этой позиции, как и представители Арктической группы. Изолят Vladimir\_525 в позиции 399 содержит пролин вместо треонина.

Согласно полученным данным, 12 изолятов были отнесены к Центральной группе. Внутри группы исследуемые образцы отличаются друг от друга и от ранее выделенных изолятов не более чем на 3—4% в последовательности нуклеотидов.

К Евразийской группе было отнесено 8 изолятов на основании генетической близости к ранее описанным изолятам этой группы. По первичной нуклеотидной последовательности исследуемые изоляты отличаются друг от друга не более чем на 0,9%, а от других изолятов этой группы — примерно на 8%. Друг от друга все исследуемые изоляты отличаются примерно на 9,3%.

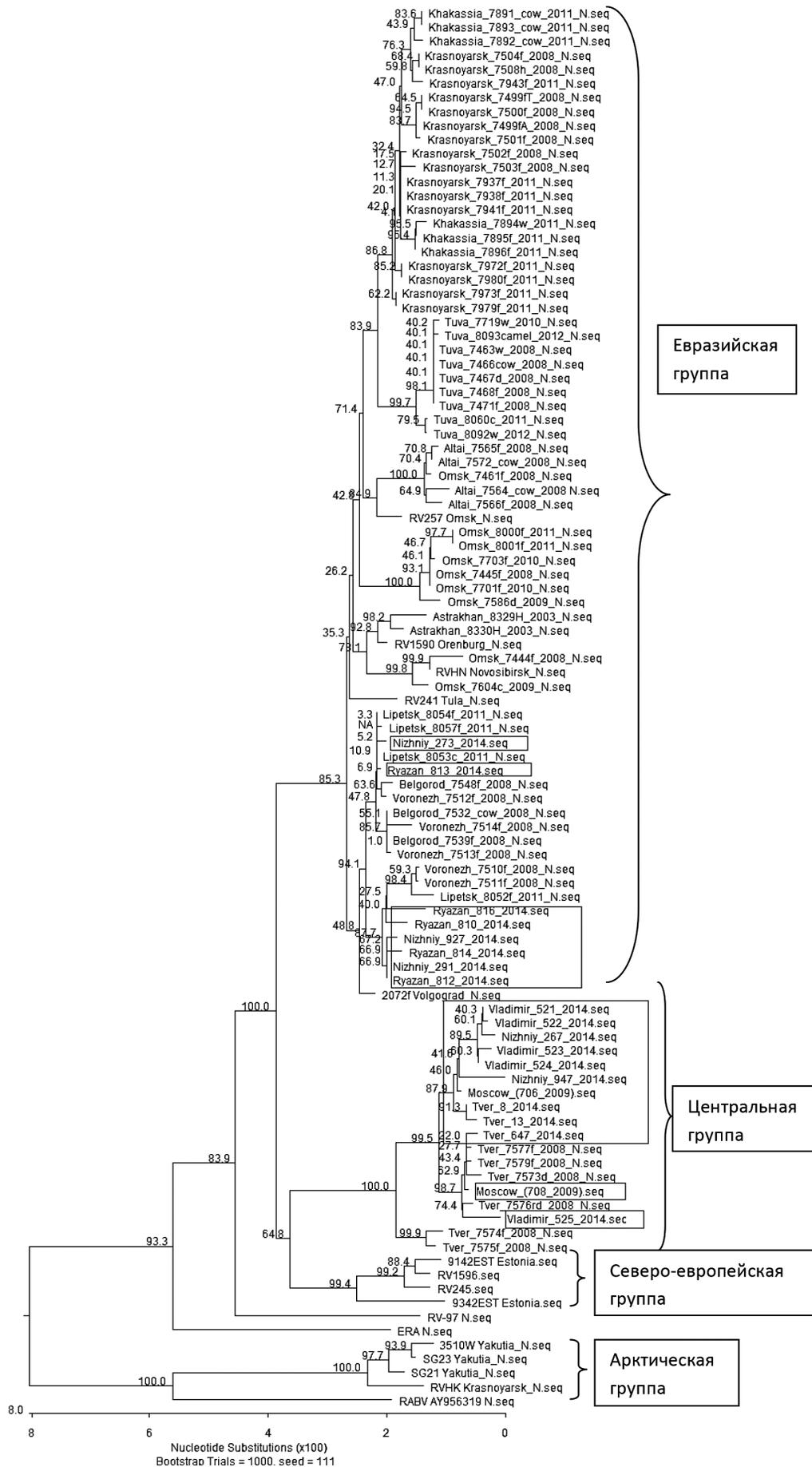


Рис. 1. Филогенетическая дендрограмма штаммов и изолятов вируса бешенства, построенная на основании нуклеотидных последовательностей гена N. Рамками показаны исследуемые изоляты. К названиям штаммов и изолятов добавлен регион происхождения.

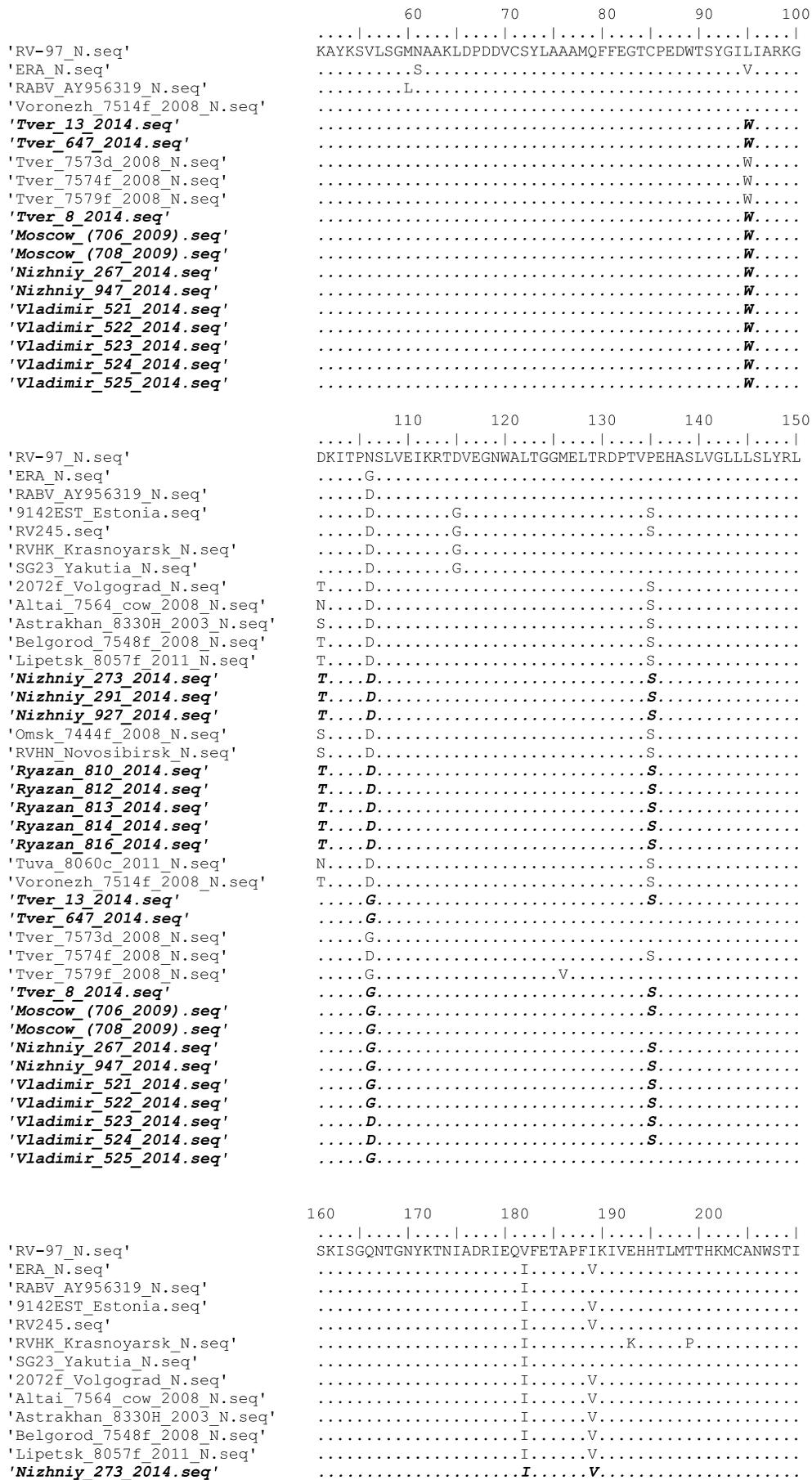


Рис. 2.

```

160          170          180          190          200
'RV-97_N.seq'          SKISGQNTGNYKTNADRIEQVFETAPFFIKIVEHHTLMTTHKMCANWSTI
'Nizhniy_291_2014.seq'          .I. .V.
'Nizhniy_927_2014.seq'          .A. .I. .V.
'Omsk_7444f_2008_N.seq'          .I. .V.
'RVHN_Novosibirsk_N.seq'          .I. .V.
'Ryazan_810_2014.seq'          .I. .V.
'Ryazan_812_2014.seq'          .I. .V.
'Ryazan_813_2014.seq'          .I. .V.
'Ryazan_814_2014.seq'          .I. .V.
'Ryazan_816_2014.seq'          .I. .V.
'Tuva_8060c_2011_N.seq'          .I. .V.
'Voronezh_7514f_2008_N.seq'          .I. .V.
'Tver_13_2014.seq'          .I. .V.
'Tver_647_2014.seq'          .I. .V.
'Tver_7573d_2008_N.seq'          .I. .V.
'Tver_7574f_2008_N.seq'          .I. .V.
'Tver_7579f_2008_N.seq'          .I. .V.
'Tver_8_2014.seq'          .I. .V.
'Moscow_(706_2009).seq'          .I. .V.
'Moscow_(708_2009).seq'          .I. .V.
'Nizhniy_267_2014.seq'          .I. .V.
'Nizhniy_947_2014.seq'          .I. .V.
'Vladimir_521_2014.seq'          .I. .V.
'Vladimir_522_2014.seq'          .I. .V.
'Vladimir_523_2014.seq'          .I. .V.
'Vladimir_524_2014.seq'          .I. .V.
'Vladimir_525_2014.seq'          .I. .V.

          210          220          230          240          250
'RV-97_N.seq'          PNFRLAGTYDMFFSRIDHLYSAIRVGTVVVTAYEDCSGLVSFTGFVKQIN
'ERA_N.seq'          .E. .I.
'RABV_AY956319_N.seq'          .E. .I.
'9142EST_Estonia.seq'          .E. .I.
'RV245.seq'          .E. .I.
'RVHK_Krasnoyarsk_N.seq'          .E. .I.
'SG23_Yakutia_N.seq'          .E. .I.
'2072f_Volgograd_N.seq'          .E. .I.
'Altai_7564_cow_2008_N.seq'          .E. .I.
'Astrakhan_8330H_2003_N.seq'          .E. .I.
'Belgorod_7548f_2008_N.seq'          .E. .I.
'Lipetsk_8057f_2011_N.seq'          .E. .I.
'Nizhniy_273_2014.seq'          .E. .I.
'Nizhniy_291_2014.seq'          .E. .I.
'Nizhniy_927_2014.seq'          .E. .I.
'Omsk_7444f_2008_N.seq'          .E. .I.
'RVHN_Novosibirsk_N.seq'          .E. .I.
'Ryazan_810_2014.seq'          .E. .I.
'Ryazan_812_2014.seq'          .E. .I.
'Ryazan_813_2014.seq'          .E. .I.
'Ryazan_814_2014.seq'          .E. .I.
'Ryazan_816_2014.seq'          .E. .I.
'Tuva_8060c_2011_N.seq'          .E. .I.
'Voronezh_7514f_2008_N.seq'          .E. .I.
'Tver_13_2014.seq'          .VE. .I.
'Tver_647_2014.seq'          .VE. .I.
'Tver_7573d_2008_N.seq'          .VE. .I.
'Tver_7574f_2008_N.seq'          .VE. .I.
'Tver_7579f_2008_N.seq'          .VE. .I.
'Tver_8_2014.seq'          .VE. .I.
'Moscow_(706_2009).seq'          .VE. .I.
'Moscow_(708_2009).seq'          .VE. .I.
'Nizhniy_267_2014.seq'          .VE. .I.
'Nizhniy_947_2014.seq'          .VE. .I.
'Vladimir_521_2014.seq'          .VE. .I.
'Vladimir_522_2014.seq'          .VE. .I.
'Vladimir_523_2014.seq'          .VE. .I.
'Vladimir_524_2014.seq'          .VE. .I.
'Vladimir_525_2014.seq'          .VE. .I.

          360          370          380          390          400
'RV-97_N.seq'          GKGTFFERRFRDERELQYEAAELTKTDVALADDGTVNSDDEDYFSGETR
'ERA_N.seq'          .K. .T.
'RABV_AY956319_N.seq'          .K. .T.
'9142EST_Estonia.seq'          .K. .T.
'RV245.seq'          .K. .T.
'RVHK_Krasnoyarsk_N.seq'          .K. .T. .T.

```

Рис. 2.



## ЛИТЕРАТУРА (п.п. 8, 12 см. REFERENCES)

1. Васильев Д.А., Луговцев В.Ю., ред. Курс лекций по вирусологии. Часть вторая: Вирусы, вызывающие болезни общие для многих видов сельскохозяйственных животных. Ульяновск; 2004.
2. Львов Д.К., ред. *Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных*. М.: Медицинское информационное агентство; 2013.
3. Всемирная организация здравоохранения. Available at: <http://www.who.int/ru>
4. Шабейкин А.А., Зайкова О.Н., Гулюкин А.М. Обзор эпизоотической ситуации по бешенству в российской федерации за период с 1991 по 2015 годы. *Ветеринария Кубани*. 2016; (4): 4—6.
5. Гулюкин А.М., Шабейкин А.А., Зайкова О.Н., Полякова И.В., Забережный А.Д., Хисматуллина Н.А. и др. Особенности эпизоотического процесса и молекулярно-генетических характеристик изолятов вируса бешенства в Республике Татарстан. *Ветеринарный врач*. 2015; (6): 3—11.
6. Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору. Available at: [www.fsvps.ru](http://www.fsvps.ru)
7. Ботвинкин А.Д. Смертельные случаи заболевания людей бешенством в Евразии после контактов с рукокрылыми (Обзор литературы). *Plecotus et al.* 2011; (14): 75—86.
9. Шабейкин А.А., Гулюкин А.М., Цареградский П.Ю., Паршикова А.В., Южаков А.Г., Зайкова О.Н. Анализ текущей эпизоотической ситуации по бешенству на территории Российской Федерации. *Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные*. 2015; (4): 5—8.
10. Елаков А.Л., Зайкова О.Н., Кочергин-Никитский К.С., Гребенникова Т.В., Алипер Т.И. Мониторинг бешенства у диких животных в Брянской области. *Ветеринария*. 2015; (1): 11—4.
11. Зайкова О.Н., Гребенникова Т.В., Елаков А.Л., Кочергин-Никитский К.С., Алипер Т.И., Чучалин С.Ф. и др. Молекулярно-генетическая характеристика геномов полевых изолятов вируса бешенства, циркулирующих на территории Кировской области. *Вопросы вирусологии*. 2016; (4): 186—92.
13. Полещук Е.М., Сидоров Г.Н., Грибенча С.В. Итоги изучения антигенного и генетического разнообразия вируса бешенства в популяциях наземных млекопитающих России. *Вопросы вирусологии*. 2013; 58(3): 9—15.
14. Чупин С.А., Чернышова Е.В., Метлин А.Е. Генетическая характеристика полевых изолятов вируса бешенства, выявленных на территории Российской Федерации в период 2008—2011 гг. *Вопросы вирусологии*. 2013; (4): 44—9.
15. Гулюкин А.М. Значимость современных методов лабораторной диагностики и идентификации возбудителя бешенства для иммунологического мониторинга данного зооноза. *Вопросы вирусологии*. 2014; 59(3): 5—10.
- chie bolezni obshchie dlya mnogikh vidov sel'skokhozyaystvennykh zhivotnykh*. Ul'yanovsk; 2004. (in Russian)
2. L'vov D.K., ed. *Guide to Virology. Viruses and Viral Infections of Humans and Animals [Rukovodstvo po virusologii. Virusy i virusnye infektsii cheloveka i zhivotnykh]*. Moscow: Meditsinskoe informatcionnoe agentstvo; 2013. (in Russian)
3. World Health Organization. Available at: <http://www.who.int/ru> (in Russian)
4. Shabeykin A.A., Zaykova O.N., Gulyukin A.M. Review of the epizootic situation of rabies in the Russian Federation for the period from 1991 to 2015. *Veterinariya Kubani*. 2016; (4): 4—6. (in Russian)
5. Gulyukin A.M., Shabeykin A.A., Zaykova O.N., Polyakova I.V., Zaberezhnyy A.D., Khismatullina N.A., et al. Features of epizootic process and molecular genetic characterization of isolates of rabies virus in the Republic of Tatarstan. *Veterinarnyy vrach*. 2015; (6): 3—11. (in Russian)
6. Service for Veterinary and Phytosanitary Surveillance. Available at: [www.fsvps.ru](http://www.fsvps.ru) (in Russian)
7. Botvinkin A.D. Deaths of people of rabies in Eurasia after contact with bats (Literature review). *Plecotus et al.* 2011; (14): 75—86. (in Russian)
8. Hanlon C.A., Kuzmin I.V., Blanton J.D., Weldon W.C., Manangan J.S., Rupprecht C.E. Efficacy of rabies biologics against new lyssaviruses from Eurasia. *Virus Res*. 2005; 111(1): 44—54.
9. Shabeykin A.A., Gulyukin A.M., Tsaregradskiy P.Yu., Parshikova A.V., Yuzhakov A.G., Zaykova O.N. Analysis of the current epizootic situation of rabies in the territory of the Russian Federation. *Rossiyskiy veterinarnyy zhurnal. Sel'skokhozyaystvennye zhivotnye*. 2015; (4): 5—8. (in Russian)
10. Elakov A.L., Zaykova O.N., Kochergin-Nikitskiy K.S., Grebennikova T.V., Aliper T.I. Monitoring of rabies Wild animals in the Bryansk region. *Veterinariya*. 2015; (1): 11—4. (in Russian)
11. Zaykova O.N., Grebennikova T.V., Elakov A.L., Kochergin-Nikitskiy K.S., Aliper T.I., Chuchalin S.F., et al. Molecular genetic characteristics of field isolats genomes rabies virus circulating on Kirov region territory. *Voprosy virusologii*. 2016; (4): 186—92. (in Russian)
12. Cai L., Tao X., Liu Y., Zhang H., Gao L., Hu S., et al. Molecular characteristics and phylogenetic analysis of N gene of human derived rabies virus. *Biomed. Environ. Sci.* 2011; 24(4): 431—7.
13. Poleshchuk E.M., Sidorov G.N., Gribencha S.V. Results of studying the antigenic and genetic diversity of the rabies virus in populations of terrestrial mammals of Russia. *Voprosy virusologii*. 2013; 58(3): 9—15. (in Russian)
14. Chupin S.A., Chernyshova E.V., Metlin A.E. Genetic characterization of field isolates of rabies virus identified in the territory of the Russian Federation in 2008—2011. *Voprosy virusologii*. 2013; (4): 44—9. (in Russian)
15. Gulyukin A.M. The importance of modern methods of laboratory diagnosis of rabies and identification of the causative agent for immunological monitoring of zoonoses. *Voprosy virusologii*. 2014; 59(3): 5—10. (in Russian)

## REFERENCES

1. Vasil'ev D.A., Lugovtsev V.Yu., eds. *Course of Lectures on Virology. Part II: The Virus Causes Disease Common to Many Species of Animals. [Kurs lektsiy po virusologii. Chast'vtoraya: Virusy, vyuzvayush-*

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017  
УДК 578.832.1.083.33

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**Information about authors:**

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

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

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

Received 01 July 2016

Accepted 13 December 2016

## Введение

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### Материал и методы

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### Результаты

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

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

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

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

Таблица 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## Обсуждение

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

Таблица 2

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

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

Таблица 3

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

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

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

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

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

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

### Заключение

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

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

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

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

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

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

### REFERENCES

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

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

Поступила 01.07.16  
Принята в печать 13.12.16

© ОЛЕЙНИК А.Ф., ФАЗЫЛОВ В.Х., 2017

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

Олейник А.Ф., Фазылов В.Х.

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

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

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

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

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

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

Oleynik A.F., Fazylov V.Kh.

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

Kazan State Medical University, Kazan, 420012, Russian Federation

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

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

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

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

of ART in sub-groups with durations of HIV infection prior to initiating therapy of 1-8 years and > 8 years ( $p = 0.035$ ;  $p = 0.015$ ;  $p = 0.05$ ;  $p = 0.05$ , respectively). In patients who started ART with CD4 levels > 200 cells/mcl after 8 years of HIV infection, the risk of immunological treatment failure is 4 times higher as compared to patients with the same CD4 level, but lesser duration of HIV infection.

**Conclusions.** The shorter the duration of HIV infection, the greater the increase in CD4 cell count. When starting ART at CD4 level of 200-350 cells/mcl, restoration of CD4 count is more intense in the group with lesser period of HIV infection. A negative effect of the >8-year infection duration before the start of ART on the development of the immunological treatment failure was observed in a subgroup with a starting level of CD4 > 200 cells /mcl.

**Key words:** HIV infection; CD4 recovery; immunological efficiency/inefficiency of ART; duration of HIV infection.

**For citation:** Oleynik A.F., Fazylov V.Kh. The influence of HIV infection duration before antiretroviral therapy on immunological treatment failure. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2017; 62(3): 114-119. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-3-114-119>

**For correspondence:** Alfiya F. Oleynik, PhD, Kazan State Medical University, Kazan, 420012, Russian Federation.

E-mail: [aalfons@yandex.ru](mailto:aalfons@yandex.ru)

**Information about authors:**

Oleynik A.F., <https://orcid.org/0000-0001-6576-9839>; Fazylov V.H., <https://orcid.org/0000-0003-4333-6316>

**Acknowledgements.** The authors are grateful to the senior staff of GAUZ RTsPB SPID IZ MZ RT (chief medical officer N.I. Galiullin, deputy chief medical officer F.I. Nagimova, head of the Department of sociomedical rehabilitation of HIV patients A.T. Beshimov) for making this study possible. The study had no sponsorship.

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

Received 16 May 2016

Accepted 13 December 2016

## Введение

С появлением антиретровирусной терапии (АРВТ) ВИЧ-инфекция перешла в разряд терапевтически контролируемых заболеваний [1]. Основными задачами АРВТ, позволяющими добиться улучшения показателей выживаемости ВИЧ-инфицированных пациентов, являются вирусологический и иммунологический ответы на терапию. Если вирусологическая задача — снизить вирусную нагрузку до минимального уровня и удерживать ее на этом уровне в течение как можно более длительного времени, то об иммунологическом успехе АРВТ свидетельствует увеличение числа лимфоцитов CD4 на фоне лечения. Динамика прироста количества лимфоцитов CD4 коррелирует с динамикой снижения вирусной нагрузки, однако в некоторых случаях наблюдаются дискордантные изменения показателей, в рамках которых можно выделить феномен иммунологической неэффективности АРВТ. Иммунологическая неэффективность лечения развивается ориентировочно у 15% пациентов [2], когда на фоне исчезновения вируса из крови отсутствует подъем уровня CD4-лимфоцитов. Несмотря на длительный прием антиретровирусных препаратов, у данной категории пациентов сохраняется иммунодефицитное состояние и как следствие повышенный риск наступления стадии СПИДа. Кроме того, в этой группе пациентов отмечается небольшое увеличение показателей смертности, не связанной со СПИД-индикаторными заболеваниями [3]. К факторам, способным повлиять на выраженность иммунологического ответа на фоне вирусологически успешной АРВТ, относятся прежде всего исходный уровень CD4-лимфоцитов, возраст, генетическая предрасположенность, наличие вторичных и сопутствующих заболеваний. Эффект неблагоприятного влияния большинства вышеперечисленных факторов учтен в ведущих руководствах, регламентирующих показания к началу АРВТ [4—7]. Длительность инфицирования ВИЧ до начала АРВТ также способна оказывать влияние на восстановление лимфоцитов CD4 [8]. Однако неясно, насколько выражен этот эффект и связано ли негативное влияние фактора длительности инфицирования ВИЧ до начала лечения с исходным уровнем CD4-лимфоцитов.

Цель нашего исследования — оценить влияние факто-

ра длительности инфицирования ВИЧ до начала АРВТ на развитие иммунологической неэффективности лечения.

## Материал и методы

Обсервационное когортное ретро/проспективное исследование было проведено в 2010—2014 гг. на базе ГАУЗ «Республиканский центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями Министерства здравоохранения Республики Татарстан» (далее — СПИД-центр). В работу были включены данные о пациентах с установленным диагнозом «ВИЧ-инфекция», находившихся на диспансерном наблюдении в СПИД-центре в период с 1999 по 2014 г. Данные для ретро-спективной оценки за период с 1999 по 2010 г. взяты из электронной базы данных СПИД-центра AIDS-NET. Данные для проспективной оценки отбирались во время плановой диспансеризации пациентов в 2010—2014 гг. В исследование включали пациентов, отвечающих критериям включения: это взрослые пациенты с ВИЧ-инфекцией, получающие АРВТ в течение 3 лет, с уровнем РНК ВИЧ в плазме крови ниже порога определения через 6 мес от начала АРВТ и в дальнейшем периоде наблюдения; АРВТ начата в стадиях 3 или 4 по классификации ВИЧ-инфекции, утвержденной приказом Минздравсоцразвития России от 17 марта 2006 г. № 166. Критериями исключения из исследования были: детский возраст; длительность АРВТ менее 3 лет; пациенты с ВИЧ-инфекцией, получающие АРВТ, с определяемым уровнем РНК ВИЧ в плазме крови через 6 мес от начала АРВТ и в дальнейшем периоде наблюдения; пациенты с ВИЧ-инфекцией, находящиеся в стадиях инкубации, первичных проявлений и терминальной; пациенты с ВИЧ-инфекцией, получающие одновременно АРВТ и противовирусную терапию (ПВТ) вирусного гепатита (для первого и третьего этапа исследования). Критерии досрочного выбытия из исследования: прекращение пациентом получения АРВТ; определяемая вирусная нагрузка РНК ВИЧ, развившаяся после ранее достигнутой супрессии ВИЧ в плазме крови; старт ПВТ вирусного гепатита у пациента, принимающего АРВТ (для первого и третьего этапа исследования); смерть пациента.

