

**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:** 129515,  
Москва, ул. 1-я Останкинская, д. 26  
Зав. редакцией *Т.М. Курушина*  
Тел.: +7-495-150-07-47 доб. 402  
E-mail: vopr.virusol@idm.msk.ru  
[www.medlit.ru](http://www.medlit.ru)

**ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ**

Тел. +7-495-150-07-47  
E-mail: 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 *Л. В. Кузнецова*  
Верстка *Е. М. Архипова*

Сдано в набор 20.07.2017.  
Подписано в печать 18.08.2017.  
Формат 60 × 88½.  
Печать офсетная.  
Печ. л. 6,00.  
Усл. печ. л. 5,88.  
Уч.-изд. л. 6,36.  
Заказ 782.

Отпечатано в типографии ООО  
«Подольская Периодика»,  
142110, г. Подольск, ул. Кирова, 15  
ISSN 0507-4088. *Вопр. вирусологии.* 2017.  
Т. 62. № 5. 193-240

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

Свидетельство о регистрации № 1170  
от 11 декабря 1990 г.



**МОСКВА  
«ИЗДАТЕЛЬСТВО  
"МЕДИЦИНА"»**

# ВОПРОСЫ ВИРУСОЛОГИИ

**ДВУХМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ**

Основан в 1956 г.

**5**

**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:

Альховский С.В. (д.б.н.)  
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.; член-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., член-корр. РАН; Москва, Россия)

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

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

**Шестопалов 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., член-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 (Russian Journal)

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

**Volume 62 • 5 • 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:*

**Al'khovskiy S.V.** – Doctor of Biological Sciences; **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)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**Hoenen T.** – PhD (Hamilton, USA)

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

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

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

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

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

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

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

**Oxford J.** – DSc (London, UK)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**Webby R.** – PhD (Memphis, USA)

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

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



Izdatel'stvo Meditsina

## СОДЕРЖАНИЕ

### ОБЗОРЫ

- Снегирева И.И., Дармоштукова М.А., Затолочина К.Э., Казakov А.С., Аляутдин Р.Н.* Взаимозаменяемость препаратов вирусных вакцин для иммунизации населения. . . . . 197
- Глотова Т.И., Никонова А.А., Глотов А.Г.* Противовирусные соединения и препараты, эффективные в отношении вируса вирусной диареи крупного рогатого скота . . . . . 204

### ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Мальдов Д.Г., Андропова В.Л., Калнина Л.Б., Ильичёв А.В., Носик Д.Н., Галегов Г.А.* Действие препарата Стимфорте на экспериментальную герпесвирусную инфекцию совместно с ацикловиром и ВИЧ-инфекцию совместно с ретровирусом . . . . . 211
- Казорина Е.В., Красовская Т.Ю., Казанцев А.В., Найденова Е.В., Шарова И.Н., Захаров К.С., Поршаков А.М., Чекашов В.Н., Матросов А.Н., Шилов М.М., Яковлев С.А., Князева Т.В., Толоконникова С.И., Миронова Н.И., Частов А.А., Казакова Л.В., Кириллова Л.П., Красильникова Н.Н., Кожанова О.И., Щербакoва С.А., Кутырев В.В.* Лихорадка Западного Нила на территории Саратовской области в 2013—2015 гг. . . . . 219
- Генералов С.В., Ерохин П.С., Красовская Т.Ю., Осина Н.А., Абрамова Е.Г., Никифоров А.К., Щербакoва С.А.* Изучение ультраструктуры поверхности клеток линии Vero, инфицированных вирусом бешенства (RABV, *Lissavirus, Rhabdoviridae*) . . . . . 227

### В ПОМОЩЬ ВИРУСОЛОГУ

- Постнова Е.Л., Шалунова Н.В., Саркисян К.А., Мовсесянц А.А.* Методы оценки специфической активности препаратов для профилактики гепатита В. . . . . 233

## CONTENTS

### REVIEWS

- Snegireva I.I., Darmostukova M.A., Zatolochina K.E., Kazakov A.S., Alyautdin R.N.* Interchangeability of viral vaccines for immunization . . . . . 197
- Glotova T.I., Nikonova A.A., Glotov A.G.* Antiviral compounds and preparations effective against bovine viral diarrhea . . . . . 204

### ORIGINAL RESEARCH

- Maldov D.G., Andronova V.L., Kalnina L.B., Ilyichev A.V., Nosik D.N., Galegov G.A.* Influence of immunomodulatory drug Stimforte on the experimental herpes virus infection in combination with acyclovir and on HIV-infection in combination with retrovir . . . . . 211
- Kazorina E.V., Krasovskaya T.Yu., Kazantsev A.V., Naydenova E.V., Sharova I.N., Zakharov K.S., Porshakov A.M., Chekashov V.N., Matrosov A.N., Shilov M.M., Yakovlev S.A., Knyazeva T.V., Tolokonnikova S.I., Mironova N.I., Chastov A.A., Kazakova L.V., Kirillova L.P., Krasilnikova N.N., Kozhanova O.I., Shcherbakova S.A., Kutyrev V.V.* West Nile fever in the Saratov region in 2013-2015 . . . . . 219
- Generalov S.V., Erokhin P.S., Krasovskaya T.Yu., Osina N.A., Abramova E.G., Nikiforov A.K., Shcherbakova S.A.* A study of the ultrastructure of the surface of the transplantable line Vero cells infected with the rabies virus (RABV, *Lissavirus, Rhabdoviridae*) . . . . . 227

### TO VIROLOGIST'S AID

- Postnova E.L., Shalunova N.V., Sarkisyan K.A., Movsesyants A.A.* Methods for assessment of the specific activity of drugs for prevention of hepatitis B . . . . . 233

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

---

## ОБЗОРЫ

---

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017  
УДК 615.371.015

*Снегирева И.И., Дармостукова М.А., Затолочина К.Э., Казаков А.С., Аляутдин Р.Н.*

### ВЗАИМОЗАМЕНЯЕМОСТЬ ПРЕПАРАТОВ ВИРУСНЫХ ВАКЦИН ДЛЯ ИММУНИЗАЦИИ НАСЕЛЕНИЯ

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, 127051, г. Москва

---

В обзоре представлены результаты анализа отечественной и зарубежной научной литературы по вопросам взаимозаменяемости вакцин против вирусного гепатита В, А, вакцин для профилактики гриппа. Обобщены материалы ВОЗ, положения нормативных документов, данные научной литературы ряда зарубежных стран и России относительно взаимозаменяемости вакцин. Проблема объективной оценки взаимозаменяемости лекарственных препаратов является актуальной во всем мире. В определении взаимозаменяемого лекарственного препарата не проводится четкой грани между критериями взаимозаменяемости для химических и иммунобиологических препаратов. Контрольно-регуляторные органы многих стран издаю рекомендации о том, как следует поступать в случае необходимости замены вакцины. В официальных руководящих документах по иммунопрофилактике некоторых зарубежных стран термином «взаимозаменяемость» (interchangeability) обозначают практику перехода от вакцины одного производителя к препарату аналогичного назначения другого производителя. Однако в России отсутствуют какие-либо специальные нормативные положения, касающиеся взаимозаменяемости вакцин. Использование термина «взаимозаменяемость» для иммунобиологических препаратов допустимо в отношении равной возможности применения сравниваемых препаратов и замены одного препарата на другой в течение курса вакцинации. Понятие взаимозаменяемости применимо в отношении вакцин, не различающихся между собой по показателям эффективности (иммунологической, профилактической, эпидемиологической) и безопасности, которые в течение курса иммунизации вводятся несколько раз. Определение взаимозаменяемости важно также для решения вопроса о замене однонаправленных вакцин разных производителей при закупках препаратов, включенных в национальный календарь профилактических прививок и календарь профилактических прививок по эпидемическим показаниям. Результаты научных исследований допускают взаимозаменяемость вакцин при их использовании в соответствии с рекомендуемым графиком введения и дозировкой, указанной производителем. Необходимо понятие «взаимозаменяемость» для вакцин распространить на продолжение курса прививок у конкретного лица препаратом другого производителя и возможность применения вакцин аналогичного назначения, выпускаемых разными производителями.

Ключевые слова: обзор; взаимозаменяемость; вакцина; иммунобиологический препарат; вакцинация.

*Для цитирования:* Снегирева И.И., Дармостукова М.А., Затолочина К.Э., Казаков А.С., Аляутдин Р.Н. Взаимозаменяемость препаратов вирусных вакцин для иммунизации населения. *Вопросы вирусологии.* 2017; 62(5): 197-203.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-5-197-203>

*Snegireva I.I., Darmostukova M.A., Zatolochina K.E., Kazakov A.S., Alyautdin R.N.*

#### INTERCHANGEABILITY OF VIRAL VACCINES FOR IMMUNIZATION

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, 127051, Russian Federation

The review presents the results of the analysis of domestic and foreign scientific literature on the interchangeability of hepatitis A, B and influenza vaccines. The WHO materials, regulatory documents, data from scientific literature of foreign countries and Russia about the vaccine interchangeability are summarized. The problem of objective assessment of interchangeability of drugs is relevant worldwide. The definition of an "interchangeable drug" does not draw a clear line between the interoperability criteria for chemical and immunobiological drugs. The official guidance documents on immunization adopted in several countries define "interchangeability" as the practice of transition from a vaccine available from a certain manufacturer to a similar vaccine available from another manufacturer. The term "interchangeable" can be applied to immunobiological drugs if one of the drugs can be replaced with the other in the course of vaccination. The concept of interchangeability applies to vaccines that do not differ in efficacy (immunological, preventive, epidemiological) and safety and are used in an immunization course involving multiple administration of these vaccines. The definition of interchangeability is important in order to address the problem of replacing unidirectional vaccines available from different manufacturers when purchasing vaccines included in the national schedule of preventive vaccinations and in the schedule of preventive vaccination on epidemic indications. One of the most important conditions for "interchangeability" of vaccines is their application in accordance with the recommended schedule of administration and the dosage indicated by the manufacturer. Research data show that vaccines can be interchangeable if used in accordance with the recommended schedule of administration and the dosage specified by the manufacturer. Control agencies of many countries issue recommendations regulating the procedure of vaccine replacement in case

---

*Для корреспонденции:* Снегирева Ирина Илларионовна, канд. мед. наук, начальник отдела экспертизы побочного действия медицинских иммунобиологических препаратов Центра экспертизы безопасности лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, 127051, г. Москва. E-mail: [SnegirevaII@expmed.ru](mailto:SnegirevaII@expmed.ru)

**of necessity. However, there are no special regulations of vaccine interchangeability in Russia. The concept of vaccine “interchangeability” should be extended to the continuation of a course of vaccinations in a particular person with a vaccine of another manufacturer and the possibility of applying similar vaccines available from different manufacturers.**

**Key words:** review; interchangeability; vaccine; immunobiological drug; vaccination.

**For citation:** Snegireva I.I., Darmostukova M.A., Zatulochina K.E., Kazakov A.S., Alyautdin R.N. Interchangeability of viral vaccines for immunization. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2017; 62(5):197-203. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-5-197-203>

**For correspondence:** Irina I. Snegireva, PhD, Head of the Department of Safety of Biological Medicinal Products, Centre of Expertise of Drugs Safety, Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products», Moscow, 127051, Russian Federation. E-mail: [SnegirevaII@expmed.ru](mailto:SnegirevaII@expmed.ru)

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

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

Received 15 March 2017

Accepted 25 April 2017

Проблема объективной оценки взаимозаменяемости лекарственных препаратов (ЛП) актуальна во всем мире, так как способствует развитию конкурентной среды на фармацевтическом рынке, позволяет снизить затраты при закупке лекарственных средств, регулировать цены на лекарственное обеспечение и создает возможность замены одного препарата на другой у пациента при сохранении эффективности, безопасности и качества. Согласно ФЗ № 429 от 22.12.14, взаимозаменяемый ЛП — это ЛП с доказанной терапевтической эквивалентностью или биоэквивалентностью в отношении референсного ЛП, имеющий эквивалентные ему качественный и количественный состав действующих веществ, состав вспомогательных веществ, лекарственную форму и способ введения [1]. В данном определении не проводится четкой грани между критериями взаимозаменяемости для химических и иммунобиологических препаратов, которые принципиально различаются по происхождению, механизму действия и способности вызывать иммунные реакции. С вышеуказанных позиций определение «взаимозаменяемость» не распространяется на иммунобиологические ЛП (ИЛП), каждый из которых вне зависимости от отсутствия отличий в механизме действия, технологии изготовления производственного штамма, способе введения и других характеристиках от препарата аналогичного назначения, выпускаемого другим производителем, является оригинальным лекарственным ЛП. Использование термина «взаимозаменяемость» для ИЛП возможно в отношении равной возможности применения сравниваемых препаратов и замены одного препарата на другой в течение курса вакцинации. В обоих случаях вопрос должен решаться для конкретных пар (групп) препаратов с учетом возрастных показаний к их применению и медицинских противопоказаний. Выбор препарата при его назначении определяет врач, руководствуясь национальным календарем профилактических прививок, календарем профилактических прививок по эпидемическим показаниям, инструкцией по медицинскому применению препарата [2].

На сегодняшний день на фармацевтическом рынке имеется большое число разных торговых наименований вакцин, предназначенных для профилактики одних и тех же инфекционных болезней. Многократное введение препарата при проведении курса вакцинации в течение длительного времени (1—6 мес и более), а также различные обстоятельства, связанные с отсутствием вакцин конкретного производителя, миграцией вакцинируемого населения, заменой поставщиков препаратов, принятием административных решений об отзыве или

приостановлении использования препаратов, диктуют необходимость решения вопроса о взаимозаменяемости однонаправленных вакцин разных производителей.

В официальных руководящих документах по иммунопрофилактике некоторых зарубежных стран термином «взаимозаменяемость» (interchangeability) обозначают практику перехода от вакцины одного производителя к препарату аналогичного назначения другого производителя. Так, согласно основным принципам взаимозаменяемости вакцин в Канаде (директива Health Canada), взаимозаменяемые вакцины должны иметь одинаковые показания к применению с учетом возрастных ограничений, перечень медицинских противопоказаний, схемы применения, состав антигенов, показатели безопасности, реактогенности, иммуногенности и эффективности [3].

В настоящее время в России отсутствуют какие-либо нормативные положения относительно взаимозаменяемости вакцин. Несмотря на то что вакцины разных производителей могут иметь одинаковое назначение, при их производстве применяются различные технологии. Кроме того, препараты могут различаться по составу антигенов или их количественному содержанию, а в качестве вспомогательных веществ используются разные адьюванты, конъюгирующие белки, стабилизаторы и консерванты. Все эти факторы влияют на взаимозаменяемость вакцин. Понятие взаимозаменяемости применимо в отношении вакцин, не различающихся между собой по показателям эффективности (иммунологической, профилактической, эпидемиологической) и безопасности, которые в течение курса иммунизации вводятся несколько раз. Определение взаимозаменяемости также важно для решения вопроса о замене однонаправленных вакцин разных производителей при закупках препаратов, включенных в национальный календарь профилактических прививок и календарь профилактических прививок по эпидемическим показаниям.

В доступных источниках можно найти сравнительно большое количество публикаций, касающихся результатов исследований применения однонаправленных вакцин разных производителей.

Вакцинация против гриппа в нашей стране является общепринятой мерой профилактики. Иммунизация гриппозной вакциной повышает неспецифическую резистентность человека к гриппу и другим респираторным инфекциям. Иммунитет кратковременный, поэтому требуется ежегодная вакцинация. Мониторинг циркуляции вирусов и рассылка штаммов по странам, производимым гриппозные вакцины, осуществляются под эги-

дой ВОЗ [4]. В настоящее время существует несколько видов вакцин против гриппа, каждый из которых имеет свои преимущества и недостатки. Это живые и инактивированные вакцины, содержащие убитый вирус или его фрагменты. Более распространены инактивированные гриппозные вакцины, которые подразделяются на цельновирионные, расщепленные (сплит-вакцины) и субъединичные вакцины [5].

В России спектр используемых для специфической профилактики гриппа медицинских иммунобиологических препаратов достаточно широк и включает как инактивированные, так и живые вакцины, всего зарегистрировано 13 гриппозных вакцин 4 отечественных и 7 зарубежных производителей [4].

Позиция ВОЗ по выбору препарата для проведения кампании иммунизации населения сводится к тому, что индивидуальные национальные решения относительно применения гриппозных вакцин должны приниматься с учетом национальных возможностей и ресурсов [6]. Иммунопрофилактика в России является частью государственной политики [7], и с учетом особенностей организации закупок иммунобиологических препаратов за счет средств государственного бюджета особую важность приобретает возможность замены вакцины для профилактики гриппа одного производителя на препарат другого производителя.

Классическая схема иммунизации против гриппа, рекомендованная национальным календарем профилактических прививок, — однократное введение вакцины ежегодно. В связи с этим вопрос взаимозаменяемости вакцин может быть освещен только как возможность применения сравниваемых препаратов для конкретной программы вакцинации, а не у одного конкретного вакцинируемого.

В Российской Федерации проведены исследования по изучению эффективности и переносимости гриппозных вакцин разных производителей [8—14]. В исследовании, которое выполнялось на базе двух отделений ФГБУ «Научный центр здоровья детей» Минздрава России, приняли участие 160 детей в возрасте от 3 до 17 лет. Исследование охватило три эпидемических сезона: 2011—2012, 2012—2013 и 2013—2014 гг. Все дети были рандомизированы на 2 группы: дети 1-й группы были вакцинированы полимер-субъединичной вакциной отечественного производства, в состав которой входит иммуномодулятор, дети 2-й группы — полимер-субъединичной вакциной зарубежного производства, не имеющей в своем составе иммуномодулятора. Антигенный состав обеих вакцин идентичен. Во всех экспериментальных группах после вакцинации было зарегистрировано статистически достоверное нарастание титров антител. Изучение иммуногенных свойств противогриппозных вакцин показало, что 4-кратный прирост титров антител в группе привитых отечественной вакциной ко всем трем серотипам находился в диапазоне 77—90%, в группе привитых зарубежной вакциной сероконверсия отмечена у 73—93%. Доля лиц с защитным уровнем титров антител во всех группах была высокой и составляла 77—90% в группе А, 74—93% в группе В. Кратность прироста титров антител после вакцинации по сравнению с исходным уровнем во всех группах превышала 2,5. Таким образом, иммуногенность всех препаратов (и отечественного, и зарубежного производства) не имеет достоверных различий [8].

Другое исследование позволило определить проти-

возбудительскую эффективность вакцины Гриппол® плюс. Исследование проводили в 2008—2009 гг. с ноября по апрель, т. е. в период предсезонного и сезонного подъема заболеваемости гриппом и острыми респираторными заболеваниями, в 5 школах Санкт-Петербурга. Всего в исследовании приняли участие 2768 здоровых детей в возрасте 7—17 лет. В основную группу (привитые) вошли 1002 ребенка, которые были иммунизированы вакциной Гриппол® плюс, контрольную группу (непривитые) составили 1766 детей. Противоэпидемическую эффективность вакцинации оценивали путем сравнения заболеваемости ОРЗ и гриппом среди привитых и непривитых, также учитывали тяжесть и длительность зарегистрированного заболевания, наличие осложнений. Показано, что вакцинация препаратом Гриппол® плюс приводила к снижению заболеваемости гриппом и ОРЗ, способствовала уменьшению количества осложнений. Было отмечено, что в группе непривитых грипп и ОРЗ протекали с осложнениями в 2,5 раза чаще, чем среди привитых [9]. Изучение противоэпидемической эффективности данной вакцины при вакцинации учащихся школ другого региона (Подольского района Московской области) показало, что гриппозная вакцина обладает высокой противоэпидемической эффективностью, снижает заболеваемость гриппом привитых в 4,7 раза по сравнению с непривитыми, другими ОРВИ — в 1,4 раза. Общее количество участников исследования составило 3203 человека (1950 привитых и 1253 непривитых) [10].

В следующем исследовании проведена сравнительная оценка клинической безопасности и иммунологической эффективности отечественной инактивированной цельновирионной вакцины Грипповак® и импортной сплит-вакцины Ваксигрипп® (Франция). Обе вакцины содержали штаммы вируса гриппа, актуальные для сезона 2012—2013 гг. и не содержали адьюванта. В результате анализа полученных данных установлено, что при рутинной практике применения вакцин Грипповак и Ваксигрипп для профилактики гриппа у взрослых не выявлено статистически достоверных различий в частоте развития нормальных местных и общих реакций. Обе вакцины хорошо переносятся и имеют высокий профиль безопасности. И отечественная, и импортная вакцины эффективны в формировании специфического иммунного ответа в отношении вирусов гриппа А и В [12].

В Витебском государственном медицинском университете изучена реактогенная и иммуногенная активность инактивированной гриппозной сплит-вакцины Флюарикс и гриппозной полимер-субъединичной вакцины Гриппол у 166 пациентов с различными клиническими формами туберкулеза органов дыхания. Установлена низкая реактогенность гриппозных вакцин у больных туберкулезом органов дыхания, о чем свидетельствует отсутствие у большинства вакцинированных больных общих и местных реакций, поствакцинальных осложнений. Специфический протективный иммунитет к вирусу гриппа после вакцинации к серотипу H1N1 вируса гриппа А вырабатывается у  $95,14 \pm 1,80\%$  пациентов, к серотипу H3N2 вируса гриппа А — у  $81,94 \pm 3,22\%$  пациентов, к вирусу гриппа В — у  $94,44 \pm 1,92\%$  пациентов. После вакцинации в сыворотках крови привитых к серотипам вируса гриппа А и гриппа В наблюдается статистически достоверное нарастание титров антител, при этом наиболее выраженное у лиц с низким исходным уровнем антител. Высокая иммуногенная актив-

ность инактивированных гриппозных вакцин Флюарикс и Гриппол у больных туберкулезом легких подтверждается высоким процентом 4-кратной сероконверсии после вакцинации [11].

Иная ситуация наблюдается относительно взаимозаменяемости живых и инактивированных вакцин. Группа исследователей во главе с R. Belshe и K. Edwards [13] в ходе двойного слепого исследования оценивала эффективность и безопасность применения живой аттенуированной вакцины в сравнении с инактивированной вакциной у детей в возрасте от 6 мес до 6 лет. Всего в исследовании приняли участие 8352 ребенка, которые были поровну распределены по двум группам. В 1-й группе детям вводили трехвалентную живую аттенуированную вакцину, а дети из 2-й группы получили трехвалентную инактивированную вакцину. В группе детей, получивших живую вакцину, было зарегистрировано 153 случая заболевания гриппом, которые были лабораторно подтверждены. Во 2-й группе были лабораторно подтверждены 338 случаев заболевания гриппом, что составило более 54,9% ( $p < 0,001$ ). В результате исследователи пришли к выводу, что живая аттенуированная вакцина более эффективна против гриппа у детей в возрасте до 6 лет. Оценка соотношения польза/риск показала, что вакцинация живой вакциной высокоэффективна и безопасна у детей от 1 года до 6 лет, не имеющих в анамнезе бронхиальной астмы.

В другом исследовании серологические показатели иммунного ответа и частота развития нежелательных реакций статистически не различались при применении живых вакцин для профилактики гриппа. Группа ученых из США в 2012 г. исследовала иммуногенность и безопасность четырехвалентной живой аттенуированной вакцины (Q/LAIV) по сравнению с двумя трехвалентными живыми вакцинами (T/LAIV), содержащими разные штаммы вирусов гриппа, у детей от 2 до 17 лет. Все участники исследования были распределены на 3 группы в соотношении 3(Q/LAIV): 1(T/LAIV): 1(2T/LAIV). Субъекты исследования в возрасте от 9 до 17 лет получили 1 дозу вакцины, а детей от 2 до 8 лет (ранее не были вакцинированы против гриппа) вакцинировали дважды с промежутком в 1 мес [14].

Таким образом, для организации массовой иммунизации населения против гриппа могут быть использованы инактивированные и живые вакцины разных производителей при условии их применения в рекомендуемых производителями дозах и в соответствии с утвержденными инструкциями по их применению. Возможность замены живых и инактивированных гриппозных вакцин в рамках одной прививочной кампании требует дальнейшего изучения.