Все пациенты, согласно правилам клинической практики, подписали информированное согласие на обследование при постановке на учет в СПИД-центр, а также информированное согласие на АРВТ перед ее началом. Было получено одобрение локального этического комитета на проведение данного исследования.

Под наблюдением находились 140 ВИЧ-инфицированных пациентов с известной длительностью инфицирования ВИЧ в возрасте 34 [30; 39] лет, 53% мужчин. В 44% случаев путь заражения парентеральный. Стаж инфицирования ВИЧ до начала лечения — 6 [3; 9,5] лет. Пациенты находились в стадиях: 3 — 34,8%, 4А — 22,5%, 4Б — 35,9%, 4В — 6,8%. У 8,9% пациентов отмечено прогрессирование ВИЧ-инфекции на фоне АРВТ, из них более половины (62,5%) — пациенты с иммунологической неэффективностью АРВТ. Надир лимфоцитов CD4 в периферической крови составил 188 [111; 290] кл/мкл. Уровень РНК ВИЧ в плазме крови перед началом АРВТ — 98 600 [18 400; 359 500] копий/мл.

Длительность инфицирования установлена на основании данных об отрицательном результате иммуноферментного анализа на антитела к ВИЧ в течение 1 года до первого положительного результата. В этом случае за дату заражения принималась срединная дата между отрицательным и положительным тестом на ВИЧ. Кроме того, длительность инфицирования устанавливалась на основании лабораторных признаков незавершенной сероконверсии методом иммунного блоттинга. Учитывались наличие клинических данных, свидетельствующих о стадии первичных проявлений, и эпидемиологических данных, свидетельствующих о вероятном заражении ВИЧ. Для пациентов с сероконверсией за дату инфицирования принималась точка, соответствующая 12 мес (как максимально возможный инкубационный период) до первого положительного/сомнительного результата иммунного блоттинга.

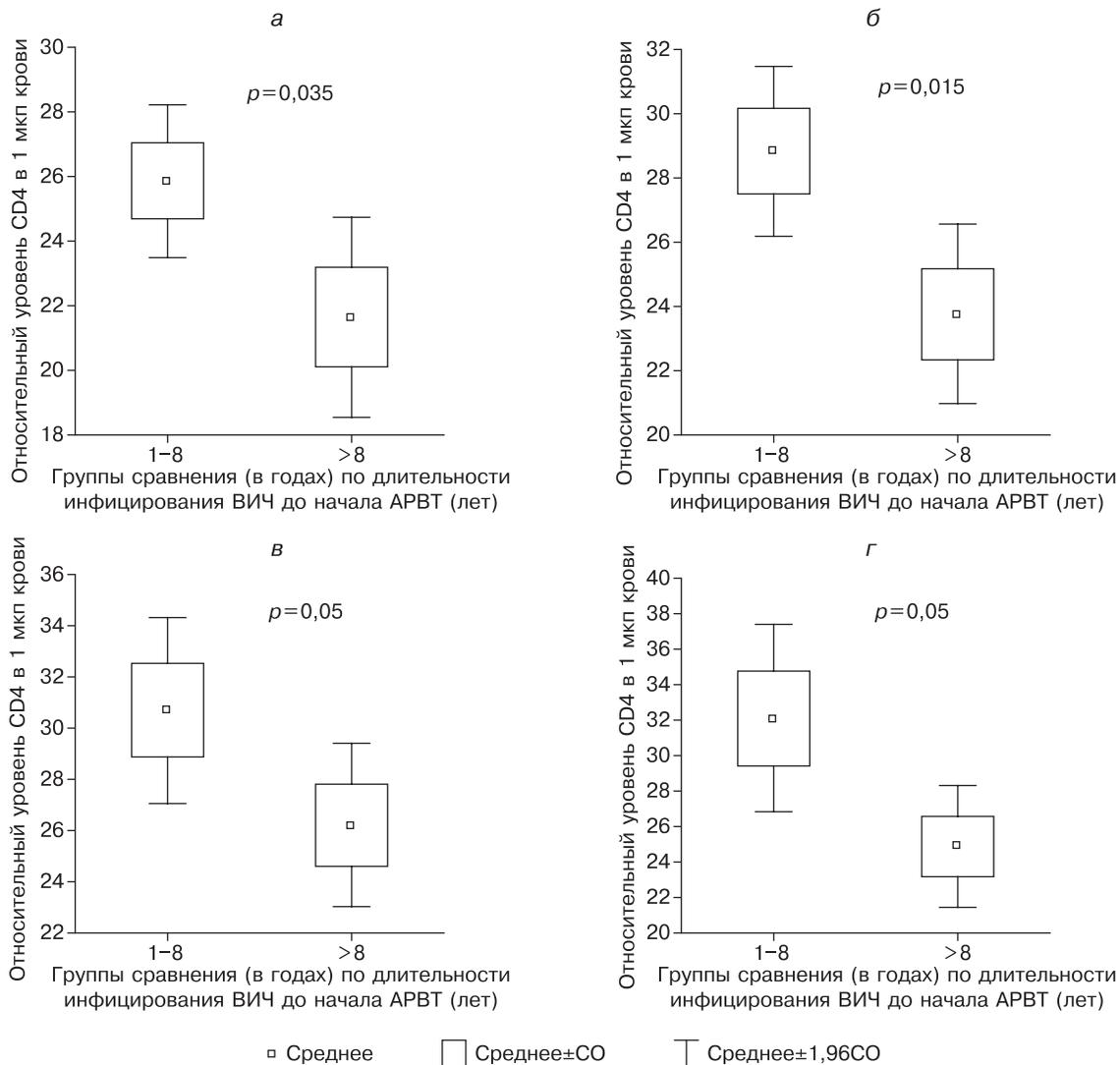
На основании длительности инфицирования пациенты были разделены на 4 группы: 1—3 года, 4—7 лет, 8—10 лет, более 10 лет инфицирования. Однако в ходе исследования не было обнаружено различий между группами 1—3 и 4—7 лет, а также 8—10 и более 10 лет. С целью упрощения статистической обработки группы с отсутствием различий были объединены с образованием двух групп: 1—8 и более 8 лет инфицирования ВИЧ до начала терапии. Всем пациентам начата АРВТ (в соответствии с Методическими рекомендациями Минздравсоцразвития РФ № 7125-РХ от 29.12.2006), за ходом которой наблюдали в течение 3 лет. В зависимости от уровня прироста CD4-лимфоцитов на фоне АРВТ пациенты были разделены на 2 группы: иммунологические «неответчики» — пациенты с приростом CD4-лимфоцитов менее 50 кл/мкл за 1 год; пациенты, ответившие на АРВТ приростом CD4-лимфоцитов более 50 кл/мкл за 1 год. Оценка прироста CD4-лимфоцитов проводилась как минимум в двух повторных измерениях с разницей в 3 мес для исключения случайной ошибки ввиду вариабельности абсолютного показателя уровня лимфоцитов CD4.

Для исследования отобраны данные клинического и лабораторного обследования (абсолютное и относительное количество лимфоцитов CD4 в 1 мкл крови, количество копий РНК ВИЧ в 1 мл крови) следующих временных точек: перед началом АРВТ, через 6 и 12 мес после начала АРВТ, далее ежегодно на протяжении всего периода лечения. Количественное определение РНК

ВИЧ в плазме крови выполнялось методом ПЦР с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени на анализаторах COBAS TaqMan 48 («Hoffman-La-Roche», Швейцария), Abbott m2000rt («Abbott Biosystems», США) с порогом чувствительности 400 копий/мл до 2010 г., 150 копий/мл — в более поздний период. Количество CD4-лимфоцитов определялось методом проточной цитофлуориметрии с использованием моноклональных антител. Фенотипирование лимфоцитов выполняли методом прямой реакции иммунофлуоресценции с моноклональными антителами (мкАТ) фирмы «Becton Dickinson» (США). Использовали реагент BD Мультипест 6-цветный TBNK, содержащий мкАТ CD3, CD4, CD8, CD16/56, CD19 с учетом реакции иммунофлуоресценции на проточном цитофлуориметре FACScanto II («Becton Dickinson», США).

Исследование проведено в 3 этапа. На первом этапе оценивали силу связи стажа инфицирования ВИЧ с приростом лимфоцитов CD4 через 6 мес, 1, 2 и 3 года получения АРВТ. На этом этапе исключены из исследования пациенты, получающие одновременно АРВТ и ПВТ хронического гепатита С (ХГС) ввиду значительного снижения абсолютного количества CD4-лимфоцитов на фоне ПВТ ХГС. Число наблюдаемых на этом этапе составило 89 человек. На втором этапе проводилось сравнение темпа восстановления относительного количества лимфоцитов CD4 в группах с равным стартовым уровнем лимфоцитов CD4, но разной длительностью инфицирования: 1—8 и более 8 лет инфицирования в группах с исходными CD4 < 100, 100—200, 200—350 и > 350 кл/мкл. Поскольку исследовали относительный уровень CD4-лимфоцитов, в этом этапе приняли участие 140 больных, включая пациентов, получавших ПВТ ХГС. На заключительном этапе оценивали влияние фактора длительности инфицирования ВИЧ на развитие иммунологической неэффективности (ИН) АРВТ. Воздействие фактора оценивали за трехлетний период АРВТ в целом независимо от срока возникновения ИН. На этом этапе из исследования исключены пациенты, получающие одновременно АРВТ и ПВТ ХГС, количество наблюдаемых составило 89 человек.

*Статистическая обработка.* Необходимый размер выборки рассчитан на основе 90% мощности обнаружения значимого на уровне 5% различия в группах. Используются методы описательной и сравнительной статистики с помощью программ Statistica 10.0, Microsoft Excel 2003. Нормальность распределения количественного признака в вариационном ряду оценивали с помощью критерия Шапиро—Уилка, равенство дисперсий распределения признаков — с применением *F*-теста. В случае наличия отличного от нормального распределения признака в вариационном ряду применяли непараметрические методы статистического анализа. Данные, подчиняющиеся закону нормального распределения, представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения ( $M \pm SD$ ). При отличном от нормального распределении признака в вариационном ряду для представления данных использованы медиана и межквартильный размах  $Me [Q_1; Q_3]$ . При сравнении независимых выборок для определения достоверности различий между группами прибегали к *t*-критерию Стьюдента и критерию Манна—Уитни (при распределении, отличном от нормального). Сравнение категориальных данных проведено при помощи критерия  $\chi^2$  и точного критерия Фишера (при малом числе наблюдений). Для оценки



Относительный уровень лимфоцитов CD4 через 6 мес (а), 1 год (б), 2 года (в) и 3 года (г) АРВТ в группах с различной длительностью инфицирования ВИЧ до начала лечения, но одинаковым стартовым уровнем CD4-лимфоцитов 200—350 кл/мкл.

связи двух признаков ( $r$ ) применен непараметрический метод корреляционного анализа Спирмена. Для сравнения частот исходов рассчитывали относительный риск (RR) и 95% доверительные интервалы. Отклонение нулевой гипотезы происходило при пороговом уровне статистической значимости  $p = 0,05$ .

### Результаты

Установлено наличие обратной корреляционной зависимости между длительностью инфицирования ВИЧ и приростом лимфоцитов CD4 через 6 мес, 1, 2 и 3 года АРВТ ( $r = -0,33, p < 0,01$ ;  $r = -0,3, p < 0,01$ ;  $r = -0,3, p < 0,01$ ;  $r = -0,29, p < 0,01$  соответственно), т. е. с увеличением длительности инфицирования ВИЧ до начала АРВТ снижался показатель прироста CD4-лимфоцитов на фоне лечения.

При старте АРВТ с уровня CD4 200—350 кл/мкл выявлены статистически значимые различия по уровню относительного количества лимфоцитов CD4 через 6 мес, 1, 2 и 3 года АРВТ в группах с различной длительностью инфицирования ВИЧ до начала терапии (1—8 и более 8 лет) (см. рисунок).

При этом в группе с длительностью инфицирования ВИЧ до начала лечения 1—8 лет содержание CD4 на фоне лечения было больше в среднем на 58, 60, 73 и 100 кл/мкл на этапах лечения 6 мес, 1, 2 и 3 года АРВТ соответственно.

При старте АРВТ с уровня CD4 100—200 кл/мкл также зарегистрирован более высокий относительный уровень CD4-лимфоцитов на всех этапах лечения в группе с длительностью инфицирования 1—8 лет по сравнению с группой с большим стажем инфицирования ВИЧ до начала лечения, однако результат не был статистически значимым ( $p = 0,31$ ;  $p = 0,07$ ;  $p = 0,19$ ;  $p = 0,08$  на этапах лечения 6 мес, 1, 2 и 3 года АРВТ соответственно).

При старте АРВТ с уровня CD4 менее 100 и более 350 кл/мкл не выявлено существенных различий между группами сравнения по содержанию CD4-лимфоцитов в крови на фоне АРВТ.

При оценке влияния длительности инфицирования ВИЧ как фактора риска развития ИН АРВТ выявлено повышение риска развития иммунологического «неответа» в 2,694 раза в группе со стажем инфицирования более 8 лет по сравнению с пациентами со стажем ин-

фицирования 1—8 лет ( $F = 0,03$ ;  $\chi^2 = 0,016$ ; 95% ДИ 1,174—6,179).

Для оценки возможной модификации эффекта и конфаундинга мы провели стратификацию пациентов по надиру CD4-лимфоцитов: менее 200 и более 200 кл/мкл. Стратификация показала, что стартовый уровень CD4 значительно модифицирует влияние длительности инфицирования ВИЧ на развитие ИН лечения: RR для подгруппы «надир CD4 < 200» составил 1,75 ( $F = 0,45$ ;  $\chi^2 = 0,28$ ; ДИ 0,6139—4,989), для подгруппы «надир CD4 > 200» — 4 ( $F = 0,05$ ;  $\chi^2 = 0,03$ ; ДИ 1,055—15,16). Таким образом, неблагоприятное влияние длительности инфицирования более 8 лет на развитие ИН терапии может иметь отношение к группе со стартовым уровнем CD4 > 200 кл/мкл; ранжирование больных по возрасту и полу показало, что возраст и пол не являлись конфаундером или модификатором эффекта.

### Обсуждение

Причины отсутствия прироста лимфоцитов CD4 при достижении вирусологического ответа на АРВТ до сих пор остаются недостаточно ясными. Четких рекомендаций в случае возникновения феномена ИН АРВТ нет. На иммунологическую эффективность терапии влияют множество факторов, среди которых исходный низкий уровень CD4-лимфоцитов является, вероятно, самым неблагоприятным в отношении восстановления CD4-лимфоцитов при АРВТ [9]. Кроме того, иммунологический ответ нередко менее выражен у пожилых пациентов. Показано, что больные старше 50 лет имеют худший иммунологический ответ на АРВТ и низкую выживаемость [10]. Возможно, это связано в первую очередь с дистрофическими изменениями тимуса [11].

Среди прочих факторов, которые потенциально могут оказывать влияние на прирост CD4-лимфоцитов на фоне вирусологически эффективной АРВТ, рассматриваются также длительность инфицирования ВИЧ до начала терапии. Данные литературы относительно эффекта этого фактора крайне скудные и противоречивые. Например, в исследовании К. Shmagel и соавт. [8] обнаружено, что чем больше длительность течения заболевания без АРВТ, тем ниже восстановительный потенциал CD4-лимфоцитов. Результаты первого этапа нашего исследования подтверждают эти данные: установлена обратная связь между длительностью инфицирования ВИЧ до начала АРВТ и приростом CD4-лимфоцитов на фоне лечения. Указанная закономерность может быть следствием разного стартового уровня CD4-лимфоцитов перед началом АРВТ, так как известно, что чем больше длительность инфицирования ВИЧ, тем меньше содержание в крови лимфоцитов CD4. Чтобы ответить на этот вопрос, на втором этапе нами проведено сравнение темпа восстановления относительного количества лимфоцитов CD4 в группах с одинаковым стартовым уровнем лимфоцитов CD4, но разной длительностью инфицирования: 1—8 и более 8 лет инфицирования в группах с исходными CD4 < 100, 100—200, 200—350 и > 350 кл/мкл. Равный уровень CD4 на старте дал возможность проявить эффект длительности инфицирования ВИЧ, а не надир лимфоцитов CD4, а показатель процентного содержания CD4-клеток обеспечил точность измерения количества лимфоцитов CD4, поскольку является менее вариабельным, чем их абсолютное число [12]. Этот подход позволил нам выявить различия в уровне относительного количества лимфоцитов CD4 на всех этапах лечения в группах с различной длительностью инфицирования ВИЧ до на-

чала терапии при старте АРВТ с уровня CD4 200—350 и 100—200 кл/мкл. При меньшем стартовом количестве CD4 негативное влияние длительного инфицирования ВИЧ нивелировалось, вероятно, потому, что ключевым фактором неэффективного восстановления лимфоцитов CD4 является низкий надир CD4.

Кроме того, К. Shmagel и соавт. [8] не удалось продемонстрировать влияние длительности инфицирования ВИЧ на развитие ИН. Полученные данные могли быть результатом недостаточной мощности исследования либо недостаточной строгости критериев установления длительности инфицирования ВИЧ и ИН. Изучение длительности инфицирования ВИЧ до АРВТ в качестве возможного фактора риска развития ИН лечения, по нашему мнению, не кажется обосновательным и заслуживает внимания. Одним из возможных механизмов, лежащих в основе негативного влияния стажа инфицирования ВИЧ на восстановление лимфоцитов CD4, может являться гиперактивация иммунной системы [13], которая запускается вслед за инфицированием ВИЧ [14]. Чем длительнее период инфицирования ВИЧ до начала АРВТ, тем длительнее и период активации иммунной системы, что в конечном счете может приводить к неэффективному восстановлению CD4 при АРВТ. Установлено, что уровень маркеров иммунной активации и сосудистой дисфункции значительно повышен у так называемых «элитных контролеров» [15]. Следует заметить, что современные рекомендации в отношении показаний к АРВТ опираются на клинические, иммунологические, эпидемиологические и в меньшей степени вирусологические критерии без учета при этом стажа инфицирования ВИЧ. «Элитные контролеры» длительное время способны удерживать нормальный уровень лимфоцитов CD4 и низкую вирусную нагрузку РНК ВИЧ, в связи с чем нет показаний к началу АРВТ. Однако активация иммунной системы непрерывно продолжается, а показания к назначению АРВТ длительно отсутствуют. Нами было установлено, что длительность инфицирования ВИЧ до начала АРВТ более 8 лет является фактором риска развития ИН терапии. Подтверждено также, что негативное влияние длительности инфицирования ВИЧ более 8 лет сильнее в группе с более высоким уровнем CD4 на старте терапии. Полученные результаты диктуют необходимость учета длительности инфицирования ВИЧ при назначении АРВТ.

### Выводы

1. Установлена обратная связь между длительностью инфицирования ВИЧ до начала АРВТ и приростом CD4-лимфоцитов при АРВТ: чем меньше длительность инфицирования ВИЧ, тем выше прирост CD4-лимфоцитов.
2. При старте АРВТ с уровня CD4 200—350 кл/мкл восстановление лимфоцитов CD4 происходит интенсивнее в группе с менее продолжительным периодом инфицирования ВИЧ.
3. Длительность инфицирования ВИЧ до начала АРВТ более 8 лет является фактором риска развития ИН терапии, увеличивая вероятность ее возникновения в 4 раза (у пациентов, начавших АРВТ с уровня CD4 более 200 кл/мкл).

**Благодарность.** Авторы благодарят руководство ГАУЗ «РЦПБ СПИД и ИЗ МЗ РТ» в лице главного врача Н.И. Галиуллина, заместителя главного врача по лечебной работе Ф.И. Нагимову, заведующего отделением медико-социальной реабилитации пациентов с ВИЧ-инфекцией А.Т. Бешимова за возможность проведения данного исследования.

**Финансирование.** Авторы заявляют об отсутствии финансовой поддержки.

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

#### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 2, 3, 5—13, 15 см. REFERENCES)

1. Бартлетт Д., Галант Д., Фам П. *Клинические аспекты ВИЧ-инфекции. 2009—2010*. Пер. с англ. М.: Р. Валент; 2010.
4. Покровский В.В., Юрин О.Г., Кравченко А.В., Беляева В.В., Канестри В.Г., Афонина Л.Ю. и др. Протоколы диспансерного наблюдения и лечения больных ВИЧ-инфекцией. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2014; (6): 14—5.
14. Фазылов В.Х., Манапова Э.Р., Гольц М.Л., Бешимов А.Т. Клинико-иммунологический и цитокиновый профиль у пациентов ВИЧ-инфекцией на ранних сроках заболевания при различных путях инфицирования. *Цитокины и воспаление*. 2013; 12(3): 35—40.

#### REFERENCES

1. Bartlett J.G., Gallant J.E., Pham P.A. *Medical management of HIV infection*. Durham, NC: Knowledge Source Solutions, LLC; 2009.
2. Moore D., Hogg R., Yip B., Wood E., Tyndall M., Braitstein P. et al. Discordant immunologic and virologic responses to highly active antiretroviral therapy are associated with increased mortality and poor adherence to therapy. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2005; 40: 288—293.
3. Gilson R.J., Man S.L., Copas A., Rider A., Forsyth A., Hill S. et al. Discordant responses on starting highly active antiretroviral therapy: suboptimal CD4 increases despite early viral suppression in the UK Collaborative HIV Cohort (UK CHIC) Study. *HIV Med.* 2010; 11: 152—160.
4. Pokrovskiy V.V., Yurin O.G., Kravchenko A.V., Belyaeva V.V., Kanestri V.G., Afonina L.Yu. et al. Protocols of follow-up and treatment of patients with HIV infection. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni*. 2014; (6): 14—5. (in Russian)
5. Antiretroviral therapy guidelines, version 7.1. November 2014. European AIDS Clinical Society. Available at: [http://arvt.ru/sites/default/files/EACS\\_Guidelines\\_v7.1\\_ENG.pdf](http://arvt.ru/sites/default/files/EACS_Guidelines_v7.1_ENG.pdf)
6. Consolidated guidelines on HIV prevention, diagnosis, treatment and

care for key populations. World Health Organization. Available at: <http://www.who.int/hiv/pub/guidelines/en/>

7. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. Department of Health and Human Services. Available at: <http://aidsinfo.nih.gov/guidelines>
8. Shmagel K., Smagel N., Saydakova E., Zverev S., Korolevskaya L., Vorobyeva N. et al. Investigation of mechanisms of immunological inefficiency of antiretroviral therapy in HIV-infected patients. In: *Proceedings of the ERA.Net RUS Brokerage event*. Yekaterinburg; 2011.
9. Julg B., Poole D., Ghebremichael M., Castilla C., Altfeld M., Sunpath H. et al. Factors predicting discordant virological and immunological responses to antiretroviral therapy in HIV-1 clade C infected Zulu/Xhosa in South Africa. *PLoS One*. 2012; 7(2): 1—5.
10. Blanco J.R., Jarrin I., Vallejo M., Berenguer J., Solera C., Rubio R. et al. Definition of advanced age in HIV infection: looking for an age cut-off. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2012; 28(9): 1000—6.
11. Grabar S., Kousignian I., Sobel A., Le Bras P., Gasnault J., Enel P. et al. Immunological and clinical responses to Highly active antiretroviral therapy over 50 years of age. Results from the French Hospital Database on HIV. *AIDS*. 2004; (18): 2029—38.
12. Hoover D.R. Would confirmatory retesting of CD4+ cells to verify AIDS status be too expensive? *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 1993; 6(5): 537—9.
13. Deeks S.G., Kithen C.M., Liu L., Guo H., Gascon R., Narváez AB., et al. Immune activation see point during early HIV infection predicts subsequent CD4+ T-cell changes independent of viral load. *Blood*. 2004; 104(4): 942—7.
14. Fazylov V.Kh., Manapova E.R., Gol'ts M.L., Beshimov A.T. Clinical and immunological and cytokine profile in patients with HIV infection in the early stages of the disease at different ways of infection. *Tsitokiny i vospalenie*. 2013; 12(3): 35—40. (in Russian)
15. Hunt P.W., Brenchley J., Sinclair E., McCune J.M., Roland M., Shafer KP. et al. Relationship between T cell activation and CD4+ T cell count in HIV-seropositive individuals with undetectable plasma HIV RNA levels in the absence of therapy. *J. Infect. Dis.* 2008; 197(1): 126—33.

Поступила 16.05.16

Принята в печать 13.12.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 578.891:578.31.083.2

**Коноплева М.В.<sup>1</sup>, Соколова М.В.<sup>1</sup>, Шевлягина Н.В.<sup>1</sup>, Баженов А.И.<sup>2</sup>, Фельдшера А.А.<sup>1</sup>, Крымский М.А.<sup>3</sup>, Борисова В.Н.<sup>3</sup>, Семенов Т.А.<sup>1</sup>, Нестеренко В.Г.<sup>1</sup>, Суслов А.П.<sup>1</sup>**

## МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВИРУСА ГЕПАТИТА В с ЭСКЕЙП-МУТАЦИЯМИ в S-гене G145R и S143L

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

<sup>2</sup> ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского» Департамента здравоохранения г. Москвы, 129090, г. Москва;

<sup>3</sup> ЗАО НПК «Комбиотех», 117997, г. Москва

**Введение.** По серологическим свойствам и при иммунизации дикий тип HBsAg вируса гепатита В (ВГВ) и его мутант G145R ведут себя как различные антигены. Это свидетельствует о серьезных структурных изменениях, которые предположительно способны оказать существенное влияние на морфогенез вирионов и субвирусных частиц. Однако морфологические и ультраструктурные исследования ВГВ с мутацией G145R ранее не проводились. **Цель работы:** изучение структурно-морфологической организации ВГВ при наличии эскейп-мутации G145R. **Методы.** Исследования сывороток, очищенных вирусов, а также рекомбинантных HBsAg проводили с помощью трансмиссионной электронной микроскопии методом негативного контраста и непрямой реакции иммуномечения с применением моноклональных антител различной специфичности. В качестве контроля использовали образцы ВГВ дикого типа и ВГВ, имеющего мутацию S143L, полученные аналогичным способом.