Более чем 30-летний мировой опыт применения рекомбинантных гепатитных В-вакцин показал возможность их взаимозаменяемости (равноценной замены). В соответствии с позицией ВОЗ по данному вопросу все вакцины против вирусного гепатита В (ВГВ), производимые в мире, являются иммунологически сопоставимыми и могут быть взаимозаменяемыми [15]. Того же мнения придерживаются регулирующие органы здравоохранения ряда стран, которые включают информацию о взаимозаменяемости вакцин против ВГВ в руководящие документы и рекомендации по иммунопрофилактике. Так, в соответствии с руководством Центра по контролю и профилактике заболеваний (CDC), а также рекомендациями по иммунизации Консультативного комитета

по проблемам вакцинации (ACIP) все зарегистрированные в США вакцины против ВГВ взаимозаменяемы. Применение вакцин разных производителей в течение одного курса вакцинации не влияет на показатели иммунологической эффективности. Сроки иммунизации не должны быть нарушены, если производитель введенной ранее вакцины неизвестен или препарат определенно-го производителя оказывается недоступным [16—19]. При этом каждая вакцина должна вводиться в строгом соответствии с инструкцией по применению. Согласно указаниям, содержащимся в руководствах по иммунизации в Великобритании (Green Book) и Канаде (Canadian Immunization Guide), для завершения курса иммунизации или ревакцинации против ВГВ могут быть использованы вакцины разных производителей при условии их применения в рекомендуемых производителями дозах и в соответствии с утвержденными схемами введения [3, 19]. Руководством по иммунизации в Австралии (Australian Immunization Handbook) не рекомендовано применение вакцин против ВГВ разных производителей в течение курса иммунизации. В то же время подобная замена допускается в том случае, когда наименование ранее введенной вакцины неизвестно [20].

В нормативных документах по иммунизации в Российской Федерации отсутствуют указания о взаимозаменяемости вакцин против ВГВ. Тем не менее в руководствах и научных публикациях по вакцинопрофилактике инфекционных болезней имеются разделы, посвященные взаимозаменяемости зарегистрированных на территории России вакцин против ВГВ [21—23]. В инструкциях по применению вакцин для профилактики ВГВ Энджерикс® В/Engerix® В и Шанвак-В указано, что эти препараты могут использоваться для завершения курса вакцинации, начатого с применением других вакцин, а также для ревакцинации [24].

Включение информации о взаимозаменяемости вакцин в руководящие документы по иммунизации стало возможным благодаря исследованиям в этой области. В зарубежной и отечественной научной литературе можно найти данные в подтверждение взаимозаменяемости моновалентных вакцин для профилактики ВГВ у взрослого населения, полученные при изучении иммунологической, профилактической и эпидемиологической эффективности.

Исследования иммунологической эффективности вакцинации против ВГВ, проводимой с использованием препаратов разных производителей, основаны на сравнительной оценке уровней антител к поверхностному антигену ВГВ (анти-НВsAg) после законченного курса иммунизации. При гепатите В протективным считается уровень антител в сыворотке крови 10 МЕ/л и более, который должен определяться не менее чем у 90% иммунизированных по классической схеме 0—1—6 мес [24].

Так, в проведенном в Италии исследовании оценивали иммунологическую эффективность вакцинации в группах добровольцев. Одна группа ( $n = 480$ ) получила полный курс вакцинации против ВГВ с использованием рекомбинантных вакцин разных производителей — Recombivax HB и Engerix B, а другая ( $n = 160$ ) была привита только одним видом вакцины. Результаты исследования показали отсутствие различий в напряженности иммунитета к ВГВ между сравниваемыми группами [25]. Взаимозаменяемость двух вышеуказанных вакцин подтверждена результатами другого исследования, в которое были включены 48 взрослых здоровых добро-

вольцев, иммунизированных против ВГВ трехкратно, при этом в первых двух вакцинациях использовали препарат Recombivax HB. Перед третьей прививкой вакцинируемые были рандомизированы и завершали курс препаратом Recombivax HB или Engerix B. После законченной иммунизации в обеих группах защитный титр анти-HBsAg определялся более чем у 90% привитых. Это позволило сделать заключение, что схемы иммунизации с использованием вакцин одного или разных производителей обеспечивают равноценную защиту против ВГВ [25]. В Австралии с целью оценки иммунологической эффективности двух рекомбинантных вакцин против гепатита В (Engerix B и Recombivax HB/HB-Vax II) были проанализированы результаты 181 клинического исследования, включающие данные о 32 904 вакцинированных, из которых 24 277 были привиты Engerix B и 8627 — Recombivax/HB-Vax II. Результаты анализа дали основание утверждать, что для программ массовой иммунизации населения против ВГВ может одинаково эффективно использоваться как вакцина Engerix B, так и вакцина Recombivax HB/HB-Vax II [26].

В Российской Федерации также проводились исследования по изучению иммунологической эффективности моновалентных вакцин для профилактики ВГВ разных производителей, результаты этих исследований отражены в научных публикациях [27—29].

В исследовании, проведенном среди медицинского персонала Санкт-Петербурга, использовали вакцину Эувакс В и вакцину против гепатита В рекомбинантную дрожжевую (ЗАО НПК «Комбиотех»), которые вводили по разным схемам: 0—1—6; 0—1—2; 0—1—3 и 0—1—18—22 мес. При иммунизации по схеме 0—1—18—22 мес применяли комбинацию препаратов: для первых двух доз использовали вакцину против гепатита В рекомбинантную дрожжевую, для последующих — Эувакс В. В результате исследования отмечена высокая антигенная активность как в случае применения вакцины одного производителя, так и при комбинации двух вакцин разных производителей. Данное исследование позволило предположить возможность взаимозаменяемости вакцин против ВГВ [28].

В ходе контролируемых полевых клинических испытаний, выполненных в Смоленской области в период с 1991 по 1996 г., оценивали эффективность, реактогенность и безопасность 4 рекомбинантных вакцин против ВГВ: вакцины против гепатита В рекомбинантной дрожжевой, ЗАО НПК «Комбиотех» (Россия), Rec-HBsAg (Куба), Энджерикс® В/Engerix® В (Бельгия), HB-Vax II (США). Результаты показали высокую иммунологическую эффективность всех четырех вакцин разных производителей: защитные титры антител после законченного курса иммунизации выявлялись более чем у 95% привитых [29].

В Санкт-Петербурге был проведен ретроспективный эпидемиологический анализ данных обследования 214 медицинских работников, трехкратно вакцинированных против ВГВ. Защитные титры антител к поверхностному антигену ВГВ обнаружены у 79,43% сотрудников медицинских организаций, привитых вакцинами Энджерикс® В/Engerix® В, вакциной против гепатита В рекомбинантной (рДНК), Эувакс В, Регевак® В, Шанвак-В. В исследовании не выявило достоверных различий в напряженности иммунитета у медработников, привитых вакцинами разных производителей [28].

Проведенные исследования продемонстрировали от-

сутствие статистической разницы в концентрации анти-HBsAg в схемах иммунизации, включающих препараты одного или разных наименований, и позволили сделать вывод о том, что моновалентные вакцины для профилактики ВГВ различных производителей взаимозаменяемы и любая из них может быть использована для завершения курса вакцинации независимо от того, каким препаратом была начата иммунизация, а также для полного курса иммунизации.

Все моновалентные вакцины для профилактики вирусного гепатита А взаимозаменяемы.

В России были проведены исследования взаимозаменяемости различных вакцин против гепатита А. Согласно условиям исследования, вакцину Аваксим использовали в качестве бустера после первичной вакцинации вакциной Хаврикс. Авторы делают заключение, что обе вакцины можно применять в качестве бустера при иммунизации против гепатита А при использовании вакцины Хаврикс для первичной вакцинации [30].

В странах Евросоюза выполнены исследования, показавшие, что вакцины против вирусного гепатита А, адсорбированные на алюминии в качестве адьюванта, могут быть взаимозаменяемыми [31—36]. В 2004 г. проводилось открытое несравнительное мультицентровое исследование, в котором было установлено, что живая вакцина может быть использована в качестве средства бустер-вакцинации тогда, когда в качестве первой дозы применяли алюминий-адсорбированную вакцину [37].

В Швейцарии в ходе рандомизированного простого слепого перекрестного клинического исследования изучали взаимозаменяемость вирусомальной (Ерахал) и алюминий-адсорбированной (Наврикс 1440) вакцин против вирусного гепатита А с целью установить, существуют ли значимые различия в иммуногенности, уровне сероконверсии и реактогенности после введения этих вакцин. Обе вакцины производятся из ВГА, полученных из зараженной культуры диплоидных клеток человека и инактивированных формалином. Вакцина под торговой маркой Наврикс 1440 адсорбируется на гидроокиси алюминия в качестве адьюванта. Для вакцины Ерахал используется вирусомный адьювант из синтетических липидов и белков гриппа. Схемы иммунизации обеими вакцинами сходны (согласно указаниям производителя): ревакцинация проводится через 6—18 мес после введения первой дозы. В исследовании приняли участие 111 здоровых взрослых, у которых измеряли уровень антител к вирусному гепатиту А (anti-HAV) в 0-й (день введения первой дозы), 14 и 28-й день, на 3, 6, 12-й (введение второй дозы), 13, 24, 36, 48, 60 и 72-й месяц. На 14-й день после введения первой дозы сероконверсия наблюдалась у 96% лиц, получивших вирусомальную вакцину, и у 100% получивших алюминий-адсорбированную вакцину. Перед введением второй дозы на 12-й месяц сероконверсия достигла 98 и 100% соответственно. Разница в уровне сероконверсии между этими двумя группами статистически незначима. Большинство побочных реакций было незначительно, и их количество не различалось между группами. Введение второй дозы показало, что любая из двух исследуемых вакцин вызывает адекватный иммунный ответ независимо от того, какая вакцина использовалась для первичной вакцинации. Таким образом, обе вакцины обладают высокой иммуногенностью, хорошо переносятся и взаимозаменяемы при проведении иммунизации против вирусного гепатита А [38].

### Заключение

Для организации массовой иммунизации населения против гриппа могут быть использованы инактивированные и живые вакцины разных производителей. Возможность замены живых и инактивированных гриппозных вакцин в рамках одной прививочной кампании требует дальнейшего изучения. По результатам исследований отечественные и зарубежные авторы допускают взаимозаменяемость вакцин для профилактики вирусного гепатита А, В. Одно из важнейших условий взаимозаменяемости вакцин — это их применение в соответствии с рекомендуемым графиком введения и дозировкой, указанной производителем.

На основании проведенного анализа нормативно-правовой базы РФ можно сделать вывод, что в отношении возможной замены препарата, выпускаемого одним производителем, на препарат того же назначения, выпускаемый другим производителем, в России отсутствуют какие-либо специальные нормативные положения, касающиеся взаимозаменяемости вакцин, следовательно, понятие «взаимозаменяемость» для вакцин необходимо расценивать как:

— возможность продолжения курса прививок у конкретного лица препаратом другого производителя;

— возможность применения вакцин аналогичного назначения, выпущенных разными производителями.

Это позволит свести к минимуму ошибки и потенциальные риски для здоровья населения, обусловленные субъективными факторами, приводящими к неправильному пониманию взаимозаменяемости вакцин и их дальнейшему применению.

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

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

### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 3, 13—20, 25, 26, 31—38 см. REFERENCES)

1. Затолочина К.Э., Аляутдин Р.Н., Журавлева Е.О., Пастернак Е.Ю., Дармостукова М.А., Колесникова Е.Ю. и др. О взаимозаменяемости ингибиторов кальциневрина. *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2016; (2): 5—10.
2. Снегирева И.И., Затолочина К.Э., Дармостукова М.А. Современные подходы к взаимозаменяемости вакцин. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2016; (4): 3—8.
3. Медуницын Н.В., Миронов А.Н., Мовсесянц А.А. *Теория и практика вакцинологии*. М.: Ремедиум; 2015.
4. Лонская Н.И., Горбунов М.А., Рукавишников А.В., Шевцов В.А., Миронов А.Н. Основные критерии оценки эффективности гриппозных вакцин. *Биопрепараты*. 2014; (3): 11—8.
5. Гриппозные вакцины: документ по позиции ВОЗ, ноябрь 2012 года. *Еженедельный эпидемиологический бюллетень*. 2012; 87(47): 461—76.
6. Федеральный закон № 157-ФЗ. Об иммунопрофилактике инфекционных болезней. М.; 1998.
7. Бокучава Е.Г., Намазова-Баранова Л.С., Ткаченко Н.Е. Клинико-иммунологическая эффективность иммунопрофилактики гриппа у детей с аллергическими болезнями. *Аллергология и иммунология*. 2016; (1): 118—22.
8. Ерофеева М.К., Никоноров И.Ю., Максакова В.Л., Ельшина Г.А., Горбунов М.А., Крайнова Т.И. и др. Оценка эффективности применения гриппозной вакцины Гриппол® плюс у детей школьного возраста в период эпидемии гриппа 2008—2009 годов инактивированной полимер-субъединичной вакцины при

иммунизации школьников. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2010; 53(4): 80—6.

10. Ильина Т.Н. Оценка эпидемиологической эффективности гриппозной инактивированной полимер-субъединичной вакцины при иммунизации школьников. *Вопросы современной педиатрии*. 2009; 8(5): 47—51.
11. Кучко И.В., Семенов В.М., Будрицкий А.М. Клинико-иммунологическое обоснование вакцинопрофилактики гриппа у больных туберкулезом легких. *Вестник Витебского государственного медицинского университета*. 2010; 9(1): 117—26.
12. Лиознов Д.А. Сравнительная оценка эффективности и безопасности вакцин для профилактики гриппа у взрослых жителей мегаполиса. *Современная поликлиника*. 2016; 1(8): 27—30.
13. Зуева Л.П. *Вакцинопрофилактика в учреждениях здравоохранения*. СПб: Медикус; 2004.
14. Озерцовский Н.А., Шалунова Н.В., Петручук Е.М., Индикова И.Н. Вакцинопрофилактика вирусного гепатита В. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2015; (2): 87—95.
15. Таточенко В.К., Озерцовский Н.А., Федоров А.М. *Иммунопрофилактика: (справочник)*. М.: ПедиатрЪ; 2014.
16. Государственный реестр лекарственных средств. Available at: <http://grls.rosminzdrav.ru/default.aspx>
17. Калинина З.П., Дарьина М.Г., Мовчан К.Н., Мамичева О.Ю., Гагаркина И.Б., Аверина Т.Я. и др. О поствакцинальном иммунитете против вирусного гепатита В у медицинских работников Санкт-Петербурга. *Инфекция и иммунитет*. 2015; 5(1): 89—92.
18. Кузин С.Н. Опыт применения вакцины «Эувакс В» для профилактики гепатита В. *Бюллетень «Вакцинация. Новости вакцинопрофилактики»*. 2001; (3). Available at: <http://medi.ru/doc/15b1504.htm>
19. Титов И.А. *Характеристика вакцин против гепатита «В» и их использование в календаре прививок*: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. М.; 1998.
20. Сабанин Ю.В., Кузин С.Н. Характеристика вакцины «Аваксим» по данным отечественной и зарубежной литературы. *Вакцинация для путешественников*. 2005; (2). Available at: <https://medi.ru/info/11344/>

### REFERENCES

1. Zatolochina K.E., Alyautdin R.N., Zhuravleva E.O., Pasternak E.Yu., Darmostukova M.A., Kolesnikova E.Yu. et al. On the interchangeability of the calcineurine inhibitors. *Bezopasnost' i risk farmakoterapii*. 2016; (2): 5—10. (in Russian)
2. Snegireva I.I., Zatolochina K.E., Darmostukova M.A. Modern approaches to vaccines interchangeability. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya*. 2016; (4): 3—8. (in Russian)
3. Piazza M. Demonstration of the interchangeability of 2 types of recombinant anti-hepatitis-B vaccine. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* 1993; 69(4): 273—80. (in Italian)
4. Medunitsyn N.V., Mironov A.N., Movsesyants A.A. *Theory and Practice of Vaccinology [Teoriya i praktika vaktinologii]*. Moscow: Remedium; 2015. (in Russian)
5. Lonskaya N.I., Gorbunov M.A., Rukavishnikov A.V., Shevtsov V.A., Mironov A.N. Main criteria for influenza vaccines efficacy assessment. *Biopreparaty*. 2014; (3): 11—8. (in Russian)
6. Vaccines against influenza. WHO position paper — November 2012. *Wkly Epidemiol. Rec.* 2012; 87(47): 461—76.
7. Federal law №157-FZ. On preventive infection disease. Moscow; 1998. (in Russian)
8. Bokuchava E.G., Namazova-Baranova L.S., Tkachenko N.E. Clinical and immunological efficacy of influenza vaccination in kids with allergic. *Allergologiya i immunologiya*. 2016; (1): 118—22. (in Russian)
9. Erofeeva M.K., Nikonov I.Yu., Maksakova V.L., El'shina G.A., Gorbunov M.A., Krainova T.I. et al. Evaluating the Effectiveness of Influenza Vaccine Grippol® Plus School-Aged Children During the

- Influenza Epidemic 2008—2009. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika*. 2010; 53(4): 80—6. (in Russian)
10. Il'ina T.N. Evaluation of epidemiologic effectiveness of influenza inactivated polymer-subunit vaccine in schoolchildren. *Voprosy sovremennoy pediatrii*. 2009; 8(5): 47—51. (in Russian)
  11. Kuchko I.V., Semenov V.M., Budritskiy A.M. Clinico-immunological substantiation of influenza vaccination in patients with pulmonary tuberculosis. *Vestnik Vitebskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*. 2010; 9(1): 117—26. (in Russian)
  12. Lioznov D.A. Comparative evaluation of efficacy and safety of vaccines for the prevention of influenza in adults, residents of the metropolis. *Sovremennaya poliklinika*. 2016; 1(8): 27—30. (in Russian)
  13. Belshe R., Edwards K., Vesikari T., Black S.V., Walker R.E., Hultquist M. et al. Live attenuated versus inactivated influenza vaccine in infants and young children. *N. Engl. J. Med.* 2007; 356: 685—96.
  14. Block S., Falloon J., Hirschfield J., Krilov L.R., Dubovsky F., Yi T. et al. Immunogenicity and safety of a quadrivalent live attenuated influenza vaccine in children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2012; 31(7): 747—51.
  15. Connor B.A., Phair J., Sack D., McEniry D., Hornick R., Banerjee D. et al. Randomised, double-blind study in healthy adults to assess the boosting effect of Vaqta or Havrix after a single dose of Havrix. *Clin. Infect. Dis.* 2001; 32(3): 396—401.
  16. Bush L.M., Moonsammy G.I., Boscia J.A. Evaluation of initiating a hepatitis B vaccination schedule with one vaccine and completing it with another. *Vaccine*. 1991; 9(11): 807—9.
  17. Mast E.E., Weinbaum C.M., Fiore A.E., Alter M.J., Bell B.P., Finelli L. et al. A Comprehensive Immunization Strategy to Eliminate Transmission of Hepatitis B Virus Infection in the United States. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) Part II: Immunization of Adults. *MMWR*. 2006; 55(RR16): 1—25.
  18. Hamborsky J., Kroger A., Wolfe S., eds. *CDC. Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases. Chapter 10, Hepatitis B*. 13th ed. Washington D.C.: Public Health Foundation; 2015: 149—73. Available at: <http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/hepb.html>
  19. Public Health Agency of Canada. Canadian Immunization Guide. Principles of Vaccine Interchangeability. Available at: <http://www.phac-aspc.gc.ca/publicat/cig-gci/p01-06-eng.php>
  20. Australian Immunization Handbook. Part 4, 5. Hepatitis B. Available at: <http://www.immunise.health.gov.au/internet/immunise/publishing.nsf/Content/Handbook10-home>
  21. Zueva L.P. *Vaccination in Healthcare Institutions [Vaktsinoprofilaktika v uchrezhdeniyakh zdravookhraneniya]*. St. Petersburg: Medikus; 2004. (in Russian)
  22. Ozeretskovskiy N.A., Shalunova N.V., Petrushuk E.M., Indikova I.N. Vaccinal prevention of viral hepatitis B. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika*. 2015; (2): 87—95. (in Russian)
  23. Tatochenko V.K., Ozeretskovskiy N.A., Fedorov A.M. *Immunoprophylaxis: Reference [Immunoprofilaktika: (spravochnik)]*. 12th edition, revised. Moscow: Pediatr<sup>™</sup>; 2014. (in Russian)
  24. The state register of medicines. Available at: <http://grls.rosminzdrav.ru/default.aspx>. (in Russian)
  25. Loutan L., Bovier P., Althaus B., Gluck R. Inactivated virosome hepatitis A vaccine. *Lancet*. 1994. 343(8893): 322—4.
  26. Kroger A.T., Sumaya C.V., Pickering L.K., Atkinson W.L. General recommendations on immunization: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR*. 2011; 60(RR02): 1—60.
  27. Kalinina Z.P., Dar'ina M.G., Movchan K.N., Mamicheva O.Yu., Gagarkina I.B., Averina T.Ya. et al. On post-vaccination immunity against hepatitis b among health care workers of St. Petersburg. *Infektsiya i immunitet*. 2015; 5(1): 89—92. (in Russian)
  28. Kuzin S.N. Experience with the application of vaccines «Euvax B» for the prevention of hepatitis B. *Byulleten' «Vaktsinatsiya. Novosti vaktsinoprofilaktiki»*. 2001; (3). Available at: <http://medi.ru/doc/15b1504.htm> (in Russian)
  29. Titov I.A. *Characterization of vaccines against hepatitis B and their use in the immunization schedule*: Diss. Moscow; 1998. (in Russian)
  30. Sabanin Yu.V., Kuzin S.N. *Vaccination for Travelers [Vaktsinatsiya dlya puteshestvennikov]*. 2005; (2). Available at: <https://medi.ru/info/11344/> (in Russian)
  31. Bryan J.P., Henry C.H., Hoffman A.G., South-Paul J.E., Smith J.A., Cruess D. et al. Randomised, cross-over, controlled comparison of two inactivated hepatitis A vaccines. *Vaccine*. 2000; 19(7—8): 743—50.
  32. Coates T., Wilson R., Patrick G., Andre F., Watson V. Hepatitis B vaccines: assessment of the seroprotective efficacy of two recombinant DNA vaccines. *Clin. Ther.* 2001; 23(3): 392—403.
  33. Hepatitis B Vaccine. Position Paper WHO. *Wkly Epidemiol. Rec.* 2009; 84(40): 405—20.
  34. Holzer B.R., Hatz C., Schmidt-Sissolak D., Gluck R., Althaus B., Egger M. Immunogenicity and adverse effects of inactivated virosome versus alum-adsorbed hepatitis A vaccine: a randomised controlled trial. *Vaccine*. 1996; 14(10): 982—6.
  35. Holzer B., Hatz C., Schmidt-Sissolak D., Gluck R., Althaus B., Egger M. Immunogenicity and adverse effects of inactivated virosome versus alum-adsorbed hepatitis A vaccine: a randomised controlled trial. *Vaccine*. 1997; 15(2): 230—6.
  36. Zuckerman J.N., Kirkpatrick C.T., Huang M. Immunogenicity and reactogenicity of Avaxim (160 AU) as compared with Havrix (1440 EL.U) as a booster following primary immunization with Havrix (1440 EL.U) against hepatitis A. *J. Travel. Med.* 1998; 5(1): 18—22.
  37. Beck B., Hatz C., Loutan L., Steffen R. Immunogenicity of booster vaccination with a virosomal hepatitis A vaccine after primary immunization with an aluminium-adsorbed hepatitis A vaccine. *J. Travel. Med.* 2004; 11(4): 201—7.
  38. Bouvier P.A., Farinelli T., Loutan L. Interchangeability and tolerability of a virosomal and aluminium-adsorbed hepatitis A vaccine. *Vaccine*. 2005; 23(19): 2424—9.

Поступила 15.03.17

Принята в печать 25.04.17

Глотова Т.И., Никонова А.А., Глотов А.Г.

## ПРОТИВОВИРУСНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ И ПРЕПАРАТЫ, ЭФФЕКТИВНЫЕ В ОТНОШЕНИИ ВИРУСА ВИРУСНОЙ ДИАРЕИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

ФГБУН «Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий» РАН, Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока, 630501, Новосибирская область, Новосибирский район, пос. Краснообск

Вирус вирусной диареи — болезни слизистых оболочек крупного рогатого скота (BVDV) принадлежит к роду *Pestivirus*, семейству *Flaviviridae*. Он вызывает многообразные клинические формы инфекции, приводя к значительным экономическим потерям в мясном и молочном животноводстве во всем мире. Кроме того, вирус является контаминантом биологических препаратов (эмбриональная сыворотка, перевиваемые линии культур клеток, вакцины для медицины и ветеринарии, интерфероны, трипсин, биотехнологические препараты, эмбрионы, стволовые клетки и другие) и используется в качестве тестового объекта при отработке методов их деконтаминации. В некоторых странах инструментом контроля инфекций, вызываемых вирусом, является вакцинация, основанная на применении живых и инактивированных вакцин с различной эффективностью. Противовирусные соединения представляют собой потенциальную меру борьбы в случаях недостаточной эффективности вакцин. Их преимущество в борьбе с BVDV-инфекцией заключается в способности обеспечить немедленную защиту животных групп риска в случае вспышки болезни. В настоящем обзоре обобщено современное состояние знаний относительно противовирусных соединений против BVDV. Установлено, что благодаря использованию передовых биомедицинских технологий наметилась тенденция к поиску препаратов, потенциально эффективных для противовирусной терапии BVDV, на что указывают многочисленные исследования новых соединений и противовирусной эффективности известных лекарственных средств, применяющихся в медицине. У вируса, помимо хорошо известных противовирусных мишеней RdRp, IMPDH, NS3, открыт новый — протеин p7, механизм действия на который еще предстоит изучить. Сделан вывод, что потенциал борьбы с BVDV путем использования противовирусных препаратов значителен, но пока еще не реализован. Отсутствие демонстрации эффективности идентифицированных соединений *in vivo* является самым большим препятствием для их коммерческой реализации. Дополнительные исследования должны быть направлены на разработку методов групповой доставки эффективных лекарственных средств.

Ключевые слова: обзор; вирус вирусной диареи — болезни слизистых оболочек; крупный рогатый скот; противовирусные препараты; мишени; ингибиторы.

Для цитирования: Глотова Т.И., Никонова А.А., Глотов А.Г. Противовирусные соединения и препараты, эффективные в отношении вируса вирусной диареи крупного рогатого скота. *Вопросы вирусологии*. 2017; 62(5):204-210.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-5-204-210>

Glotova T.I., Nikonova A.A., Glotov A.G.

### ANTIVIRAL COMPOUNDS AND PREPARATIONS EFFECTIVE AGAINST BOVINE VIRAL DIARRHEA

Siberian Federal Scientific Centre of Agro-Biotechnologies, Krasnoobsk, Novosibirsk region, 630501, Russian Federation

Bovine viral diarrhea virus (BVDV) belongs to the genus *Pestivirus*, family *Flaviviridae*. It causes various clinical forms of infection leading to significant economic losses in beef and dairy industry worldwide. Furthermore, the virus is a contaminant of biological preparations (bovine fetal serum, continuous cell cultures, vaccines for human and veterinary medicine, interferons, trypsin, biotechnological preparations, embryos, stem cells, etc.). It is used as a test object when developing methods of decontamination. In some countries, a tool for monitoring the infection caused by the virus is vaccination based on the use of live and inactivated vaccines with varying efficiency. The antiviral compounds are a potential means of control in case of insufficient efficacy of vaccines. Their advantage for BVDV control is the ability to provide immediate protection for animals at risk in the case of an outbreak of the disease. This review summarizes the current state of knowledge about antiviral compounds against BVDV. It was noted that due to the use of advanced biomedical technologies there is a tendency to search for drugs that might be effective for antiviral therapy of BVDV, as indicated by numerous studies of new compounds and the antiviral efficacy of known drugs used in medical practice. In addition to the well-known antiviral targets for the virus, such as the RdRp, IMPDH, NS3, new targets were discovered, such as protein p7. Its mechanism of action remains to be explored. It can be concluded that there is a great potential for BVDV control through the use of antiviral drugs which has not yet implemented. The biggest obstacle for commercial implementation of identified compounds is the lack of demonstration of their efficacy *in vivo*. Further studies should be performed to develop a method for administering effective drugs to groups of animals.

Key words: review; bovine viral diarrhea virus; cattle; antiviral drugs; antiviral target; inhibitor.

For citation: Glotova T.I., Nikonova A.A., Glotov A.G. Antiviral compounds and preparations effective against bovine viral diarrhea. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2017; 62(5): 204-210. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-5-204-210>

For correspondence: Tatyana I. Glotova, Dr. Sci. Biol., Head of laboratory, Siberian Federal Scientific Centre of Agro-Biotechnologies, Krasnoobsk, Novosibirsk region, 630501, Russian Federation. E-mail: [t-glotova@mail.ru](mailto:t-glotova@mail.ru)

Для корреспонденции: Глотова Татьяна Ивановна, д-р биол. наук, зав. лабораторией вирусологии Сибирского федерального научного центра агробиотехнологий РАН, 630501, Новосибирская обл., Новосибирский район, пос. Краснообск. E-mail: [t-glotova@mail.ru](mailto:t-glotova@mail.ru)

**Information about authors:**Glotova T.I., [http:// orcid.org/0000-0003-3538-8749](http://orcid.org/0000-0003-3538-8749)Nikonova A.A., <http://orcid.org/0000-0003-4554-1612>; Glotov A.G., [http:// orcid.org/0000-0002-2006-0196](http://orcid.org/0000-0002-2006-0196)**Acknowledgments.** The study had no sponsorship.**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 23 March 2017

Accepted 25 April 2017

**Введение**

Вирус вирусной диареи — болезни слизистых оболочек крупного рогатого скота (BVDV) принадлежит к роду *Pestivirus*, семейству *Flaviviridae*. Он представлен двумя различными генетическими типами: BVDV1 и BVDV2, а также двумя фенотипами: цитопатогенным и нецитопатогенным [1]. По данным некоторых исследователей, насчитывается не менее 21 субтипа BVDV1 [2—3] и 4 субтипа BVDV 2 (2a ... 2d) [4].

Вирус вызывает многообразные клинические формы инфекции, приводя к значительным экономическим потерям в мясном и молочном животноводстве во всем мире. BVDV-инфекция сопровождается патологией воспроизводства, болезнями респираторного тракта, дисфункцией иммунной системы, изнуряющими хроническими заболеваниями с предрасположенностью к развитию вторичной бактериальной и другой вирусной инфекции. Отличительной чертой пестивирусов является их способность преодолевать плацентарный барьер и в зависимости от сроков стельности инфицировать плод, приводя к развитию персистентной инфекции (ПИ) [5]. Животные с ПИ выделяют инфекционный вирус на протяжении всей жизни, что создает проблему в борьбе с заболеванием. Хотя острая форма инфекции встречается довольно часто, нередко она сопровождается лишь слабыми клиническими признаками, что способствует быстрому распространению вируса в стаде [6].

В некоторых странах инструментом контроля инфекций, вызываемых BVDV, является вакцинация, основанная на применении живых и инактивированных вакцин с различной эффективностью, в других — стратегия сдерживания, включающая карантин, выявление и убой ПИ-животных или комбинированные стратегии, основанные на элементах двух первых [7]. Чтобы быть эффективной, вакцинация против BVDV должна защищать от вирусемии с целью предотвращения диссеминации вируса среди восприимчивых животных, блокировать инфекцию клеток-мишеней репродуктивной и лимфатической систем для препятствия инфицированию плода и иммуносупрессии соответственно. Наличие генетического разнообразия BVDV осложняет разработку эффективных вакцин [8].

Кроме того, вирус является контаминантом биологических препаратов (эмбриональная сыворотка, перевиваемые линии культур клеток, вакцины для медицины и ветеринарии, интерфероны, трипсин, биотехнологические препараты, эмбрионы, стволовые клетки и другие) и используется в качестве тестового объекта при отработке методик их деконтаминации. Учитывая высокую гомологию с другим представителем семейства *Flaviviridae* вирусом гепатита С, цитопатогенные штаммы BVDV используют в качестве суррогатной модели при изучении противовирусной активности препаратов относительно данного заболевания человека [9—12].

Противовирусные соединения представляют собой потенциальную меру борьбы в тех случаях, когда вак-

цинация оказывается недостаточно эффективной. Их преимущество в борьбе с BVDV-инфекцией заключается в способности обеспечить немедленную защиту животных групп риска при вспышке болезни.

Применение противовирусных препаратов может снизить экономические потери, связанные с контаминацией биологических препаратов, использованием ПИ-животных для племенных целей, ограничением в международной торговле животными, а также может быть полезно в качестве дополнения к специфической профилактике болезни в стационарно-неблагополучных хозяйствах.

Необходимость дальнейшего развития противовирусной химиотерапии BVDV-инфекции весьма актуальна и имеет большое научное и практическое значение.

В настоящем обзоре обобщено современное состояние знаний относительно антивирусных соединений против BVDV.

Группу противовирусных препаратов составляют лекарственные средства, оказывающие прямое или косвенное воздействие на вирусы и способствующие частичной или полной элиминации их из организма.

Несмотря на постоянно проводимый во всем мире поиск новых противовирусных препаратов, их количество ограничено. В значительной степени это объясняется особенностями паразитизма вирусов, поражающих геном клетки. С этим связано важное требование к противовирусным препаратам: они должны либо непосредственно воздействовать на сам вирус, не повреждая клетки, в которых он паразитирует, либо обладать способностью к активации выработки эндогенного интерферона, направленного на недопущение распространения вируса в организме.

К соединениям, оказывающим прямое действие на вирус в различных стадиях его жизненного цикла, относятся только химиопрепараты.

Все этапы жизненного цикла вируса представляют собой потенциальные мишени для противовирусного действия. В настоящее время, как правило, в качестве антивирусных препаратов используют лекарственные средства, ингибирующие ферменты, которые участвуют в репликации или экспрессии генома вируса. Однако недавние успехи, включая определение структуры, свойств и функций капсида и вириона, а также событий, связанных с взаимодействием между компонентами вирусной частицы или между ними и молекулами клеток-хозяев, открыли новые пути для разработки лекарственных средств, действующих непосредственно на вирусную частицу [13].

В современной вирусологии с точки зрения действия на определенные мишени известны следующие препараты: средства, блокирующие внутриклеточные процессы, необходимые для синтеза вируса; ингибиторы вирусной сборки, созревания, раздевания или выхода вируса из клетки; препараты, препятствующие проникновению вируса в клетку. В обзоре приведены сведения о соединениях, активных в отношении BVDV (см. таблицу).

## Сведения о противовирусных препаратах и химических соединениях, тестированных в отношении BVDV

Природа соединений	Возможный механизм действия	Исследованы	
		<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>
Азотистые гетероциклические соединения [14], соединения ароматических катионов [15], кислородсодержащие гетероциклические соединения [14, 16—20], нуклеозидные соединения [24—27], азосоединения [28—31]		Исследованы	Не исследованы
Соединение класса ароматических катионов DB772 [15, 32—36]	Ингибирование репликации генома	"	Исследованы
ИФН [66—69], индукторы ИФН [71]		"	Не исследованы
Форзитозид А [72]		"	"
Нуклеозидные аналоги [37, 38], производные микофеноловой кислоты [39]	Ингибирование инозинмонофосфатдегидрогеназы	"	"
Малые интерферирующие РНК [40, 41], плазмиды, экспрессирующие shRNA [42, 43]	Подавление функциональной активности генов		
Борная кислота и ее аналоги [47, 48], пиримидиновые нуклеозиды [49]	Ингибирование сериновой протеазы		
Иминосакхара и их производные [51—55]	Нарушение фолдинга гликопротеинов вируса		
Амантадин [61], соединение BIT225, производное дифенилметана	Препятствие проникновению вируса в клетку		
соединение SH-595A [63], каприлат [64]	Ингибирование адсорбции вируса на клетку		
Бактериальные культуры <i>Bacillus</i> spp. B555, B584 и B616 [64]			

## Ингибиторы репликации генома BVDV

**Действие на NS5B.** NS5B, или РНК-зависимая РНК-полимераза (RdRp), играет ключевую роль в синтезе и репликации вирусной РНК. Большинство известных противовирусных соединений, активных в отношении BVDV, действуют на RdRp вируса.

Синтезирован и изучен в условиях *in vitro* ряд азотистых гетероциклических соединений, оказывающих ингибирующее действие на репликацию BVDV за счет внесения единичных мутаций в RdRp вируса. Среди них производные акридина, бензимидазола, карболина, пиридина, хинолина, тиазепина, пиримидинамина (LZ37), триазиноиндола, алинина, замещенные производные пиримидина. Соединения класса тиазол мочевины и производные циклических мочевины [14] также ингибировали RdRp. Подавление репликации BVDV вызывали соединения ароматических катионов [15]. Предполагают, что противовирусный эффект данных молекул связан с подавлением RdRp вируса, однако точный механизм их действия пока не установлен.

Способность ингибировать RdRp вируса была открыта у некоторых кислородсодержащих гетероциклических соединений [14, 16—20]. Однако при их использовании происходила быстрая селекция резистентных вариантов BVDV [21—23]. Антивирусная активность установлена также у нуклеозидных соединений, которые действуют как антиметаболиты на специфические ферментные системы вирусной частицы, в том числе на RdRp [24—27].

Некоторые исследованные азосоединения, тиосемикарбазоны и 2-фенилбензимидазол также подавляли репликацию BVDV в условиях *in vitro*, воздействуя на RdRp [28—31].

Из соединений, ингибирующих RdRp *in vitro*, лишь некоторые испытывали *in vivo*. Так, соединение DB772 из класса ароматических катионов испытано *in vivo* на ПИ у телят. Его применение привело к снижению вирусемии, но не полному освобождению животных от персистирующего вируса [32]. Внутривенное введение DB772 перед интраназальным заражением вирулентным штаммом вируса успешно предотвращало инфицирование серонегативных телят.

Однако эти животные становились восприимчивыми к BVDV после снижения защитного уровня концентрации соединения в организме [33]. Кроме того, установлено, что данное соединение обладает выраженной почечной токсичностью [34]. Несмотря на это, авторы считают, что DB772 может найти другое применение в борьбе с болезнью. Известно, что ароматические катионные соединения ранее использовали для устранения BVDV-инфекции культур клеток и эмбрионов [15, 35], а эмбрионы крупного рогатого скота, культивируемые с этим соединением, были успешно имплантированы реципиентам с последующим рождением здоровых телят с нормальной репродуктивной способностью [36].

**Ингибиторы IMPDH.** Инозинмонофосфат-дегидрогеназа (IMPDH) является ферментом, ограничивающим образование гуаниновых нуклеотидов, что приводит к выраженному снижению уровня внутриклеточного гуанозинтрифосфата и сопровождается подавлением синтеза вирусной РНК и вирусспецифических белков. Таким образом, ингибиторы IMPDH могут давать антипролиферативный и противовирусный эффект.

Существуют 2 пути ингибирования IMPDH: через аналоги субстрата, такие как инозинмонофосфат, или через аналоги кофактора, например никотинамидадениндинуклеотид [27].

По типу субстрата действуют некоторые нуклеозидные аналоги, такие как рибавирин [37] и мизорбин [38]. По всей видимости, кроме ингибирования IMPDH, они используют и другие механизмы воздействия на вирус. По типу кофактора действуют производные микофеноловой кислоты, обладающие антивирусной активностью в отношении BVDV [39].

Препарат рибавирин, применяемый в медицине для лечения гепатита С, ингибирует репликацию новых вирусных частиц, обеспечивая снижение вирусной нагрузки, селективно подавляет синтез вирусной РНК, не влияя на синтез РНК в нормально функционирующих клетках. Для ветеринарии разработан комплексный препарат, включающий рибавирин и антибактериальные препараты: триметоприм и энрофлоксацин. Он рекомендован

для лечения смешанных вирусно-бактериальных инфекций молодняка сельскохозяйственных животных. Однако препарат токсичен, дает выраженный тератогенный эффект и не может использоваться при лечении репродуктивных животных. Нет экспериментальных данных о его эффективности. В медицине прошел клинические испытания препарат липосомального рибавирина с пониженной токсичностью и более высокой терапевтической эффективностью, чем рибавирин. Однако его применение у животных ограничено высокой стоимостью.

### Препараты, влияющие на экспрессию гена

Применение методов современной молекулярной биологии позволяет разработать препараты, способные подавлять функциональную активность любого из известных генов. Антисмысловая терапия основана на остановке синтеза специфических белков при помощи коротких нуклеотидных последовательностей — антисмысловых олигонуклеотидов, комплементарных матричной РНК. Доставка олигонуклеотидов в клетки при этом может осуществляться методами РНК-интерференции.

В условиях *in vitro* установлена умеренная противовирусная активность в отношении BVDV1 сконструированных синтетических малых интерферирующих РНК (миРНК) с активностью, направленной на белки оболочки вируса (Erns, E1 и E2) и высококонсервативную область генома вириона 5'-нетранслируемый регион (5'UTR) [40]. Выраженная противовирусная активность *in vitro* выявлена у миРНК (С, NS4В и NS5А), направленных на 5'UTR и белки BVDV. Кроме того, авторы исследования обнаружили противовирусное действие у коротких РНК, образующих BVDV-специфические шпильки (shRNA) [41]. Позже были созданы плазмиды, экспрессирующие shRNA, направленные на консервативные области генома вируса, подавляющие репликацию BVDV типа 1, субтипов а, b и с [42]. Их удалось встроить в геном овцы и получить культуру эпителиальных клеток почки трансгенных животных с устойчивой shRNA, устойчивую к заражению различными субтипами BVDV1. Можно предположить, что РНК-интерференция позволит в перспективе создать трансгенных животных с повышенной устойчивостью к BVDV [43].

Несмотря на возросший в последние годы интерес к РНК-терапии, исследователи сталкиваются с проблемой неспецифического действия антисмысловых олигонуклеотидов на ткани организма, сопровождающегося побочными эффектами [44].

В литературе описан ряд соединений, ингибирующих репликацию BVDV, механизм действия которых еще предстоит определить [45, 46].

### Ингибиторы созревания и вирусной сборки

*Действие на NS3.* Белок NS3 играет большую роль в жизненном цикле всех представителей семейства Flaviviridae, проявляя протеазную, нуклеозидтрифосфатазную и хеликазную ферментативную активность.

Сериновая протеиназа разрезает полипротеин вируса, в результате чего образуются зрелые белки NS4А, NS4В, NS5А и NS5В. Ингибитором сериновой протеиназы является борная кислота [47]. Получен ее аналог DPC-AB9144-00, ингибирующий белок NS3 BVDV [48].

Известно, что пиримидиновые нуклеозиды проявляют высокую субстратную активность по отношению к NTP-азе/хеликазе вирусов семейства Flaviviridae. Описано соединение из этой группы, эффективно подавляю-

щее репликацию BVDV [49]. Противовирусная активность, основанная на воздействии на NS3, установлена у известного антигельминтного препарата ивермектин в отношении некоторых вирусов этого семейства: денге, лихорадки Западного Нила, желтой лихорадки. Однако данных о его активности в отношении BVDV нет [50].

Несмотря на успешные опыты в условиях *in vitro*, описанные препараты не были испытаны *in vivo*.

### Нарушение фолдинга гликопротеинов вируса

Одними из наиболее перспективных лекарственных препаратов могут стать иминосахара и их производные. Они ингибируют глюкозидазы эндоплазматической сети, приводя к нарушению фолдинга гликопротеинов вируса [51]. Большое количество исследований *in vitro* подтверждает выраженную противовирусную активность иминосахаров в отношении BVDV [52—55], но нет данных об экспериментах *in vivo* с этими соединениями.

### Препятствие проникновению вируса в клетку

Проникновение вириона в клетку — необходимый процесс цикла размножения всех вирусов, поскольку они не способны к самостоятельной репликации. Стратегия создания ингибитора, препятствующего проникновению вируса в клетку, очень перспективна. Она может предотвратить различные негативные воздействия на клеточный цикл и оставить вирион уязвимым для иммунной системы хозяина.

*Действие на гликопротеины оболочки вируса.* Белки оболочки (Е) вирусов семейства Flaviviridae играют ключевую роль в процессах сборки, морфогенеза и инфицирования клеток. Получено несколько соединений, активных в отношении вируса денге [56, 57], но сведений о подобных работах в отношении BVDV не найдено.

*Действие на полипептид р7.* Полипептид р7, образуемый при процессинге белка Е2, относится к виropоринам. Это небольшие и обычно гидрофобные многофункциональные белки вирусов. Они способны формировать олигомерные ионные каналы или поры в мембране клетки-хозяина, что делает ее проницаемой и облегчает выход вирионов из клетки. Нарушение функционирования р7 приводит к потере инфекционности вируса [58, 59]. Установлено, что функции р7 протонного канала могут быть заблокированы небольшими молекулами-ингибиторами. Это приводит к блокаде воспроизводства вирусных частиц [60]. Подтверждена функция белка р7 вируса гепатита С человека как ионного канала в искусственном липидном бислое. Эксперименты *in vitro* продемонстрировали возможность прекращения работы канала, образованного белком р7, при помощи амантадина [61]. Недавно описано низкомолекулярное соединение BIT225, ингибирующее р7 у BVDV и вируса гепатита С [62].

Таким образом, соединения, подобные BIT225, могут стать новыми препаратами, эффективными в борьбе с BVDV.

*Ингибиторы проникновения вируса в клетку с неустановленным механизмом действия.* При исследовании производных дифенилметана установлено, что некоторые из них влияют на репликацию BVDV за счет ингибирования синтеза РНК. Однако противовирусное действие одного из этих соединений, SH-595А, не удалось объяснить только данным эффектом. Показано, что оно влияет на проникновение вируса в клетку, но механизм этого действия неясен [63]. Противовирусный эффект в отношении BVDV обнаружен у трех (B555, B584 и B616)

бактериальных культур *Bacillus* spp., изолированных из тканей морской губки *Petromica citrina*. Он основан на ингибировании адсорбции вируса на клетки [64].

Установлено вируцидное действие каприлата в отношении BVDV, механизм которого, возможно, обусловлен способностью к проникновению в оболочку вируса и ее разрушению, что создает препятствия для слияния капсида вируса с мембраной клетки [65].

### Интерфероны

Интерфероны (ИФН) представляют собой семейство цитокинов с широким спектром биологической активности, в том числе ингибирования репликации вируса, противоопухолевой активности, индукции главного комплекса гистосовместимости антигенов класса I и II, а также Fc-рецепторов [66]. Проведены исследования, свидетельствующие об активности экзогенных ИФН в отношении BVDV *in vitro* [67]. Эксперименты по изучению антивирусной активности ИФН *in vivo* не были достаточно успешными. Так, подкожное введение рекомбинантного ИФН крупного рогатого скота (boIFN) в дозе  $10^6$  ед/кг 5 раз в неделю в течение 2 нед приводило лишь к незначительному снижению вирусной нагрузки ПИ BVDV у животных [68]. По данным других авторов, boIFN подавляет активность вируса *in vitro* и снижает степень виремии у животных. Введение рекомбинантного человеческого ИФН- $\alpha 2a$  телятам с ПИ нецитопатогенным BVDV1 сопровождалось выработкой сывороточного ИФН в течение периода лечения и его сохранением до 2 нед после прекращения курса [69].

Производство альфа- и бета-ИФН в ответ на действие вирусной РНК (dsRNA) является первой линией обороны против вирусных инфекций. Установлено, что Erns-гликопротеин BVDV может действовать как ингибитор dsRNA-индуцированной реакции клеток [70].

Таким образом, хотя исследования *in vitro* продемонстрировали хорошие результаты, низкая эффективность *in vivo* и необходимость длительных курсов лечения ограничивают практическое применение ИФН.