**Для корреспонденции:** Коноплева Мария Вениаминовна, канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории медиаторов и эффекторов иммунитета, отдел иммунологии ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва. E-mail: maria-konopleva@rambler.ru

**Результаты.** В препаратах дикого штамма и ВГВ с мутацией S143L показано наличие типичных вирусных частиц ВГВ. Препараты ВГВ с мутацией G145R отличались выраженной морфологической гетерогенностью. В исходной сыворотке и препарате очищенного вируса, содержащих мутант G145R, обнаружены крупные овальные частицы размером 60–70 нм и до 200 нм соответственно. Подтверждено наличие антигенных структур ВГВ во всех гетерогенных формах. Показано, что формирование субвирусных частиц при экспрессии рекомбинантного HBsAg с мутацией G145R зависит от условий экспрессии и очистки белка. Они могут варьировать от хорошо сформированных круглых и овальных субвирусных частиц размером 20–50 нм до практически неструктурированных мелкозернистых масс. **Заключение.** Получены прямые данные о влиянии эскейп-мутации G145R в S-гене в отличие от мутации S143L на морфогенез вирионов и субвирусных частиц ВГВ.

Ключевые слова: мутация; S-ген; G145R; S143L; вирус гепатита В; HBsAg; электронная микроскопия; вирион; субвирусные частицы.

**Для цитирования:** Коноплева М.В., Соколова М.В., Шевлягина Н.В., Баженов А.И., Фельдшерова А.А., Крымский М.А., Борисова В.Н., Семенов Т.А., Нестеренко В.Г., Суслов А.П. Морфологический анализ вируса гепатита В с эскейп-мутациями в S-гене G145R и S143L. *Вопросы вирусологии.* 2017; 62(3): 119-128.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-3-119-128>

**Konopleva M.V.<sup>1</sup>, Sokolova M.V.<sup>1</sup>, Shevlyagina N.V.<sup>1</sup>, Bazhenov A.I.<sup>2</sup>, Fel'dsherova A.A.<sup>1</sup>, Krymskij M.A.<sup>3</sup>, Borisova V.N.<sup>3</sup>, Semenenko T.A.<sup>1</sup>, Nesterenko V.G.<sup>1</sup>, Suslov A.P.<sup>1</sup>**

### MORPHOLOGICAL ANALYSIS OF HEPATITIS B VIRUS WITH ESCAPE MUTATIONS IN S-GENE G145R AND S143L

<sup>1</sup>Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russian Federation;

<sup>2</sup>N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine of Moscow Healthcare Department, Moscow, 129090, Russian Federation;

<sup>3</sup>ZAO NPK Combiotech, Moscow, 117997, Russian Federation

**Background.** In terms of serological properties and immunization, the wild type of HBsAg HBV and its G145R mutant behave as different antigens. This testifies to serious structural changes, which presumably could have a significant impact on the morphogenesis of virions and subviral particles. Nevertheless, morphological and ultrastructural investigations of HBV with G145R mutation have not been carried yet.

**Objectives.** Research of structural and morphological organization of HBV in the presence of the G145R escape mutation.

**Methods.** Studies of sera, purified viruses and recombinant HBsAg were carried out by transmission electron microscopy by the method of negative staining and indirect reaction of immunelabeling using monoclonal antibodies of different specificity. Specimens of wild type HBV and HBV with S143L mutation obtained in an identical manner were used as the control.

**Results.** The presence of typical virus particles of HBV was shown in the specimens of wild strain and HBV with S143L mutation. Specimens of HBV with G145R mutation were characterized by expressed morphological heterogeneity. In the initial serum and in the specimen of purified virus containing G145R mutant, large oval particles 60–70 nm and up to 200 nm in size, respectively, were found. The presence of antigen structures of HBV in all heterogeneous forms was confirmed. It was shown that forming of subviral particles in the process of expression of the recombinant HBsAg with G145R mutation depends on conditions of expression and purification of the protein. They can vary from well-formed circular and oval particles to practically unstructured fine-grained masses.

**Conclusion.** Direct data on the impact of G145R escape-mutation in S-gene, in contrast to S143L mutation, on the morphogenesis of virions and subviral particles of HBV were obtained.

**Key words:** mutation; S-gene; G145R; S143L; HBV; HBsAg; electronic microscopy; virion; subviral particles.

**For citation:** Konopleva M.V., Sokolova M.V., Shevlyagina N.V., Bazhenov A.I., Fel'dsherova A.A., Krymskij M.A., Borisova V.N., Semenenko T.A., Nesterenko V.G., Suslov A.P. Morphological analysis of hepatitis B virus with escape mutations in S-gene G145R and S143L. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal).* 2017; 62(3): 119-128. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-3-119-128>

**For correspondence:** Mariya V. Konopleva, PhD (Biol.), Senior Scientist, Laboratory of mediators and effectors of immunity, Department of Immunology, Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russian Federation. E-mail: maria-konopleva@rambler.ru

#### Information about authors:

Konopleva M.V., <http://orcid.org/0000-0002-9724-695X>; Sokolova M.V., <http://orcid.org/0000-0002-2836-8232>;  
Shevlyagina N.V., <http://orcid.org/0000-0001-9651-1654>; Bazhenov A.I., <http://orcid.org/0000-0002-1926-145>;  
Fel'dsherova A.A., <http://orcid.org/0000-0001-7216-4301>; Krymskij M.A., <http://orcid.org/0000-0003-4603-7354>;  
Borisova V.N., <http://orcid.org/0000-0001-7571-150X>; Semenenko T.A., <http://orcid.org/0000-0002-6686-9011>;  
Nesterenko V.G., <http://orcid.org/0000-0002-9574-6512>; Suslov A.P., <http://orcid.org/0000-0001-5731-3284>

**Acknowledgements.** We would like to thank our prematurely deceased colleagues Tretyakov O.Yu., Didenko, L.V. and Kost E.A. for their generous and invaluable help with the experimental work.

This work was funded by the ZAO NPK Combiotech, Moscow, Russian Federation.

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

Received 30 January 2017  
Accepted 28 February 2017

## Введение

Вирус гепатита В (ВГВ) человека относится к семейству *Hepadnaviridae*. Нуклеокапсид вириона бывает двух

размеров, поскольку core-частицы могут состоять из 90 и 120 НВс-димеров, обладающих T = 3 или T = 4 ико-саэдрической симметрией соответственно, при этом при

инфекции доминируют  $T = 4$  капсиды [1, 2]. Капсиды содержат единичную копию частично двунитевой кольцевой ДНК, состоящей из 3200 нуклеотидных оснований, ковалентно связанной с вирусной ДНК-полимеразой на 5'-конце полноразмерной минус-цепи [3]. Оболочка вириона ВГВ сформирована тремя разными гликозилированными поверхностными белками (HBs), обозначаемыми L- (большой), M- (средний) и S- (малый) HBsAg, в пропорции 1:1:4, которые встроены в липидный слой, происходящий от клетки-хозяина, и являются продуктами одного гена, транслируясь в одной рамке считывания, но с разных стартовых кодонов [1].

В частично очищенных препаратах ВГВ были обнаружены 3 основные морфологические формы частиц: частицы 42—47 нм с двойной оболочкой (частицы Дейна), неинфекционные квазисферические частицы диаметром 20—22 нм и октаэдрической симметрией и филаменты диаметром 22 нм различной длины [4—7]. Субвирусные частицы экспрессируются в большей степени, чем вирионы, и их концентрация в сыворотке может быть больше в 10 000 раз [7]. Сферические субвирусные частицы состоят только из S-HBsAg и содержат низкое количество L-HBsAg, в то время как в филаментах и частицах Дейна относительное количество L-HBsAg гораздо выше [7]. Для морфогенеза вириона и секреции вирионов важны и Pre-S1, и S-домены [1, 7—11]. Экспрессия рекомбинантного S-HBsAg (например, в дрожжах *H. polymorpha* или клетках млекопитающих) приводит к появлению высокоиммуногенных внутриклеточных 20 нм-HBsAg частиц [7, 12].

Процесс включения липидов в субвирусные частицы до конца не ясен. Возможно, это происходит с участием шаперонов, помогающих созреванию HBsAg [7, 13]. Однако хотя липидов в субвирусных частицах содержится лишь около 25%, липидный слой важен не только для морфогенеза вируса, но и для его иммуногенности. С помощью поликлональных антител к HBsAg было показано, что его антигенная активность существенно снижается при удалении липидов. Шесть различных антигенных сайтов, распознаваемых панелью моноклональных антител, снижали свою способность связывать соответствующее антитело, если из препарата HBsAg удаляли липиды [13].

Некоторые мутации в S-HBsAg также могут кардинальным образом менять способность HBsAg взаимодействовать с антителами. Обнаружение относительно часто встречаемой мутации G145R [14] определило направление исследований HBsAg-мутантов, ускользающих от вакцинального и диагностического контроля [15, 16]. До 90% моноклональных антител к HBsAg теряют свою реактивность при взаимодействии с мутантом G145R [17—19] в отличие от HBsAg с близко расположенной мутацией S143L [20]. При иммунизации животных природным или рекомбинантным HBsAg, несущим мутацию G145R, образуются антитела, специфичные к данному мутанту, но не к дикому типу [18]. Вакцинация людей HBsAg дикого типа с одинаковой эффективностью индуцирует образование антител как к HBsAg дикого типа, так и к мутанту S143L, но практически не вызывает образования антител к HBsAg, несущему мутацию G145R [21]. Таким образом, как по серологическим свойствам, так и при иммунизации дикий тип HBsAg и мутант G145R ведут себя как различные антигены.

Столь существенные изменения в антигенных свойствах HBsAg с мутацией G145R свидетельствуют о се-

рьезных структурных изменениях. Замена G145R вызывает значимое снижение иммуногенной активности HBsAg за счет конформационного изменения антигенных петель в его молекуле. Эта мутация вставляет новую  $\beta$ -складку в район  $\alpha$ -детерминанты HBsAg и изменяет ориентацию трансмембранных сегментов, что влияет на локализацию мутантного HBsAg в липидном слое, т. е. меняет мембранную топологию HBsAg. Мутация G145R также повышает компактность и стабильность HBsAg за счет увеличения жесткости его  $\alpha$ -детерминанты [3].

Можно ожидать, что столь значимые отличия ВГВ, содержащего мутацию G145R, способны оказать существенное влияние и на морфогенез вирионов и субвирусных частиц. Однако морфологические и ультраструктурные исследования проводились до сих пор только для ВГВ дикого типа. В этой связи целью настоящего исследования было изучение особенностей морфологической организации ВГВ при наличии мутации G145R в препаратах очищенного в градиенте сахарозы вируса, в нативном сывороточном материале, а также в образцах рекомбинантного HBsAg, экспрессированного в дрожжах *H. polymorpha*.

### Материал и методы

*Сыворотки крови, полученные от хронических HBsAg-носителей*

Источником ВГВ с мутациями S143L и G145R являлись ранее охарактеризованные нами [20] сыворотки № 283 (генотип D, субтип ауw3, ENA ERZ377007) и № 111 (генотип D, субтип адw<sub>3</sub>, ENA ERZ377006) с вирусной нагрузкой  $7,4 \cdot 10^8$  и  $9,0 \cdot 10^5$  копий/мл соответственно. По данным полногеномного секвенирования, в обоих мутантных вирусах целевая мутация представлена в 99% молекул, гетерогенности нуклеотидов в соответствующих кодонах обнаружено не было (данные не приведены). В качестве контрольного образца использовали ранее охарактеризованную сыворотку № 43, содержащую HBsAg дикого типа. Выделение ДНК ВГВ и определение вирусной нагрузки в образцах проводили методом количественной ПЦР с детекцией в режиме реального времени с помощью коммерческой тест-системы РеалБест ДНК-ВГВ (ЗАО «Вектор-Бест», Россия) и приборов Rotor-Gene 3000 («Corbett Research», Австралия) и CFX-96 («Bio-Rad», США).

*Рекомбинантные HBsAg с мутацией G145R*

В работе использовали рекомбинантные HBsAg ESC-15 и ESC-17 с мутацией G145R, относящиеся к субтипу ауw2 (генотип D), полученные от ЗАО НПК «Комбиотех» (Россия) [22]. ESC-антигены были экспрессированы в дрожжах *H. polymorpha* и очищены в различных условиях. Концентрации ESC-антигенов определяли методом иммуноблоттинга с поликлональными кроличьими антителами к HBsAg субтипа ауw2. Для проведения иммуноблоттинга использовали аффинно-очищенные поликлональные антитела кролика к восстановленному HBsAg (2% SDS, 5%  $\beta$ -меркаптоэтанол) в разведении 1:2000. Концентрация ESC-15 составляла 0,8 мг/мл, ESC-17 — 0,75 мг/мл.

*Выделение очищенного ВГВ дикого типа и мутантных форм вируса*

Сыворотку, содержащую ВГВ, осветляли центрифугированием при 13400 об/мин в течение 10 мин. К супернатанту добавляли равный объем 4% лимонной кислоты и пепсин до конечной концентрации 1 мг/мл (1 мг пепсина на 50—100 мг белка). Полученную смесь инкубировали

при 37 °С в течение 18 ч, после чего пепсиновый перевар нейтрализовывали 1 М NaOH до pH 8,0, добавляли Твин-80 до конечной концентрации 2% и инкубировали в течение 8 ч при комнатной температуре.

Для выделения вируса использовали ультрацентрифугирование в ступенчатом градиенте плотности сахарозы. В центрифужную пробирку объемом 14,5 мл вносили 3 мл 50% сахарозы в 0,9% NaCl, наслаивали 7 мл 20% сахарозы и вносили 4 мл пепсинового перевара. Пробирки уравнивали минеральным маслом Bayol F, запаивали и центрифугировали при 70 000 g в течение 20 ч при 15 °С, после чего отбирали фракции по 1 мл и проверяли их на наличие белка методом Брэдфорда и содержание HBsAg методом иммуноферментного анализа (ИФА).

#### Моноклональные анти-HBsAg-антитела

Моноклональные мышинные антитела 11F3 (IgG2a) и H2 (IgG1) к конформационным эпитопам а-детерминанты HBsAg были получены в лаборатории медиаторов и эффекторов иммунитета ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. Антитела обладают различной специфичностью по отношению к HBsAg дикого и мутантного типа. Антитело 11F3 практически не выявляет варианты HBsAg, несущие мутации S143L и G145R, тогда как конъюгат H2 выявляет как HBsAg

дикого типа, так и названные варианты, причем взаимодействие с мутантом G145R превышает взаимодействие с HBsAg дикого типа [20].

#### Метод трансмиссионной электронной микроскопии

Пробоподготовка перед трансмиссионной электронной микроскопией заключалась в фиксации сыровоточного материала, а также образцов очищенного ВГВ и рекомбинантного HBsAg по методу S. Ito и M. Karnovsky [23] с последующей постфиксацией в 1% OsO<sub>4</sub> и обработкой 1% раствором уранилацетата, обезвоживанием в спиртах и заключением в метакрилатную смолу LR White. С помощью ультратома LKB-III (Швеция) готовили ультратонкие срезы и помещали их на медные и никелевые сетки (300 меш), которые непосредственно перед электронно-микроскопическим анализом контрастировали 1% раствором уранилацетата и цитрата свинца [24].

#### Метод негативного контрастирования

Для негативного контрастирования каплю каждого фиксированного по методу S. Ito и M. Karnovsky образца наносили на покрытую формваром никелевую сетку (300 меш) на 10 мин, после чего фильтровальной бумагой удаляли жидкость и наносили каплю 1% водного раствора уранилацетата или 2% фосфорно-вольфрамовой кислоты либо 1% водного раствора молибдата аммония на

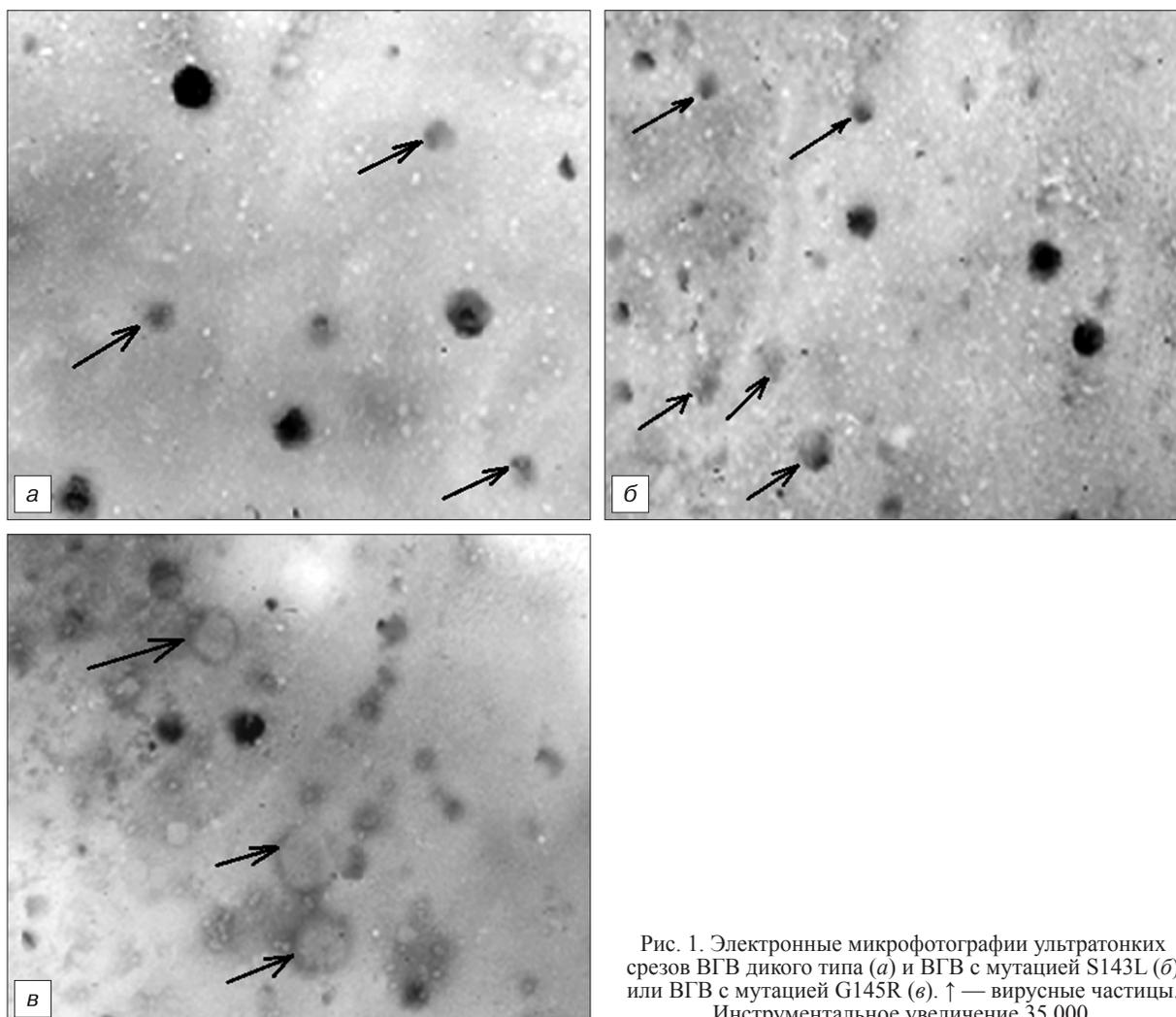


Рис. 1. Электронные микрофотографии ультратонких срезов ВГВ дикого типа (а) и ВГВ с мутацией S143L (б) или ВГВ с мутацией G145R (в). ↑ — вирусные частицы. Инструментальное увеличение 35 000.

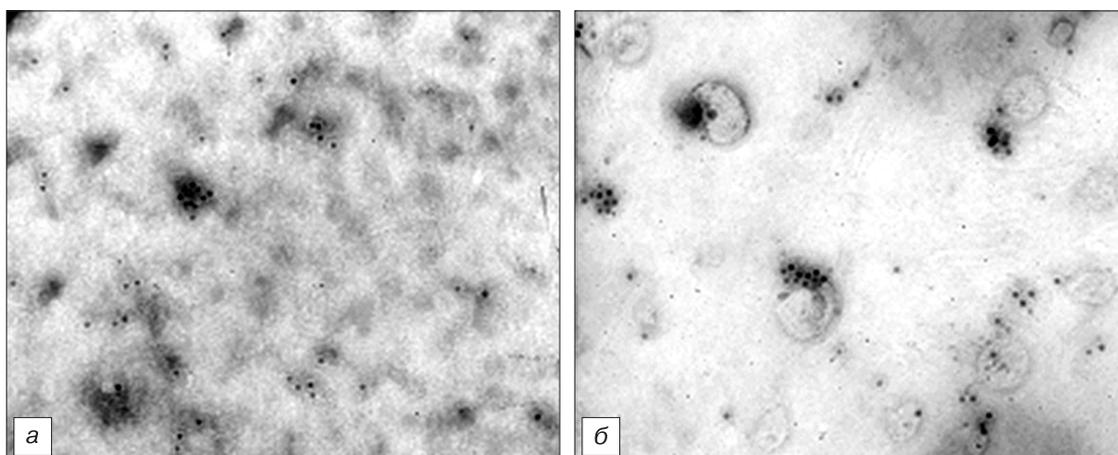


Рис. 2. Электронные микрофотографии ультратонких срезов с проведенной реакцией непрямого иммуномечения: анти-HBsAg H2 взаимодействуют с частицами ВГВ дикого типа (а) и крупными овальными частицами ВГВ, несущего мутацию G145R (б). Инструментальное увеличение 40 000.

1 мин, высушивали и анализировали на трансмиссионном электронном микроскопе JEM 100B («JEOL», Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ и на микроскопе STEM Tecnai 12 iCORR («Philips», Нидерланды) при ускоряющем напряжении 120 кВ в двух режимах (CCD Acquire или CCD Eagle 4x4k).

*Реакция непрямого иммуномечения*

Реакция иммуномечения проводилась на тотальных препаратах очищенных ВГВ и сывороточном материале, содержащем ВГВ, на никелевых сетках с формваровой подложкой. Каплю, содержащую вирусные частицы, наносили на никелевую сетку на 10 мин, после этого фильтровальной бумагой удаляли лишнюю жидкость и

обрабатывали мышинными моноклональными аффинно-очищенными антителами к HBsAg. В работе были использованы 2 вида моноклональных антител: 11F3, способные распознавать HBsAg дикого типа, но не HBsAg с мутацией G145R, а также антитела H2, взаимодействующие с мутантным вариантом HBsAg G145R. В качестве вторичных антител использовали конъюгат антимишинных антител с коллоидным золотом с размером частиц 10 нм (AlexaFluor 488, «Invitrogen», США). Инкубацию с антителами проводили в течение 30 мин при 37 °С, после чего препараты были отмыты фосфатно-солевым буфером и контрастированы 1% водным раствором уранилацетата.

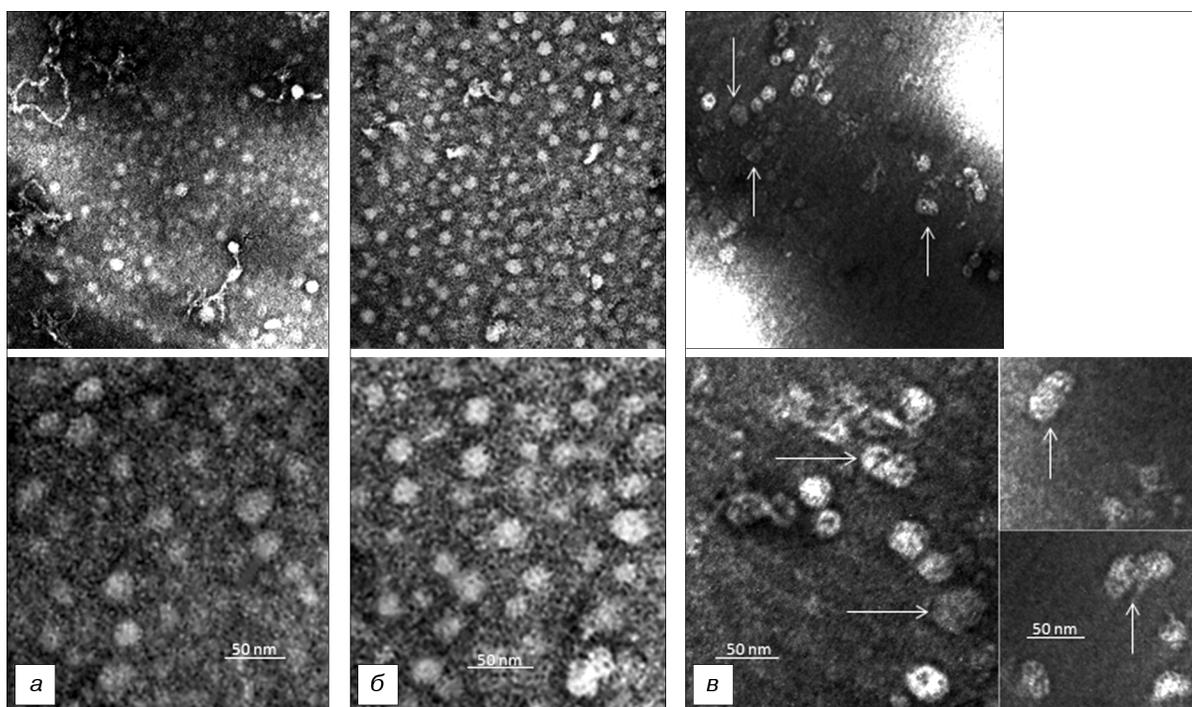


Рис. 3. Электронные микрофотографии (метод негативного контрастирования): а — ВГВ дикого типа; б — ВГВ с мутацией S143L; в — ВГВ с мутацией G145R; ↑ — овальные вирусные частицы.

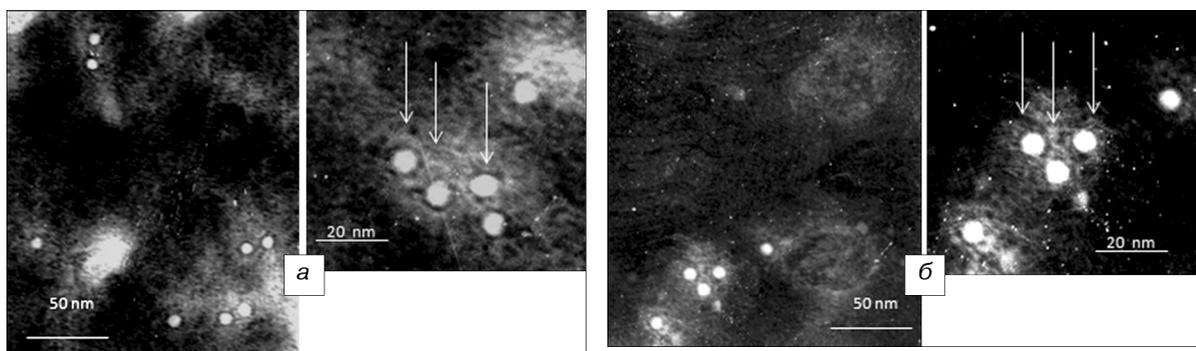


Рис. 4. Электронная микрофотография (негатив) иммунной метки ВГВ дикого типа (а) и ВГВ с мутацией G145R (б) с использованием первичных моноклональных антител 11F3 и вторичных антител, конъюгированных с золотом (размер наночастиц золота — 10 нм); ↓ — сферические вирусные частицы.

Кроме того, реакция иммунометки проводилась на неконтрастированных ультратонких срезах с использованием вышеперечисленных первичных и вторичных антител [25, 26]. Анализ препаратов проводили с помощью электронного микроскопа JEM 100B («JEOL», Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ.

### Результаты

В очищенных препаратах вирусов, полученных ультрацентрифугированием в градиенте плотности сахарозы, наблюдалось существенное отличие морфологии вирусных частиц мутантного G145R-варианта ВГВ от ВГВ дикого типа и ВГВ с мутацией S143L.

При исследовании ультраструктуры ВГВ, несущего мутацию S143L, и ВГВ дикого типа не было установлено существенных различий. Обнаружены относительно крупные частицы размером около 40 нм и мелкие частицы — около 20 нм (рис. 1, а, б), что согласуется с классическими представлениями о морфологии ВГВ. Напротив, при исследовании ультраструктуры изолята ВГВ с мутацией G145R помимо частиц классических размеров и форм в больших количествах обнаружены крупные овальные частицы размером более 100 нм (рис. 1, в). Принадлежность выявленных крупных овальных частиц к мутанту G145R доказывается результатами иммуноэлектронной микроскопии (рис. 2), где видно, что моноклональные антитела H2, выявляющие HBsAg с мутацией G145R, реагируют именно с такими частицами. Поскольку методика выделения вируса для всех сывороточных образцов была одинаковой, можно предположить, что наблюдаемые морфологические различия связаны с природой поверхностного антигена. Этот вывод представляется справедливым, несмотря на возможные артефакты, связанные с манипуляциями при очистке вируса.

Результаты, полученные при морфологическом изучении вирусов в их нативном состоянии в исходных сыворотках, в целом согласовывались с результатами, полученными при исследовании очищенных вариантов ВГВ вирусов гепатита В, хотя между ними были обнаружены различия в размерах вирусных частиц.

В препарате нативной сыворотки, содержащей HBsAg дикого типа, выявлялись сферические, овальные частицы размером 30—50 нм и частицы Дейна (рис. 3, а). В препаратах, содержащих вирус с мутацией S143L, обнаруживались такие же морфологические варианты вирусных частиц (рис. 3, б). В препаратах ВГВ с мутацией G145R также обнаружены сходные сферические части-

цы, но в то же время выявлены более крупные овальные частицы размером 60—70 нм, которые отсутствовали в препаратах дикого типа и с мутацией S143L (рис. 3, в).

При проведении реакции иммунометки с антителами 11F3 к дикому типу ВГВ метка была обнаружена на сферических частицах во всех препаратах вируса и не выявлялась на овальных частицах в препаратах мутанта G145R (рис. 4), которые позитивно метились только антителами H2 (рис. 5).

Исследования рекомбинантных HBsAg с мутацией G145R показали, что формирование субвирусных частиц зависит от условий экспрессии и очистки белка. Так, в образце ESC-15 были обнаружены частицы размером 20—30 нм округлой и овальной формы. Форма некоторых частиц напоминала прямоугольники. Ободок частиц имел низкую электронную плотность и относительно более темный центр при окраске 1% раствором молибдата аммония (рис. 6) и 1% раствором уранилацетата. Встречались в небольшом количестве более крупные частицы размером 50 нм (см. рис. 6). В отличие от препарата ESC-15 в препарате ESC-17 подобные структуры не выявлялись. Препарат представлял собой скопление мелкозернистых масс высокой, средней и низкой электронной плотности (рис. 7).

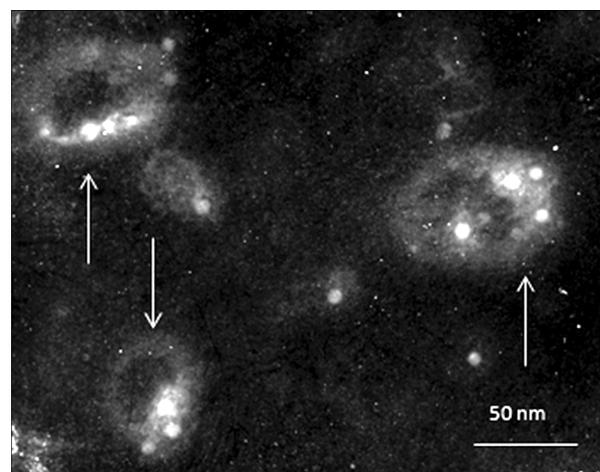


Рис. 5. Электронная микрофотография (негатив) иммунной метки ВГВ с мутацией G145R с использованием первичных моноклональных антител H2 и вторичных антител, конъюгированных с золотом (размер наночастиц золота — 10 нм); ↑ — овальные вирусные частицы.

### Обсуждение

Классические представления о морфологических типах ВГВ, согласно которым вирус ассоциируется с частицами Дейна 42—47 нм, сферическими субвирусными частицами 20—22 нм и филаментами диаметром 22 нм, в последнее десятилетие стали пересматриваться. Имеются сообщения о морфологической вариабельности ВГВ. Еще D.S. Dane и соавт. [4] обнаружили ВГВ в форме «головастика» с головой около 42 нм и хвостом 22 нм в диаметре с длиной 120 нм. В исследованиях M. Kaito и соавт. [6], проведенных как с клеточными линиями, так и с сыворотками крови пациентов, были обнаружены морфологические варианты ВГВ в виде «кобры» и «рога», причем в сыворотке соотношение классических частиц Дейна, кобро- и рогоподобных частиц составляло 5:4:1. После ультрацентрифугирования последние варианты полностью исчезали, оставались только частицы

Дейна, сферические частицы и микрофиламенты. Авторы предполагают, что первичными репликативными формами ВГВ являются именно кобро- и рогоподобные частицы [6]. В работе S. Seitz и соавт. [1] методом криоэлектронной микроскопии было идентифицировано 2 основных морфологических фенотипа, «компактные» и «рыхлые», с нуклеокапсидами в различных конформациях. Также были обнаружены промежуточные формы. Предположительно часть морфологических форм ВГВ связана со структурными особенностями его упаковки в виде упорядоченной решетки, отличающими этот вирус от других оболочечных вирусов [27].

Несмотря на довольно интенсивные исследования ультраструктуры ВГВ дикого типа, до сих пор отсутствуют публикации о морфологическом «портрете» эскейп-мутантов ВГВ, содержащих замены в S-гене HBsAg, хотя предполагается, что для морфообразующе-

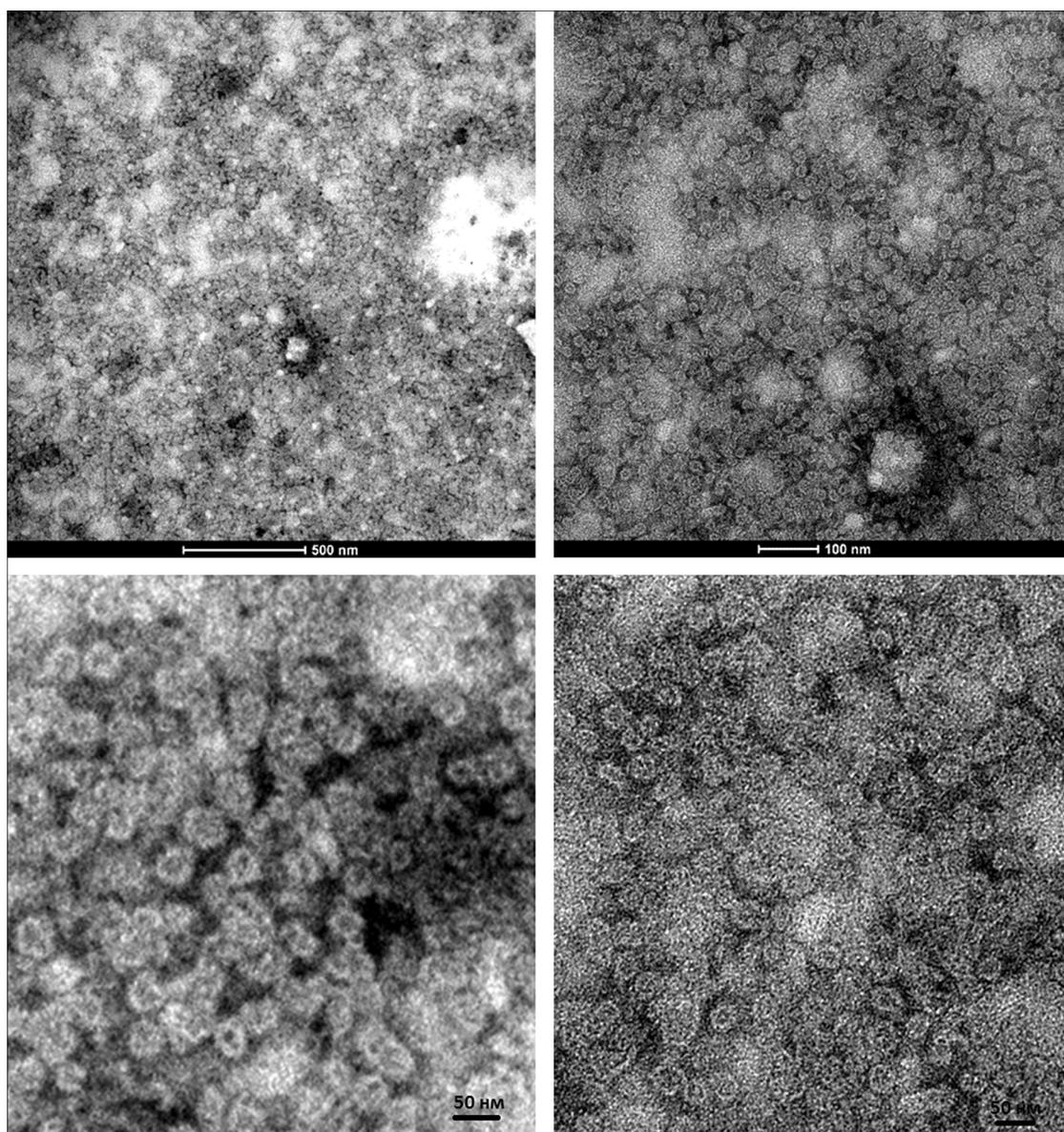


Рис. 6. Исследование рекомбинантного HBsAg ESC-15 с мутацией G145R методом негативного контрастирования 1% водным раствором молибдата аммония.

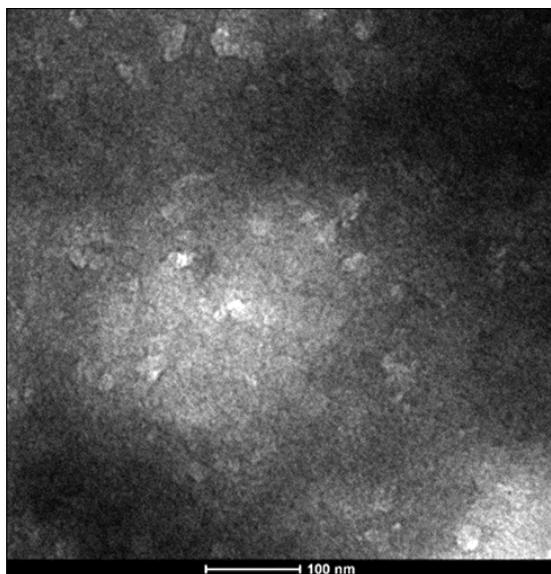
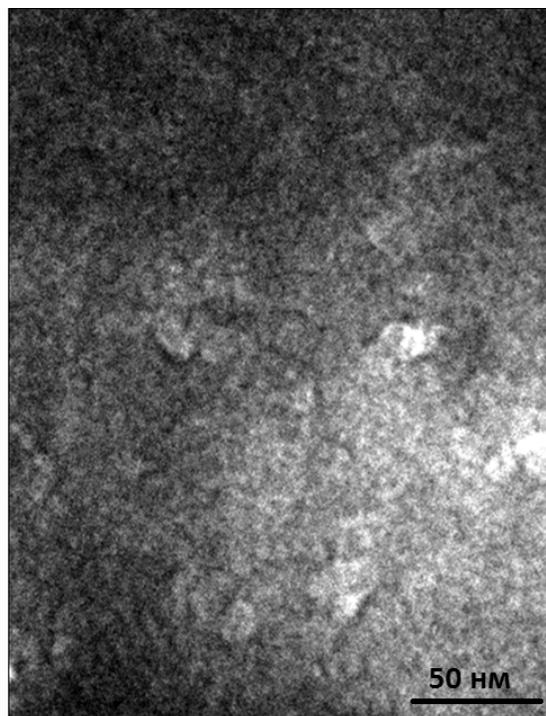


Рис. 7. Исследование рекомбинантного HBsAg ESC-17 с мутацией G145R методом негативного контрастирования 1% водным раствором молибдата аммония. При большом увеличении обнаружены мелкозернистые массы.



го взаимодействия HBsAg с HBcAg в вирионах важен не только Pre-S1, но и S-район [10], причем именно двойное взаимодействие между капсидом и обоими S- и Pre-S1 доменами требуется для морфогенеза вируса [9]. Так, было показано, что в L-белке существует 2 разных сайта, локализованных между 24-м и 191-м аминокислотными остатками (а. о.), а также между 191-м и 322-м а. о., действующих синергически для обеспечения высокой аффинности антител к HBcAg, причем в этом взаимодействии наиболее важную роль играет Arg92 (R92) [10]. Кроме R92, в классических частицах Дейна с HBcAg могут также взаимодействовать R88 и R102 Pre-S1 (для субтипа ауw). Все эти 3 аргинина способны образовывать связь с E77 и D78 а. о. в HBcAg [1, 8]. В то же время иммунопреципитация С-концевых делеционных мутантов показала, что Pre-S-регионы сами по себе недостаточны для эффективной ассоциации с HBcAg. Для формирования лучшего докинг-сайта для HBcAg требуется дополнительно 28 а. о. в S-регионе, особенно остатки 21—26 S-HBsAg в предполагаемой гидрофобной спирали I, однако роль пептида 21—26 а. о. S-HBsAg не была доказана [10]. В работе [9] для связывания HBcAg была показана важность другого региона S-HBsAg, располагающегося в I цитозольной петле S-белка, включающего 56—80 а. о. S-HBsAg (примерно соответствующие 219—243 а. о. от N-конца Pre-S1), содержащего кластер из трех остатков аргинина (R73, R78 и R79 S-HBsAg), которые могут опосредовать взаимодействие с отрицательно заряженными E77 и D78 а. о. в HBcAg [1, 9, 28]. Некоторые экспериментальные данные позволяли предположить, что во взаимодействии с HBcAg, возможно, способна вовлекаться гидрофильная петля между остатками 263 и 322 в L-белке (между спиралями II и III), что соответствует приблизительно области 100—159 а. о. в S-HBsAg, т. е. α-детерминанта [10].

Следует учитывать, что особенностью замены G145R в S-HBsAg является появление дополнительного аргинина,

который гипотетически может связываться аминокислотными остатками E77 и D78 в HBcAg и тем самым нарушать обычное формирование вирусных частиц. Это становится особенно интересным, если учесть недавно опубликованные результаты компьютерного моделирования структуры HBsAg, показавшие, что происходящая перестройка α-детерминанты HBsAg изменяет ориентацию трансмембранных сегментов, т. е. изменяет локализацию мутантного HBsAg в липидном слое [3].

То, что мутация G145R может нарушать классическое формирование вирусных частиц, косвенно было показано в работе [29], в которой сравнивали продукцию вирусных частиц после трансфекции клеток гепатомы человека рекомбинантными вирусами дикого типа и несущего мутацию G145R по их продукции и стабильности. Стабильность экспрессированных вирусных частиц оценивали по влиянию детергента NP-40, который разрушает оболочку частиц, зависящую от взаимодействий белок/липид и белок/белок. Оказалось, что разрушение оболочки носило дозозависимый характер. При этом в самой большой дозе детергента число сохранившихся частиц дикого типа составило 10%, тогда как мутанта — лишь 1% [29]. Кроме того, авторы показали, что после трансфекции мутанта G145R количество выходящих в супернатант поверхностных белков уменьшалось до 65—70% по сравнению с диким типом, причем значительное угнетение секреции наблюдалось только для L-белка, тогда как уровень S-белка оставался неизменным. Полученный результат был подтвержден с помощью ИФА и иммуноблоттинга. Основываясь на факте предпочтительного угнетения секреции L-белка, авторы предположили, что мутация G145R может по-разному влиять на секрецию сферических частиц, содержащих только S-белок, а также на вирионы и филаменты, содержащие как S-белок, так и L-белок. В частности, мутация G145R может интерферировать с правильной упаковкой Core, нарушая таким образом предпочтительно

морфогенез и секрецию вирионов ВГВ, но не пустых субвирусных частиц [29].

Проведенные нами с помощью трансмиссионной электронной микроскопии исследования выявили в препарате очищенного ВГВ с мутацией G145R и в исходной сыворотке большую гетерогенность морфологических форм вируса, в том числе структуры необычной овальной формы. Размер овальных частиц в препарате очищенного вируса составил 100—200 нм, а в исходной сыворотке — 60—70 нм. При этом выявлялись также сферические частицы. В отличие от ВГВ с мутацией G145R в нативной сыворотке, содержащей ВГВ дикого типа и ВГВ с мутацией S143L, а также в препаратах очищенных из них вирусов подобные частицы не обнаруживались. В нативной сыворотке выявлялись сферические и овальные частицы размером 30—50 нм, частицы Дейна. Аналогичные результаты были получены и с очищенным вирусом. Картина, наблюдавшаяся при исследовании ультраструктуры ВГВ, несущего мутацию S143L, практически не отличалась от картины, наблюдаемой с ВГВ дикого типа. На поверхности всех гетерогенных форм ВГВ, выделенных из мутантного изолята G145R, были представлены эпитопы, распознаваемые моноклональными антителами H2, реагирующими в ИФА с мутантом G145R с не меньшей активностью, чем с HBsAg дикого типа, но не выявлялись антителами 11F3, практически не реагирующие с мутантом G145R в ИФА. Эти результаты подтверждают, что обнаруженные нами в препаратах необычные вирусные частицы связаны именно с мутацией G145R. Это находится в соответствии с гипотезой о влиянии замены G145R на морфогенез ВГВ.

Тем не менее в значительной степени в образцах очищенного вируса наблюдалось сохранение лишь контуров частиц и отсутствие хорошей сохранности деталей строения ДНК и капсульных белков. Это может являться как результатом воздействия факторов, возникших в процессе очистки вирусных частиц, так и повышенной нестабильностью оболочки самого вируса в случае наличия в нем мутации G145R.

Полученные нами результаты согласуются с данными о наличии морфологической гетерогенности ВГВ, а также с результатами экспериментов, посвященных нарушенной секреции и стабильности ВГВ с мутацией G145R, показанных методами ИФА и иммуноблоттинга [29].

Мы также установили, что формирование субвирусных частиц при экспрессии рекомбинантного HBsAg с мутацией G145R очень сильно зависит от условий экспрессии и очистки белка. Морфологические структуры, образуемые при этом рекомбинантным белком, могут варьировать от четко сформированных круглых и овальных субвирусных частиц размером 20—50 нм до практически неструктурированных мелкозернистых агрегатов. Однако это может являться не только следствием условий получения мутантного белка, но и присущими ему свойствами, поскольку для рекомбинантного HBsAg дикого типа не было показано подобной зависимости.

В исследовании *in silico* [3] было показано, что при мутации G145R не только возникает новая  $\beta$ -складка, но и утрачивается часть  $\alpha$ -спиральной структуры. В то же время, согласно общепринятому мнению,  $\beta$ -складки играют ключевую роль в агрегации белков. Таким образом, в соответствии с этими данными мутация G145R может увеличивать жесткость, компактность и агрегационный потенциал  $\alpha$ -детерминанты, что влияет на ее

иммуногенность и секрецию [3]. Полученные нами экспериментальные данные о морфологической гетерогенности мутанта G145R, обнаружении существенно более крупных вирусоподобных и субвирусных частиц в целом согласуются с этими данными. Вероятно также, что предполагаемая вовлеченность области 100—159 а. о. в S-HBsAg  $\alpha$ -детерминанты во взаимодействии с HBcAg [10] в случае мутанта G145R имеет место или даже усиливается за счет изменения трансмембранной топологии HBsAg [3] и возможного взаимодействия G145R с отрицательно заряженными аминокислотными остатками белка core.

### Заключение

Впервые получены прямые данные о влиянии мутации G145R в отличие от мутации S143L на морфологические свойства ВГВ. Структурные изменения в S-доме белков оболочки ВГВ, вызванные эскейп-мутацией G145R, влияют не только на иммуногенные и антигенные свойства HBsAg, но и на морфогенез вирионов и субвирусных частиц. Возможно, это происходит за счет изменения мембранной топологии белка, в результате чего G145R приобретает способность взаимодействовать с E77 и D78 а. о. в HBcAg, а также за счет возрастания агрегационного потенциала мутантного G145R HBsAg.

**Благодарности.** Авторы статьи выражают благодарность безвременно ушедшим сотрудникам ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России Третьякову О.Ю., Диденко Л.В. и Кост Е.А. за неоценимую помощь в экспериментальной работе.

**Финансирование.** Работа была выполнена при финансовой поддержке ЗАО НПК «Комбиотех», г. Москва, Россия.

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

### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1—19, 23—29 см. REFERENCES)

20. Баженов А.И., Коноплева М.В., Эльгорт Д.А., Фельдшерова А.А., Хац Ю.С., Годков М.А. и др. Алгоритм серологического поиска и оценка распространенности серологически значимых HBsAg-мутаций у хронических носителей вируса гепатита В. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2007; (6): 30—7.
21. Баженов А.И., Эльгорт Д.А., Фельдшерова А.А., Будницкая П.З., Никитина Н.И., Хац Ю.С. и др. Сравнительная оценка активности анти-HBs, индуцированных естественным путем или вакцинацией, в отношении различных вариантов HBsAg. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2012; (2): 76—81.
22. Крымский М.А., Борисов И.А., Яковлев М.С., Агафонов М.О., Тер-Аванесян М.Д., Суслов А.П. и др. Рекомбинантный штамм дрожжей *Hansenula polymorpha* — продуцент мутантного поверхностного антигена вируса гепатита В (варианты). Патент РФ № 2586513 С1; 2016.

### REFERENCES

1. Seitz S., Urban S., Antoni C., Böttcher B. Cryo-electron microscopy of hepatitis B virions reveals variability in envelope capsid interactions. *EMBO J*. 2007; 26(18): 4160—7.
2. Zlotnick A., Venkatakrishnan B., Tan Z., Lewellyn E., Turner W., Francis S. Core protein: A pleiotropic keystone in the HBV lifecycle. *Antiviral Res*. 2015; 121: 82—93.
3. Rezaee R., Poorebrahim M., Najafi S., Sadeghi S., Pourdast A., Alavian S.M. et al. Impacts of the G145R Mutation on the Structure and Immunogenic Activity of the Hepatitis B Surface Antigen: A Computational Analysis. *Hepat. Mon*. 2016; 16(7): e39097.
4. Dane D.S., Cameron C.H., Briggs N.M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet*. 1970; 1(7649): 695—708.