### Индукторы ИФН и иммуномодуляторы

Индукторы ИФН — группа разнообразных по составу, высоко- и низкомолекулярных природных и синтетических соединений, способных вызывать в организме образование эндогенного ИФН. Иммуномодуляторы — это группа препаратов, обладающих способностью воздействовать на различные звенья системы иммунитета. Индукторы ИФН и иммуномодуляторы широко применяют для профилактики и лечения вирусных заболеваний животных, особенно препараты растительного происхождения, имеющие низкую себестоимость.

Препарат, разработанный на основе РНК пекарских дрожжей, являющийся индуктором ИФН, проявил выраженное противовирусное действие *in vitro* за счет подавления репликации вируса. Аналогичные результаты получены в опытах на телятах, естественно инфицированных BVDV. Препарат в дозе 0,5 мг/кг при введении телятам с субклинической формой BVDV-инфекции привел к сокращению сроков выделения вируса с носовыми секретами, нормализации температуры тела и гематологических показателей [71].

Изучено противовирусное действие препарата форзитозид А (FTA) — полифенольного вещества, получаемого из плодов форзиции (*Forsythia suspensa*), которые используют в китайской народной медицине в качестве иммуностимулятора и антиоксиданта. Установлено, что

FTA защищает мононуклеарные клетки периферической крови от инфекции BVDV, активирует Т-клеточный иммунный ответ, ингибирует репликацию вируса и подавляет его цитопатическое действие [72].

### Заключение

Благодаря использованию передовых биомедицинских технологий наметилась тенденция к поиску препаратов, потенциально эффективных для противовирусной терапии вирусной диареи крупного рогатого скота. На это указывают многочисленные исследования новых соединений и противовирусной эффективности известных лекарственных препаратов для медицины. У вируса, помимо хорошо известных противовирусных мишеней RdRp, IMPDH, NS3, открыты новые, например протеин р7, механизм действия на который еще предстоит изучить. Многие соединения показали высокую эффективность *in vitro*, но они либо не тестировались, либо не проявляли активность *in vivo*. Помимо специфических химиопрепаратов, перспективы для дальнейшего применения в ветеринарии имеют индукторы ИФН и иммуномодуляторы, получаемые из природных источников.

Особое значение имеет определение места для противовирусной терапии ПИ высокоплеменных животных. В настоящее время наиболее эффективными методами являются своевременное их выявление и выбраковка, так как лечение достаточно сложно и экономически невыгодно.

При транзитной BVDV-инфекции экономические и трудовые затраты на противовирусную терапию будет трудно оправдать в связи с низкой смертностью и часто слабыми клиническими признаками инфекции. В таких случаях выгоднее осуществлять профилактическую вакцинацию, а не лечение животных.

Тем не менее стратегическое использование противовирусных препаратов в стационарно неблагополучных очагах инфекции может предприниматься для защиты от инфицирования и сохранения ценного племенного скота, а также редких зоологических коллекций и видов, находящихся под угрозой исчезновения. В настоящее время получены доказательства BVDV-инфекции у представителей более 50 семейств отряда парнокопытных, включающих несколько редких и исчезающих видов [73]. До сих пор не разработаны методы для их защиты от этой инфекции.

Применение противовирусных препаратов с целью профилактики в ветеринарной медицине пока находится в стадии разработки, но имеет большие перспективы. Их преимущество заключается в обеспечении мгновенной защиты животных от инфицирования. Одним из способов групповой профилактики вирусной диареи у продуктивных и племенных животных могут быть кормовые добавки, содержащие противовирусные препараты или индукторы ИФН. Это особенно необходимо в тех случаях, когда происходит смешивание животных с неизвестным иммунным статусом в молочных и мясных стадах, особенно поступающих по импорту.

Несмотря на проводимую вакцинацию телят, отсрочка иммунной защиты обеспечивает временной промежуток для воздействия вируса, когда возможно их инфицирование и заболевание. В таком случае противовирусные препараты могли бы обеспечить адекватную защиту до формирования поствакцинального иммунитета.

Особое значение в трансконтинентальных масштабах приобретает поиск противовирусных препаратов

и способов их применения для деконтаминации биологических препаратов, полученных на основе перевиваемых культур клеток, инфицированных вирусом, а также контаминированной эмбриональной сыворотки. Клеточные культуры нашли широкое применение во многих областях, таких как искусственное оплодотворение, лабораторная диагностика, производство биофармацевтических препаратов и вакцин, исследования в области рака, скрининг и разработка лекарственных препаратов, генная и клеточная терапия, тканевая инженерия, а также испытания на токсичность. Поэтому в настоящее время особую актуальность приобретают исследования по деконтаминации эмбриональных сывороток и культур клеток, используемых в стремительно развивающейся отрасли биологической промышленности.

Таким образом, потенциал борьбы с BVDV путем использования противовирусных препаратов весьма значителен, но пока не реализован. Отсутствие демонстрации эффективности идентифицированных соединений *in vivo* является самым большим препятствием для их коммерческой реализации. Дополнительные исследования должны быть направлены на разработку методов групповой доставки эффективных лекарственных средств. Наличие и применение таких соединений будут неопределимыми в борьбе со вспышками заболеваний, обеспечивая немедленную направленную защиту от вируса.

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

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

#### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1—5, 7—10, 12—48, 50—65, 67—69, 71, 72 см. REFERENCES)

6. Глотов А.Г., Глотова Т.И., Семенова О.В., Котенева С.В., Никонова А.А. Индикаторы циркуляции вируса вирусной диареи (болезни слизистых оболочек) крупного рогатого скота на молочных комплексах в условиях Сибири. *Сельскохозяйственная биология*. 2016; 51(4): 483—90.
11. Урываев Л.В., Ионова К.С., Дедова А.В., Дедова Л.В., Селиванова Т.К., Прасюк Н.А. и др. Анализ контаминации культур пестивиром BVDV и микоплазмами. *Вопросы вирусологии*. 2012; (5): 15—21.
49. Иванов М.А., Иванов А.В., Красницкая И.А., Смирнова О.А., Карпенко И.Л., Беланов Е.Ф. и др. Новые фурано- и пирроло [2,3-*D*] пиримидиновые нуклеозиды и их 5-трифосфаты: синтез и биологические свойства. *Биоорганическая химия*. 2008; (5): 661—70.
66. Глотова Т.И., Кунгурцева О.В., Глотов А.Г. Действие препаратов экзогенного интерферона на вирус вирусной диареи-болезни слизистых крупного рогатого скота. *Аграрный вестник Урала*. 2012; (5): 34—6.
70. Ямковая Т.В., Глотова Т.И., Глотов А.Г., Семенова О.В., Ямковой В.И., Панин Л.Е. Активность препарата Виталанг-2 в отношении возбудителя вирусной диареи — болезни слизистых оболочек КРС. *Ветеринария*. 2014; (3): 10—4.
- B.J., McElroy D.R. Acute bovine viral diarrhea associated with extensive mucosal lesions, high morbidity, and mortality in a commercial feedlot. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2012; 24(2): 397—4.
6. Glotov A.G., Glotova T.I., Semenova O.V., Koteneva S.V., Nikonova A.A. The bovine viral diarrhea indicators in the cattle on the big dairy farms in Siberia. *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya*. 2016; 51(4): 483—90. (in Russian)
7. Moennig V., Becher P. Pestivirus control programs: how far have we come and where are we going? *Anim. Health Res. Rev.* 2015; 16(1): 83—7.
8. Kalaycioglu A.T. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) diversity and vaccination. A review. *Vet. Q.* 2007; 29(2): 60—7.
9. Pinheiro de Oliveira T.F., Fonseca A.A. Jr, Camargos M.F., de Oliveira A.M., Pinto Cottorello A.C., Souza Ados R. et al. Detection of contaminants in cell cultures, sera and trypsin. *Biologicals*. 2013; 41(6): 1—8.
10. Buckwold V.E., Beer B.E., Donis R.O. Bovine viral diarrhea virus as a surrogate model of hepatitis C virus for the evaluation of antiviral agents. *Antiviral Res.* 2003; 60(1): 1—15.
11. Uryvaev L.V., Ionova K.S., Dedova A.V., Dedova L.V., Selivanova T.K., Prasyuk N.A. et al. Analysis of the cell tissue culture contamination with the bovine viral diarrhea virus and mycoplasmas. *Voprosy virusologii*. 2012; (5): 15—21. (in Russian)
12. Uryvaev A.V., Dedova L.V., Dedova K.S., Ionova K.S., Parasjuk N.A., Selivanova T.K. et al. Contamination of cell cultures with bovine viral diarrhoea virus (BVDV). *Bull. Exp. Biol. Med.* 2012; 153(1): 77—81.
13. Menéndez-Arias L., Gago F. Antiviral agents: structural basis of action and rational design. *Subcell. Biochem.* 2013; 68: 599—30.
14. Newcomer B.W., Givens M.D. Approved and experimental countermeasures against pestiviral diseases: Bovine viral diarrhoea, classical swine fever and border disease. *Antiviral Res.* 2013; 100(1): 133—50.
15. Givens M.D., Dykstra C.C., Brock K.V., Stringfellow D.A., Kumar A., Stephens C.E. et al. Detection of inhibition of bovine viral diarrhoea virus by aromatic cationic molecules. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003; 47(7): 2223—30.
16. Buckwold V.E., Wilson R.J., Nalca A., Beer B.B., Voss T.G., Turpin J.A. et al. Antiviral activity of hop constituents against a series of DNA and RNA viruses. *Antiviral Res.* 2004; 61(1): 57—2.
17. Mazzei M., Nieddu E., Miele M., Balbi A., Ferrone M., Fergiegia M. et al. Activity of Mannich bases of 7-hydroxycoumarin against Flaviviridae. *Bioorg. Med. Chem.* 2008; 16(5): 2591—605.
18. Giampieri M., Balbi A., Mazzei M., La Colla P., Ibba C., Loddo R. Antiviral activity of indole derivatives. *Antiviral Res.* 2009; 83(2): 179—85.
19. Zhang N., Liu Z., Han Q., Chen J., Lou S., Qiu J. et al. Inhibition of bovine viral diarrhoea virus in vitro by xanthohumol: comparisons with ribavirin and interferon-alpha and implications for the development of anti-hepatitis C virus agents. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2009; 38(4): 332—40.
20. Ibrahim M.M., Mazzei M., Delogu I., Szabó R., Sanna G., Loddo R. Activity of bis (7-hydroxycoumarin) Mannich bases against bovine viral diarrhoea virus. *Antiviral Res.* 2016; 134: 153—60.
21. Chezai J.M., Paeshuysse J., Gaumet V., Canitrot D., Maisoniaux A., Lartigues C. et al. Synthesis and antiviral activity of an imidazo [1,2-*a*] pyrolo [2,3-*c*] pyridine series against the bovine viral diarrhoea virus. *Eur. J. Med. Chem.* 2010; 45(5): 2044—7.
22. Paeshuysse J., Letellier C., Froeyen M., Dutartre H., Vrancken R., Canard B. et al. A pyrazolotriazolopyrimidinamine inhibitor of bovine viral diarrhoea virus replication that targets the viral RNA-dependent RNA polymerase. *Antiviral Res.* 2009; 82(3): 141—7.
23. Baginski S.G., Pevear D.C., Seipel M., Sun S.C., Benetatos C.A., Chunduru S.K. et al. Mechanism of action of a pestivirus antiviral compound. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000; 97(14): 7981—6.
24. Manfredini S., Angusti A., Veronese A.C., Durini E., Vertuani S., Nalin F. et al. Hindered nucleoside analogs as antinflaviviridae agents. *Pure Appl. Chem.* 2004; 76: 1007—5.
25. Pierra C., Amador A., Badaroux E., Storer R., Gosselin G. Synthesis of 2'-C-methylcytidine and 2'-C-methyluridine derivatives modified in the 3'-position as potential antiviral agents. *Coll. Czech. Chem. Comm.* 2006; 71: 991—1010.
26. Angusti A., Manfredini S., Durini E., Ciliberti N., Vertuani S., Solari N. et al. Design, synthesis and anti flaviviridae activity of N(6), 5',3'-O- and 5',2'-O-substituted adenine nucleoside analogs. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 2008; 56(4): 423—32.
27. Finkielstein L.M., Moltrasio G.Y., Caputto M.E., Castro E.F., Cavallaro L.V., Mogliani A.G. What is known about the antiviral agents active against bovine viral diarrhoea virus (BVDV)? *Curr. Med. Chem.* 2010; 17(26): 2933—55.
28. Giliberti G., Ibba C., Marongiu E., Loddo R., Tonelli M., Boido V. et al. Synergistic experimental/computational studies on arylazoenamine derivatives that target the bovine viral diarrhoea virus RNA-dependent RNA polymerase. *Bioorg. Med. Chem.* 2010; 18(16): 6055—8.

#### REFERENCES

1. King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J., eds. *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Academic Press; 2011.
2. Giammaroli M., Ceglie L., Rossi E., Bazzucchi M., Casciari C., Petrini S. et al. Increased genetic diversity of BVDV-1: recent findings and implications thereof. *Virus Genes*. 2015; 50(1): 147—51.
3. Factor C., Yus E., Eiras C., Sanjuan M.L., Cerviño M., Arnaiz I. et al. Genetic diversity of bovine viral diarrhoea viruses from the Galicia region of Spain. *Vet. Rec. Open*. 2016, 3(1): e000196.
4. Deng M., Ji S., Fei W., Raza S., He C., Chen Y. et al. Prevalence study and genetic typing of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in four bovine species in China. *PLoS ONE*. 10(4): e0121718.
5. Hessman B.E., Sjeklocha D.B., Fulton R.W., Ridpath J.F., Johnson

29. Finkielsztein L.M., Castro E.F., Fabián L.E., Moltrasio G.Y., Campos R.H., Cavallaro L.V. et al. New 1-indanone thiosemicarbazone derivatives active against BVDV. *Eur. J. Med. Chem.* 2008; 43(8): 1767—3.
30. Castro E.F., Fabian L.E., Caputto M.E., Gagey D., Finkielsztein L.M., Moltrasio G.Y. et al. Inhibition of bovine viral diarrhea virus RNA synthesis by thiosemicarbazone derived from 5,6-dimethoxy-1-indanone. *J. Virol.* 2011; 85: 5436—5.
31. Tonelli M., Simone M., Tasso B., Novelli F., Boido V., Sparatore F. et al. Antiviral activity of benzimidazole derivatives. II. Antiviral activity of 2 phenylbenzimidazole derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* 2010; 18(8): 2937—3.
32. Newcomer B.W., Marley M.S., Galik P.K., Walz P.H., Zhang Y., Riddell K.P. et al. Antiviral treatment of calves persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *Antivir. Chem. Chemother.* 2012; 22(4): 171—9.
33. Newcomer B.W., Marley M.S., Galik P.K., Zhang Y., Riddell K.P., Boykin D.W. et al. Effect of treatment with a cationic antiviral compound on acute infection with bovine viral diarrhoea virus. *Can. J. Vet. Res.* 2013; 77(3): 170—6.
34. Newcomer B.W., Neill J.D., Marley M.S., Ridpath J.F., Givens M.D. Mutations induced in the NS5B gene of bovine viral diarrhoea virus by antiviral treatment convey resistance to the compound. *Virus Res.* 2013; 96(1—2): 127—9.
35. Givens M.D., Stringfellow D.A., Riddell K.P., Galik P.K., Carson R.L., Riddell M.G. et al. Normal calves produced after transfer of in vitro fertilized embryos cultured with an antiviral compound. *Theor. Biogenology.* 2006; 65(2): 344—5.
36. Givens M.D., Marley M.S., Riddell K.P., Galik P.K., Stringfellow D.A. Normal reproductive capacity of heifers that originated from in vitro fertilized embryos cultured with an antiviral compound. *Anim. Reprod. Sci.* 2009; 113(1—4): 283—6.
37. Escuret V., Parvaz P., Hantz O., Petit M.A., Trepo C., Zoulim F. Study of the antiviral mechanism of action of ribavirin in the bovine viral diarrhoea virus model. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 2002; 26(6—7): 584—90. (in French)
38. Yanagida K., Baba C., Baba M. Inhibition of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) by mizoribine: synergistic effect of combination with interferon-alpha. *Antiviral Res.* 2004; 64(3): 195—201.
39. Stuyver L.J., Lostia S., Patterson S.E., Clark J.L., Watanabe K.A., Otto M.J. et al. Inhibitors of the IMPDH enzyme as potential anti-bovine viral diarrhoea virus agents. *Antivir. Chem. Chemother.* 2002; 13(6): 345—52.
40. Mishra N., Rajukumar K., Kalaiyarasu S., Behera S.P., Nema R.K., Dubey S.C. Small interfering RNAs targeting viral structural envelope protein genes and the 5'-UTR inhibit replication of bovine viral diarrhoea virus in MDBK cells. *Acta Virol.* 2011; 55(3): 279—82.
41. Lambeth L.S., Moore R.J., Muralitharan M.S., Doran T.J. Suppression of bovine viral diarrhoea virus replication by small interfering RNA and short hairpin RNA-mediated RNA interference. *Vet. Microbiol.* 2007; 119(2-4): 132—43.
42. Ni W., Hu S., Qiao J., Yu Y., Wang D., Tong Q. et al. Suppression of bovine viral diarrhoea virus replication by single and dual short hairpin RNA-mediated RNA interference. *Res. Vet. Sci.* 2012; 93(1): 544—8.
43. Ni W., Qiao J., Ma Q., Wang J., Wang D., Zhao X. et al. Development of sheep kidney cells with increased resistance to different subgenotypes of BVDV-1 by RNA interference. *J. Virol. Methods.* 2015; 218: 66—70.
44. Chery J. RNA therapeutics: RNAi and antisense mechanisms and clinical applications. *Postdoc J.* 2016; 4(7): 35—50.
45. Fischer M.A., Smith J.L., Shum D., Stein D.A., Parkins C., Bhinder B. et al. Flaviviruses are sensitive to inhibition of thymidine synthesis. *J. Virol.* 2013; 87(17): 9411—9.
46. Hoover S., Striker R. Thiopurines inhibit bovine viral diarrhoea virus production in a thioipurine methyltransferase-dependent manner. *J. Gen. Virol.* 2008; 89(Pt. 4): 1000—9.
47. Koehler K.A., Lienhard G.E. 2-phenylethylboronic acid, a possible transition-state analog for chymotrypsin. *Biochemistry.* 1971; 10(13): 2477—3.
48. Bukhtiyarova M., Rizzo C.J., Kettner C.A., Korant B.D., Scarnati H.T., King R.W. Inhibition of the bovine viral diarrhoea virus NS3 serine protease by a boron-modified peptidyl mimetic of its natural substrate. *Antivir. Chem. Chemother.* 2001; 12: 367—3.
49. Ivanov M.A., Ivanov A.V., Krasnitskaya I.A., Smirnova O.A., Karpenko I.L., Belanov E.F. et al. New furano- and pyrrolo[2,3-d]pyrimidine nucleosides and their 5'-O-triphosphates: Synthesis and biological properties. *Bioorganicheskaya khimiya.* 2008; (5): 661—70. (in Russian)
50. Baharuddin A., Hassan A.A., Sheng G.C., Nasir S.B., Othman S., Yusof R. et al. Current approaches in antiviral drug discovery against the flaviviridae family. *Curr. Pharm. Des.* 2014; 20(21): 3428—44.
51. Alonzi D.S., Dwek R.A., Butters T.D. Improved cellular inhibitors for glycoprotein processing alpha-glucosidases: biological characterization of alkyl- and arylalkyl-N-substituted deoxynojirimycins. *Tetrahedron Asymmetry.* 2009; 20: 897—1.
52. Mehta A., Ouzounov S., Jordan R., Simsek E., Lu X., Moriarty R.M. et al. Imino sugars that are less toxic but more potent as antivirals, in vitro, compared with N-n-nonyl DNJ. *Antivir. Chem. Chemother.* 2002; 13(5): 299—4.
53. Whitby K., Taylor D., Patel D., Ahmed P., Tynms A.S. Action of celgosivir (6 O-butanoyl castanospermine) against the pestivirus BVDV: implications for the treatment of hepatitis C. *Antivir. Chem. Chemother.* 2004; 15(3): 141—51.
54. Durantel D., Branza-Nichita N., Carrouée-Durantel S., Butters T.D., Dwek R.A., Zitzmann N. Study of the mechanism of antiviral action of iminosugar derivatives against bovine viral diarrhoea virus. *J. Virol.* 2001; 75(19): 8987—8.
55. Du Y., Ye H., Gill T., Wang L., Guo F., Cuconati A. et al. N-Alkyldeoxynojirimycin derivatives with novel terminal tertiary amide substitution for treatment of bovine viral diarrhoea virus (BVDV), Dengue, and Tacaribe virus infections. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2013; 23(7): 2172—6.
56. Poh M.K., Yip A., Zhang S., Priestle J.P., Ma N.L., Smit J.M. et al. A small molecule fusion inhibitor of dengue virus. *Antiviral. Res.* 2009; 84(3): 260—6.
57. Yennamalli R., Subbarao N., Kampmann T., McGeary R.P., Young P.R., Kobe B. Identification of novel target sites and an inhibitor of the dengue virus E protein. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* 2009; 23(6): 333—41.
58. Griffin S.D., Beales L.P., Clarke D.S., Worsfold O., Evans S.D., Jaeger J. et al. The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett.* 2003; 535(1—3): 34—8.
59. Harada T., Tautz N., Thiel H.J. E2-p7 region of the bovine viral diarrhoea virus polyprotein: processing and functional studies. *J. Virol.* 2000; 74(20): 9498—6.
60. Griffin S.D.C., Harvey R., Clarke D.S., Barclay W.S., Harris M., Rowlands D.J. A conserved basic loop in hepatitis C virus p7 protein is required for amantadine-sensitive ion channel activity in mammalian cells but is dispensable for localization to mitochondria. *J. Gen. Virol.* 2004; 85(Pt. 2): 451—61.
61. Foster T.L., Verow M., Wozniak A.L., Bentham M.J., Thompson J., Atkins E. et al. Resistance mutations define specific antiviral effects for inhibitors of the hepatitis C virus p7 ion channel. *Hepatology.* 2011; 54(1): 79—90.
62. Luscombe C.A., Huang Z., Murray M.G., Miller M., Wilkinson J., Ewart G.D. A novel Hepatitis C virus p7 ion channel inhibitor, BIT225, inhibits bovine viral diarrhoea virus in vitro and shows synergism with recombinant interferon-alpha-2b and nucleoside analogues. *Antiviral Res.* 2010; 86(2): 144—3.
63. Bastos J.C., Kohn L.K., Fantinatti-Garbozzini F., Padilla M.A., Flores E.F., da Silva B.P. et al. Antiviral activity of *Bacillus* sp. isolated from the marine sponge *Petromica citrina* against bovine viral diarrhoea virus, a surrogate model of the hepatitis C virus. *Viruses.* 2013; 5(5): 1219—30.
64. Johnston A., Uren E., Johnstone D., Wu J. Low pH, caprylate incubation as a second viral inactivation step in the manufacture of albumin. Parametric and validation studies. *Biologicals.* 2003; 31(3): 213—1.
65. Baron S., Tying S.K., Fleischmann W.R., Coppenhaver D.H., Niesel D.W., Klimpel G.R. et al. The interferons: mechanisms of action and clinical applications. *JAMA.* 1991; 266(10): 1375—3.
66. Glotova T.I., Kungurtseva O.V., Glotov A.G. The drugs exogenous interferon in BVDV. *Agrarny vestnik Urala.* 2012; (5): 34—6. (in Russian)
67. Kohara J., Nishikura Y., Konnai S., Tajima M., Onuma M. Effects of interferon-tau on cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *Jpn. J. Vet. Res.* 2012; 60(2—3): 63—70.
68. Peek S.F., Bonds M.D., Schaele P., Weber S., Friedrichs K., Schultz R.D. Evaluation of antiviral activity and toxicity of recombinant human interferon alfa-2a in calves persistently infected with type 1 bovine viral diarrhoea virus. *Am. J. Vet. Res.* 2004; 65(6): 865—70.
69. Iqbal M., Poole E., Goodbourn S., McCauley J.W. Role for bovine viral diarrhoea virus Erns glycoprotein in the control of activation of beta interferon by double-stranded RNA. *J. Virol.* 2004; 78(1): 136—5.
70. Yamkovaya T.V., Glotova T.I., Glotov A.G., Semenova O.V., Yamkovoy V.I., Panin L.E. The drug activity Vitalang 2 against virus of bovine viral diarrhoea - mucosal disease. *Veterinariya.* 2014; (3): 10—4. (in Russian)
71. Song Q., Weng X.G., Cai D.J., Zhang W., Wang J.F. Forsythoside A inhibits BVDV Replication via TRAF2-Dependent CD28-4-1BB Signaling in Bovine PBMCs. *PLoS One.* 2016; 11(9): e0162791.
72. Passler T., Walz P.H. Bovine viral diarrhoea virus infections in heterologous species. *Anim. Health Res. Rev.* 2010; 11(2): 191—5.

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 615.281.8.03:616.98:578.825.11 + 578.828.6] = 092:612.017.1.064

Мальдов Д.Г.<sup>1</sup>, Андропова В.Л.<sup>2</sup>, Калнина Л.Б.<sup>2</sup>, Ильичев А.В.<sup>1</sup>, Носик Д.Н.<sup>2</sup>, Галегов Г.А.<sup>2</sup>

### ДЕЙСТВИЕ ПРЕПАРАТА СТИМФОРТЕ НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНУЮ ГЕРПЕСВИРУСНУЮ ИНФЕКЦИЮ СОВМЕСТНО С АЦИКЛОВИРОМ И ВИЧ-ИНФЕКЦИЮ СОВМЕСТНО С РЕТРОВИРОМ

<sup>1</sup>ЗАО «СКАЙ ЛТД», 129301, г. Москва;<sup>2</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

При изучении сочетанного действия иммуностимулирующего препарата Стимфорте с базовым, широко применяемым для лечения герпесвирусных инфекций этиотропным химиопрепаратом Ацикловир, на модели экспериментальной летальной инфекции мышей BALB/c, инфицированных вирусом простого герпеса (ВПГ) 1-го типа, было установлено, что взаимодействие этих лекарств носит аддитивный характер. Показано также, что стимфорте подавляет инфекцию, вызванную штаммом вируса, глубоко резистентного к ацикловиру. Установлена достоверная антиретровирусная активность стимфорте при введении за 24 ч до заражения лимфобластоидных клеток человека MT-4 ВИЧ-1, максимально выраженная на ранних сроках инфекции (3 сут). На 6-е сутки наблюдения эффект практически полностью утрачивался. При комбинированном применении стимфорте в дозе 50—100 мкг/мл с субпороговыми дозами ретровируса (0,03 мкг/мл) обнаружен синергидный противовирусный эффект. Таким образом, препарат Стимфорте, обладающий, с одной стороны, противовирусной активностью в отношении вирусов разных семейств, а с другой — иммуномодулирующими свойствами, может быть перспективен как этиопатогенетическое средство, способствующее нормализации как неспецифического, так и специфического иммунитета, одновременно с этиотропными противовирусными химиопрепаратами в составе комплексной терапии генерализованной герпетической инфекции в условиях иммунодефицита. Возможно также использование стимфорте в случае развития лекарственной резистентности у ВПГ, в том числе у ВИЧ-инфицированных пациентов.

Ключевые слова: *Стимфорте; иммуностимулятор; вирус простого герпеса; ацикловир; вирус иммунодефицита человека; ретровир; антивирусная активность.*

*Для цитирования:* Мальдов Д.Г., Андропова В.Л., Калнина Л.Б., Ильичев А.В., Носик Д.Н., Галегов Г.А. Действие препарата Стимфорте на экспериментальную герпесвирусную инфекцию совместно с ацикловиром и ВИЧ-инфекцию совместно с ретровирусом. *Вопросы вирусологии.* 2017; 62(5): 211-218.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-5-211-218>

Maldov D.G.<sup>1</sup>, Andronova V.L.<sup>2</sup>, Kalnina L.B.<sup>2</sup>, Ilyichev A.V.<sup>1</sup>, Nosik D.N.<sup>2</sup>, Galegov G.A.<sup>2</sup>

### INFLUENCE OF IMMUNOMODULATORY DRUG STIMFORTE ON THE EXPERIMENTAL HERPES VIRUS INFECTION IN COMBINATION WITH ACYCLOVIR AND ON HIV-INFECTION IN COMBINATION WITH RETROVIR

<sup>1</sup>ZAO SKY LTD, Moscow, 129301, Russian Federation;<sup>2</sup>D.I. Ivanovsky Institute of Virology «Federal Research Center of Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation

The combined action of the immunostimulatory drug Stimforte and the basic etiotropic drug acyclovir commonly used to treat herpes infections was studied using the model of lethal experimental infection of mice BALB/c with herpes simplex virus type 1. It was found that the interaction of these drugs is additive. In addition, Stimforte inhibits infection caused by a strain of virus, which is highly resistant to acyclovir.

When administered 24 hours prior to HIV-1 infection of human lymphoblastoid cells MT-4, Stimforte exhibited reliable antiretroviral activity best expressed during the early period of infection (the 3rd day). On the 6th day of observation the effect was almost completely lost. Combined use of Stimforte at a dose of 50-100 µg/ml with a subthreshold dose of retrovir (0.03 µg/ml) had a synergistic antiviral effect.

Thus, Stimforte, which exhibits, on the one hand, antiviral activity against viruses of different families and, on the other hand, the immunomodulatory properties, could be promising as an etiopathogenic tool in helping to normalize both nonspecific and specific immunity. It may be used simultaneously with etiotropic antiviral chemotherapy in treatment of generalized herpes infection in patients with immunodeficiency. Furthermore, Stimforte can be used in the case of development of drug resistance in HSV, in particular, in HIV-infected patients.

Keywords: *Stimforte; herpes simplex virus; immunostimulant; acyclovir; human immunodeficiency virus; retrovir; antiviral action.*

*Для корреспонденции:* Мальдов Дмитрий Григорьевич, канд. биол. наук, зав. лабораторией фармакологии ЗАО «СКАЙ ЛТД», 129301, г. Москва. E-mail: [maldov-dg@yandex.ru](mailto:maldov-dg@yandex.ru)

**For citation:** Maldov D.G., Andronova V.L., Kalnina L.B., Ilyichev A.V., Nosik D.N., Galegov G.A. Influence of immunomodulatory drug Stimforte on the experimental herpes virus infection in combination with acyclovir and on HIV-infection in combination with retrovir. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2017; 62(5): 211-218. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-5-211-218>

**For correspondence:** Dmitriy G. Maldov, Ph.D., Head of the Laboratory of Pharmacology, ZAO SKY LTD, Moscow, 129301, Russian Federation. E-mail: [maldov-dg@yandex.ru](mailto:maldov-dg@yandex.ru)

**Information about authors:**

Maldov D.G., <http://orcid.org/0000-0002-8214-0538>;

Kalnina L.B., <http://orcid.org/0000-0002-2702-8578>;

Nosik D.N., <http://orcid.org/0000-0001-5757-5671>;

Andronova V.L., <http://orcid.org/0000-0002-2467-0288>;

Ilyichev A.V., <http://orcid.org/0000-0003-4675-0766>;

Galegov G.A., <http://orcid.org/0000-0001-6162-1650>

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

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

**Contribution.** All authors contributed equally to this work.

Received 14 February 2017

Accepted 25 April 2017

## Введение

Вирус простого герпеса (ВПГ) является одним из самых распространенных патогенов человека. В соответствии с последними данными ВОЗ ВПГ 1-го типа (ВПГ-1) инфицированы более 3,7 млрд человек в возрасте до 50 лет (67% населения), более 530 млн человек имеют ВПГ 2-го типа [1, 2]. ВПГ высококонтагиозен, после первичного инфицирования обеспечивает пожизненную латентную инфекцию с периодическим рецидивированием, способен поражать практически все органы и ткани человека. Основными заболеваниями, ассоциированными с ВПГ-1/2, являются лабиальный герпес, герпес кожи и слизистых оболочек, в том числе генитальный герпес, неонатальный герпес, офтальмогерпес.

Постепенное разрушение иммунной системы организма вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) приводит к развитию синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИД) и повышает риск развития оппортунистических инфекций (ОИ), так как возможность возникновения рецидивов ОИ и их частота в значительной степени определяются иммунным статусом организма. Герпетические инфекции (ГИ) относят к наиболее распространенным ВИЧ/СПИД-ассоциированным ОИ. Около 95% пациентов с ВИЧ/СПИД-инфекцией имеют антитела к ВПГ-1 и/или ВПГ-2. В последние годы роль ГИ возросла в связи с эпидемическим подъемом заболеваемости ВИЧ-инфекцией: по оценкам ВОЗ и ЮНЭЙДС, к середине 2016 г. общее число ВИЧ-инфицированных во всем мире достигло 36,7 млн и продолжает увеличиваться [3], а также возросла доля больных с поздними стадиями ВИЧ-инфекции (4Б, 4В, 5), сопровождающимися развитием тяжелых форм ОИ, в том числе ГИ [4]. У пациентов с иммунодефицитом ВИЧ-этиологии (при уровне CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов менее 200 в 1 мкл) реактивация герпесвирусов из латентного состояния происходит значительно чаще; ГИ, как правило, характеризуются тяжелым клиническим течением, поражения более обширные (зостериформный простой герпес, герпетическая экзема Капоши, язвенно-некротическая форма), дольше заживляющиеся; возможно развитие генерализованной формы ГИ с поражением внутренних органов (эзофагит, пневмония, гепатит, поперечный миелит, некротическая миелопатия), ЦНС (менингит, энцефалит) и диссеминированных инфекций, которые могут стать непосредственной причиной смерти больных СПИДом [4, 5]. Для современного здравоохранения повышается значимость поиска способов оптимизации путей воздействия на ГИ прежде всего у лиц с иммунодефицитными состояниями.

Этиотропные противовирусные препараты Аци-

кловир (АЦВ), Валацикловир (препарат АЦВ) и Фамцикловир, относящиеся к классу модифицированных нуклеозидов, являются препаратами выбора (препаратами первого ряда) для лечения и профилактики ВПГ-инфекций, в том числе у ВИЧ-инфицированных пациентов в стадии СПИДа [5, 6]. Однако феномен развития лекарственной устойчивости ВПГ к этой группе ингибиторов, особенно на фоне выраженного иммунодефицита, может существенно снизить эффективность проводимых химиотерапевтических мероприятий. Частота выделения таких изолятов у лиц со сниженным иммунным статусом достаточно велика. Так, у ВИЧ-инфицированных пациентов резистентность ВПГ к АЦВ отмечается в 5—7% случаев [7].

Ранее на модели летальной ГИ мышей BALB/c нами было показано, что препарат Стимфорте (лиофилизированный порошок водной вытяжки из органов и тканей ушей, оказывающий иммуностимулирующее действие; разработан в ЗАО «СКАЙ ЛТД») ингибирует репродукцию ВПГ-1 в головном мозге и снижает смертность инфицированных животных. Была установлена способность стимфорте влиять на течение хронической ГИ морских свинок [8]. Препарат показал хорошие результаты в клинических испытаниях при использовании в составе комбинированной терапии рецидивирующей ГИ [9] и в настоящее время рекомендован к использованию при вторичных иммунодефицитных состояниях, вызванных острыми и хроническими бактериальными и вирусными инфекциями (в стадии обострения и ремиссии), в том числе генитального герпеса (регистрационный номер ЛСР-005240/08, производитель — Опытное биотехнологическое производство Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН).

В настоящем исследовании проведено изучение эффекта препарата Стимфорте в комбинации с АЦВ (на модели экспериментальной летальной ГИ мышей) и ретровирусом (на модели ВИЧ-инфекции *in vitro*) с целью оценки перспективности его использования для лечения ГИ в составе комплексной терапии, в том числе у ВИЧ-инфицированных пациентов.

## Материал и методы

**Препараты.** В работе использовали препарат Стимфорте (ЗАО «СКАЙ ЛТД»), полученный на Опытном биотехнологическом производстве Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, ацикловир (АЦВ, зовиракс, ациклогуанозин, 9-[(2-гидрокси-этокси)метил]гуанин) про-

изводства компании «Wellcome Foundation Ltd.» (Великобритания) и ретровир (зидовудин, азидотимидин, 3'-азидо-3'-дезокситимидин; АЗТ) производства компании «Glaxo Operations UK, Limited» (Великобритания).

**Вирусы и клетки.** В работе использовали культуру клеток почек зеленой маргаритки Vero E6 (ростовая питательная среда: среда Игла (производства ФГБУ «НИИ полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова»), соединенная с эмбриональной сывороткой телят (ЭТС, 5%) производства «ПанЭко» (Россия) с добавлением бензилпенициллина 100 ЕД/мл). Клетки инкубировали при 37°C в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub> в течение 24 ч. Полученную монослойную культуру клеток использовали для работ с ВПГ.

Перевиваемые лимфобластоидные клетки человека МТ-4 и лейкоциты периферической крови доноров культивировали в концентрации 3,0—5,0 • 10<sup>6</sup> клеток в 1 мл среды RPMI 1640 (производство ФГБУ «НИИ полиомиелита и вирусных энцефалитов») с 10% ЭТС (производство ФГБУ «НИИ полиомиелита и вирусных энцефалитов»), 100 мкг/мл гентамицина («Фармахим», Болгария). Жизнеспособность клеток определяли окраской 0,4% раствором трипанового синего («Сигма», США).

Эталонный штамм ВПГ-1 L<sub>2</sub> (ВПГ-1/L<sub>2</sub>(ТК<sup>+</sup>)) получен из Государственной коллекции вирусов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. Штамм ВПГ-1/L<sub>2</sub>/R<sup>АЦВ</sup> (ТК<sup>-</sup>), резистентный к действию АЦВ, получен нами путем серийного пассирования ВПГ-1/L<sub>2</sub>(ТК<sup>+</sup>) в градиенте концентраций АЦВ с последующим трехкратным клонированием [10]. Свойства и механизм формирования резистентности к АЦВ варианта ВПГ-1/L<sub>2</sub>/R<sup>АЦВ</sup>(ТК<sup>-</sup>) были подробно изучены и описаны в ряде наших публикаций [11, 12].

ВИЧ 1-го типа (ВИЧ-1) штамма ВИЧ-1<sub>BRU</sub> из коллекции штаммов вирусов иммунодефицита человека Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России инкубировали в культуре лимфобластоидных Т-клеток. Инкубацию инфицированных клеток проводили при 37°C в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub> и 98% влажности 5—7 дней. Учет результатов: световая микроскопия — исследование цитопатического эффекта вируса (ЦПЭ) и определение уровня антигена ВИЧ в культуральной жидкости методом ИФА, как описано ранее [13].

**Животные.** В исследовании использовали самцов белых линейных мышей BALB/c массой 12 г, полученных из питомника Научного центра биомедицинских технологий ФМБА России, филиал «Столбовая» (Московская область, Чеховский район, пос. Столбовая). Животные были здоровы, имели ветеринарный сертификат качества и состояния здоровья. Все процедуры выполняли строго в соответствии с требованиями, изложенными в «Правилах проведения работ с использованием экспериментальных животных за № 755 от 12.08.1977». В опытных и контрольных группах было по 15 животных. Инфекционный материал с титром вируса 3,0 • 10<sup>5</sup> БОЕ/мл (5,48 Ig БОЕ/мл) вводили внутривентрально (в/б). Доза вируса 6,0 • 10<sup>4</sup> БОЕ/0,2 мл на мышью обеспечивала 50% гибель животных в контроле.

**Схема введения препаратов инфицированным животным.** Препараты перед употреблением растворяли в стерильном физиологическом растворе и вводили животным в/б в объеме 0,2 мл. Разовая доза стимуфорте составляла 100 мг/мышью, препарат вводили двукратно

— через 24 ч после заражения животных, затем вторично через 48 ч. Курсовая доза препарата была равна 200 мг/мышью. АЦВ вводили в разовой дозе 25 мг/кг (0,3 мг/мышью) 2 раза в день в течение 5 дней (первое введение через 2 ч после инфицирования). Курсовая доза препарата составляла, таким образом, 3 мг/мышью. При изучении комбинации АЦВ со стимуфорте (2-й и 2-й дни инфекции) последний вводили через 1 ч после введения АЦВ. Схема введения, разовые и курсовые дозы препаратов не отличались от таковых при проведении монотерапии. Срок наблюдения за животными составлял 21 сут.

Для определения влияния препаратов на репродукцию ВПГ в органном материале по 3 мыши из каждой группы забивали через 4 сут после заражения, органнй материал (головной мозг, легкие) гомогенизировали при 4°C и готовили 10% суспензию в физиологическом растворе. Суспензию центрифугировали при 5000 об/мин в течение 10 мин при 4°C. Полученный таким образом супернатант хранили при -25°C. Инфекционный титр вируса в супернатанте определяли путем титрования в культуре клеток, как описано ниже.

**Инфекционный титр ВПГ** определяли методом бляшкообразования. Для этого монослойные культуры клеток Vero E6, выращенные в 24-луночных пластиковых планшетах («Costar», США), заражали 10-кратными разведениями вируса. Через 1 ч клеточный монослой отмывали от неадсорбированного вируса физиологическим раствором, вносили среду покрытия по 2 мл/луночку и инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Среда покрытия состояла из среды Игла и 199 (производство НИИ полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова), соединенных в соотношении 1:1, 5% ЭТС, 0,4% агарозы («Сигма», США). Через 48 ч среду покрытия удаляли, инфицированные культуры фиксировали 10% нейтральным формалином, окрашивали 0,5% раствором генцианового фиолетового и подсчитывали бляшки [14].

## Результаты

При изучении эффективности препаратов Стимуфорте, АЦВ и их комбинации на модели летальной ГИ мышей, инфицированных эталонным вирусом ВПГ-1/L<sub>2</sub>(ТК<sup>+</sup>), параметрами защитной активности соединений служили показатели снижения смертности инфицированных животных и увеличения средней продолжительности жизни (СПЖ) в опытных группах, получавших препараты, по сравнению с контрольной инфицированной, но не леченой группой животных. О противовирусной активности препаратов судили также по снижению величины инфекционного титра вируса в органном материале, полученном от животных, опытной группы по сравнению с контрольной группой. Результаты приведены в табл. 1.

Смертность в контрольной группе животных, зараженных ВПГ-1, по результатам двух независимых опытов составила 54,5% (12/22), СПЖ — 11,82 сут. Показатели смертности в опытных группах животных, получавших стимуфорте или АЦВ, в обоих случаях были снижены на 21,2%, а СПЖ увеличена на 4,01 и 4,18 сут соответственно.

При использовании комбинации препаратов, сохраняя ту же их дозировку и схему введения, что и при использовании по отдельности, удалось существенно оптимизировать их защитный эффект: смертность в группе снизилась в 4 раза, а СПЖ увеличилась почти на 4 сут

Таблица 1

Действие стимфорте и АЦВ на экспериментальную инфекцию ВПГ-1 у мышей BALB/c

Препарат	Смертность		Защита, %	Средняя продолжительность жизни, сут	Инфекционный титр вируса в органном материале (на 4-е сутки после заражения), Ig	
	A/B*	%			головной мозг	легкие
Стимфорте 100 мкг/мышь	8/24	33,3	21,2	15,83 ± 2,21	2,44 ± 0,07	1,27 ± 0,13
АЦВ 25 мг/кг	8/24	33,3	21,2	16,00 ± 2,14	2,43 ± 0,09	1,10 ± 0,05
Стимфорте + АЦВ 100 мкг/мышь + 25 мг/кг	2/24	8,3	46,2	19,75 ± 1,22	1,14 ± 0,09	0,23 ± 0,23
Вирусный контроль	12/22	54,5	—	11,82 ± 2,67	3,75 ± 0,03	1,86 ± 0,24

Примечание. \*А — число погибших животных/В — общее число животных в группе. Здесь и в табл. 2: приведены результаты двух независимых опытов.

по сравнению с АЦВ и стимфорте, используемыми по отдельности. В соответствии с приведенными показателями полученный эффект комбинации можно оценить как синергидный.

Результаты изучения влияния стимфорте, АЦВ и их комбинации на репродукцию ВПГ-1 в органном материале также приведены в табл. 1. Величины инфекционных титров вируса при применении препаратов по отдельности были хорошо сопоставимы, и их разница с показателем контрольной группы составила 1,3 lg БОЕ/мл, а при использовании комбинации препаратов титр вируса в головном мозге был снижен на 2,6 lg БОЕ/мл. Результаты титрования материала легочной ткани также дали близкие результаты — снижение величин инфекционного титра в группах животных, получавших стимфорте или АЦВ, составило 0,6 и 0,8 lg БОЕ/мл соответственно, а в группе, получавшей комбинацию препаратов, — 1,6 lg БОЕ/мл. Тот факт, что в группе животных, получавших комбинацию препаратов, наблюдалось гораздо более глубокое ингибирование репродукции ВПГ как в головном мозге, так и в легких животных, указывает на синергидный характер взаимодействия препаратов при сочетанном использовании.

При проведении сравнительного анализа активности стимфорте на модели ГИ мышей, инфицированных ВПГ-1/L<sub>2</sub>(ТК<sup>+</sup>) или ВПГ-1/L<sub>2</sub>/R<sup>АЦВ</sup>(ТК<sup>-</sup>), показано, что при введении животным стимфорте в концентрации 50 и 100 мкг/мышь значительно снижался титр вируса в головном мозге и легких (табл. 2). Противовирусная активность носила дозозависимый характер.

Чтобы установить потенциальную возможность воздействия стимфорте на патогенез ВИЧ-инфекции, изучено его влияние на ВИЧ-инфекцию *in vitro* — на модели ВИЧ-инфицированных клеток. Установлено, что стимфорте не оказывает заметного цитотоксического действия на незараженные лимфобластоидные Т-клетки в концентрациях до 100 мкг/мл. В концентрациях

100 мкг/мл наблюдалось антипролиферативное действие препарата — на 5-е сутки после добавления препарата в культуральную жидкость количество клеток в опытной культуре снизилось в 4 раза по сравнению с контрольной (табл. 3). При этом жизнеспособность лимфобластов изменилась незначительно.

При исследовании противовирусной активности стимфорте в отношении ВИЧ-инфицированных клеток обнаружено уменьшение количества вирусиндуцированных синцитиев — конгломератов нескольких клеток с общей клеточной оболочкой, образовавшейся в результате слияния их мембран. Наибольший эффект отмечен при использовании препарата в дозе 100 мкг/мл. Однако количество клеток было заметно ниже, чем в контрольной культуре, что, по-видимому, связано с антипролиферативным эффектом стимфорте (см. табл. 3).

При внесении препарата одновременно с вирусом (табл. 4) количество живых клеток, обработанных препаратом, было несколько выше, чем в контроле зараженных клеток, однако при этом скорость и степень развития ЦПЭ в клетках были сходны с соответствующими показателями в контроле вируса. В культурах инфицированных клеток, обработанных антиретровирусным референс-препаратом Ретровир (концентрация 0,267 мкг/мл), ЦПЭ отсутствовал (см. табл. 4; 5).

В результате исследования динамики развития противовирусного эффекта при профилактической схеме

Таблица 3

Исследование противовирусной активности стимфорте на модели лимфобластоидных клеток человека, инфицированных ВИЧ-1 (внесение препарата за 24 ч до инфицирования клеток)

Условия опыта (концентрация, мкг/мл)	Жизнеспособность клеток, %*	Количество клеток, %**	ЦПЭ/синцитии, %		
			3-и сутки	5-е сутки	6-е сутки
Контроль клеток	100	100	0	0	0
Контроль вируса	20	13,0	87,5	100,0	100,0
Ретровир 0,267	98,0	95,0	0	0	0
Стимфорте 50,0	85,0	54,0	6,25	37,5	75,0
Стимфорте 100,0	97,0	25,0	0	12,5	62,5

Примечание. \* — жизнеспособность клеток по отношению к интактному контролю клеток на 5-е сутки; \*\* — количество клеток на 5-е сутки.