5. Gilbert R.J., Beales L., Blond D., Simon M.N., Lin B.Y., Chisari F.V. et al. Hepatitis B small surface antigen particles are octahedral. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005; 102(41): 14783—8.
6. Kaito M., Ohba H., Chiba J., Kohara M., Tanaka H., Fujita N. et al. The ultrastructural morphology of native hepatitis B virus. *Med. Mol. Morphol.* 2006; 39(3): 136—45.
7. Bruss V. Hepatitis B virus morphogenesis. *World J. Gastroenterol.* 2007; 13(1): 65—73.
8. Bruss V. A short linear sequence in the pre-S domain of the large hepatitis B virus envelope protein required for virion formation. *J. Virol.* 1997; 71(12): 9350—7.
9. Poisson F., Severac A., Hourieux C., Coudeau A., Roingard P. Both pre-S1 and S domains of hepatitis B virus envelope proteins interact with the core particle. *Virology.* 1997; 228(1): 115—120.
10. Tan W.S., Dyson M.R., Murray K. Two distinct segments of the hepatitis B virus surface contribute synergistically to its association with the viral core particles. *J. Mol. Biol.* 1999; 286(3): 797—808.
11. Khan N., Guarnieri M., Ahn S.H., Li J., Zhou Y., Bang G. et al. Modulation of hepatitis B virus secretion by naturally occurring mutations in the S gene. *J. Virol.* 2004; 78(7): 3262—70.
12. Greiner V.J., Egelé C., Oncul S., Ronzon F., Manin C., Klymchenko A. et al. Characterization of the lipid and protein organization in HBsAg viral particles by steady-state and time-resolved fluorescence spectroscopy. *Biochimie.* 2010; 92(8): 994—1002.
13. Gavilanes F., Gomez-Gutierrez J., Aracil M., Gonzalez-Ros J.M., Ferragut J.A., Guerrero E. et al. Hepatitis B surface antigen. Role of lipids in maintaining the structural and antigenic properties of protein components. *Biochem. J.* 1990; 265(3): 857—64.
14. Carman W.F., Zanetti A.R., Karayiannis P., Waters J., Manzillo G., Tanzi E., et al. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet.* 1990; 336(8711): 325—9.
15. Zuckerman A.J., Zuckerman J.N. Molecular epidemiology of hepatitis B virus mutant. *J. Med. Virol.* 1999; 58: 193—5.
16. Weber B. Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact. *J. Clin. Virol.* 2005; 32: 102—12.
17. Ben-Porath E., Wands J.R., Marciniak R.A., Wong M.A., Hornstein L., Ryder R. et al. Structural analysis of hepatitis B surface antigen by monoclonal antibodies. *J. Clin. Invest.* 1985; 76(4): 1338—47.
18. Waters J.A., Kennedy M., Voet P., Hauser P., Petre J., Carman W. et al. Loss of the Common «A» Determinant of Hepatitis B Surface Antigen by a Vaccine-induced Escape Mutant. *J. Clin. Invest.* 1992; 90: 2543—7.
19. Roohi A., Khoshnoodi J., Zarnani A.H., Shokri F. Epitope mapping of recombinant hepatitis B surface antigen by murine monoclonal antibodies. *Hybridoma (Larchmt).* 2005; 24(2): 71—7.
20. Bazhenov A.I., Konopleva M.V., El'gort D.A., Fel'dsherova A.A., Khats Yu.S., Godkov M.A. et al. Algorithm of serologic screening and assessment of prevalence of serologically meaningful mutations of HBsAg in hepatitis B virus carriers. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2007; (6): 30—7. (in Russian)
21. Bazhenov A.I., El'gort D.A., Fel'dsherova A.A., Budnitskaya P.Z., Nikitina N.I., Khats Yu.S. et al. The comparative estimation of anti-HBs activity against native and recombinant type HBsAg. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika.* 2012; (2): 76—81. (in Russian)
22. Krymskiy M.A., Borisov I.A., Yakovlev M.S., Agafonov M.O., Ter-Avanesyan M.D., Suslov A.P. et al. Recombinant Hansenula polymorpha yeast strain — producer of mutant hepatitis B virus surface antigen (versions). Patent RF № 2586513 C1; 2016. (in Russian)
23. Ito S., Karnovsky M.J. Formaldehyde/glutaraldehyde fixatives containing trinitro compounds. *J. Cell Biol.* 1968; 39: 168a-9a.
24. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 1963; 17(2): 208—12.
25. Newman G.R., Jasani B., Williams E.D. A simple post-embedding system for the rapid demonstration of tissue antigens under the electron microscope. *Histochem. J.* 1983; 15(6): 543—55.
26. Bendayan M., Zollinger M. Ultrastructural localization of antigenic sites on osmium-fixed tissues applying the protein A-gold technique. *J. Histochem. Cytochem.* 1983; 31(1): 101—9.
27. Dryden K.A., Wieland S.F., Witten-Bauer C., Gerin J.L., Chisari F.V., Yeager M. Native hepatitis B virions and capsids visualized by electron cryomicroscopy. *Mol. Cell.* 2006; 22: 843—50.
28. Böttcher B., Tsuji N., Takahashi H., Dyson M.R., Zhao S., Crowther R.A. et al. Peptides that block hepatitis B virus assembly: analysis by cryomicroscopy, mutagenesis and transfection. *EMBO J.* 1998; 17(23): 6839—45.
29. Kalinina T., Iwanski A., Will H., Sterneck M. Deficiency in virion secretion and decreased stability of the hepatitis B virus immune escape mutant G145R. *Hepatology.* 2003; 38(5): 1274—81.

Поступила 30.01.17

Принята в печать 28.02.17

© СМЕРНОВ В.С., ПЕТЛЕНКО С.В., 2017

УДК 615.281.8.03:616.98:578.825.11|.076.9

Смирнов В.С., Петленко С.В.

## ВЛИЯНИЕ ИМИХИМОДА НА ПРОДУКЦИЮ ИНТЕРФЕРОНА И РАЗВИТИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ ВИРУСАМИ ПРОСТОГО ГЕРПЕСА

ЗАО «Медико-биологический научно-производственный комплекс «ЦИТОМЕД», 191023, г. Санкт-Петербург

Производное имидазола — имихимод — относится к иммуномодуляторам, действующим на врожденную и адаптивную системы иммунитета. Целью исследований было изучение динамики синтеза сывороточного интерферона (ИФН) при разных режимах дозирования и оценка противовирусной активности воспроизведенного в России препарата имихимода в отношении вируса простого герпеса (ВПГ) при его подкожном применении мышам и интравагинальном — морским свинкам. **Результаты.** При подкожном введении имихимода мышам в дозах 0,5; 1 и 10 мг/кг наблюдали дозозависимое увеличение выработки ИФН, пик концентрации которых достигался через 4 ч после введения. Применение имихимода защищало лабораторных животных (мышей) от внутрибрюшинного заражения ВПГ в дозах 3,2 и 32 ЛД<sub>50</sub>. При этом максимальный защитный эффект (100% выживаемость) достигался при введении имихимода в дозе 100 мг/кг ежедневно в течение 5 дней до заражения. Топическое применение имихимода в виде 5% крема по сравнению с контрольной группой сопровождалось достоверно более быстрой и полной элиминацией вируса при интравагинальном заражении морских свинок ВПГ 2-го типа. **Заключение.** Воспроизведенный аналог имихимода обладает иммуномодулирующими и противовирусными свойствами, выявленными у первоначально синтезированного химического соединения.

Ключевые слова: имихимод; вирус простого герпеса; морские свинки; мыши.

**Для корреспонденции:** Смирнов Вячеслав Сергеевич, д-р мед. наук, профессор, руководитель научно-исследовательского отдела ЗАО МБНПК «Цитомед». 191023, г. Санкт-Петербург. E-mail: vssmi@mail.ru

**Для цитирования:** Смирнов В.С., Петленко С.В. Влияние имихимода на продукцию интерферона и развитие экспериментальной инфекции, вызванной вирусами простого герпеса. *Вопросы вирусологии*. 2017; 62(3): 128-134.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-3-128-134>

**Smirnov V.S., Petlenko S.V.**

### INFLUENCE OF THE IMIQUIMOD ON THE INTERFERON PRODUCTION AND TREATMENT OF THE EXPERIMENTAL HERPES SIMPLEX VIRUS INFECTION

Biomedical Research and Production Complex «Cytomed», St. Petersburg, 191023, Russian Federation

**Background.** Imiquimod is an imidazole derivative acting as an immunomodulator on the level of innate and adaptive immune system. Our objective was to evaluate the antiviral activity of generically reproduced imiquimod administered subcutaneously in mice and intravaginally in guinea pigs against herpes simplex virus (HSV), as well as to study the dynamics of serum interferon (IFN) synthesis under different dosing regimens.

**Results.** When administered subcutaneously at doses of 0.5, 1.0 and 10 mg/kg imiquimod increased IFN production in mice in a dose-dependent manner with maximum serum IFN concentrations occurring 4 hours after dosing. Imiquimod protected mice from intraperitoneal HSV infection at doses of 3.2 and 32 LD<sub>50</sub>. The utmost protection (100% survival) was observed when imiquimod was administered at a dose of 100 mg/kg daily for 5 days before infection. Topical application of imiquimod 5% cream exhibited significantly more rapid and complete virus elimination in guinea pigs intravaginally infected with HSV type 2 compared to control group.

**Conclusion.** Imiquimod produced as a generic possesses the same immunomodulatory and antiviral properties as the originally synthesized substance.

**Key words:** *imiquimod; herpes simplex virus; guinea pigs; mice.*

**For citation:** Smirnov V.S., Petlenko S.V. Influence of the imiquimod on the interferon production and treatment of the experimental herpes simplex virus infection. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2017; 62(3): 128-134. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-3-128-134>

**For correspondence:** Vyacheslav S. Smirnov, Dr. Med. Sci., professor, Head of the Scientific Research Department of the Biomedical Research and Production Complex «Cytomed», St. Petersburg, 191023, Russian Federation. E-mail: [vssmi@mail.ru](mailto:vssmi@mail.ru)

**Acknowledgments.** The study had no sponsorship.

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

Received 20 January 2017  
Accepted 19 February 2017

## Введение

Около 10 лет назад произошло, на первый взгляд, малозаметное, но, как оказалось, весьма важное событие. Открытие семейства паттерн-распознающих рецепторов поставило под сомнение обоснованность широко известного термина «неспецифическая резистентность». Стало понятно, что неспецифическая резистентность в своей основе достаточно специфична и в зависимости от природы антигенного воздействия включает те или иные механизмы защиты. Рецепторным аппаратом этой системы оказались паттерн-распознающие рецепторы, действие которых заключается в распознавании «образа» того или иного антигена и соответственно мобилизации определенных рецепторных и регуляторных систем [1, 2]. Это семейство представлено достаточно широко и, по последним данным, включает Толл-подобные рецепторы (ТЛР), Nod-подобные рецепторы и др. [2, 3]. Вместе с тем преимущественное внимание все же уделяется ТЛР. Показано, что многие ТЛР связаны с противовирусной защитой [2]. Так, ТЛР4 связан с вирусами гриппа, малярии и гепатита В [4, 5], ТЛР2 — с боррелиозом и ВИЧ [6, 7]. Особый интерес представляют ТЛР7/8, с активацией которых связаны процессы иммунного воспаления при инфекционных заболеваниях, обусловленных вирусом папилломы человека (ВПЧ), вирусом простого герпеса ВПГ, ВИЧ, а также некоторыми простейшими (лейшманиями) и бактериями [8—10].

Накопленные данные послужили отправной точкой всех попыток использовать агонисты и антагонисты ТЛР в качестве терапевтических средств. Одним из первых препаратов этого семейства оказался имихимод — производное имидазол-хинолинамина — агонист ТЛР7

и ТЛР8 [11]. Первоначально разработанный для лечения бронхолегочных заболеваний [12] имихимод оказался более подходящим средством для топического лечения папилломавирусной инфекции, в первую очередь аногенитальных бородавок, а также некоторых опухолей [13]. Кроме того, в доклинических, а затем и клинических исследованиях показана его противовирусная активность при герпетической инфекции *in vivo* [14]. При анализе механизмов действия имихимода была обнаружена его способность активировать провоспалительный ответ, в том числе стимуляцию выработки интерферонов (ИФН)  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ , интерлейкинов (ИЛ)-1 $\beta$ , ИЛ-6 и ИЛ-12 [8, 15, 16], фактора некроза опухоли (ФНО)- $\alpha$ , кроме того, имихимод способствовал активации Т-клеточного иммунитета и системы НК-клеток. В конечном счете имихимод был одобрен Управлением санитарного надзора за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) как средство для местного лечения аногенитальных бородавок, вызываемых преимущественно ВПЧ 6-го и 11-го типов [17].

Вместе с тем история имихимода не ограничилась только бородавками, не менее важным направлением остается лечение герпетической инфекции, особенно генитального герпеса [8]. Хорошо известно, что вирус герпеса чрезвычайно широко распространен в человеческой популяции и может быть причиной тяжелых, в том числе рецидивирующих инфекций, иногда приводящих к смерти, особенно среди иммунокомпрометированных лиц (реципиенты органов, ВИЧ-инфицированные) [18]. Проблема осложняется тем, что у этих лиц вирус герпеса нередко приобретает устойчивость ко многим, если не всем, нуклеозидам [17], в этой связи топическое

применение имихимода при генитальном герпесе может быть дополнительной альтернативой.

Лекарственная субстанция и фармакологический препарат имихимода были запатентованы в США 4 августа 1987 г. [19]. В 2007 г. патентная защита закончилась, после чего это соединение было воспроизведено в Китае, странах Латинской Америки [20], а также на территории Российской Федерации под названием Вартоцид [21]. Целью данного исследования была оценка интерферон-индуцирующих и противовирусных свойств имихимода в рамках доклинического исследования.

### Материал и методы

*Лекарственная субстанция* 1-(2-метилпропил)-1-Нимидазол[4,5-с]хинолин-4-амина была синтезирована по стандартной методике. Молекулярная масса соответствовала оригинальному препарату и составляла 240,3. По данным инфракрасной спектроскопии в диске с калия йодидом и протонного магнитного резонанса в дейтерированном диметилсульфоксиде при 300 МГц, исследованное соединение соответствовало химической формуле  $C_{14}H_{16}N_4$ . Таким образом, результаты исследования показали, что исследованное соединение является полным химическим аналогом оригинальной активной субстанции — имихимода.

*Лабораторные животные.* В исследованиях использовали беспородных морских свинок массой 250—300 г и беспородных белых мышей-самцов массой 16—18 и 7—8 г. Перед началом исследования животных выдерживали в карантине в течение 1 нед. В процессе исследования животных содержали на стандартной диете без ограничения водопотребления в оптимальных климатических условиях и режиме освещенности 12/12 ч.

*Вирусы.* В исследовании использовали ВПГ 1-го типа. Вирус поддерживали пассажами на мышках-сосунках путем их интрацеребрального инфицирования. Титр вируса составлял  $6 \cdot 10^3$  ЛД<sub>50</sub>/мл. Для титрования ИФН 1-го типа в качестве тест-вируса применяли стандартный штамм вируса энцефаломиокардита (ЕМС).

*Титрование сывороточного ИФН.* Титрование сывороточного ИФН проводили биологическим микрометодом. Культуру клеток L-020, разведенную ростовой средой до необходимой концентрации ( $3-4 \cdot 10^5$  кл/мл), вносили в лунки 96-луночных пластиковых панелей и инкубировали в термостате в течение 24 ч. На протяжении всего процесса титрования инкубацию культуры выполняли в одинаковых условиях: температура 37 °С в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> и 98% влажности. После формирования на дне лунок монослоя клеток ростовую среду удаляли и вносили поддерживающую среду, в которой производили последовательные двукратные разведения тестируемых проб (в парных лунках). После суточной инкубации тестируемые пробы удаляли и в монослой клеток вводили тест-вирус ЕМС в рабочем разведении (100 ЦПД<sub>50</sub>). Через сутки учитывали результаты с помощью инвертированного микроскопа. Титр ИФН — величина, обратная последнему разведению сыворотки, в котором наблюдается 50% защита от цитопатогенного действия (ЦПД) тест-вируса.

*Моделирование инфекции.* Генерализованную герпетическую инфекцию моделировали путем внутрибрюшинного заражения белых беспородных мышей (ВПГ). Инкубационный период при этой инфекции составлял 4—5 сут. Развитие заболевания характеризовалось следующими признаками: животные становились мало-

подвижными, отказывались от еды и питья, у них была взъерошенная шерсть. В последующем развились явления энцефалита (парезы и параличи), и на 7—9-й день животные погибали. Наблюдение за животными проводили в течение 21 сут с момента заражения, ежедневно регистрируя количество павших животных. Противовирусную активность имихимода оценивали при инфицировании животных вирусом ВПГ в двух интервалах доз: 2—2,5—3,2 и 20—25 и 32 ЛД<sub>50</sub>. Имихимод вводили однократно подкожно в дозах 0,1; 1 и 10 мг/кг массы тела.

Для оценки противовирусной активности топической формы имихимода (крем для местного применения 5%) морских свинок интравагинально заражали ВПГ, а затем ежедневно интравагинально им наносили имихимод в дозе 5000 мкг/кг в течение 5 дней.

*Статистический анализ.* Заражающую дозу рассчитывали по методу Кербера в модификации И.П. Ашмарина и А.А. Воробьева [22]. Расчет средней продолжительности жизни (СПЖ) проводили по вероятностной модели в виде суммарной доли дожития при допущении, что время дожития животных, не погибших в течение всего срока наблюдения, составляло 1, при этом вес одного дня выживания одного животного был равен  $1/21 = 0,048$ . Статистическую обработку полученных данных проводили стандартными методами вариационной статистики. Уровень достоверности  $p = 0,95$ . Иные приемы статистической обработки, когда они использовались, приведены в тексте при описании полученных данных.

### Результаты

*Влияние имихимода на индукцию эндогенного ИФН.* Исследования проведены на белых мышках, которым однократно подкожно вводили имихимод в дозах 0,5; 1 и 10 мкг/кг. Через 1; 2; 4; 8 и 24 ч у животных брали кровь из ретробульбарного венозного сплетения и в сыворотке определяли содержание ИФН. Полученные результаты представлены на рис. 1.

Как видно из представленных данных, подкожное введение препарата сопровождалось отчетливым увеличением выработки ИФН, максимум которого приходился на 4-й час после введения препарата, при этом концентрация цитокина зависела от дозы препарата. Максимальная выработка наблюдалась в ответ на введение 10 мкг/кг имихимода. Отметим, что следовая активность ИФН, индуцированного имихимодом в дозе 10 мкг/кг, наблюдалась до 24 ч.

В другом опыте этой серии мы оценивали влияние кратности введения имихимода на синтез ИФН. С этой целью, как и в работе [15], препарат в дозе 10 мкг/кг вводили подкожно 1; 2; 3 и 4 раза с интервалом 2 ч. Титр ИФН оценивали через 2 ч после введения последней дозы (рис. 2).

Как следует из представленных данных, многократное введение имихимода в течение 8 ч сопровождалось дозозависимым увеличением индукции ИФН. Максимальный уровень отмечен через 2 ч после введения 4-й дозы. Эти результаты подтверждают данные, полученные М.Ж. Reiter и соавт. [15].

*Влияние имихимода на течение острой вирусной инфекции, вызванной ВПГ.* Для оценки протективной активности имихимода, т. е. его способности предотвращать развитие острой генерализованной инфекции, имихимод вводили подкожно в дозах 10; 100 и 1000 мкг/кг за 4 ч до заражения ВПГ. При определении лечебной активности имихимода препарат вводили подкожно в

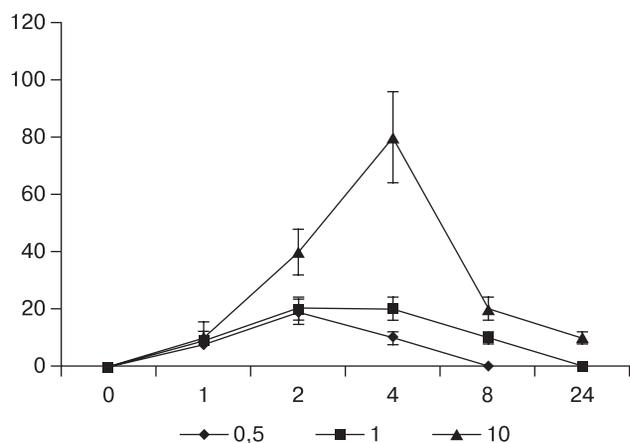


Рис. 1. Динамика содержания ИФН в сыворотке белых мышей при однократном подкожном введении имихимода.

По оси ординат: содержание интерферона, ед/мл; по оси абсцисс: время после введения препарата, ч; легенда: дозы имихимода, мкг/кг.

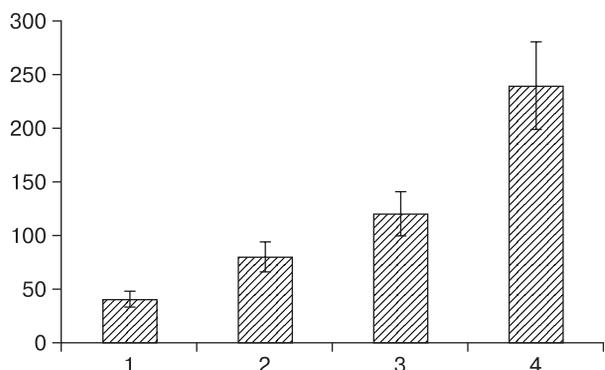


Рис. 2. Индукция ИФН при различной кратности подкожного введения имихимода в дозе 10 мкг/кг. Мышам вводили имихимод 1; 2; 3 и 4 раза. В каждую дозовую группу брали по 10 мышей. ИФН титровали в сыворотке крови, взятой через 2 ч после введения последней дозы.

По оси ординат: титр ИФН, ед/мл; по оси абсцисс: количество введенного имихимода.

дозах 100; 1000 и 10 000 мкг/кг ежедневно в течение 5 дней. Контрольным животным в соответствующие сроки подкожно вводили аликвотный объем изотонического раствора хлорида натрия.

Таблица 1  
Защитная эффективность имихимода на модели ВПГ у белых мышей

Доза препарата, мкг/кг	Доза вируса, LD <sub>50</sub>	Результаты	
		мыши, взятые в опыт	выжившие мыши (% выживаемости)
10,0	32	20	4 (20)
	3,2	20	16 (80)
100	32	20	6 (30)
	3,2	20	18 (90)
1000	32	20	10 (50)
	3,2	20	20 (100)
Контроль вируса	32	20	0 (0)
	3,2	20	10 (50)

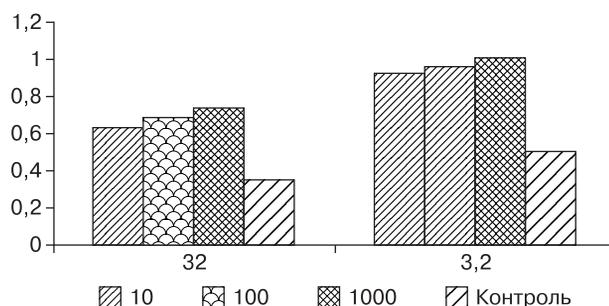


Рис. 3. СПЖ мышей, получавших имихимод за 4 ч до заражения ВПГ.

По оси ординат: показатель СПЖ, отн. ед; по оси абсцисс: доза ВПГ, LD<sub>50</sub>; легенда: 10; 100; 1000 — доза имихимода, мкг/кг; контроль — контрольная группа.

Инкубационный период при этой инфекции составляет 4—5 сут. Развитие заболевания характеризуется следующими признаками: животные становятся малоподвижными, с взъерошенной шерстью, отказываются от еды и питья. В последующем у них развиваются парезы и параличи и наступает гибель, чаще всего на 7—9-е сутки после заражения. Результаты оценки защитной активности имихимода приведены в табл. 1.

Полученные результаты показали, что введение имихимода до заражения сопровождалось дозозависимым возрастанием выживаемости зараженных мышей. Так, при введении имихимода в дозе 10 мкг/кг выживало до 20% мышей, зараженных ВПГ в дозе 32 LD<sub>50</sub>, а при введении препарата в дозе 1000 мкг/кг выживаемость достигала 50% при 100% гибели животных в контроле (рис. 3).

Как следует из представленных данных, показатель СПЖ возрастал одновременно с увеличением дозы имихимода и зависел от дозы вируса. Так, при заражении животных ВПГ в дозе 3,2 LD<sub>50</sub> СПЖ достигала максимального значения 1 отн. ед. (ни одно животное не погибло), в то время как при дозе 32 LD<sub>50</sub> максимальная выживаемость составила 0,74% (погибло 50% животных), но при этом не умершие животные жили дольше, чем при меньших дозах имихимода. В контрольной группе, зараженной вирусом в дозе 32 LD<sub>50</sub>, погибли все животные, а при введении вируса в дозе 3,2 LD<sub>50</sub> — только 50% животных. Таким образом, полученные результаты

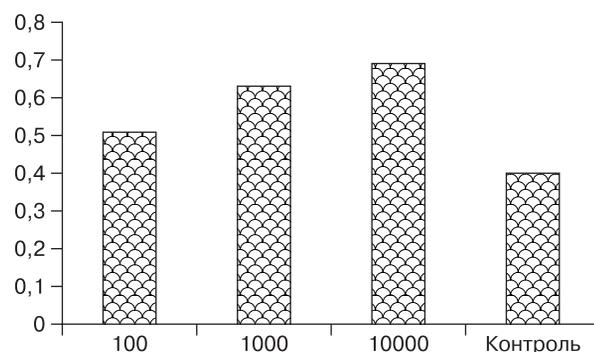


Рис. 4. СПЖ мышей, получавших имихимод в течение 5 дней после заражения ВПГ.

По оси ординат: показатель СПЖ, отн. ед; по оси абсцисс: разовая доза имихимода, мкг/кг.

Таблица 2

**Лечебная эффективность имихимода при заражении белых мышей ВПГ в дозе 10 ЛД<sub>50</sub>**

Доза препарата, мкг/кг	Результаты		
	мыши, взятые в опыт	выжившие мыши	выживаемость, %
100	10	2	20
1000	10	4	40
10 000	10	6	60
Контроль	10	0	0

показали, что однократное подкожное введение имихимода за 4 ч до заражения оказывает отчетливое защитное действие в отношении острой инфекции, вызванной ВПГ.

Целью второй серии исследований была оценка терапевтической эффективности имихимода при его курсовом назначении после заражения животных ВПГ. Для этого животных заражали ВПГ в дозе 10 ЛД<sub>50</sub>. Начиная с 24 ч после заражения и в течение последующих 5 сут животным подкожно вводили одну из доз имихимода: 100; 1000 и 10 000 мкг/кг. Животным контрольной группы вводили аликвотный объем изотонического раствора хлорида натрия. В каждую дозовую группу было взято по 10 животных (табл. 2).

Полученные результаты показали, что при острой инфекции ВПГ имихимод оказывает дозозависимое терапевтическое действие. Так, в группе животных, которым вводили имихимод в дозе 10 мкг/кг, выжило только 20% животных, тогда как среди мышей, которым вводили 10 000 мкг/кг, выжило 60%. В контрольной группе при этом погибли все 10 (100%) мышей. Сходные зависимости выявлены и при расчете СПЖ (рис. 4).

Как видно на рис. 4, наименьший показатель СПЖ отмечен в контрольной группе, что вполне объяснимо, поскольку все животные погибли и инфекционный процесс у них развивался наиболее быстро. Курсовое введение имихимода в дозе 100 мкг/кг не было особенно эффективным — выжило 20% животных, взятых в опыт, при этом показатель СПЖ у них относительно контроля увеличился только в 1,3 раза, а наибольшая продолжительность выживания инфицированных животных отмечена при курсовом введении имихимода в дозе 10 000 мг/кг массы ( $p < 0,05$ ).