Таблица 2

Действие стимфорте на экспериментальную инфекцию у мышей BALB/c, инфицированных эталонным штаммом ВПГ-1 или резистентным к АЦВ штаммом ВПГ-1

Разовая/курсовая доза	ВПГ-1/L <sub>2</sub> (ТК <sup>+</sup> )		ВПГ-1/L <sub>2</sub> /R <sup>АЦВ</sup> (ТК <sup>-</sup> )	
	головной мозг	легкие	головной мозг	легкие
0	3,62 ± 0,09	1,76 ± 0,06	2,97 ± 0,02	1,12 ± 0,06
50 мкг/мышь	2,92 ± 0,70	1,40 ± 0,07	2,19 ± 0,06	0,47 ± 0,23
100 мкг/мышь	2,01 ± 0,04	0,90 ± 0,10	1,45 ± 0,02	0,23 ± 0,23

Таблица 4

**Исследование противовирусной активности стимфорте при сочетанном применении с ретровирусом на модели лимфобластоидных клеток человека, инфицированных ВИЧ-1 (внесение препарата одновременно с инфицированием клеток)**

Условия опыта (концентрация, мкг/мл)	Цитотоксичность (без вируса)		ВИЧ-инфекция			
	жизнеспособность клеток, %	количество клеток, % *	жизнеспособность клеток, %	количество клеток, %*	ЦПЭ/синцитии, %	снижение уровня антигена вируса, %**
Контроль клеток	93,0 ± 2,6	100,0	—	—	—	—
Контроль вируса	—	—	15,0 ± 1,2	2,6	100,0	0,0
Ретровир 0,3	89,0 ± 1,4	53,8	88,0 ± 1,5	57,6	0,0	80,0
Ретровир 0,03	90,0 ± 2,6	80,7	51,0 ± 1,2	22,9	50,0	10,5
Ретровир 0,003	91,0 ± 2,5	84,6	16,0 ± 1,1	3,8	87,5	0,0
Стимфорте 100	90,0 ± 2,5	80,7	29,0 ± 0,8	11,4	75,0	22,5
Стимфорте 50	92,0 ± 2,7	80,7	18,0 ± 1,4	10,3	87,5	24,0
Ретровир 0,3 + стимфорте 100	90,0 ± 2,5	73,1	89,0 ± 2,7	69,2	12,5	83,4
Ретровир 0,3 + стимфорте 50	91,0 ± 2,5	80,7	86,0 ± 3,2	53,8	12,5	82,1
Ретровир 0,03 + стимфорте 100	91,0 ± 2,5	80,7	77,0 ± 4,1	27,8	37,5	41,0
Ретровир 0,03 + стимфорте 50	91,0 ± 2,6	80,7	82,0 ± 3,6	53,8	50,0	16,3
Ретровир 0,003 + стимфорте 100	92,0 ± 2,6	84,6	27,0 ± 1,5	7,0	87,5	0,0
Ретровир 0,003 + стимфорте 50	91,0 ± 2,5	80,7	22,0 ± 1,5	6,5	100,0	6,6

Примечание. Здесь и в табл. 5: \* — количество клеток по отношению к интактному контролю клеток; \*\* — снижение количества вирусного антигена по отношению к уровню антигена в контроле вируса; результаты относительно жизнеспособности, количества клеток и ЦПЭ получены на 6-й день наблюдения.

введения стимфорте установлено наибольшее защитное действие препарата на ранних сроках инфекции (3 сут) и практически полное исчезновение эффекта на 6-е сутки наблюдения (см. табл. 3).

При сочетанном применении стимфорте с ретровирусом в культуре незараженных лимфоцитов не отмечено увеличения цитотоксического действия комбинации препаратов (см. табл. 4, 5). При исследовании противовирусной активности комбинации стимфорте в дозе 50—100 мкг/мл с ретровирусом в дозе 0,3 мкг/мл в условиях внесения препаратов одновременно с инфицированием клеток не было выявлено заметного увеличения уровня защиты клеток по сравнению с ретровирусом при его индивидуальном использовании.

В ходе сравнительной оценки средних показателей жизнеспособности с помощью двухвыборочного *T*-критерия Стьюдента в профилактической схеме внесения обоих препаратов в комбинации 100 мкг/мл стимфорте и 0,3 мкг/мл ретровируса отмечено небольшое (7%), но достоверное (при уровне значимости  $p < 0,05$ ) увеличение количества живых клеток по сравнению с индивидуальным применением ретровируса (см. табл. 5).

При 10-кратном снижении дозы ретровируса в комбинации (до 0,03 мкг/мл) показан потенцирующий противовирусный эффект препаратов, выразившийся в увеличении количества и жизнеспособности клеток, замедленной динамике развития ЦПЭ, а также в снижении уровня антигена вируса в культуральной жидкости и соответственно повышении защиты клеток от цитопатического действия ВИЧ при сочетанном применении препаратов в этих дозах (см. табл. 4, 5). Изучаемые показатели в данном случае достоверно различались (между сочетанным и индивидуальным применением препаратов) при уровне значимости  $p < 0,05$ .

При использовании низкой дозы ретровируса (0,003 мкг/мл) противовирусный эффект комбинации препаратов оставался на уровне их индивидуального применения.

Очевидно, при комбинированном применении стимфорте в дозе 50—100 мкг/мл с субпороговыми дозами ретровируса (0,03 мкг/мл) профилактическая схема применения препаратов дает более высокий уровень защиты от действия вируса (см. табл. 5).

### Обсуждение

Известно, что для проявления противогерпетической активности АЦВ должен фосфорилироваться с образованием трифосфата АЦВ, который является ингибитором вирусной ДНК-полимеразы, а при включении в элонгирующуюся цепь ДНК ингибирует ее синтез по терминационному механизму. Высокий уровень селективности действия АЦВ в значительной степени определяется тем, что первый этап его фосфорилирования до монофосфата катализируется герпесвирусной тимидинкиназой (ТК) [15]. Соответственно развитие у ВПГ устойчивости к АЦВ в 95% случаев связано с мутациями по ТК-гену и в 5% случаев — с мутациями по *rol*-гену [16]. Очевидно, такие АЦВ-резистентные мутанты будут кросс-резистентны к валацикловиру (L-валиновому эфиру АЦВ), представляющему собой метаболический предшественник АЦВ, а также в большинстве случаев к фамцикловиру, механизм действия которого близок таковому АЦВ, чем и определяется сходство путей формирования резистентности к этим препаратам [17].

Таким образом, формирование лекарственной резистентности ВПГ к АЦВ является фактором, лимитирующим применение всех противогерпетических препаратов первого ряда. В связи с этим было важно показать, что стимфорте сохраняет противовирусную активность на модели ГИ, резистентной к АЦВ. Мы использовали штамм ВПГ-1/L<sub>2</sub>/R<sup>АЦВ</sup> (ТК-), ТК-активность которого была полностью утрачена [11, 12]. Такие штаммы ВПГ с утраченной или в значительной степени сниженной ТК-активностью составляют подавляющее большинство

**Исследование противовирусной активности стимфорте при сочетанном применении с ретровирусом на модели лимфобластоидных клеток человека, инфицированных ВИЧ-1 (внесение препарата за 24 ч до инфицирования клеток)**

Условия опыта (концентрация, мкг/мл)	Цитотоксичность (без вируса)		ВИЧ-инфекция			
	жизнеспособность клеток, %	количество клеток, %*	жизнеспособность клеток, %	количество клеток, %*	ЦПЭ/синцитии, %	снижение уровня антигена вируса, %**
Контроль клеток	93 ± 5,4	100,0	—	—	—	—
Контроль вируса	—	—	20 ± 1,5	8,0	100,0	0,0
Ретровир 0,3	89 ± 3,5	56,7	87 ± 2,5	91,9	0,0	81,6
Ретровир 0,03	88 ± 1,6	70,4	54 ± 1,8	32,4	50,0	50,1
Ретровир 0,003	90 ± 4,5	73,0	37 ± 2,4	73,0	87,5	0,0
Стимфорте 150	86 ± 4,2	32,4	37 ± 2,8	14,2	75,0	50,5
Стимфорте 100	97 ± 3,6	92,0	34 ± 1,8	17,8	75,0	4,4
Стимфорте 50	85 ± 3,8	89,1	20 ± 1,1	16,9	75,0	13,9
Ретровир 0,3 + стимфорте 100	94 ± 5,5	100,0	94 ± 2,7	90,0	0,0	81,6
Ретровир 0,3 + стимфорте 50	89 ± 1,2	73,0	94 ± 4,9	79,5	0,0	76,0
Ретровир 0,03 + стимфорте 150	86 ± 4,3	62,1	63 ± 3,5	43,2	12,5	64,8
Ретровир 0,03 + стимфорте 100	92 ± 3,8	60,0	90 ± 3,9	46,0	18,75	78,8
Ретровир 0,03 + стимфорте 50	80 ± 1,9	75,7	87 ± 4,0	86,5	43,75	69,3
Ретровир 0,003 + стимфорте 100	91 ± 4,5	81,1	69 ± 4,0	48,6	56,25	4,8
Ретровир 0,003 + стимфорте 50	82 ± 2,4	67,6	55 ± 2,1	30,0	68,75	0,0

(96%) всех АЦВ-резистентных клинических изолятов с мутациями по ТК-гену [16].

Независимость противовирусной активности стимфорте от чувствительности ВПГ к АЦВ, а также синергидный характер взаимодействия стимфорте и АЦВ на модели ГИ *in vivo* определяются принципиальным различием механизмов действия этих препаратов. На фоне часто рецидивирующих ГИ вследствие длительной персистенции вируса развивается ряд глубоких изменений состояния иммунной системы (вторичные иммунодефициты). Прежде всего блокируется продукция и секреция интерферонов (ИФН- $\alpha$  и ИФН- $\gamma$ ), ограничивающих внутриклеточную репродукцию ВПГ, значительно снижается функциональная активность НК-клеток (англ. natural killer cells — клеток естественных киллеров), снижается продукция сывороточных интерлейкинов (ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-12), фактора некроза опухоли  $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ), снижается количество моноцитов, экспрессирующих TLR-2 (англ. toll like receptor — толл-подобный рецептор, индуцирует гуморальный иммунный ответ, стимулирует пролиферацию и дифференцировку В-лимфоцитов), наблюдаются различные нарушения Т-клеточного и гуморального звеньев иммунной системы [18]. Ранее было установлено, что противовирусная активность Стимфорте связана с его комплексным воздействием на систему противовирусного иммунитета, позволяющим корректировать деятельность ряда дефектных звеньев как клеточного, так и гуморального иммунитета и повышающим, таким образом, иммунный статус организма. При введении стимфорте мышам с индуцированной иммуносупрессией увеличивается количество мононуклеарных лейкоцитов, индуцируется продукция цитокинов ИЛ-10, ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ФНО- $\alpha$ ). Показаны его интерферогенная активность (в присутствии препарата повышается уровень сывороточных ИФН- $\alpha$ , ИФН- $\beta$  и

ИФН- $\gamma$ ) и иммуностимулирующая активность, направленная на реакции врожденного иммунитета (повышается количество F4/80<sup>+</sup>-клеток) и адаптивного иммунитета (повышается количество CD4<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>-клеток), препарат позитивно влияет на продукцию специфических антител [19—21]. Благодаря иммуномодулирующему действию препарата можно не только обеспечить усиление терапевтической эффективности этиотропных противовирусных лекарственных средств, но и снизить вероятность развития лекарственной резистентности ВПГ, находящейся в прямой зависимости от иммунного статуса пациента.

Как отмечено выше, одной из основных причин иммунодефицитов у людей является ВИЧ-инфекция. На модели ВИЧ-инфицированных клеток показано, что стимфорте проявляет достоверную антиретровирусную активность, а при комбинированном его применении с субпороговыми дозами ретровируса обнаружен синергидный противовирусный эффект.

Взаимоусиление анти-ВИЧ-действия стимфорте и ретровируса при сочетанном использовании, по-видимому, является следствием различий в механизмах их воздействия на ВИЧ-инфекцию, которые реализуются в разных стадиях жизненного цикла вируса. Наиболее вероятно, что ингибирование репродукции ВИЧ стимфорте связано с его способностью как активатора TLR-4 ингибировать проникновение ВИЧ в клетки в стадии перехода эндосома/лизосома [22].

При смешанной инфекции клеток ВИЧ-1 и ВПГ-1, как нами было показано ранее, заметно усилился процесс синцитийобразования и клеточной деструкции, а также увеличения продукции антигенов ВИЧ-1 в 1,4—2,1 раза, а уровень ВПГ-1 в 1,3—1,8 раза (в зависимости от вида клеток) [23]. Сходная картина наблюдалась при одновременном заражении клеток ВИЧ-1 и ВПГ-2. Поэтому применение препаратов, способных

действовать одновременно на несколько вирусов, весьма актуально.

Многочисленные клинические исследования показали, что супрессивная терапия инфекции ВПГ-2 с использованием АЦВ или валацикловира у ВИЧ-1/ВПГ-2-инфицированных пациентов замедляет прогрессирование ВИЧ-инфекции и развитие СПИДа, снижает вирусную нагрузку ВИЧ-1 и увеличивает выживаемость пациентов [24, 25]. Механизм воздействия АЦВ на ВИЧ-1 состоит в следующем. АЦВ в форме трифосфата узнается обратной транскриптазой (ОТ), и последующее его включение в синтезирующуюся цепь ДНК приводит к подавлению репликации вируса (ИД<sub>50</sub> 3,11 мкМ). Однако ВИЧ не имеет фермента, способного обеспечить инициацию кинирования АЦВ с образованием монофосфата АЦВ. Для этого необходима герпетическая ТК. В условиях коинфекции ВПГ-2/ВИЧ-1 АЦВ в клинически значимых концентрациях (3 мкМ и более) ингибирует *in vitro* репликацию изолятов ВИЧ-1, в том числе устойчивых к используемым в настоящее время лекарственным средствам (азидотимидину, ламивудину, невирапину, комбинации нуклеозидных ингибиторов ОТ (НИОТ) и ингибиторам протеазы) [26, 27]. Мутация V75I в ОТ ВИЧ-1 приводит к резистентности ВИЧ-1 к АЦВ и не связана с развитием резистентности к утвержденным в настоящее время НИОТ [28].

Препараты, фармакологическая эффективность которых сочетает в себе как ингибирующее воздействие на инфекционные агенты, так и благоприятное воздействие на иммунную систему организма путем восстановления нарушенных функций иммунного ответа и/или мобилизации резервных механизмов защиты, представляют особый интерес для лечения хронических инфекционно-воспалительных заболеваний.

Стимфорте активирует пролиферацию и дифференцировку как лейкоцитов, так и лимфоцитов *in vivo*, что ведет, по данным литературы, к восстановлению иммунной системы пациента, пораженного ВИЧ-инфекцией, и способствует активации ВИЧ внутри гематопозитических клеток [29, 30] с тем, чтобы он мог быть обнаружен и уничтожен иммунной системой человека.

Таким образом, препарат Стимфорте, обладающий с одной стороны, противовирусной активностью в отношении вирусов разных семейств, а с другой — иммуномодулирующими свойствами, может быть перспективен как этиопатогенетическое средство, способствующее нормализации как неспецифического, так и специфического иммунитета, одновременно с этиотропными противовирусными химиопрепаратами в составе комплексной терапии генерализованной ГИ в условиях иммунодефицита. Возможно также использование стимуфорте в случае развития лекарственной резистентности у ВПГ, в том числе у ВИЧ-инфицированных пациентов.

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

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

**Определение авторства.** Участие авторов в написании статьи является равнодолевым.

#### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 2, 6, 7, 14—18, 22, 24—30 см. REFERENCES)

- ВОЗ. Инфекции, передаваемые половым путем (ИППП). Информационный бюллетень ВОЗ №110. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs110/ru/>
- ВОЗ. ВИЧ/СПИД. Информационный бюллетень ВОЗ № 360. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs360/ru/>
- Леонова О.Н., Виноградова Т.Н., Сизова Н.В., Степанова Е.В. Проблемы лечения больных с тяжелыми формами ВИЧ-инфекции. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии*. 2013; 5(2): 58—65.
- Ерамова И., Матич С., Мюнз М. Тактика ведения пациентов с оппортунистическими инфекциями и общими симптомами ВИЧ/СПИДа. Клинический протокол для Европейского региона ВОЗ. Available at: [http://aids.belmapo.by/downloads/protocols/dl/protocol02\\_ru\\_w2003-edit-final16feb28.pdf](http://aids.belmapo.by/downloads/protocols/dl/protocol02_ru_w2003-edit-final16feb28.pdf).
- Мальдов Д.Г., Григорян С.С., Галегов Г.А., Андропова В.Л., Бельков А.П., Ильичев А.В. Действие иммуномодулирующего препарата Стимфорте на герпесвирусную инфекцию. *Иммунология*. 2011; 32(5): 250—6.
- Зуйкова И.Н., Шульженко А.Е., Мальдов Д.Г., Ильичев А.В., Пинегин Б.В. Применение препарата «Стимфорте» в комплексной терапии рецидивирующей герпес-вирусной инфекции. *Герпес*. 2009; (2): 30—6.
- Андропова В.Л., Галегов Г.А., Ясько М.В., Куханова М.К., Скоблов Ю.С. Сравнительное изучение лекарственной устойчивости вируса простого герпеса к ациклоганозину и Н-фосфонату ациклоганозина. *Вопросы вирусологии*. 2010; 55(1): 31—4.
- Андропова В.Л., Гроховский С.Л., Суrowая А.Н., Дерябин П.Г., Гурский Г.В., Галегов Г.А. Подавление репродукции вируса простого герпеса с лекарственной устойчивостью сочетанием 15Lys-Nt с некоторыми противогерпетическими препаратами. *Вопросы вирусологии*. 2014; 59(1): 36—41.
- Коровина А.Н., Гуськова А.А., Скоблов М.Ю., Андропова В.Л., Галегов Г.А., Кочетков С.Н. и др. Анализ мутаций в генах ДНК-полимераз и тимидинкиназ клинических изолятов вируса простого герпеса, резистентных к антигерпетическим препаратам. *Молекулярная биология*. 2010; 44(3): 488—96.
- Носик Д.Н., Носик Н.Н., Каплина Е.Н., Калнина Л.Б., Киселева Л.А., Кондрашина Н.Г. и др. Активность препарата «Ферровир» в отношении РНК и ДНК вирусов. *Вопросы вирусологии*. 2002; 47(3): 21—3.
- Бельков А.П., Муругин В., Григорян С.С., Ильичев А.В., Чубарова Г.Д., Мальдов Д.Г. Активность веществ Стимфорте и их физико-химическая характеристика. *Фармация*. 2012; 61(4): 39—42.
- Мальдов Д.Г., Андропова В.Л., Балакина А.А., Ильичев А.В., Галегов Г.А. Влияние иммуномодулирующего препарата Стимфорте на гуморальный иммунный ответ при экспериментальной герпесвирусной инфекции. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61(4): 172—5.
- Мальдов Д.Г., Ильичев А.В., Лебединская Е.А., Фадеева Е.В., Лебединская О.В., Ахматова Н.К. и др. Действие Стимфорте на мононуклеарные лейкоциты и лимфоидные органы мышей на фоне введения циклофосфана. *Медицинская иммунология*. 2011; 13(2—3): 133—8.
- Баринский И.Ф., Носик Д.Н., Кальнов С.Л., Никитина А.А., Львов Н.Д., Петрова М.С. и др. Активация репродукции вирусов при смешанной инфекции вирусом иммунодефицита человека и герпес-вирусами. *Вопросы вирусологии*. 1994; 39(5): 223—6.

#### REFERENCES

- WHO. Sexually transmitted infections (STIs). Fact sheet of WHO №110. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs110/en/>
- Looker K.J., Magaret A.S., May M.T., Turner K.M.E., Vickerman P., Gottlieb S.L., et al. Global and Regional Estimates of Prevalent and Incident Herpes Simplex Virus Type 1 Infections in 2012. *PLoS ONE*. 2015; 10(10): e0140765.
- WHO. HIV/AIDS. Fact sheet of WHO №360. Available at: <http://www.who.int/features/qa/71/en/>
- Leonova O.N., Vinogradova T.N., Sizova N.V., Stepanova E.V. Problems in the therapeutic treatment of patients having severe forms of HIV infection. *VICH-infektsiya i immunosupressii*. 2013; 5(2): 58—65. (in Russian)
- Eramova I., Matic S., Munz M. Management of opportunistic

- infections and general symptoms of HIV / AIDS. Clinical protocol for WHO Regional Office for Europe. Available at: [http://www.euro.who.int/\\_data/assets/pdf\\_file/0007/78118/E90840\\_Chapter\\_2.pdf](http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0007/78118/E90840_Chapter_2.pdf)
6. De Clercq E. Antiviral drugs in current clinical use. *J Clin Virol.* 2004; 30(2): 115—33.
  7. Frobert E., Burrell S., Ducastelle-Lepretre S., Billaud G., Ader F., Casalegno J.S. et al. Resistance of herpes simplex viruses to acyclovir: an update from a ten-year survey in France. *Antiviral Res.* 2014; 111: 36—41.
  8. Mal'dov D.G., Grigoryan S.S., Galegov G.A., Andronova V.L., Bel'kov A.P., Il'ichev A.V. Action of immunomodulatory drug Stimforte for herpesvirus infection. *Immunologiya.* 2011; 32(5): 250—6. (in Russian)
  9. Zuykova I.N., Shul'zhenko A.E., Mal'dov D.G., Il'ichev A.V., Pinegin B.V. Use of the drug «Stimforte» in the combined treatment of recurrent herpes infections. *Gerpes.* 2009; (2): 30—6. (in Russian)
  10. Andronova V.L., Galegov G.A., Yas'ko M.V., Kukhanova M.K., Skoblov Yu.S. Comparative study of drug resistance to acycloguanosine and acycloguanosine H-phosphonate in herpes simplex virus. *Voprosy virusologii.* 2010; 55(1): 31—4. (in Russian)
  11. Andronova V.L., Grokhovskiy S.L., Surovaya A.N., Deryabin P.G., Gurskiy G.V., Galegov G.A. Research of suppression of the herpes simplex virus reproduction with drug resistance using a combination 15-Lys-bis-Nt with some antiherpetic drugs. *Voprosy virusologii.* 2014; 59(1): 36—41. (in Russian)
  12. Korovina A.N., Gus'kova A.A., Skoblov M.Yu., Andronova V.L., Galegov G.A., Kochetkov S.N. et al. Analysis of mutations in DNA polymerase and Thymidine Kinase genes of Herpes Simplex Virus clinical isolates resistant to antiherpetic drugs. *Molekulyarnaya biologiya.* 2010; 44(3): 488—96. (in Russian)
  13. Nosik D.N., Nosik N.N., Kaplina E.N., Kalnina L.B., Kiseleva L.A., Kondrashina N.G. et al. Activity of «Ferrovir» preparation towards RNA and DNA viruses. *Voprosy virusologii.* 2002; 47(3): 21—3. (in Russian)
  14. Sarisky R.T., Nguyen T.T., Duffy K.E., Wittrock R.J., Leary J.J. Difference in incidence of spontaneous mutations between herpes simplex virus types 1 and 2. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000; 44(6): 1524—9.
  15. Elion G.B. Mechanism of action and selectivity of acyclovir. *Am. J. Med.* 1982; 73(1A): 7—13.
  16. Gaudreau A., Hill E., Balfour H.H. Jr., Erice A., Boivin G. Phenotypic and genotypic characterization of acyclovir-resistant herpes simplex viruses from immunocompromised patients. *J. Infect. Dis.* 1998; 178(2): 297—303.
  17. Sauerbrei A., Bohn K., Heim A., Hofmann J., Weissbrich B., Schnitzler P., et al. Novel resistance-associated mutations of thymidine kinase and DNA polymerase genes of herpes simplex virus type 1 and type 2. *Antivir. Ther.* 2011; 16(8): 1297—308.
  18. Melchjorsen J., Matikainen S., Paludan S.R. Activation and evasion of innate antiviral immunity by Herpes Simplex Virus. *Viruses.* 2009; 1(3): 737—59.
  19. Bel'kov A.P., Murugin V., Grigoryan S.S., Il'ichev A.V., Chubarova G.D., Mal'dov D.G. Activity of substances of Stimforte and their physicochemical characteristics. *Farmatsiya.* 2012; 61(4): 39—42. (in Russian)
  20. Mal'dov D.G., Andronova V.L., Balakina A.A., Il'ichev A.V., Galegov G.A. Influence of the immunomodulatory drug Stimforte on the humoral immune response in the experimental Herpes Simplex Virus infection. *Voprosy virusologii.* 2016; 61(4): 172—5. (in Russian)
  21. Mal'dov D.G., Il'ichev A.V., Lebedinskaya E.A., Fadeeva E.V., Lebedinskaya O.V., Akhmatova N.K. et al. Effect of Stimforte upon murine mononuclear leukocytes and lymphoid organs during Cyclophosphan treatment. *Meditinskaya immunologiya.* 2011; 13(2—3): 133—8. (in Russian)
  22. Shiratsuchi A., Watanabe I., Takeuchi O., Akira S., Nakanishi Y. Inhibitory effect of Toll-like receptor 4 on fusion between phagosomes and endosomes/lysosomes in macrophages. *J. Immunol.* 2004; 172(4): 2039—47.
  23. Barinskiy I.F., Nosik D.N., Kal'nov S.L., Nikitina A.A., L'vov N.D., Petrova M.S., et al. Activation of virus reproduction in mixed infection caused by HIV and Herpesviruses. *Voprosy virusologii.* 1994; 39(5): 223—6. (in Russian)
  24. Delany S., Mlaba N., Clayton T., Akpomiemie G., Capovilla A., Legoff J. et al. Impact of aciclovir on genital and plasma HIV-1 RNA in HSV-2/HIV-1 co-infected women: a randomized placebocontrolled trial in South Africa. *AIDS.* 2009; 23(4): 461—9.
  25. Lingappa J.R., Baeten J.M., Wald A., Hughes J.P., Thomas K.K., Mujigira A. et al. Daily acyclovir for HIV-1 disease progression in people dually infected with HIV-1 and herpes simplex virus type 2: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet.* 2010; 375(9717): 824—33.
  26. Lisco A., Vanpouille C., Tchesnokov E.P., Grivel J.C., Biancotto A., Brichacek B. et al. Acyclovir is activated into a HIV-1 reverse transcriptase inhibitor in herpesvirus-infected human tissues. *Cell Host Microbe.* 2008; 4(3): 260—70.
  27. Vanpouille C., Lisco A., Introini A., Grivel J.C., Munawwar A., Merbah M. et al. Exploiting the anti-HIV-1 activity of acyclovir: suppression of primary and drug-resistant HIV isolates and potentiation of the activity by ribavirin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012; 56(5): 2604—11.
  28. Tchesnokov E.P., Obikhod A., Massud I., Lisco A., Vanpouille C., Brichacek B. et al. Mechanisms Associated with HIV-1 Resistance to Acyclovir by the V75I Mutation in Reverse Transcriptase. *J. Biol. Chem.* 2009; 284(32): 21496—504.
  29. Alexaki A., Liu Y., Wigdahl B. Cellular reservoirs of HIV-1 and their role in viral persistence. *Curr. HIV Res.* 2008; 6(5): 388—400.
  30. Carter C.C., Onafuwa-Nuga A., McNamara L.A., Riddell J. 4th, Bixby D., Savona M.R. et al. HIV-1 infects multipotent progenitor cells causing cell death and establishing latent cellular reservoirs. *Nat. Med.* 2010; 16(4): 446—51.