Топическая форма имихимода (5% крем) была испытана на генитальной герпетической инфекции у морских свинок — наиболее распространенной модели для исследования противогерпетических средств [8]. С целью воспроизведения инфекции животным вводят вирулентный штамм ВПГ-2 в дозе около  $1 \cdot 10^5$ — $1 \cdot 10^6$  отн. ед. Как правило, при такой дозе вирулентного вируса уже через 12 ч наблюдается шеддинг вируса, который можно идентифицировать иммуноферментным методом или с помощью полимеразной цепной реакции.

Для оценки противогерпетической активности 5% крема имихимода морским свинкам, зараженным вирулентным штаммом ВПГ-2, ежедневно интравагинально применяли имихимод в дозе 5000 мкг/кг в течение 5 дней. У контрольных животных никаких препаратов не применяли. Ежедневно начиная с 1-го дня после первого применения 5% крема имихимода, определяли динамику интравагинального выделения вируса (рис. 5).

Из представленных данных следует, что в опытной группе уже к 4-му дню отмечено достоверное уменьшение количества выделяемого вируса, которое к 5—6-му дню практически прекращалось. В этот же период у контрольных животных наблюдались активная репликация и выделение вируса. Можно полагать, что в результате применения имихимода происходила существенная мобилизация местных механизмов врожденного иммунитета, в частности активная стимуляция выработки и секреции эндогенного ИФН- $\alpha$ , сопровождающаяся быстрой редукцией инфекционного процесса. Представленные результаты полностью согласуются с данными других авторов. Так, в частности, применение имихимода дважды в день начиная с 12 ч после интравагинальной инокуляции ВПГ-2 сопровождалось полной элиминацией вируса.

**Обсуждение**

В совокупности молекулярных механизмов, объясняющих действие имихимода, одним из ведущих факторов наряду с выбросом провоспалительных цитокинов является индукция ИФН [14, 15].

Исследования имихимода, выполненные на этапе его доклинического изучения, показали, что это соединение активирует каскад провоспалительных цитокинов, в первую очередь ИФН- $\alpha$ , ФНО- $\alpha$  и др. [8, 23, 24]. Эти данные нашли подтверждение в наших экспериментах, показавших дозозависимую индукцию ИФН через 4 ч после однократного введения. С другой стороны, интенсивность синтеза ИФН существенно зависела от кратности его введения, при которой максимальная выработка наблюдалась при 4-кратном введении имихимода. Полученные результаты хорошо согласуются с признанными механизмами действия препарата [8, 13].

Результаты доклинических исследований показали, что имихимод не обладает прямой противовирусной активностью, но в результате активации механизмов врожденного иммунитета, в том числе Th1-ответа в очаге поражения, оказывает защитное действие при моделировании герпетической и ряда других инфекций как при системном, так и при местном применении [8, 9, 13, 24]. В то же время другие исследователи получили свидетельства прямого противовирусного действия имихимода при его применении *in vivo*, по крайней мере в отно-

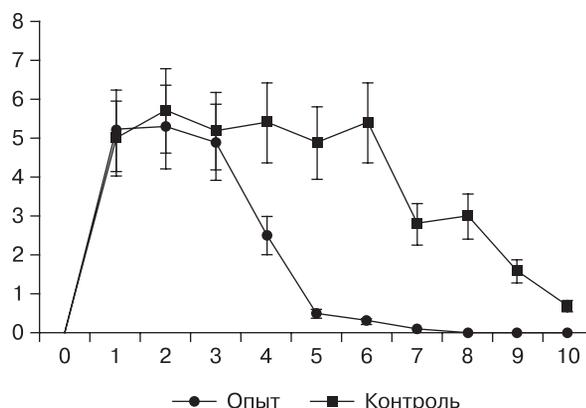


Рис. 5. Динамика вагинального выделения вируса у морских свинок, зараженных ВПГ-2 и леченных 5% кремом имихимода. По оси ординат: титр вируса, log10; по оси абсцисс: срок наблюдения, сут. Имихимод применяли с 1-го по 5-й день после заражения.

шении ВПГ [24]. Показано, что это действие не зависит от TLR7 и вызвано индукцией цистатина  $A_1$ , который ингибирует цистеиновую протеазу хозяина через негативный сигналинг аденозиновых рецепторов  $A_1$  [24].

Особый интерес представляет применение имихимода при лечении вирусных инфекций, особенно вызванных ВПЧ и ВПГ, существующие схемы лечения которых далеко не всегда обеспечивают клинически приемлемые результаты. Это связано либо с высокой частотой рецидивирования (аногенитальные бородавки), склонностью к малигнизации (плоскоклеточный рак кожи) или быстро формирующейся резистентностью к противовирусным препаратам (ВПГ). В этих ситуациях имихимод может стать дополнительной альтернативой недостаточной эффективной или совсем неэффективной терапии [8, 24, 25], что особенно актуально при лечении атипичных форм генитального герпеса у ВИЧ-инфицированных больных, для которых характерны торпидное течение, высокий риск рецидивов и множественная лекарственная устойчивость [25].

Уже в самых первых исследованиях было установлено, что имихимод оказывает как защитное, так и лечебное действие на модели острой ВПГ-инфекции у мышей [26]. В целом эти результаты согласуются с поздними публикациями, которые свидетельствуют о том, что имихимод способен эффективно контролировать острую герпетическую инфекцию [27].

При исследовании протективной активности имихимода, вводимого за 4 ч до заражения ВПГ, получено отчетливое увеличение СПЖ относительно контроля, причем 50% выживаемость зараженных мышей наблюдали в ответ на введение 1000 мкг/кг и последующего заражения животных ВПГ в дозе 32 ЛД<sub>50</sub>, среди контрольных мышей в ответ на эту дозу наблюдалась гибель 100% животных. При 10-кратном уменьшении дозы вируса выживало 90% животных опытной группы и только 50% — контрольной. При терапевтическом применении препарата в дозе 1000 мкг/кг в течение 5 дней начиная с 24 ч после заражения вирусом в дозе 10 ЛД<sub>50</sub> выживало 60% мышей при 100% гибели в контроле.

Принимая во внимание, что системное применение имихимода сопряжено с множеством побочных реакций, препарат стали применять местно в виде 5% крема, известного в США под брендом Альдара®, в России воспроизведенный аналог получил название Вартоцид [21]. Интравагинальное заражение морских свинок вирулентной культурой ВПГ 2-го типа в дозе  $1 \cdot 10^5$ — $1 \cdot 10^6$  отн. ед. с последующим применением 5% крема имихимода в дозе 5000 мкг/кг ежедневно в течение 5 дней приводило к достоверно более быстрой элиминации вируса, чем у контрольных животных. Эти данные согласуются с имеющимися результатами относительно того, что применение имихимода при остром генитальном герпесе вызывает практически полную элиминацию вируса, при этом не развивается его персистенция в нервной ткани, а в катамнезе не наблюдается рецидивов инфекции [8].

Таким образом, результаты проведенного исследования позволили сделать вывод о том, что воспроизведенный в Российской Федерации препарат имихимод вызывает синтез эндогенного интерферона *in vivo* и оказывает отчетливое противовирусное действие при моделировании герпетической инфекции у мышей и морских свинок.

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

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

#### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 2—20, 23—27 см. REFERENCES)

1. Лебедев К.А., Понякина И.Д. *Иммунология образраспознающих рецепторов (интегральная иммунология)*. М.: Librokom; 2009.
2. Смирнов В.С., Петленко С.В. Сравнительное влияние топических препаратов имихимода на неповрежденную кожу морских свинок. *Российский иммунологический журнал*. 2016; 10(3): 346—8.
22. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях Ленинград: Медгиз; 1962.

#### REFERENCES

1. Lebedev K.A., Ponyakina I.D. *Immunology Pattern Recognition Receptors (Integrated Immunology) [Immunologiya obrazraspoznayushchikh retseptorov (integral'naya immunologiya)]*. Moscow: Librokom; 2009. (in Russian)
2. Dowling J.K., Mansell A. Toll-like receptors: the swiss army knife of immunity and vaccine development. *Clin. Translat. Immunol.* 2016; 5(5): e85.
3. Wei L.J., Tan X., Fan G.J., Jiang Y.N., Shah Q.A. Role of the NOD1/NF- $\kappa$ B pathway on bovine neutrophil responses to crude lipopolysaccharide. *Vet. J.* 2016; 214: 24—31.
4. Boland G., Beran J., Lievens M., Sasadeusz J., Dentico P., Nothdurft H., et al. Safety and immunogenicity profile of an experimental hepatitis B vaccine adjuvanted with AS04. *Vaccine*. 2004; 23(3): 316—20.
5. Morefield G.L., Hawkins L.D., Ishizaka S.T., Kissner T.L., Ulrich R.G. Synthetic Toll-like receptor 4 agonist enhances vaccine efficacy in an experimental model of toxic shock syndrome. *Clin. Vaccine Immunol.* 2007; 14(11): 1499—504.
6. Abbott A. Lyme disease: uphill struggle. *Nature*. 2006; 439(7076): 524—5.
7. Borsutzky S., Ebensen T., Link C., Becker P.D., Fiorelli V., Cafaro A. et al. Efficient systemic and mucosal responses against the HIV-1 Tat protein by prime/boost vaccination using the lipopeptide MALP-2 as adjuvant. *Vaccine*. 2006; 24(12): 2049—56.
8. Miller R.L., Meng T.C., Tomai M.A. The Antiviral Activity of Toll-Like Receptor 7 and 7/8 Agonists. *Drug News Perspect.* 2008; 21(2): 68—79.
9. Craft N., Birnbaum R., Quanquin N., Erfe M.C., Quant C., Haskell J. et al. Topical resiquimod protects against visceral infection with *Leishmania infantum* chagasi in mice. *Clin. Vaccine Immunol.* 2014; 21(9): 1314—22.
10. Sepelhi Z., Kiani Z., Alavian S.M., Arababadi M.K., Kennedy D. The link between TLR7 signaling and hepatitis B virus infection. *Life Sci.* 2016; 158: 63—9.
11. Gibson S.J., Lindh J.M., Riter T.R., Gleason R.M., Rogers L.M., Fuller A.E. et al. Plasmacytoid dendritic cells produce cytokines and mature in response to the TLR7 agonists, imiquimod and resiquimod. *Cell Immunol.* 2002; 218(1-2): 74—86.
12. Stokes J.R., Sorkness R.L., Kaplan M.R., Castleman W.L., Tomai M.A., Miller R.L., et al. Attenuation of virus-induced airway dysfunction in rats treated with imiquimod. *Eur. Respir. J.* 1998; 11(2): 324—9.
13. Schön M., Schön M.P. The antitumoral mode of action of imiquimod and other imidazoquinolines. *Curr. Med. Chem.* 2007; 14(6): P681-7.
14. Bernstein D.I., Harrison C.J. Effects of the Immunomodulating Agent R837 on Acute and Latent Herpes Simplex Virus Type 2 Infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1989; 33(9): 1511—5.
15. Reiter M.J., Testerman T.L., Miller R.L., Weeks C.E., Tomai M.A. Cytokine induction in mice by the immunomodulator imiquimod. *J. Leukoc. Biol.* 1994; 55(2): 234—40.
16. Miao X., Luo D., Min W., Lin X., Wang D., Xu Y., et al. Potential efficacy of imiquimod on immunity-related cytokines in murine skin *in vivo* and in human Langerhans cells *in vitro*. *Int. J. Dermatol.* 2012; 51(9): 1116—22.
17. Diamantis M.L., Bartlett B.L., Tying S.K. Safety, efficacy and recurrence rates of imiquimod cream 5% for treatment of anogenital warts. *Skin Therapy Lett.* 2009; 14(5): 1—3, 5.
18. Bechtel M.A., Trout W. Sexually Transmitted Diseases. *Clin. Obstet. Gynecol.* 2015; 58(1): 172—84.
19. Gerster J.F. 1H-Imidazo[4,5-c]quinolin-4-amines and antiviral use. Patent US № 4689338; 1987.
20. Harrison L.I., Stoesz J.D., Battiste J.L., Nelson R.J., Zarraga I.E. A pharmaceutical comparison of different commercially available imiquimod 5% cream products. *J. Dermatolog. Treat.* 2009; 20(3): 1—5.

21. Smirnov V.S., Petlenko S.V. Comparative influence of imiquimod topical preparations of intact skin guinea pigs. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal*. 2016; 10(3): 346—8. (in Russian)
22. Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. *Statistical Methods in Microbiological Studies [Statisticheskie metody v mikrobiologicheskikh issledovaniyakh]*. Leningrad: Medgiz; 1962. (in Russian)
23. Schacker T.W., Conant M., Thoming C., Stanczak T., Wang Z., Smith M. Imiquimod 5-percent cream does not alter the natural history of recurrent herpes genitalis: a phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002; 46(10): 3243—8.
24. Kan Y., Okabayashi T., Yokota S., Yamamoto S., Fujii N., Yamashita T. Imiquimod suppresses propagation of herpes simplex virus 1 by upregulation of cystatin A via the adenosine receptor A1 pathway. *J. Virol.* 2012; 86(19): 10338—46.
25. van der Snoek E.M., den Hollander J.C., van der Ende M.E. Imiquimod 5% cream for five consecutive days a week in an HIV-infected observational cohort up to 32 weeks in the treatment of high-grade squamous intraepithelial lesions. *Sex Transm. Infect.* 2015; 91(4): 245—7.
26. Harrison C.J., Jenki L., Voychehovski T., Bernstein D.I. Modification of immunological responses and clinical disease during topical R-837 treatment of genital HSV-2 infection. *Antiviral Res.* 1988; 10(4-5): 209—23.
27. Leeyaphan C., Surawan T.M., Chirachanakul P., Prasertworonun N., Punyaratabandhu P., Omcharoen V. et al. Clinical characteristics of hypertrophic herpes simplex genitalis and treatment outcomes of imiquimod: a retrospective observational study. *Int. J. Infect. Dis.* 2015; 33: 165—70.

Поступила 20.01.17

Принята в печать 19.02.17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 578.841.1.083.2

*Колосов А.В., Терновой В.А., Швалов А.Н., Моисеева А.А., Сафатов А.С., Михеев В.Н.*

## АДАПТАЦИЯ ВИРУСА ОДИНОЧНО-КАПСИДНОГО ЯДЕРНОГО ПОЛИЭДРОЗА АМЕРИКАНСКОЙ ХЛОПКОВОЙ СОВКИ (*HELICOVERPA ZEA* SNPV) ДЛЯ КОНТРОЛЯ ПОПУЛЯЦИИ ХЛОПКОВОЙ СОВКИ (*HELICOVERPA ARMIGERA*)

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Роспотребнадзора, 630559, раб. поселок Кольцово, Новосибирская область

Вирус одиночно-капсидного ядерного полиэдроза (ВЯП) американской хлопковой совки (АХС) (*Helicoverpa zea* (Boddie, 1850)) был адаптирован к хлопковой совке Старого Света (ХС) *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1805) с помощью 5 слепых пассажей на личинках. Была определена полная геномная последовательность полученного штамма ХС-18 (GenBank № KJ004000.1). По биологической активности штамм ХС-18 превосходит как все ранее созданные в России варианты ВЯП, так и штамм HearSNPV-G4 на основе ВЯП хлопковой совки. Гусеницы хлопковой совки III и IV возрастов при заражении их штаммом ХС-18 гибнут значительно быстрее, чем при заражении эталонным штаммом HearSNPV-G4. Основным отличием генома ХС-18 от ближайшего родственного штамма ВЯП АХС, использованного в препарате Элькар, является наличие повтора из 18 пар нуклеотидных оснований внутри рамки считывания гена *RING-finger*, что подтверждает высокую изменчивость этого региона. Три другие вставки и обнаруженные 7 замен нуклеотидных оснований наблюдались ранее, 6 замен ранее не встречались. Мутации расположены в генах *ORF42*, *lef-9*, *ORF58*, *VP39*, *PIF-4*, *P48*, *SOD*, *ORF111*, *ORF129* и *ORF138*. Среди всех нуклеотидных замещений только одна является синонимичной, что свидетельствует о присутствии селективного давления на вирус. Полученный штамм ХС-18 рекомендован в качестве биопестицида для контроля численности ХС на полях хлопчатника.

Ключевые слова: бакуловирусы; штамм; вирус ядерного полиэдроза; хлопковая совка.

Для цитирования: Колосов А.В., Терновой В.А., Швалов А.Н., Моисеева А.А., Сафатов А.С., Михеев В.Н. Адаптация вируса одиночно-капсидного ядерного полиэдроза американской хлопковой совки (*Helicoverpa zea* SNPV) для контроля популяции хлопковой совки (*Helicoverpa armigera*). *Вопросы вирусологии*. 2017; 62(3): 134-137.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-3-134-137>

*Kolosov A.V., Ternovoy V.A., Shvalov A.N., Moiseeva A.A., Safatov A.S., Mikheev V.N.*

### ADAPTATION OF THE CORN EARWORM SINGLE NUCLEOCAPSID NUCLEOPOLYHEDROVIRUS (*HELICOVERPA ZEA* SNPV) FOR THE CONTROL OF THE COTTON BOLLWORM (*HELICOVERPA ARMIGERA*) POPULATION

State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, 630559, Novosibirsk Region, Russian Federation

*Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) (Hz) single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus (SNPV) was adapted to the cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*, (Hübner, 1805) (Ha)) by five blind passages on larvae. The full genomic sequence of the resulting strain HS-18 has been determined (GenBank acc. №: KJ004000.1). Biological activity of the HS-18 strain is higher than the activity of all other Russian strains of NPV, as far as cotton bollworm strain HearSNPV-G4. HS-18-infected caterpillars at the 3-rd and 4-th ages died much faster than those infected with HearSNPV-G4 strain. A major difference of HS-18 genome is an 18 bp repeat in the RING-finger ORF that confirms high variability of this region. Three other insertions and seven base substitutions were observed earlier, while six base substitutions are new. Mutations are located at ORF42, *lef-9*, ORF58, VP39, PIF-4, P48, SOD, ORF111, ORF129 and ORF138 genes. Among

Для корреспонденции: Колосов Алексей Владимирович, канд. биол. наук, старший научный сотрудник отдела биофизики и экологических исследований, ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область. E-mail: kolosov\_av@vector.nsc.ru

**all nucleotide mutation only one is synonymous. Thus we suppose the selective pressure to the virus. The resulting strain HS-18 is recommended as a biopesticide for controlling the number of cotton bollworm in cotton fields.**

**Key words:** baculoviruses; strain; nucleopolyhedrovirus; cotton bollworm *Helicoverpa armigera*.

**For citation:** Kolosov A.V., Ternovoy V.A., Shvalov A.N., Moiseeva A.A., Safatov A.S., Mikheev V.N. Adaptation of the corn earworm single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus (*Helicoverpa zea* SNP) for the control of the cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*) population. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2017; 62(3):134-137. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-3-134-137>

**For correspondence:** Alexey V. Kolosov, PhD Biol., Senior researcher, Department of biophysics and environmental investigations, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Kol'tsovo, 630559, Novosibirsk Region, Russian Federation. E-mail: kolosov\_av@vector.nsc.ru

**Information about authors:**

Shvalov A.N., <http://orcid.org/0000-0001-6890-1575>

**Acknowledgments.** The study had no sponsorship.

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

Received 15 September 2016

Accepted 11 October 2016

## Введение

Семейство бакуловирусов включает патогены членистоногих, главным образом относящихся к отрядам чешуекрылых, двукрылых и перепончатокрылых. Хлопковая совка (ХС; *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1805)) широко распространена в умеренных областях Евразии, Африки и Австралии. В 2013 г. она впервые была зарегистрирована в Южной Америке и нанесла серьезный урон сельскому хозяйству Бразилии [1]. В Новом Свете традиционным вредителем являются близкородственные виды ХС — американская хлопковая совка (АХС; *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850)) и южноамериканская хлопковая совка (*Helicoverpa gelatopoeon* (Duar, 1921)).

Бакуловирусы эволюционно и серологически не связаны ни с одним вирусом позвоночных. Они подразделяются на 3 типа: вирусы ядерного полиэдроза (ВЯП), вирусы гранулеза и фильтрующиеся вирусы. Первые характеризуются наличием липопротеидной внешней оболочки — полиэдром, основу которого составляет белок полиэдрин [2]. Полиэдры помогают сохранить вирусные частицы в окружающей среде. По этой причине вирус может оставаться инфекционным, даже если он в течение ряда лет находится вне своего хозяина [3].

Благодаря этим свойствам, а также естественному происхождению и высокой специфичности бакуловирусы являются привлекательными агентами контроля численности насекомых-вредителей.

Многие государства, в частности Австралия, Бразилия, Германия, Индия, Китай, США, Швейцария и другие, активно занимаются разработкой и производством инсектицидов на основе бакуловирусов [4—8]. Важнейшим этапом этой работы является получение высоковирулентных штаммов вирусов, которые становятся активной основой биопрепаратов.

Вирусы одиночно-капсидного ядерного полиэдроза АХС, ХС Старого Света и южноамериканской хлопковой совки перекрестно поражают близкородственные виды совок рода *Helicoverpa*, большинство из которых являются вредителями.

Известно, что ВЯП АХС эффективно поражает несколько видов рода *Helicoverpa*, что делает его хорошим кандидатом для использования в качестве инсектицида. Так, выделенный в США в 1961 г. штамм ВЯП АХС Элькар (пассирован несколько раз на *Heliothis virescens*, полная нуклеотидная последовательность определена в 2002 г.) [9, 10] активен в отношении *H. armigera*. В 2013 г. в Бразилии наблюдались вспышки, вызванные ВЯП АХС, поражающей ХС [1], а в Аргентине в том же году

близкородственный вирус поразил южноамериканскую хлопковую совку [11].

В России в 2007 г. был выделен и охарактеризован штамм ВЯП, который депонирован в Коллекции культур микроорганизмов ГНЦ ВБ «Вектор» как ХС-17 под регистрационным номером VB-06 [12]. Хотя данный штамм обладает достаточно высокой вирулентностью по отношению к ХС, были продолжены поиски штаммов с независимой историей происхождения и еще более биологически активных, особенно по отношению к гусеницам старших возрастов.

Целью данного исследования было получение нового высоковирулентного штамма ВЯП ХС ХС-18, определение его геномной последовательности и вирулентности по отношению к гусеницам ХС средних и старших возрастов.

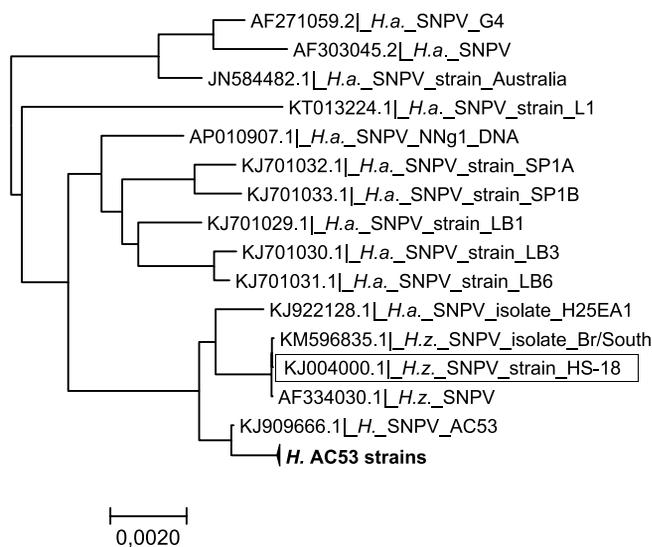
## Материал и методы

Все испытания проводили на гусеницах лабораторной популяции ХС *H. armigera*, выращенных в инсектарии отдела биофизики и экологических исследований ГНЦ ВБ «Вектор» (Новосибирская область, Новосибирский район, раб. поселок Кольцово).

Изолят ВЯП ХС был выделен в 2012 г. в инсектарии при активации латентной инфекции личинки III возраста лабораторной популяции ХС. Из погибшей от полиэдроза гусеницы ХС был приготовлен гомогенат, из которого методом грубой очистки был выделен образец ВЯП. Собственно штамм был получен посредством слепого пятикратного пассирования образца на личинках *H. armigera* путем заражения *per os* и приготовления гомогената из погибших личинок. На 7-е сутки после инфицирования из каждого пассажа для прохождения дальнейшего пассирования отбирали вирус, выделенный только из одной погибшей гусеницы. Данный штамм получил название ХС-18 (HS-18). Штамм прошел 4 пассажа на гусеницах ХС *H. armigera* лабораторной популяции.

Для установления генотипа штамма ХС-18 образцы вирусного материала были секвенированы на Ion Torrent PGM («Life Technologies»). Полученные последовательности выравнились на прототипные последовательности из международной базы данных GenBank.

Сравнительные испытания биологической активности нового штамма ВЯП ХС-18 и штаммов ХС-17, КС-3-86 [13], полученных из государственной коллекции микроорганизмов при ГНЦ ВБ «Вектор», проводили параллельно на лабораторной популяции гусениц. Биологическую активность штаммов оценивали путем определения величины ЛД<sub>50</sub> — дозы вируса (полиэдров на



Филогенетическое дерево, построенное для штаммов ВЯП совок рода *Helicoverpa*. Анализ проведен методом объединения ближайших соседей с использованием двухпараметрической модели Кимуры. Приведены оригинальные названия штаммов, депонированных в GenBank.

гусеницу), вызывающей гибель 50% инфицированных насекомых II возрастной стадии.

Для определения вирулентности ВЯП ХС-18 против различных возрастных групп личинок биопробы испытывали на личинках хлопковой совки III, IV и V возрастных стадий. Исследовали 4 концентрации вируса штамма ХС-18, полученные путем последовательных разведений, —  $4,3 \cdot 10^8$ ;  $4,3 \cdot 10^7$ ;  $2,2 \cdot 10^7$ ;  $2,2 \cdot 10^6$  полиэдров на 1 мл. Эксперимент проводили в трех повторностях. На одну пробу в каждой повторности в среднем использовали 240 гусениц. Для этого в чашки Петри диаметром 40 мм помещали маленький кусочек искусственной питательной среды (ИПС) массой  $70 \pm 10$  мг и с помощью пипетки наносили на него  $10 \pm 1$  мкл вирусной суспензии соответствующего разведения. Затем в эти чашки рассаживали гусениц ХС. Через 1 сут гусеницам подкладывали кусочки неинфицированной ИПС массой  $450 \pm 50$  мг. Личинок культивировали в контролируемых условиях с фотопериодом 16 ч света и 8 ч темноты при  $25 \pm 1$  °C и относительной влажности 70%. Учет смертности (в процентах) проводили ежедневно с 3-го по 10-й день после инфицирования. Определение ЛВ<sub>50</sub> — времени, в течение которого погибают 50% насекомых, и ЛД<sub>50</sub> — дозы вируса, вызывающей 50% гибель насекомых, проводили с помощью пробит-анализа.