Поступила 14.02.17

Принята в печать 25.04.17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 616.98:578.833.281-036.2(470.44) «2013—2015»

**Казорина Е.В.<sup>1</sup>, Красовская Т.Ю.<sup>1</sup>, Казанцев А.В.<sup>1</sup>, Найденова Е.В.<sup>1</sup>, Шарова И.Н.<sup>1</sup>, Захаров К.С.<sup>1</sup>,  
Поршаков А.М.<sup>1</sup>, Чекашов В.Н.<sup>1</sup>, Матросов А.Н.<sup>1</sup>, Шилов М.М.<sup>1</sup>, Яковлев С.А.<sup>1</sup>, Князева Т.В.<sup>1</sup>,  
Толоконникова С.И.<sup>1</sup>, Миронова Н.И.<sup>2</sup>, Частов А.А.<sup>3</sup>, Казакова Л.В.<sup>5</sup>, Кириллова Л.П.<sup>5</sup>, Красильникова Н.Н.<sup>4</sup>,  
Кожанова О.И.<sup>4</sup>, Щербакова С.А.<sup>1</sup>, Кутырев В.В.<sup>1</sup>**

## ЛИХОРАДКА ЗАПАДНОГО НИЛА НА ТЕРРИТОРИИ САРАТОВСКОЙ ОБЛАСТИ в 2013—2015 гг.

<sup>1</sup>ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»» Роспотребнадзора, 410005, г. Саратов;

<sup>2</sup>ГУЗ «Саратовская городская клиническая больница № 2 им. В.И. Разумовского», 410028, г. Саратов;

<sup>3</sup>Управление ветеринарии Правительства Саратовской области, 410069, г. Саратов;

<sup>4</sup>Управление Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Саратовской области, 410028, г. Саратов;

<sup>5</sup>ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Саратовской области», 410028, г. Саратов

С целью изучения циркуляции вируса Западного Нила (ВЗН) на территории Саратовской области и определения его роли в инфекционной патологии в 2013—2015 гг. были исследованы суспензии кровососущих членистоногих, органов птиц и мелких млекопитающих на наличие маркеров (антигенов и/или РНК) ВЗН, определен уровень иммунной к вирусу прослойки сельскохозяйственных животных и населения области, исследован клинический материал от больных с симптомами, не исключающими лихорадку Западного Нила (ЛЗН). В результате исследований маркеры этого вируса обнаружены в пробах полевого материала, собранного как в природных биотопах области, так и в черте Саратова, выявлена иммунная прослойка лошадей к ВЗН, зарегистрирован стабильный уровень иммунной прослойки населения области к этому возбудителю, ежегодно с 2012 г. регистрируются больные ЛЗН. Полученные данные подтверждают активную циркуляцию ВЗН на территории Саратовской области, формирование стойкого природного и антропоургических очагов ЛЗН.

Ключевые слова: *вирус Западного Нила; лихорадка Западного Нила; мониторинг циркуляции вируса Западного Нила; Саратовская область; природный очаг; антропоургический очаг.*

**Для цитирования:** Казорина Е.В., Красовская Т.Ю., Казанцев А.В., Найденова Е.В., Шарова И.Н., Захаров К.С., Поршаков А.М., Чекашов В.Н., Матросов А.Н., Шилов М.М., Яковлев С.А., Князева Т.В., Толоконникова С.И., Миронова Н.И., Частов А.А., Казакова Л.В., Кириллова Л.П., Красильникова Н.Н., Кожанова О.И., Щербакова С.А., Кутырев В.В. Лихорадка Западного Нила на территории Саратовской области в 2013-2015 гг. *Вопросы вирусологии*. 2017; 62(5): 219-226.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-5-219-226>

**Kazorina E.V.<sup>1</sup>, Krasovskaya T.Yu.<sup>1</sup>, Kazantsev A.V.<sup>1</sup>, Naydenova E.V.<sup>1</sup>, Sharova I.N.<sup>1</sup>, Zakharov K.S.<sup>1</sup>,  
Porshakov A.M.<sup>1</sup>, Chekashov V.N.<sup>1</sup>, Matrosov A.N.<sup>1</sup>, Shilov M.M.<sup>1</sup>, Yakovlev S.A.<sup>1</sup>, Knyazeva T.V.<sup>1</sup>,  
Tolokonnikova S.I.<sup>1</sup>, Mironova N.I.<sup>2</sup>, Chastov A.A.<sup>3</sup>, Kazakova L.V.<sup>5</sup>, Kirillova L.P.<sup>5</sup>, Krasilnikova N.N.<sup>4</sup>,  
Kozhanova O.I.<sup>4</sup>, Shcherbakova S.A.<sup>1</sup>, Kutyrev V.V.<sup>1</sup>**

### WEST NILE FEVER IN THE SARATOV REGION IN 2013-2015

<sup>1</sup>Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, 410005, Russian Federation;

<sup>2</sup>V.I. Razumovsky Saratov Clinical Hospital No.2, Saratov, 410028, Russian Federation;

<sup>3</sup>Veterinary Administration of the Saratov region Government, Saratov, 410069, Russian Federation;

<sup>4</sup>Rospotrebnadzor Administration in the Saratov region, Saratov, 410028, Russian Federation;

<sup>5</sup>Center of Hygiene and Epidemiology in the Saratov region, Saratov, 410028, Russian Federation

West Nile virus (WNV) circulation in the territory of Saratov region and its role in the infectious pathology were investigated. For this purpose, in studies conducted in 2013-2015, suspensions of bloodsucking arthropods, organs of birds and small mammals were analyzed for the presence of WNV markers (antigens and/or RNA). The seroprevalence level in live-stock animals and population of the region was evaluated; clinical samples from patients with symptoms compatible with West Nile fever (WNF) were analyzed. As a result of the investigations, WNV markers were detected in field samples gathered in natural biotopes and in the city of Saratov. Immunity to WNV was detected in horses. A stable domain of persons with immunity to this agent was revealed among regional population. Patients with WNF have been annually registered in the region since 2012. The obtained results confirm active circulation of WNF in the Saratov region, as well as formation of stable natural and anthropourgic foci.

Key words: *West Nile virus; West Nile fever; West Nile virus circulation monitoring; Saratov region; natural focus; anthropourgic focus.*

**For citation:** Kazorina E.V., Krasovskaya T.Yu., Kazantsev A.V., Naydenova E.V., Sharova I.N., Zakharov K.S., Porshakov A.M., Chekashov V.N., Matrosov A.N., Shilov M.M., Yakovlev S.A., Knyazeva T.V., Tolokonnikova S.I., Mironova N.I., Chastov A.A., Kazakova L.V., Kirillova L.P., Krasilnikova N.N., Kozhanova O.I., Shcherbakova S.A., Kutyrev V.V. West Nile fever in the Saratov region in 2013-2015. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2017; 62(5): 219-226. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-5-219-226>

**Для корреспонденции:** Казорина Екатерина Валерьевна, мл. науч. сотр. отдела диагностики инфекционных болезней ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»» Роспотребнадзора, 410005, г. Саратов. E-mail: [kazorina.katya@yandex.ru](mailto:kazorina.katya@yandex.ru)

**For correspondence:** Ekaterina V. Kazorina, junior researcher of the Department for Infectious Diseases Diagnostics, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: [kazorina.katya@yandex.ru](mailto:kazorina.katya@yandex.ru)

**Information about authors:**

Kazorina E.V., <http://orcid.org/0000-0002-1509-8763>

Krasovskaya T.Yu., <http://orcid.org/0000-0001-7663-5502>

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

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

Received 20 March 2017

Accepted 25 April 2017

## Введение

Ареал вируса Западного Нила (ВЗН) — возбудителя лихорадки Западного Нила (ЛЗН) охватывает огромные территории в пределах экваториального, тропического и умеренного климатических поясов в Африке, Европе, Америке, Азии, Австралии [1].

В Российской Федерации давние активные очаги ЛЗН существуют на юге европейской части в Астраханской и Волгоградской областях. Их активность подтверждается ежегодной регистрацией случаев заболевания ЛЗН с 1997 г. В последние годы получены данные о циркуляции ВЗН в более северных регионах европейской части России, а также в Сибири и на Дальнем Востоке. В некоторых из них уже регистрируются случаи заболевания [2, 3]. По данным Роспотребнадзора и Референс-центра по мониторингу возбудителя ЛЗН, в период с 1997 по 2015 г. было зарегистрировано около 2400 случаев заболеваний ЛЗН в 27 субъектах РФ.

Проблема ЛЗН актуальна и для Саратовской области, где с 2012 г. ежегодно регистрируются больные этим заболеванием [4]. Изучение циркуляции ВЗН на территории области ведется специалистами института «Микроб» с 1996 г. [5]. Наиболее активно исследование стало проводиться с 2010 г., когда произошло обострение эпидемиологической ситуации по ЛЗН в областях, граничащих с Саратовской (Волгоградской, Ульяновской и Воронежской) [6]. Было показано формирование сезонных очагов ЛЗН [7, 8], которым способствуют климатогеографические условия области и приграничное расположение эндемичных по данному заболеванию регионов. Эти же факторы благоприятствуют образованию при определенных условиях стойких природных очагов ЛЗН. При наличии условий для выплода комаров в городской черте возможно возникновение и антропоургических очагов.

Цель работы — мониторинг циркуляции ВЗН на территории Саратовской области и определение роли возбудителя в инфекционной патологии области.

Задачи исследования:

— выявление маркеров ВЗН в пробах потенциальных носителей и переносчиков;

— изучение иммунной к ВЗН прослойки населения области;

— исследование материала от лиц с заболеваниями, в этиологии которых нельзя исключить роль ВЗН;

— изучение эпидемиологических аспектов ЛЗН на территории области в сравнении с данными по РФ.

## Материал и методы

**Полевой материал.** Территория Саратовской области расположена на правом и левом берегах р. Волга в трех основных природных зонах (лесостепной, степной и полупустынной). Область включает 38 районов (в Правобережье — 20, в Левобережье — 18). Граничит на севере с Пензенской и Ульяновской областями, на северо-востоке

— с Самарской областью, на востоке — с Оренбургской, на западе — с Воронежской и Тамбовской, на юге — с Волгоградской областями, на юго-востоке — с Республикой Казахстан.

В 2013 и 2015 гг. потенциальных носителей и переносчиков ВЗН добывали на территории Саратовского и Энгельсского районов, расположенных в центральной части Саратовской области, а также в зеленой зоне Саратова; в южных районах — Красноармейском в Правобережье и Ровенском в Левобережье, занимающих приграничное положение с Волгоградской областью. В обследование были также включены по одному из центральных районов Правобережья и Левобережья области Воскресенский и Марковский соответственно. В 2013 г. дополнительно была обследована территория правобережного Лысогорского района и левобережного Александрово-Гайского — наиболее южного района области, расположенного на границе с Казахстаном. В 2014 г. был исследован материал, добытый на территории Саратова и Саратовского района, г. Энгельс и Энгельсского района. Все обследованные территории богаты водными биотопами и имеют широкий спектр обитавших видов мелких млекопитающих, птиц и эктопаразитов. Материал собирали вблизи населенных пунктов (городов, поселков, деревень), дачных кооперативов и зон рекреации.

Учитывая результаты эпидемиологического расследования случаев ЛЗН, зарегистрированных на территории Саратова, сбор личинок и имаго комаров осуществляли также в затопленных подвалах и подъездах многоэтажных домов, вблизи мест проживания больных и на прилегающих территориях (Заводской район в 2013—2015 гг., Октябрьский и Ленинский районы в 2015 г.).

В природных биотопах материал собирали во время экспедиционных выездов в сезон передачи ЛЗН, а в подвалах и подъездах — в течение года (ежемесячно в осенне-зимний период и 1—2 раза в месяц в весенне-летний период).

Сбор имаго комаров в природных биотопах проводили эксгаустерами по методу Гуцевича, а также стационарными ловушками Mosquito Magnet Independence и Mosquito Trap 64, личинок — сачком, клещей собирали на флаг или счесывали с птиц и млекопитающих. В подвалах домов имаго комаров отлавливали с помощью эксгаустеров и автомобильного пылесоса, приспособленного для отлова членистоногих, личинок собирали сачком или кюветами. Птиц добывали отстрелом и ловчими сетями, мелких млекопитающих — ловушками Геро, земноводных — сачком.

Членистоногих определяли до вида или рода и объединяли в пулы в количестве 1—50 экземпляров с учетом места сбора. Биологический материал от птиц и земноводных (суспензии головного мозга) тестировали индивидуально. От мелких млекопитающих исследовали суспензии внутренних органов — ткани печени и селезен-

Таблица 1

## Результаты исследования полевого материала, добытого на территории Саратовской области, на наличие маркеров ВЗН

Вид исследованного материала	2013 г.			2014 г.			2015 г.			Итого исследованных проб
	количество исследованных проб/экземпляров	количество проб с выявленными маркерами ВЗН		количество исследованных проб/экземпляров	количество проб с выявленными маркерами ВЗН		количество исследованных проб/экземпляров	количество проб с выявленными маркерами ВЗН		
		абс.	%		абс.	%		абс.	%	
Эктопаразиты:										
имаго комаров из урбанизированных биотопов	244/12040	7	2,9 ± 1,1	375/18672	2	0,5 ± 0,4	191/9376	0	0	810
личинки комаров из урбанизированных биотопов	136/6800	5	3,1 ± 1,6	146/7225	0	0	96/4800	0	0	378
имаго комаров из природных биотопов	122/3272	0	0	80/1938	0	0	267/9623	1	0,4 ± 0,4	469
личинки комаров из природных биотопов	н. и.	—	—	52/2540	0	0	8/400	0	0	60
Клещи	50/940	0	0	60/997	0	0	81/1129	0	0	191
Птицы	167/167	3	1,8 ± 1,0	90/90	1	1,1 ± 1,1	218/218	3	1,1 ± 0,8	475
Мелкие млекопитающие	291/487	0	0	411/411	1	0,2 ± 0,2	443/443	1	0,2 ± 0,2	1145
Земноводные	4/4	0	0	н. и.	—	—	н. и.	—	—	4
Всего исследованных проб...	1014			1214			1304			3532

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3: н. и. — не исследовали

ки, комплектовали индивидуальные или объединенные пробы (от 2 до 5 животных).

Итого в 2013—2015 гг. были исследованы 3532 пробы полевого материала (табл. 1).

*Иммунная прослойка населения.* Исследования биологического материала от людей одобрены комитетом по этике ГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» (протокол № 4 от 01.12.15).

С целью определения уровня иммунной к ВЗН прослойки населения Саратовской области в 2013—2015 гг. тестировали сыворотки крови здоровых жителей области: доноров (материал предоставлен ГУЗ «Саратовская областная станция переливания крови») и лиц, проходящих профилактические медосмотры (исследования проводили совместно с ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Саратовской области»). Забор крови осуществляли после завершения эпидсезона (в сентябре—октябре). Всего был протестирован 3471 образец сывороток крови, из них в 2013 г. 550, в 2014 г. 2311, в 2015 г. 610 (табл. 2).

*Иммунная прослойка сельскохозяйственных животных.* В 2013—2015 гг. тестировали образцы сывороток крови сельскохозяйственных животных (лошади) из районов Саратовской области. Всего исследовано 573 образца (табл. 3). Материал получен при содействии Управления ветеринарии Правительства Саратовской области.

*Клинический материал.* В 2013—2015 гг. с целью выявления больных ЛЗН в ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» в летне-осенний период проведены исследования клинического материала от 367 пациентов из медицинских организаций Саратова и Саратовской области с предварительными диагнозами: лихорадка неясной этиологии

(ЛНЭ), серозный менингит, серозный менингоэнцефалит, ОРВИ, геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС), ЛЗН и другими. В 2013 г. протестированы пробы от 203 человек, в 2014 г. — от 68 и в 2015 г. — от 96. Все обследуемые являются жителями Саратова и Саратовской области. Исследовали следующие виды биологического материала: кровь, сыворотку крови, взятые в острый период и период реконвалесценции, ликвор (при поражении центральной нервной системы) и мочу.

Пробы полевого материала тестировали с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) с целью выявления антигенов ВЗН, использовали набор реагентов «Биоскрин-ВЗН» (комплект «АГ») производства ЗАО «Биосервис» (г. Боровск, Калужская область). Сыворотки крови лошадей исследовали с применением тест-системы для выявления антител к ВЗН конкурентным иммуноферментным методом ID Screen West Nile Competition Multi-species производства «ID Vet» (Франция). Для обнаружения РНК возбудителя во всех видах биологического материала от носителей и переносчиков ВЗН с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) применяли набор реагентов «АмплиСенс WNV-F1» производства ООО «ИнтерЛабСервис» (Москва).

В сыворотках крови пациентов методом ИФА определяли специфические антитела классов IgM и IgG к ВЗН. Использовали диагностические препараты: «Биоскрин-ВЗН» (комплекты «G» и «M») производства ЗАО «Биосервис» (г. Боровск, Калужская область); «Вирус лихорадки Западного Нила IgM, полуколичественно», «Вирус лихорадки Западного Нила IgG, количественно» и «Вирус Западного Нила авидность IgG-антител» производства «Euroimmun AG» (Германия). С помощью ОТ-ПЦР-анализа в крови, сыворотке крови, ликворе и моче больных выявля-

Таблица 2

**Иммунная к ВЗН прослойка населения Саратовской области**

Город, район	2013 г.			2014 г.			2015 г.		
	количество обследованных	количество человек с выявленными маркерами ВЗН		количество обследованных	количество человек с выявленными маркерами ВЗН		количество обследованных	количество человек с выявленными маркерами ВЗН	
		абс.	%		абс.	%		абс.	%
г. Саратов и Саратовский	100	2	2,0 ± 1,4	621	20	3,2 ± 0,7	100	3	3,0 ± 1,7
г. Энгельс и Энгельский	100	3	3,0 ± 1,7	153	11	7,2 ± 2,0	60	2	3,3 ± 2,3
г. Балашов и Балашовский	100	4	4,0 ± 2,0	193	4	2,1 ± 1,0	200	11	5,5 ± 1,6
Красноармейский	100	8	8,0 ± 2,7	101	13	12,9 ± 3,4	100	1	1,0 ± 1,0
Ровенский	100	15	15,0 ± 3,6	124	13	10,5 ± 2,8	100	12	12,0 ± 3,3
Федоровский	50	5	10,0 ± 4,3	55	2	3,6 ± 2,5	50	0	0
Балаковский	н. и.	—	—	142	0	0	н. и.	—	—
Марковский	н. и.	—	—	115	4	3,5 ± 1,7	н. и.	—	—
Вольский	н. и.	—	—	107	2	1,9 ± 1,3	н. и.	—	—
Аркадакский	н. и.	—	—	102	4	3,9 ± 1,9	н. и.	—	—
Александрово-Гайский	н. и.	—	—	78	3	3,8 ± 2,2	н. и.	—	—
Ивантеевский	н. и.	—	—	69	4	5,8 ± 2,8	н. и.	—	—
Озинский	н. и.	—	—	68	3	4,4 ± 2,5	н. и.	—	—
Петровский	н. и.	—	—	63	0	0	н. и.	—	—
Ртищевский	н. и.	—	—	60	3	5,0 ± 2,8	н. и.	—	—
Калининский	н. и.	—	—	51	2	3,9 ± 2,7	н. и.	—	—
Краснокутский	н. и.	—	—	45	9	20,0 ± 6,0	н. и.	—	—
Лысогорский	н. и.	—	—	45	0	0	н. и.	—	—
Татищевский	н. и.	—	—	36	1	2,8 ± 2,8	н. и.	—	—
Новобурасский	н. и.	—	—	32	0	0	н. и.	—	—
Пугачевский	н. и.	—	—	21	0	0	н. и.	—	—
Новоузенский	н. и.	—	—	22	2	9,0 ± 6,2	н. и.	—	—
Базарно-Карабулакский	н. и.	—	—	3	0	0	н. и.	—	—
Аткарский	н. и.	—	—	2	0	0	н. и.	—	—
Балтайский	н. и.	—	—	2	0	0	н. и.	—	—
Екатериновский	н. и.	—	—	1	0	0	н. и.	—	—
Всего ...	550	37	6,7 ± 1,1	2311	100	4,3 ± 0,4	610	29	4,8 ± 0,9

Таблица 3

**Иммунная к ВЗН прослойка лошадей на территории Саратовской области**

Район	2013 г.			2014 г.			2015 г.		
	количество обследованных лошадей	количество лошадей с выявленными антителами к ВЗН		количество обследованных лошадей	количество лошадей с выявленными антителами к ВЗН		количество обследованных лошадей	количество лошадей с выявленными антителами к ВЗН	
		абс.	%		абс.	%		абс.	%
Воскресенский (с. Елшанка)	81	6	7,4 ± 2,9	106	5	4,7 ± 2,0	109	5	4,6 ± 2,0
Энгельский	н. и.	—	—	н. и.	—	—	77	28	36,4 ± 5,5
Ровенский	н. и.	—	—	н. и.	—	—	70	52	74,3 ± 5,3
Красноармейский	н. и.	—	—	н. и.	—	—	70	3	4,3 ± 2,4
Саратовский	н. и.	—	—	н. и.	—	—	60	6	10,0 ± 3,9
Всего ...	81	6	7,4 ± 2,9	106	5	4,7 ± 2,0	386	94	24,4 ± 2,2

ли РНК вируса, использовали набор реагентов «Ампли-Сенс *WNV-FI*» производства ООО «ИнтерЛабСервис» (Москва). Указанные выше диагностикумы для выявле-

ния IgG к ВЗН методом ИФА использовали и для определения уровня иммунной прослойки населения.