Для филогенетического анализа полноразмерных последовательностей из базы данных GenBank были по-

Таблица 1

Сравнительные данные о биологической активности штаммов

Штамм	Биологическая активность, ЛД <sub>50</sub> *, полиэдров на 1 гусеницу
ХС-18 ВЯП ХС	$(1,5—3,0) \cdot 10^1$
ХС-17 ВЯП ХС	$(2,5—5,5) \cdot 10^1$
КС-3-86	$(2,3—7,0) \cdot 10^4$
HearSNPV-G4**	$(0,5—8,0) \cdot 10^2$

Примечание. \* ЛД<sub>50</sub> — количество полиэдров, после поедания которых погибли 50% съевших их насекомых II возрастной стадии; \*\* — данные из [18].

лучены известные на данный момент геномы ВЯП рода *Helicoverpa*. Затем они были выровнены в оболочке Unipro UGENE 1.23 [14] алгоритмом MAFFT [15], после чего проводили филогенетический анализ методом максимального правдоподобия PhyML [16] с использованием алгоритма TN93 [17] с поиском параметров G (степень гетерогенности) и I (пропорция постоянных сайтов) и типом оптимизации дерева SRT&NNI.

### Результаты

Определена полная геномная последовательность ВЯП штамма ХС-18 (GenBank № KJ004000.1), изолированного с помощью 5 слепых пассажей на личинках ХС *H. armigera*. Вирусную ДНК извлекали из гомогената личинок с использованием магнитных сфер со специфическими праймерами. Извлеченные ДНК секвенировали с применением секвенатора NGS Ion Torrent («Life Technologies»). Сборку последовательности выполняли картированием на наиболее близкую известную референсную последовательность — ВЯП АХС штамма Элькар с использованием программного обеспечения TMAP 4.0 со средним покрытием 41x без пропусков и средней длиной чтения 146 нуклеотидов. Длина ВЯП ХС-18 генома составила 130 890 пар оснований с содержанием С + G 39,08%.

На основании анализа полной нуклеотидной последовательности было построено филогенетическое дерево (см. рисунок) для различных штаммов ВЯП совок рода *Helicoverpa*. Штамм ХС-18 обозначен в рамке.

Данные для сравнения биологической активности известных штаммов ХС-17, КС-3-86, эталонного штамма HearSNPV-G4 и штамма ХС-18 приведены в табл. 1.

Из табл. 1 видно, что выделенный новый штамм ХС-18 патогенен для гусениц ХС, причем его активность превышает активность известных штаммов КС-3-86 и ВЯП ХС (штамм ХС-17).

Результаты изучения процента гибели гусениц III, IV и V возрастов при инфицировании их различными дозами вируса (табл. 2) показывают, что среди гусениц III и IV возрастов все испытанные дозы приводят к гибели более 90%. При этом гусеницы V возраста значительно устойчивее к действию вируса, чем гусеницы средних возрастов.

ЛВ<sub>50</sub> для гусениц III, IV и V возрастов представлены в табл. 3.

Из полученных данных видно, что для всех возрастов увеличение дозы инфицирования приводит к сокращению ЛВ<sub>50</sub> (см. табл. 3). Для гусениц III и IV возрастов увеличение дозы в 200 раз приводило к сокращению ЛВ<sub>50</sub> на 20%, а для гусениц V возраста это сокращение достигало почти 40%.

Было проведено сравнение показателей для штамма ХС-18 (ЛВ<sub>50</sub>) для III, IV и V возрастов с аналогичными показателями эталонного штамма HearSNPV-G4 [18]. Результаты сравнения приведены в табл. 4.

Сравнение данных о ЛВ<sub>50</sub> (см. табл. 4) показало, что

Таблица 2

Гибель на 10-е сутки после заражения личинок ХС III, IV и V возрастов ВЯП ХС-18

Доза инфицирования, полиэдров на 1 гусеницу	Погибшие личинки, %		
	III возраста	IV возраста	V возраста
$4,3 \cdot 10^6$	100	100	82
$4,3 \cdot 10^5$	100	100	72
$2,2 \cdot 10^5$	100	99	61
$2,2 \cdot 10^4$	99	95	49

Таблица 3

**ЛВ<sub>50</sub> для ВЯП ХС-18 против личинок ХС III, IV и V возрастов**

Доза инфицирования, полиэдров на 1 гусеницу	ЛВ <sub>50</sub> личинок, ч		
	III возраста	IV возраста	V возраста
4,3•10 <sup>6</sup>	98,4	112,8	156
4,3•10 <sup>5</sup>	120	124,8	184,8
2,2•10 <sup>5</sup>	126	129,6	200,88
2,2•10 <sup>4</sup>	132	136,8	249,6

Таблица 4

**Сравнительные данные об активности (ЛВ<sub>50</sub>\*) ВЯП ХС штаммов ХС-18 и эталонного HearSNPV-G4\*\***

Возраст личинок ХС	Штамм вируса	Доза инфицирования, полиэдров на 1 гусеницу	Общий процент погибших при указанной концентрации вируса	ЛВ <sub>50</sub> , ч
III	HearSNPV-G4	3,6•10 <sup>5</sup>	87	156,0 ± 2,6
	ХС-18 ВЯП	2,2•10 <sup>4</sup>	99	132,0 ± 5,1
IV	HearSNPV-G4	1,2•10 <sup>6</sup>	85	156,8 ± 3,1
	ХС-18 ВЯП	2,2•10 <sup>4</sup>	95	136,8 ± 3,1
V	HearSNPV-G4	1,4•10 <sup>7</sup>	85	163,0 ± 3,6
	ХС-18 ВЯП	4,3•10 <sup>6</sup>	82	156,0 ± 6,8

Примечание. \* ЛВ<sub>50</sub> — время после заражения, в течение которого погибают 50% инфицированных насекомых данной возрастной стадии; \*\* — данные из [18].

штамм ХС-18 превосходит эталонный штамм HearSNPV-G4 по данному показателю, особенно для гусениц III и IV возрастов, против которых в случае недостаточной оперативности обычно и применяют инсектициды.

**Обсуждение**

Основным отличием генома ХС-18 от штамма Элькар ВЯП является наличие повтора из 18 пар оснований внутри рамки считывания гена *RING-finger*, что подтверждает высокую изменчивость этого региона [19]. Три другие нуклеотидные вставки и обнаруженные 7 замен оснований наблюдались ранее, 6 замен оснований ранее не встречались. Мутации расположены в генах *ORF42*, *lef-9*, *ORF58*, *VP39*, *PIF-4*, *P48*, *SOD*, *ORF111*, *ORF129* и *ORF138*. Среди всех нуклеотидных замещений только одна является синонимичной, что свидетельствует о присутствии некоторого селективного давления на вирус.

Данные, полученные при секвенировании, показали, что штамм ХС-18 ВЯП ХС принадлежит к виду *H. zea*. Его оригинальная геномная последовательность депонирована в GenBank № KJ004000.

По биологической активности адаптированный штамм ХС-18 превосходит все ранее созданные в России варианты ВЯП в отношении ХС. Гусеницы ХС III и IV возрастов при заражении их штаммом ХС-18 гибнут значительно быстрее, чем при заражении эталонным штаммом HearSNPV-G4.

Полученный штамм ХС-18 рекомендован в качестве биоинсектицида для контроля численности ХС на полях хлопчатника.

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

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

**ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1—11, 14—19 см. REFERENCES)**

12. Кошелев Ю.А., Рыжиков Г.А., Репин В.Е., Колосов А.В. Штамм вируса ядерного полиэдроза хлопковой совки *Helicoverpa armigera* Hbn., используемый для получения инсектицидного препарата. Патент РФ № 2359031; 2007.  
13. Божко Н.А., Горбунова Е.Е., Петрова И.Д., Караваев В.С., Колосов А.В. Штамм вируса ядерного полиэдроза капустной совки, используемый для получения инсектицидов. Патент РФ № 2153258; 1999.

**REFERENCES**

1. Ardisson-Araújo D.M.P., Sosa-Gomez D.R., Melo F.L., Bao S.N., Ribeiro B.M. Characterization of *Helicoverpa zea* single nucleopolyhedrovirus isolated in Brazil during the first old world bollworm (*Noctuidae*: *Helicoverpa armigera*) nationwide outbreak. *Virus Reviews & Research*. 2015; 20: 1–4.  
2. Blissard G.W., Rohrmann G.F. Baculovirus diversity and molecular biology. *Annu. Rev. Entomol.* 1990; 35: 127–55.  
3. Jacques R.P. Persistence, accumulation and denaturation of Nuclear polyhedrosis and granulosis viruses. In: Summers M.D., Engler R., Falcon L.A., Vail P.V., eds. *Baculoviruses for insect pest control: safety considerations*. Washington, DC: American Society of Microbiology; 1975: 90–9.  
4. Management Gmb. Available at: [http://slrecord.typepad.com/the\\_second\\_life\\_record/2015/01/management-gmb.html](http://slrecord.typepad.com/the_second_life_record/2015/01/management-gmb.html) (accessed 14 July 2016).  
5. Andermatt Biocontrol: Products. Available at: <http://www.export.bio-control.ch/sites/products.html> (accessed 20 June 2016).  
6. USDA Forest Service — Forest Health Protection Pesticide Viral Products. Available at: <http://www.fs.fed.us/foresthealth/pesticide/virus-products.shtml> (accessed 22 June 2016).  
7. Pest Management Queensland: ViVus Max. Available at: <http://www.agbitech.com/au/home/products/vivus-max.aspx> (accessed 4 July 2016).  
8. Bio-Pesticides Introduction: Agri Life. Available at: <http://www.agrilife.in/biopesticides.htm> (accessed 23 June 2016).  
9. Chen X., Zhang W.J., Wong J., Chun G., Lu A., McCutchen B.F. et al. Comparative analysis of the complete genome sequences of *Helicoverpa zea* and *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleopolyhedroviruses. *J. Gen. Virol.* 2002; 83(Pt 3): 673–84.  
10. Ignoffo C.M. The nuclear-polyhedrosis virus of *Heliothis zea* (boddie) and *Heliothis virescens* (fabricius). *J. Invertebr. Pathol.* 1965; 7(3): 315–19.  
11. Ferrelli M.L., Taibo C., Fichetti P., Sciocco-Cap A., Arneodo J.D. Characterization of a new *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus variant causing epizootic on a previously unreported host, *Helicoverpa gelatopoeon* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Invertebr. Pathol.* 2016; 138: 89–93.  
12. Koshelev Yu.A., Ryzhikov G.A., Repin V.E., Kolosov A.V. *The strain of Helicoverpa armigera nuclear polyhedrosis virus used to produce the insecticide*. Patent RF N 2359031; 2007. (in Russian)  
13. Bozhko N.A., Gorbunova E.E., Petrova I.D., Karavaev V.S., Kolosov A.V. *The strain of Mamestra brassicae nuclear polyhedrosis virus used to produce insecticides*. Patent RF N 2153258; 1999. (in Russian)  
14. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M., UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*. 2012; 28(8): 1166–67.  
15. Katoh K., Standley D.M. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Mol. Biol. Evol.* 2013; 30(4): 772–80.  
16. Guindon S., Dufayard J.-F., Lefort V., Anisimova M., Hordijk W., Gascuel O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* 2010; 59(3): 307–21.  
17. Tamura K., Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 1993; 10(3): 512–26.  
18. Arrizubieta M., Williams T., Caballero P., Simón O. Selection of a nucleopolyhedrovirus isolate from *Helicoverpa armigera* as the basis for a biological insecticide. *Pest Manag. Sci.* 2014; 70(6): 967–76.  
19. Le T.H., Wu T., Robertson A., Bulach D., Cowan P., Goodge K. et al. Genetically variable triplet repeats in a RING-finger ORF of *Helicoverpa* species baculoviruses. *Virus Res.* 1997; 49(1): 67–77.

Поступила 15.09.16

Принята в печать 11.10.16

## В ПОМОЩЬ ВИРУСОЛОГУ

© КОЛПАКОВ С.А., КОЛПАКОВА Е.П., 2017

УДК 578.823.91:578.53].083.2

*Колпаков С.А., Колпакова Е.П.*

### АДАПТАЦИЯ ШТАММОВ РОТАВИРУСА ЧЕЛОВЕКА ГРУППЫ А К РЕПРОДУКЦИИ НА ПЕРЕВИВАЕМЫХ КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК

ФБУН «Ростовский НИИ микробиологии и паразитологии» Роспотребнадзора, 344000, г. Ростов-на-Дону

Заболеемость ротавирусным гастроэнтеритом в мире до сих пор не имеет тенденции к уменьшению. Создание эффективной вакцины позволит снизить, а в дальнейшем, возможно, и победить это опасное высококонтагиозное заболевание. Однако до сих пор не только в нашей стране, но и за рубежом не разработаны методики, позволяющие адаптировать и культивировать штаммы ротавируса человека группы А, стабильно дающие высокий «урожай» вирусного потомства на перевиваемых культурах клеток. Используя феномен обмена генов сегментированного генома ротавируса, за рубежом для создания ротавирусных вакцин пошли по пути использования реассортантных штаммов, представляющих собой результат совместного культивирования низкотитражных ( $1-2 \cdot 10^6$  вирионов в 1 мл) штаммов ротавируса человека и штаммов ротавируса животных, например ротавируса обезьян SA-11 или ротавируса диареи телят Небраски, дающих относительно высокий «урожай» вирусного потомства ( $1 \cdot 10^7-1 \cdot 10^8$ ). Понятно, что такие вакцинные композиции не смогут заменить полноценные вакцины из чисто человеческих штаммов ротавируса различных серотипов, но на сегодняшний день это тоже может быть выходом из создавшегося положения. В идеале же нужно иметь ротавирусные вакцины, включающие весь набор G- и P-серотипов ротавирусов, циркулирующих на данной территории их применения. В работе описана авторская методика адаптации и выращивания ротавирусов человека группы А на культуре перевиваемых клеток, позволяющая получать  $5 \cdot 10^8$  вирионов в 1 мл культуральной жидкости. Проведенная работа позволила впервые получить высокотитражные культивируемые штаммы ротавируса человека, которые могут быть использованы в качестве вакцинных штаммов, а также высокоактивных антигенов для конструирования диагностических тест-систем.

Ключевые слова: *ротавирус человека; адаптация; культура клеток; вакцинные штаммы ротавируса человека группы А.*

*Для цитирования:* Колпаков С.А., Колпакова Е.П. Адаптация штаммов ротавируса человека группы А к репродукции на перевиваемых культурах клеток. *Вопросы вирусологии.* 2017; 62(3): 138-143.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-3-138-143>*Kolpakov S.A., Kolpakova E.P.*

### ADAPTATION OF HUMAN ROTAVIRUS STRAINS OF GROUP A TO THE REPRODUCTION IN PASSAGED CELL CULTURES

Rostov Scientific Research Institute of Microbiology and Parasitology, Rostov-on-Don, 344000, Russian Federation

The incidence of rotavirus gastroenteritis in the world still has no tendency to reduction. The development of an effective vaccine would reduce or, in the future, even defeat this highly contagious dangerous disease. However, both in Russia and abroad there is still no developed technique for adapting and cultivating strains of the human rotavirus A that would stably produce a high "yield" of virus progeny in transplanted culture cells. The phenomenon of gene exchange for the segmented genome of rotavirus was used by foreign researchers to create the rotavirus vaccine using reassortant strains which are the result of joint cultivation of low-titer ( $1-2 \cdot 10^6$  virions per ml) human rotavirus strains and rotavirus strains of animals, such as monkey rotavirus SA-11 or Nebraska calf rotavirus diarrhea providing a relatively high "yield" of virus progeny ( $1 \cdot 10^7-1 \cdot 10^8$ ). It is clear that such vaccine compositions will not be able to replace a full-fledged vaccine of human rotavirus strains of different serotypes, but they can be used for the time being as a solution to the problem. Ideally, a rotavirus vaccine is needed that includes the full set of G and P serotypes of rotaviruses circulating in the territory of their application.

The paper describes an original technique for adaptation and cultivation of human rotaviruses of group A on the culture of transplantable cells developed by the authors. This technique allows  $5 \cdot 10^8$  virions to be obtained per 1 ml of culture fluid. High-titer cultivated strains of human rotavirus that can be used as vaccine strains were obtained, as well as highly-active antigens for the construction of diagnostic test-systems.

Key words: *human rotavirus; adaptation; cell culture; vaccine strains of the human rotavirus A.*

*For citation:* Kolpakov S.A., Kolpakova E.P. Adaptation of human rotavirus strains of group A to the reproduction in passaged cell cultures. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal).* 2017; 62(3): 138-143. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-3-138-143>

*Для корреспонденции:* Колпаков Сергей Анатольевич, канд. мед. наук, старший научный сотрудник лаборатории вирусологии, микробиологии и молекулярно-биологических методов исследования ФБУН «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии» Роспотребнадзора, 344000, г. Ростов-на-Дону. E-mail: [kolpakov1953@mail.ru](mailto:kolpakov1953@mail.ru)

**For correspondence:** Sergey A. Kolpakov, Candidate of Medicine, senior researcher at the Laboratory of virology, microbiology, and molecular-biology research methods, Rostov Scientific Research Institute of Microbiology and Parasitology, Rostov-on-Don, 34000, Russian Federation. E-mail: kolpakov1953@mail.ru

**Acknowledgments.** The study had no sponsorship.

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

Received 18 November 2016

Accepted 13 December 2016

## Введение

Острые кишечные инфекции, несмотря на значительные успехи вирусологии, остаются чрезвычайно актуальными. Исследования отечественных и зарубежных авторов выявили ведущую роль ротавируса в возникновении большей части гастроэнтеритов инфекционной природы, особенно у детей до 2 лет. Ежегодная заболеваемость ротавирусным гастроэнтеритом в мире до сих пор не имеет тенденции к уменьшению и составляет 125 млн случаев, из которых около 1 млн заканчивается летально, что как нельзя лучше подтверждает актуальность этого вопроса, в том числе для экономически развитых стран. В США, например, регистрируется более 70 тыс. госпитализаций в год с оцененным экономическим ущербом более 1 млрд долл. [1—3]. На территории России доля ротавирусных гастроэнтеритов тоже достигает достаточно внушительных цифр — 44—47% от всех случаев инфекционной кишечной патологии. При этом до 5% всей детской смертности среди больных младше 5 лет связаны с ротавирусным гастроэнтеритом [4—9].

Бороться с этой инфекцией при помощи антибиотиков или каких-либо иных средств бесполезно, учитывая особенности возбудителя и практический опыт. Только широкий охват детского контингента вакцинацией по примеру коревой или полиовирусной способен изменить существующее положение [10—13]. С учетом этого создание ротавирусной вакцины является одной из приоритетных задач глобальной стратегии ВОЗ по снижению инфекционной заболеваемости и смертности на 2006—2015 гг. (Draft WHO/IVB/05.05).

Между тем создание ротавирусной вакцины невозможно без наличия адаптированных и хорошо растущих на перевиваемых культурах клеток аттенуированных штаммов ротавируса человека. Однако до сих пор не существует стандартных способов адаптации, дающих возможность культивировать ротавирусы человека в высоких титрах примерно  $1 \cdot 10^8$ — $1 \cdot 10^{11}$  вирионов в 1 мл культуральной жидкости. Наша работа является попыткой восполнить этот пробел.

## Материал и методы

**Культуры клеток.** В работе использовали культуру перевиваемых клеток почки эмбриона свиньи (СПЭВ), культивируемую в 80—100 мл среды 199 в стеклянных флаконах объемом 0,5 л с добавлением 10% сыворотки крупного рогатого скота (КРС).

**Вирусы.** Фекальные 10% суспензии на растворе Хенкса готовили по обычной методике. Перед заражением плотный монослой клеток 3 раза промывали раствором Хенкса и настилали предварительно обработанные трипсином суспензии фекалий больных, в которых методом электронной микроскопии (ЭМ) были обнаружены ротавирусы. После контакта восстанавливали первоначальный объем питательной средой без сыворотки (поддерживающая среда) и оставляли в термостате при 37 °C до появления первых признаков деструкции клеточного монослоя.

**Электронная микроскопия.** Пробы от каждого пассажа контролировали 1 раз в сутки на наличие ротавируса методом ЭМ на микроскопе УМВ-100К при инструментальном увеличении 65 000—85 000. Использовали медные электронно-микроскопические сетки калибром 150—400 меш с нитроцеллюлозной пленкой-подложкой толщиной 50—70 Å, изготовленной по оригинальной авторской методике. Сетки с пробами «окрашивали» (контрастировали) 0,5% раствором уранилацетата.

**Трипсин.** Для «активации» ротавируса применяли лиофилизированный трипсин фирмы «AppliChem» с молекулярной массой 23,8 кД. Его же использовали как стандарт молекулярных масс.

**Выделение РНК.** РНК ротавируса выделяли как описано в работе [14] с незначительными авторскими модификациями.

**Электрофорез.** Вертикальный электрофорез проводили в 8% полиакриламидном геле (ПААГ) (рН 8,8) с концентрирующим 4% гелем (рН 5,8) при токе 10 мА в течение 15—24 ч [15].

**Электрофорез в агарозе.** Электрофорез на стеклянных пластинах проводили в 2% агарозе рН 7,2. В качестве буфера использовали ФБР рН 7,8. Додecilсульфат натрия (ДСН) не использовали.

**Диагностикумы.** Для детекции ротавирусов, кроме ЭМ, использовали разработанный и выпускаемый нами коммерческий антительный эритроцитарный диагностикум Ротатест (ФСП-42-0425-4460-03) для реакции непрямой гемагглютинации (РНГА). Диагностикум представляет собой 1% взвесь фиксированных глутаральдегидом эритроцитов барана, сенсibilизированных  $\gamma$ -глобулиновой фракцией асцитной жидкости белых крыс, иммунизированных ротавирусом обезьян SA-11. РНГА проводили микрометодом в объеме 75 мкл в планшетах для иммунологических реакций с U-образными лунками в соответствии с прилагаемой инструкцией по применению диагностикума Ротатест [4—6]. Тест-система позволяет дать ответ на наличие антигена ротавируса в течение 1,5—2 ч, при этом ее чувствительность составила 2—4 нг по вирусному белку.

## Результаты

Для адаптации и дальнейшей работы были отобраны 56 фекальных суспензий, в которых методом РНГА в высоких титрах был обнаружен ротавирус группы А, а электронная микроскопия показала в этих пробах большое количество двухкапсидных вирионов ротавируса (рис. 1).

Критерий двухкапсидности является очень важным, так как только наличие второго капсида после нарезания протеолитическими ферментами делает ротавирус инфекционным и способным к дальнейшему размножению [16—18].

Исходя из этого культуры клеток заражали фекальными пробами, предварительно обработанными трипсином. Как правило, в пенициллиновый флакон брали 0,1 мл суспензии и разбавляли двукратно средой 199, добавляли 0,1 мл раствора трипсина и помещали в термостат

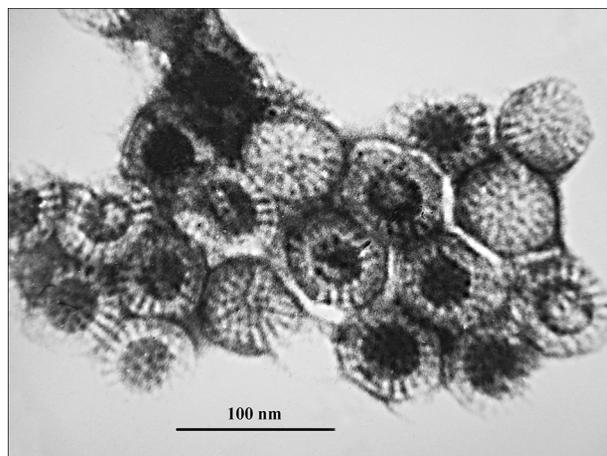


Рис. 1. Электронно-микроскопическая фотография: ротавирусы человека группы А. Негативное контрастирование. Ув. 200 000. Препарат С.А. Колпакова.

при 37 °С. Варьировали концентрациями трипсина от 10 до 500 мкг/мл с дискретностью 10 мкг/мл и временем контакта фекальных суспензий с ним от 5 мин до 1 ч с дискретностью 5 мин. После термостата наслаивали «активированные» суспензии на отмытый от ростовой среды плотный монослой клеток в течение 3—5 мин. Перед добавлением поддерживающей среды суспензии фекалий с трипсином из флакона не удаляли.

Однако при таком алгоритме заражения нам не удалось получить стабильные результаты: ротавирус обнаруживался только в заражении, а в первых и дальнейших пассажах уже не выявлялся. При этом в достаточно большом числе проб после 2-го пассажа с концентрацией трипсина 500 мкг/мл и 10 мин контактом с ним в термостате стало стабильно появляться цитопатическое действие (ЦПД), причем с каждым последующим пассажем время его появления сокращалось с 7—10 дней в заражении до 2 дней в 5—7-м пассаже и далее. Полная гибель клеток сопровождалась образованием однородной взвеси белкового характера, пенящейся при резком встряхивании. Контроль в РНГА заражений и пассажей показал почти полное отсутствие титров вируса, лишь в первой лунке реакция шла на 2—3+. Электронная микроскопия также показала отсутствие вирионов ротавируса.

Чтобы понять причину стабильного появления ЦПД на культуре клеток без обнаружения самих ротавирусов, мы изучили методом электрофореза в ПААГ белковый спектр указанных культуральных жидкостей и получили следующие результаты.

1. Во всех пробах (от заражения до 7 и более пассажей) были обнаружены «легкие» белки массой около 21 кД в зоне вирусных белков ротавируса группы А. В качестве контроля использовали культуральную жидкость после заражения клеток ротавирусом обезьян SA-11 (рис. 2, трек 11), а в качестве эталона — 0,2% раствор трипсина, молекулярная масса которого составляет 23,8 кД (рис. 2, трек 1; рис. 3, треки 1, 2).

2. Концентрация «легких» белков, судя по интенсивности окрашивания амидо черным, увеличивалась в некоторых

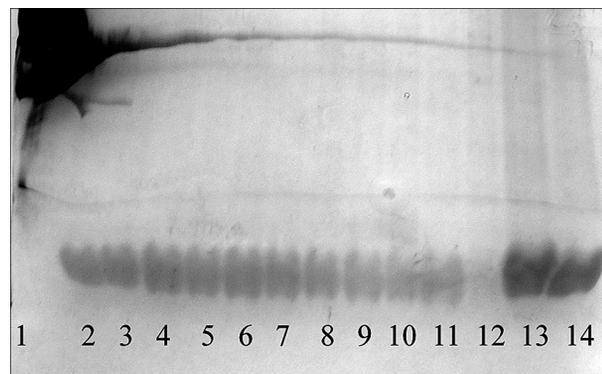


Рис. 2. Электрофореграмма культуральной жидкости зараженных клеток СПЭВ:

2—10 — 5-е пассажи проб № 13, 51, 53, 227, 240, 248, 268, 274, 279; 11 — положительный контроль — 12-й пассаж ротавируса обезьян SA-11; 12 — культуральная жидкость интактных клеток; 13, 14 — 7-е пассажи проб № 218 и 242; 1—0,2% трипсин (23,8 кД). ПААГ — 8%; ток — 10,0 мА; время — 16 ч; окраска — 1% раствор амидо черного.

пробах на порядок или более от заражения до 7-го пассажа (рис. 2, треки 13, 14). В виде контроля использовали культуральную жидкость незараженных клеток, в которой зона «легких» вирусных белков практически полностью отсутствовала (рис. 2, трек 12).

На основании полученных данных «легкие» белки массой 20,5 кД были идентифицированы нами как неструктурный гликопротеин ротавируса NSP4. Это объясняло появление ЦПД с полной гибелью клеточного монослоя, так как внутриклеточная экспрессия NSP4 приводит к нарушению структур межклеточных контактов, нарушению филаментозной структуры самой клетки, а также изменяет ионный баланс с нарушением резорбции воды, что и приводит к разрушению мембран и гибели клеток [19—23].

Таким образом, какая-то часть ротавирусных генов все-таки функционировала в зараженной культуре клеток. Электрофорез (ЭФ) в ПААГ подтвердил эту догадку. В культуральной жидкости зараженных клеток СПЭВ были обнаружены гены 6; 7; 8; 9 и 10, если сравнивать их с геномным профилем ротавируса человека (рис. 4).

Слишком темный фон электрофореграмм РНК, представленных в статье, особенно треков с пробами, не является следствием небрежной или неумелой постановки

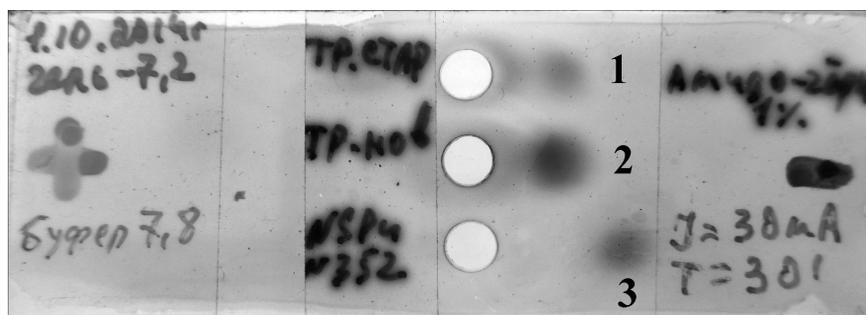


Рис. 3. Электрофореграмма 0,2% растворов трипсина: 1 — производства НПО «Биолар» выпуска 1988 г.; 2 — производства фирмы «AppliChem» выпуска 2013 г. (молекулярная масса — 23,8 кД); 3 — «легкий» белок молекулярной массой 20,5 кД (NSP4) — 5-й пассаж пробы № 352; агароза — 2% (рН 7,2); буфер — рН 7,8 без ДСН; окраска — 1% раствор амидо черного; ток — 38 мА, время — 30 мин.

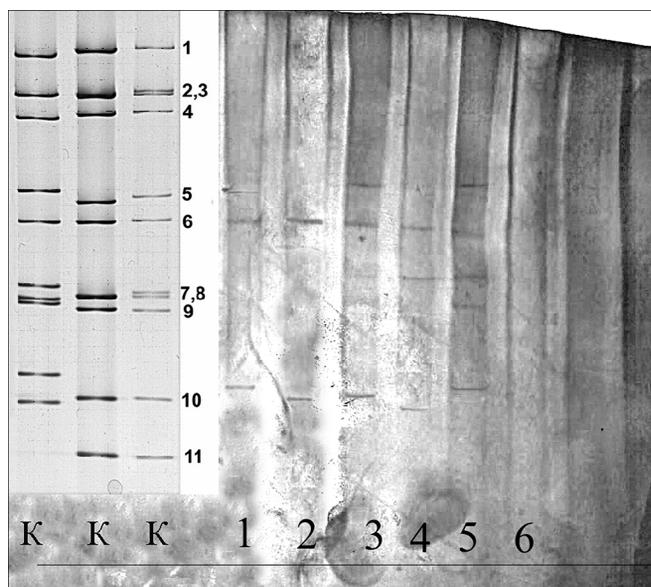


Рис. 4. Электрофореграмма РНК: ККК — трех культуральных штаммов ротавируса человека; 1—6 — 6 штаммов и разных проб культуральной жидкости, содержащих лишь часть генома ротавируса. ПААГ — 8%; ток — 10 мА; время — 18 ч. Препарат С.А. Колпакова.

опыта. Вирус во время адаптации к росту в чуждой для него клеточной среде методом многочисленных проб и ошибок «старается» так изменить свой геном, чтобы выжить и дать достаточное количество вирусного потомства. В процессе этой напряженной работы в клетках накапливается большое количество генетического материала с разбросом по молекулярным массам, которые по разным причинам не включаются в формирующиеся вирионы ротавируса человека. Именно эти «разнокалиберные» обломки РНК проявляются в треках с пробами после окрашивания нитратом серебра в виде равномерного неряшливого черного фона. Постепенно с окончанием

периода адаптации синтезируются только полноценные двухцепочечные гены ротавируса, и электрофореграмма приобретает вид, показанный на рис. 4 (треки ККК).

Поскольку гены ротавируса в пробах с концентрациями трипсина менее 500 мкг/мл не обнаруживались, мы предположили, что его просто недостаточно для полной (штатной) активации ротавируса, происходящей в естественных условиях. Поэтому базовая концентрация трипсина была увеличена до 2 мг в 1 мл. Далее проводили заражение клеточного монослоя, как описано выше, но использовали одну концентрацию трипсина 2 мг в 1 мл и время контакта с ним фекальной пробы 10 мин (самого трипсина, как и раньше, добавляли 0,1 мл). При этом после контакта с клеточным монослоем и добавления поддерживающей среды концентрация трипсина в ней составляла примерно 20 мкг в 1 мл.

Начиная с первого пассажа в таком режиме заражения стало стабильно появляться и нарастать ЦПД, причем с 3—5-го пассажа через 48 ч наблюдалась полная деструкция клеточного монослоя. Культуральная жидкость при этом оставалась розового цвета и была почти прозрачной, с легкой «белковой» опалесценцией. Контроль в РНГА с Ротатестом заражений и пассажей показал плавное нарастание титров с 1:2 в заражении до 1:32 в 5-м пассаже. При ЭМ этих проб в первых пассажах были выявлены отдельные ротавирусы и их капсомеры в виде тубулярных структур и отдельных пластов (рис. 5). Начиная с 3-го пассажа и далее постоянно обнаруживались как отдельные ротавирусы, так и их скопления (рис. 5, б; рис. 6).

На рис. 7 представлен ЭФ РНК двух штаммов ротавируса человека, адаптированных к росту на культуре перевиваемых клеток СПЭВ. По увеличению интенсивности окраски нитратом серебра отчетливо видно нарастание количества генетического материала штамма ротавируса человека № 218 от 2-го к 6-му пассажу (см. рис. 7, треки 1—5). Соответственно выросли титры ротавируса в РНГА и количество вирионов ротавируса, выявляемых при ЭМ.

Подобным образом нами были адаптированы 6 штаммов ротавируса человека, и 3 из них задепонированы в Государственной коллекции вирусов ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» под номерами депонента ГКВ № 2727, № 2728 и № 2729. Количество вирионов в поддерживающей среде до лиофилизации, по данным ЭМ, составило не менее  $5 \cdot 10^8$  в 1 мл.

Геном всех штаммов ротавируса человека содержит 11 сегментов РНК, состоящих из 4 групп: 1-я группа — 4 сегмента, 2-я группа — 2 сегмента, 3-я группа — 3 сегмента, 4-я группа — 2 сегмента. По распределению сегментов РНК после ЭФ все адаптированные нами штаммы ро-

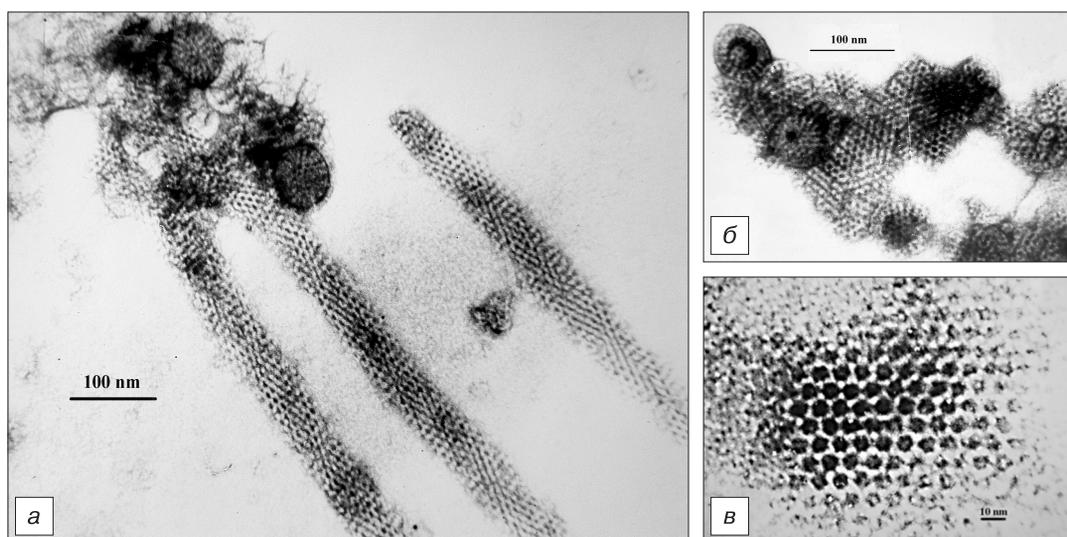


Рис. 5. Электронно-микроскопическая фотография: а и б — культуральные ротавирусы человека группы А с капсомерами в виде тубулярных структур и пластов; в — отдельные пластины капсомеров ротавируса человека. Негативное контрастирование.

Ув. 200 000. Препарат С.А. Колпакова.

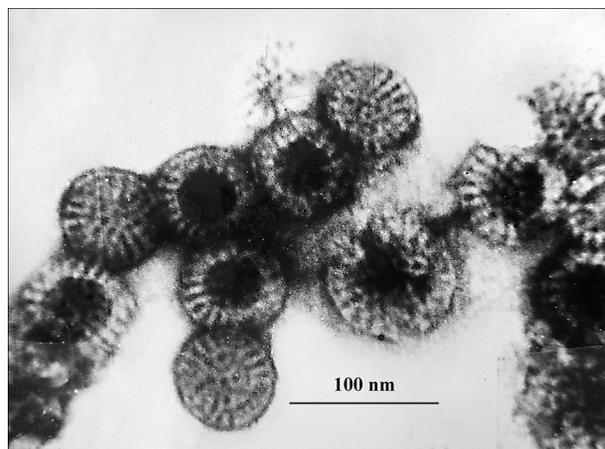


Рис. 6. Электронно-микроскопическая фотография: культуральные ротавирусы человека группы А. Ув. 200 000. Негативное контрастирование. Препарат С.А. Колпакова.



Рис. 7. Электрофореграмма РНК: 1—5 — культурального штамма ротавируса человека № 218; 6—7 — культурального штамма ротавируса человека № 356 (2-й и 3-й пассажи). ПААГ — 8%; ток — 10 мА; время — 18 ч. Препарат С.А. Колпакова.

тавируса, включая задепонированные, можно однозначно отнести к группе А ротавируса человека (см. рис. 4, ККК).

Дальнейшее повышение количества трипсина вопреки нашему желанию не приводило к повышению количества ротавируса в культуральной жидкости больше чем  $5 \cdot 10^8$  в 1 мл. Концентрации трипсина выше 2 мг/мл при наслоении на монослой вызывали деструкцию клеточного пласта с распадом на отдельные клетки. При этом вирус или переставал расти вообще, или его концентрация резко падала, что тоже не решало проблемы. Для увеличения количества культурального ротавируса человека необходимо было найти какое-либо другое решение, и исследования в этом направлении были продолжены.

### Обсуждение

Таким образом, в результате проведенной работы нам удалось адаптировать к росту на перевиваемой культуре клеток

СПЭВ штаммы ротавируса человека. Несмотря на недостаточно высокие титры  $2 \cdot 10^8$ — $5 \cdot 10^8$  в 1 мл, они вполне могут в будущем послужить прототипными штаммами для ротавирусной вакцины. Они же могут положить начало созданию национальной коллекции культивируемых штаммов ротавируса человека, которая в настоящее время отсутствует.

Всего было получено 6 штаммов различных электрофотетипов ротавируса человека, дающих стабильно высокий «урожай» вирусного потомства до 25—39-го пассажа (срок наблюдения). Три из них, как указано выше, задепонированы в Государственной коллекции вирусов.

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

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

### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 2, 3, 10—13, 15—23 см. REFERENCES)

1. Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов АМН СССР. *Ротавирусная инфекция (Методические рекомендации)*. М.; 1989.
4. Колпаков С.А., Зарубинский В.Я. Разработка эритроцитарного препарата для диагностики ротавирусных инфекций. В кн.: Новохатский А.С., ред. *Проблемы медицинской и санитарной микробиологии города*. Ростов-на-Дону; 1987.
5. Зарубинский В.Я., Колпаков С.А. Применение реакции непрямой геммагглютинации для диагностики ротавирусного гастроэнтерита. *Вопросы вирусологии*. 1989; 34(2): 250—4.
6. Симованьян Э.Н., Ловердо Р.Г., Зарубинский В.Я., Колпаков С.А., Авроров В.П. Клиника, диагностика и лечение ротавирусной инфекции у детей раннего возраста. *Педиатрия*. 1989; (2): 47—50.
7. Алексеев К.П., Кальнов С.Л., Гребенникова Т.В., Алипер Т.И. Ротавирусная инфекция человека. Стратегии Вакцинопрофилактики. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61(4): 154—9.
8. Куличенко Т.В. Лечение и вакцинопрофилактика ротавирусной инфекции у детей. *Педиатрическая фармакология*. 2007; 4(1): 42—7.
9. Таточенко В.К., Озеретский Н.А., Федоров А.М., ред. *Иммунопрофилактика-2011*. 3-е изд. М.: ИПК «Контент-пресс»; 2011.
14. *Ротавирусный гастроэнтерит. Противоэпидемические мероприятия. Пособие для врачей*. Нижний Новгород; 1999.

### REFERENCES

1. Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis AMS USSR. *Rotavirus Infection (Guidelines) [Rotavirusnaya infektsiya (Metodicheskie rekomendatsii)]*. Moscow; 1989. (in Russian)
2. Ogilvie I., Khoury H., El Khoury A.C., Goetghebeur M.M. Burden of rotavirus gastroenteritis in the pediatric population in Central and Eastern Europe: serotype distribution and burden of illness. *Hum. Vaccin.* 2011; 7(5): 523—33.
3. Global networks for surveillance of rotavirus gastroenteritis, 2001—2006. *Wkly Epidemiol. Rec.* 2008; 83(47): 421—5.
4. Kolpakov S.A., Zarubinskiy V.Ya. Development of Packed red blood cells of the drug for the diagnosis of rotavirus infections. In: Novokhatskiy A.S., ed. *Problems of Medical and Sanitary Microbiology of the City [Problemy meditsinskoy i sanitarnoy mikrobiologii goroda]*. Rostov-na-Donu; 1987. (in Russian)
5. Zarubinskiy V.Ya., Kolpakov S.A. Application of the reaction of indirect hemagglutination for the diagnosis of rotavirus gastroenteritis. *Voprosy virusologii*. 1989; 34(2): 250—4. (in Russian)
6. Simovan'yan E.N., Loverdo R.G., Zarubinskiy V.Ya., Kolpakov S.A., Avrorov V.P. Clinic, diagnostics and treatment of rotavirus infection in children of early age. *Pediatriya*. 1989; (2): 47—50. (in Russian)
7. Alekseev K.P., Kal'nov S.L., Grebennikova T.V., Aliper T.I. Rotavirus infection of man. The Strategy of Vaccination. *Voprosy virusologii*. 2016; 61(4): 154—9. (in Russian)
8. Kulichenko T.V. Treatment and vaccine prevention of rotaviral infection in children. *Pediatricheskaya farmakologiya*. 2007; 4(1): 42—7. (in Russian)
9. Tatochenko V.K., Ozeretskiy N.A., Fedorov A.M., eds. *Immunization-2011 [Immunoprofilaktika-2011]*. 3-rd ed. Moscow: IPK «Kontent-press»; 2011. (in Russian)
10. Angel J., Franco M.A., Greenberg H.B. Rotavirus immune responses and correlates of protection. *Curr. Opin. Virol.* 2012; 2(4): 419—25.
11. Soares-Weiser K., Maclehoze H., Bergman H., Ben-Aharon I., Nagpal S., Goldberg E. et al. Vaccines for preventing rotavirus diarrhoea: vaccines in use. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2012; (2): CD008521.

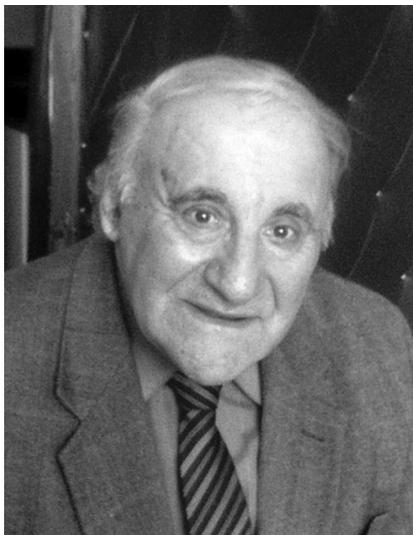
12. Grading of scientific evidence — Tables 1—4: Does RV1 and RV5 induce protection against rotavirus morbidity and mortality in young children both in low and high mortality settings? Available at: [http://www.who.int/immunization/position\\_papers/rotavirus\\_grad\\_rv1\\_rv5\\_protection.pdf](http://www.who.int/immunization/position_papers/rotavirus_grad_rv1_rv5_protection.pdf)
13. Giaquinto C., Dominiak-Felden G., Van Damme P., Myint T.T., Maldonado Y.A., Spoulou V. et al. Summary of effectiveness and impact of rotavirus vaccination with the oral pentavalent rotavirus vaccine: a systematic review of the experience in industrialized countries. *Hum. Vaccin.* 2011; 7(7): 734—48.
14. Rotavirus Gastroenteritis. *Anti-epidemic Measures. Manual for Doctors [Rotavirusnyy gastroenterit. Protivoepidemicheskie meropriyatiya. Posobie dlya vrachej]*. Nizhny Novgorod; 1999. (in Russian)
15. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage. *Nature.* 1970; 227(5259): 680—5.
16. Almeida J.D., Hall T., Banatvala J.E., Totterdell B.M., Chrystie I.L. The effect of trypsin on the growth of rotavirus. *J. Gen. Virol.* 1978; 40(1): 213—8.
17. Graham D.Y., Estes M.K. Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: biologic mechanism. *Virology.* 1980; 101(2): 432—9.
18. Ramia S., Sattar S.A. Proteolytic enzymes and rotavirus SA-11 plaque formation. *Can. J. Comp. Med.* 1980; 44(2): 232—6.
19. Estes M.K., Morris A.P. A viral enterotoxin: a new mechanism of virus induced pathogenesis. In: Paul P.S., Francis D.H. *Mechanisms in the Pathogenesis of Enteric Diseases*. New York: Kluwer Academic Plenum Publishers; 1999.
20. Zhang M., Zeng C.Q., Morris A.P., Estes M.K. A functional NSP4 enterotoxin peptide secreted from rotavirus-infected cells. *J. Virol.* 2000; 74(24): 11663—70.
21. Pérez J.F., Chemello M.E., Liprandi F., Ruiz M.C., Michelangeli F. Oncosis in MA104 cells is induced by rotavirus infection through an increase in intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration. *Virology.* 1998; 252(1): 17—27.
22. Tian P., Estes M.K., Hu Y., Ball J.M., Zeng C.Q., Schilling W.P. The rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 mobilizes Ca<sup>2+</sup> from the endoplasmic reticulum. *J. Virol.* 1995; 69(9): 5763—72.
23. Morris A.P., Scott J.K., Ball J.M., Zeng C.Q., O'Neal W.K., Estes M.K. NSP4 elicits age-dependent diarrhea and Ca<sup>2+</sup>-mediated I(-) influx into intestinal crypts of CF mice. *Am. J. Physiol.* 1999; 277(Pt. 1): G431—44.

Поступила 18.11.16

Принята в печать 13.12.16

## ЮБИЛЕИ

### ГЕОРГИЙ АРТЕМЬЕВИЧ ГАЛЕГОВ (к 85-летию со дня рождения)



29 декабря 2016 г. исполнилось 85 лет вирусологу и биохимику, одному из ведущих отечественных специалистов в области химиотерапии вирусных инфекций, доктору биологических наук (1971), профессору (1976), лауреату Премии Совета Министров СССР (1985), лауреату Государственной премии Российской Федерации (2000) Г.А. Галегову.

Г.А. Галегов в 1956 г. окончил лечебный факультет I Московского медицинского института им. И.М. Сеченова. В студенческие годы работал на кафедре биохимии под руководством С.Р. Мордашева, С.С. Дебова и Т.Т. Березова (позже академики АМН). В 1956—1959 гг. — старший лаборант, в 1959—1963 гг. — младший научный сотрудник Института биологической и медицинской химии АМН. С 1963 г. работает в Институте вирусологии им. Д.И. Ивановского АМН: старшим научным сотруд-

ником (1963—1966), с 1966 г. по настоящее время руководителем лаборатории химиотерапии вирусных инфекций, с 1990 г. руководителем отдела общей вирусологии, затем одновременно являясь профессором кафедры вирусологии факультета последипломного образования ММА.

Под руководством и при непосредственном участии Г.А. Галегова выполнены исследования, посвященные направленному ингибированию репродукции вирусов на основе модифицированных нуклеозидов и нуклеотидов, доказана высокая противовирусная активность комбинаций химиопрепаратов с различным механизмом действия против вируса гриппа (производные адамантана, интерферон и модифицированные нуклеозиды). Г.А. Галегов принимал активное участие в разработке средств лекарственной терапии ВИЧ-инфекции на основе ингибиторов обратной транскриптазы ВИЧ-1, он один из авторов препарата никавир — фосфазид (1986—2001), широко используемого для лечения пациентов с ВИЧ в нашей стране. Им детально изучена противовирусная активность новых производных нетропсина, подавляющего лекарственно-устойчивые к базовым препаратам вирусы герпеса человека (2002—2006). Г.А. Галегов — председатель проблемной комиссии по химиотерапии вирусных инфекций Научного совета по вирусологии при Президиуме РАМН, член редколлегий отечественных и зарубежного журналов. Высокая научная компетентность, основательность, организованность, профессиональная честность, принципы работы, отношение к делу и возникающим проблемам вызывают глубокое уважение его коллег.

Г.А. Галегов — автор и соавтор 46 патентов, в том числе зарегистрированных за рубежом. Награжден орденом Трудового Красного Знамени и медалями.

*Коллеги и члены редколлегии журнала «Вопросы вирусологии» поздравляют Г.А. Галегова с юбилеем и желают ему здоровья и новых творческих успехов.*

**ИГОРЬ ФЕЛИКСОВИЧ БАРИНСКИЙ (к 80-летию со дня рождения)**

Коллектив редколлегии журнала «Вопросы вирусологии» сердечно поздравляет члена редколлегии журнала, доктора медицинских наук, профессора, Заслуженного деятеля науки Российской Федерации Игоря Феликсовича Баринского со знаменательной датой — 80-летием со дня рождения!

И.Ф. Баринский прошел славный путь от аспиранта до руководителя лаборатории. В круг научных интересов профессора И.Ф. Баринского входит целый ряд наиболее актуальных проблем вирусологии: арбовирусы, вирусные гепатиты, герпесвирусные инфекции, разработка и создание профилактических и терапевтических вакцин при вирусных инфекциях. Лаборатория сравнительной вирусологии, возглавляемая И.Ф. Баринским, является одной из старейших лабораторий ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, которая в течение многих лет была центром ВОЗ по изучению герпесвирусных инфекций, а в настоящее время является Российским центром по герпесу. И.Ф. Баринским опубликовано 9 монографий и более 500 научных работ в ведущих

научных изданиях. За вклад в научные разработки по профилактике и лечению герпесвирусных инфекций И.Ф. Баринский отмечен премией Совета Министров СССР, имеет почетное звание Заслуженного деятеля науки, неоднократные благодарности.

Большое внимание И.Ф. Баринский уделяет подготовке научных кадров — под его руководством защищены 12 докторских и 32 кандидатские диссертации. Ученики И.Ф. Баринского занимают руководящие должности в различных учреждениях России и стран СНГ.

Мы знаем И.Ф. Баринского не только как известного ученого, руководителя, но и как внимательного, отзывчивого человека, прекрасного семьянина, чей супружеский стаж составляет 50 лет!

*Дорогой Игорь Феликсович, поздравляем Вас с юбилейным Днем рождения и надеемся на дальнейшую плодотворную работу! Желаем Вам жизненного оптимизма, крепкого здоровья, благополучия, счастья и дальнейших успехов в научной деятельности на благо Отчественного Здравоохранения!*