Все использованные диагностические препараты за-

регистрованы в РФ. Лабораторную диагностику проводили в соответствии с инструкциями по применению тест-систем и действующими нормативными документами: МУ 3.1.3.2600—10 «Мероприятия по борьбе с лихорадкой Западного Нила на территории Российской Федерации», МУК 4.2.3009—12 «Порядок организации и проведения лабораторной диагностики лихорадки Западного Нила для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней», СП 3.1.7.3107—13 «Профилактика лихорадки Западного Нила».

Исследования выполняли в соответствии с «Комплексным планом профилактических и противоэпидемических мероприятий по предупреждению заболеваний лихорадкой Западного Нила среди населения области на 2013—2015 гг.».

Статистическую обработку данных, полученных при исследовании биологического материала, проводили по методике В.Ю. Урбаха [9] — определяли стандартную ошибку доли вариант при альтернативном распределении.

### Результаты

**Полевой материал.** В 2013 г. маркеры ВЗН (антигены и РНК) выявлены только в биологическом материале от комаров и птиц, добытых на территории Саратова. При обследовании подвалов многоэтажных домов (Заводской район) было установлено наличие в них большого количества комаров и условий для их размножения. С целью изучения возможности формирования антропогенных очагов этого заболевания организованы сбор и исследование биологического материала в подвалах и подъездах жилых домов круглогодично, так как в этих объектах комары *Culex pipiens* обитали и размножались в течение года [10]. При исследовании проб суспензий комаров и их личинок, собранных в подвалах, антигены вируса обнаружены в 12(3,2 %) пробах, из них 7(2,9%) проб суспензий имаго комаров *C. pipiens* и 5(3,7%) проб суспензий личинок. Положительные результаты зарегистрированы в сентябре (1 проба комаров, 1 проба личинок), октябре (1 проба личинок) и ноябре (6 проб комаров, 3 пробы личинок), что подтверждает возможность трансвариальной и трансфазовой передачи вируса в популяции комаров в урбанизированных биоценозах [11] и способствует поддержанию очага ЛЗН.

При тестировании биологического материала от птиц, добытых отстрелом на полигонах твердых бытовых отходов, маркеры ВЗН обнаружены в 3(1,8%) пробах суспензий мозга птиц: РНК вируса обнаружена в 2 пробах от грача и серой вороны, в одной пробе (от обыкновенного скворца) выявлены антигены ВЗН. В полевом материале, добытом в других обследованных районах, маркеры ВЗН не были обнаружены (см. табл. 1).

В 2014 г. при исследовании полевого материала (эктопаразиты, птицы и мелкие млекопитающие) маркеры возбудителя, как и в предыдущем году, были выявлены у животных, добытых в пределах Саратова и Саратовского района. При тестировании на ВЗН материала, собранного в подвалах и подъездах многоквартирных жилых домов, где в предыдущем году были зарегистрированы больные ЛЗН (Заводской район), антигены ВЗН выявлены в 2(0,5%) пробах имаго подвальных комаров, собранных в январе и феврале. Обращает на себя внимание то, что положительные пробы зафиксированы в зимние месяцы, это свидетельствует в пользу формирования антропоургического очага.

При исследовании мелких млекопитающих, отловлен-

ных в черте Саратова, антигены ВЗН выявлены в одной (0,2%) пробе от мыши малой лесной (Ленинский район), а при исследовании проб биологического материала от птиц РНК вируса была обнаружена в суспензии мозга серой вороны (1,1%), добытой в п. Дубки (Саратовский район) (см. табл. 1). Таким образом, положительные результаты зарегистрированы у птиц и млекопитающих, добытых вблизи мест проживания людей.

В 2015 г. в результате лабораторных исследований проб полевого материала маркеры ВЗН обнаружены в 3(1,4%) пробах суспензий мозга птиц (большая синица, варакушка, серебристая чайка), добытых в с. Усть-Курдюм Саратовского района. Во всех пробах выявлена РНК вируса, а в пробе суспензии мозга варакушки, помимо РНК, методом ИФА обнаружены антигены ВЗН. Ранее уже была зафиксирована циркуляция ВЗН в этой местности — в 2013 г. зарегистрирован больной ЛЗН. При исследовании суспензий органов мелких млекопитающих РНК вируса была выявлена в одной (0,2%) пробе от мыши малой лесной, отловленной на территории Энгельсского района (с. Шумейка). При тестировании суспензий комаров, добытых в природных биотопах, положительные результаты были зафиксированы также в с. Шумейка — в одной из исследованных проб комаров (0,4%) выявлена РНК ВЗН (имаго *Ochlerotatus caspius*) (см. табл. 1). Этот маркер обнаружен в пробе комара из природного биотопа на территории Саратовской области впервые с момента изучения циркуляции ВЗН. При тестировании биологического материала от имаго и личинок комаров из урбанизированных биоценозов положительных результатов не зарегистрировано. Возможно, это явилось следствием того, что в 2015 г. была проведена работа по благоустройству и осушению подвалов многоэтажных домов, что значительно снизило численность комаров либо привело к их исчезновению. Регистрация маркеров ВЗН в 2015 г. на территории с. Шумейка подтверждает полученные ранее результаты, свидетельствующие о формировании здесь природного очага ЛЗН. Так, в 2010 г. при эпизоотологическом мониторинге на этой территории были зарегистрированы маркеры ВЗН в полевом материале (мелкие млекопитающие) [7]. В 2012 г. у 5 больных из г. Энгельса заражение ЛЗН произошло в окрестностях с. Шумейка.

Среди исследованных проб суспензий клещей образцы, содержащие маркеры ВЗН, обнаружены не были. Однако клещи не являются основными переносчиками ВЗН, кроме того, количество исследованных проб этих членистоногих было недостаточно большим. Среди нескольких проб органов земноводных образцы, содержащие РНК или антигены ВЗН, также не обнаружены.

**Иммунная прослойка населения.** С 2011 г. ежегодно регистрируется иммунная прослойка населения Саратовской области к ВЗН. Ее уровень в 2013—2015 гг. составлял от 3,6 до 6,7%. Средние показатели по области были наиболее высокими в 2013 г., что совпало с максимальной зарегистрированной заболеваемостью ЛЗН. В отдельных районах области уровень иммунной прослойки достигал 20%.

Так, в 2013 г. исследованы сыроворотки крови жителей районов, в которых в предшествующий исследованию год были выявлены больные ЛЗН или маркеры вируса в полевом материале. Антитела класса IgG к ВЗН обнаружены в 6,7% проб. Наиболее высокий уровень иммунной прослойки зарегистрирован в Ровенском — 15%, Красноармейском — 8% и Федоровском — 10% районах

области (см. табл. 2), что коррелирует с результатами проведенных ранее исследований [7].

В 2014 г. в исследование были дополнительно включены районы Саратовской области, расположенные как на левом, так и на правом берегах Волги в различных природно-климатических зонах (всего 24 из 38 районов). Иммунонный ответ к ВЗН был выявлен у 4,3% обследованных лиц. Иммунонная прослойка населения Саратова составила 3,2% ( $n = 20$ ). Антитела обнаруживали у жителей различных районов города. В 4,7% ( $n = 80$ ) случаев антитела к ВЗН выявлены у жителей 16 районов Саратовской области. Высокий уровень иммунонной прослойки зафиксирован в Энгельском (7,2%) и Красноармейском (12,9%) районах, в динамике (по сравнению с 2013 г.) отмечено ее увеличение. Также высокие показатели зарегистрированы у жителей левобережного Краснокутского района (20%) (см. табл. 2).

В 2015 г. антитела класса IgG к ВЗН выявлены в 4,8% исследованных сывороток. Высокие показатели уровня иммунонной прослойки зафиксированы в Балашовском (5,5%) и Ровенском (12%) районах (см. табл. 2).

*Иммунонная прослойка сельскохозяйственных животных.* Обращает на себя внимание факт выявления иммунонной прослойки сельскохозяйственных животных к ВЗН, являющейся маркером напряженности инфекционного процесса в антропогенных биоценозах. Лошади — один из наиболее чувствительных к ВЗН вид млекопитающих. Заражение может проявляться развитием клинических симптомов заболевания вплоть до поражения ЦНС. Поэтому регистрация иммунонной прослойки среди лошадей является индикатором интенсивности циркуляции ВЗН на территории [12, 13].

Иммунонная прослойка к ВЗН была зарегистрирована у лошадей во всех обследованных районах (см. табл. 3). При тестировании сывороток крови лошадей из Воскресенского района (с. Елшанка) иммунонный ответ регистрировался в течение 3 лет наблюдения. В 2015 г. при исследовании сывороток крови лошадей из Энгельского района в 36,4% образцов выявлены антитела к ВЗН. Полученные данные коррелируют с результатами многолетних исследований, проведенных в Энгельском районе (обнаружение маркеров вируса в полевом материале, ежегодная регистрация иммунонной прослойки населения к возбудителю, выявление ЛЗН у людей), и подтверждают активную циркуляцию здесь ВЗН. В Ровенском районе уровень иммунонной прослойки лошадей составил 74,3%. На этой территории также неоднократно выявляли маркеры ВЗН в полевом материале и ежегодно регистрировали высокую иммунонную прослойку населения к вирусу [7]. Все эти факты в комплексе свидетельствуют об активной циркуляции вируса на территории Ровенского района. При исследовании сывороток крови лошадей из Саратовского района антитела к ВЗН выявлены в 10% образцов (в 7,7% образцов из с. Усть-Курдюм и в 11,8% образцов из п. Дубки). В пробах суспензий мозга птиц, добытых на территории этих населенных пунктов в 2014 г. (п. Дубки) и 2015 г. (с. Усть-Курдюм), были обнаружены маркеры этого вируса. Иммунонная прослойка лошадей из Красноармейского района составила 4,3%. Здесь также ранее выявляли маркеры вируса в полевом материале и ежегодно регистрируется иммунонная прослойка населения к ВЗН [7]. Отмечено увеличение уровня иммунонной прослойки сельскохозяйственных животных в направлении с севера на юг, что соответствует предположению о более давней и активной циркуляции

вируса на граничащих с Волгоградской областью территориях.

Выявлена взаимосвязь между уровнем иммунонной к ВЗН прослойки населения и уровнем иммунонной прослойки сельскохозяйственных животных: иммунонная прослойка населения также высока в Энгельском и Ровенском районах.

*Клинический материал.* Среди обследуемых на ЛЗН в 2013 г., как и в 2012 г., преобладали пациенты с ЛНЭ, серозными менингитами и менингоэнцефалитами. В последующем в связи с изменением тактики диагностики ЛЗН в медицинских организациях, направленной на выявление как тяжелых форм заболевания, так и более легких, протекающих без поражения ЦНС, увеличилось количество обследуемых пациентов с предварительным диагнозом ОРВИ.

С 2013 г. в структуре обследуемых стала увеличиваться доля детей. Если в 2012 г. на долю детей приходилось 3,7%, а взрослых — 96,3%, то в 2013 г. — 29,1 и 70,9%, а в 2014 г. — 44,1 и 55,9% соответственно. В 2015 г. доли взрослых и детей были практически равны (дети — 47%, взрослые — 53%). Это стало следствием повышения настороженности инфекционистов в отношении ЛЗН.

На основании результатов лабораторного тестирования, клинических проявлений и эпидемиологического анамнеза диагноз ЛЗН в 2012 г. был поставлен 11 пациентам, в 2013 г. — 31, в 2014 г. — одному, в 2015 г. — 10. Всего с начала регистрации заболевания в области выявлены 53 больных. Летальных случаев ЛЗН в Саратовской области зафиксировано не было.

В 2013 г. (как и в 2012 г.) преобладали гриппоподобная и нейроинвазивная формы заболевания: гриппоподобная форма, среднетяжелое течение ( $n = 16$ ); нейроинвазивная форма, среднетяжелое течение ( $n = 7$ ); экзантематозная, среднетяжелое течение ( $n = 5$ ); нейроинвазивная, тяжелое течение ( $n = 2$ ); экзантематозная, легкое течение ( $n = 1$ ). В 2014—2015 гг. у всех зарегистрированных больных ЛЗН имела среднетяжелое течение без поражения ЦНС: в 2014 г. в гриппоподобной форме ( $n = 1$ ), в 2015 г. в экзантематозной ( $n = 6$ ) и гриппоподобной форме ( $n = 4$ ). В РФ за указанный период преобладали клинические формы ЛЗН без поражения ЦНС.

В 2013—2015 гг. в ходе лабораторного обследования больных с целью подтверждения диагноза ЛЗН маркеры вируса, соответствующие лабораторным критериям диагноза, были выявлены у 42 человек, из них у 41 пациента обнаружены антитела к ВЗН. При этом у 8 больных зарегистрирован только иммунонный ответ к возбудителю, из них у одного выявлены лишь антитела класса IgM (титр IgM 1:400). Максимальные регистрируемые титры антител классов IgM и IgG к ВЗН в 2013 г. составляли 1:3200, в 2014 г. — 1:1600, в 2015 г. — 1:800. В первый год официальной регистрации ЛЗН в Саратовской области (2012) были зафиксированы титры 1:6400. У 34 пациентов в крови выявлена РНК возбудителя на 2—22-й день заболевания. У одного пациента из маркеров ВЗН обнаружена лишь РНК вируса в крови. При исследовании ликвора РНК возбудителя зарегистрирована у 2 пациентов (в 1-й и 9-й день заболевания). В 2012 г. РНК в крови была обнаружена даже на 39-й день от начала заболевания.

С момента начала регистрации ЛЗН была зафиксирована у больных в возрасте от 3 до 76 лет. В структуре заболевших преобладали лица от 30 до 59 лет (трудоспособное население), их доля составила 75,3%. Эти

данные аналогичны данным по РФ. В 2013 г. на территории области ЛЗН была выявлена у детей — 2 девочки в возрасте 3 лет.

В 2013 г. доля мужчин в структуре заболевших была в 2 раза больше, чем женщин (65,5 и 34,5%), в 2012 г. доли мужчин и женщин были приблизительно равны (45,5 и 54,5%). В 2015 г. доминировали мужчины (70%).

Практически все больные ЛЗН в Саратовской области были городскими жителями (их доля составляла от 91 до 100%), средний показатель 94,5%. В РФ в этот период в структуре заболевших также преобладали жители городов (70,3%).

Превалировали местные случаи заражения, но имелись и завозные. В 2012 г. зарегистрирован 1 завозной случай из Краснодарского края, в 2013 г. — 1 из Астраханской области. В 2014 г. единственный случай ЛЗН расценен как завозной из Воронежской области.

Данные эпидемиологического анамнеза больных свидетельствовали в пользу трансмиссивного механизма передачи ЛЗН. Все пациенты указывали на контакт с природой (наличие водоемов недалеко от места жительства, отдых за городом), где отмечали нападение комаров. Однако многие из заболевших сообщили о наличии затопленных подвалов по месту жительства и работы и большом скоплении в них комаров.

В 2012 г. все случаи ЛЗН были зарегистрированы в районах Саратовской области (в структуре заболевших преобладали жители г. Энгельса). У единственного пациента из Саратова данные эпидемиологического анамнеза свидетельствовали о возможности заражения на территории Краснодарского края. В последующие годы все зарегистрированные пациенты были жителями Саратова и Саратовского района. Однако необходимо отметить, что снизилась доля обследуемых из районов области, где ранее были выявлены больные ЛЗН. В структуре заболевших в 2013 г. доминировали жители Заводского района Саратова. В 2015 г. случаи ЛЗН были выявлены практически во всех районах города.

Случаи заболевания в Саратовской области регистрировали с июля по октябрь. Пик заболеваемости приходился на август—сентябрь, что характерно в целом для территории РФ. Отличительные особенности имел эпидсезон 2013 г.: если в РФ было отмечено более раннее окончание эпидсезона (август), в Саратовской области случаи заболевания регистрировали даже в октябре.

### Обсуждение

Таким образом, полученные данные подтверждают активную циркуляцию ВЗН на территории Саратовской области, формирование антропоургических и природных очагов ЛЗН. В пользу этого свидетельствуют выявление маркеров вируса в пробах полевого материала, собранного как в природных биотопах области, так и в черте Саратова, регистрация стабильного уровня иммунной к этому возбудителю прослойки населения, ежегодная с 2012 г. регистрация больных ЛЗН, а также выявление иммунной прослойки сельскохозяйственных животных.

Учитывая ежегодную регистрацию иммунной прослойки населения с динамикой ее увеличения в ряде регионов области, можно предположить, что истинное число больных ЛЗН на территории Саратовской области значительно больше выявляемого. Это соответствует данным литературы [14, 15], согласно которым лишь 10—20% случаев ЛЗН приходится на клинически вы-

раженные формы. Выявление в 2014 г. в образцах крови доноров, проживающих на территории Саратовской области, маркеров ВЗН, указывающих на недавно перенесенное заболевание (IgM и/или низкоavidные IgG), также подтверждает этот факт [16].

Положительные результаты исследований клинического и полевого материала в 2013—2015 гг. были подтверждены Референс-центром по мониторингу за возбудителем ЛЗН (ФКУЗ «Волгоградский НИПЧИ» Роспотребнадзора). Проведено генотипирование образцов РНК ВЗН методом секвенирования фрагмента 5'-нетранслируемой области и участка гена С и определено, что вирус, циркулировавший на территории Саратовской области в 2013—2015 гг., принадлежит к генотипу 2. Именно этот генотип вируса обуславливает вспышки ЛЗН в последние годы в странах Европы и на европейской части РФ, за исключением Астраханской области, где циркулирует генотип 1.

С 2012 г. Саратовская область входит в число субъектов РФ, где ежегодно регистрируются случаи ЛЗН. В структуре общероссийской заболеваемости область занимает одно из ведущих мест. В 2013 г. случаи ЛЗН составили 15%, в 2015 г. — 24,4% от всех зарегистрированных в РФ, большая доля пришлась лишь на Астраханскую область (36,5%). Это определяет важное значение нового для здравоохранения Саратовской области инфекционного заболевания. Следует отметить, что на территории Волгоградской области, где существует многолетний природный очаг ЛЗН, откуда предположительно осуществлялся занос возбудителя в Саратовскую область, в 2015 г. не были выявлены больные, а из граничащих с Саратовской областью регионов лишь в Воронежской и Самарской областях зарегистрированы единичные случаи заболевания (3 и 4 соответственно).

Таким образом, учитывая характер сложившейся в 2015 г. в РФ и Саратовской области эпидемиологической ситуации по ЛЗН и результаты мониторинга циркуляции ВЗН в природе, можно сделать заключение о формировании на территории области стойкого природного и антропогенных очагов этой инфекционной болезни, что требует продолжения проведения эпидемиологического надзора за ЛЗН на территории Саратовской области.

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

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

### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 11, 13 см. REFERENCES)

1. Львов Д.К., ред. *Медицинская вирусология: Руководство*. М.: Медицинское информационное агентство; 2008.
2. Антонов В.А., Смоленский В.Ю., Путинцева Е.В., Липницкий А.В., Смелянский В.П., Яковлев А.Т. и др. Эпидемическая ситуация по лихорадке Западного Нила в 2011 году на территории Российской Федерации и прогноз ее развития. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2012; (1): 17—21.
3. Путинцева Е.В., Смелянский В.П., Бородай Н.В., Мананков В.В., Ткаченко Г.А., Шпак И.М. и др. Лихорадка Западного Нила в 2015 г. в мире и на территории Российской Федерации. Прогноз развития эпидемической ситуации в 2016 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016; (1): 33—9.
4. Красовская Т.Ю., Найденова Е.В., Миронова Н.И., Талаева Е.А., Куклев В.Е., Щербакова С.А. и др. Первые случаи лихорадки Западного Нила на территории Саратовской области. *Саратовский научно-медицинский журнал*. 2013; 9(3): 495—501.
5. Щербакова С.А., Билько Е.А., Клюева Е.В., Данилов А.Н., Плотникова Е.А., Тарасов М.А. и др. Экология распространения арбовирусов на территории Саратовской области. *Журнал*

- микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2005; (5): 27—30.
6. Матросов А.Н., Чекашов В.Н., Поршаков А.М., Яковлев С.А., Шилов М.М., Кузнецов А.А. и др. Условия циркуляции вируса и предпосылки формирования природных очагов лихорадки Западного Нила в Саратовской области. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2013; (3): 17—22.
  7. Красовская Т.Ю., Шарова И.Н., Найденева Е.В., Чекашов В.Н., Щербакова С.А., Билько Е.А. и др. Формирование очага лихорадки Западного Нила на территории Саратовской области. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2013; (5): 36—42.
  8. Красовская Т.Ю., Щербакова С.А., Шарова И.Н., Найденева Е.В., Билько Е.А., Чекашов В.Н. и др. Изучение циркуляции вируса Западного Нила на территории Саратовской области в 2010 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2011; (3): 13—7.
  9. Урбах В.Ю. *Математическая статистика для биологов и медиков*. М.: АН СССР; 1963.
  10. Поршаков А.М., Яковлев С.А., Захаров К.С., Матросов А.Н., Князева Т.В., Кузнецов А.А. и др. Роль комаров комплекса *Culex pipiens* в сохранении вируса лихорадки Западного Нила в урбанизированных биоценозах Саратова. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2014; (2): 66—8.
  12. Васильев А.В., Щелканов М.Ю., Джаркенов А.Ф., Аристова В.А., Галкина И.В., Львов Д.Н. и др. Заражаемость сельскохозяйственных животных вирусом Западного Нила в Астраханской области по данным серологического обследования (2001—2004 гг.). *Вопросы вирусологии*. 2005; 50(6): 36—41.
  14. Брико Н.И., Зуева Л.П., Покровский В.И., Сергиев В.П., Шкарин В.В. *Эпидемиология. Том 2*. М.: Медицинское информационное агентство; 2013.
  15. Львов Д.К., Писарев В.Б., Петров В.А., Григорьева Н.В. *Лихорадка Западного Нила: по материалам вспышек в Волгоградской области в 1999—2002 гг.* Волгоград: Издатель; 2004.
  16. Казорина Е.В., Красовская Т.Ю., Найденева Е.В., Казанцев А.В., Калинина Е.Н., Федотов Э.А. и др. Изучение возможности гемотрансфузионной передачи вируса Западного Нила на территории Саратовской области. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2015; (4): 70—3.
  - Kuklev V.E., Shcherbakova S.A. et al. First cases of West Nile fever in the territory of the Saratov Region. *Saratovskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal*. 2013; 9(3): 495—501. (in Russian)
  5. Shcherbakova S.A., Bil'ko E.A., Klyueva E.V., Danilov A.N., Plotnikova E.A., Tarasov M.A. et al. Ecology of arboviruses distribution in the territory of Saratov Region. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2005; (5): 27—30. (in Russian)
  6. Matrosov A.N., Chekashov V.N., Porshakov A.M., Yakovlev S.A., Shilov M.M., Kuznetsov A.A. et al. Conditions for virus circulation and premises for natural West Nile fever foci formation in the territory of the Saratov Region. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2013; (3): 17—22. (in Russian)
  7. Krasovskaya T.Yu., Sharova I.N., Naydenova E.V., Chekashov V.N., Shcherbakova S.A., Bil'ko E.A. et al. Formation of West Nile fever focus formation in the territory of the Saratov Region. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2013; (5): 36—42. (in Russian)
  8. Krasovskaya T.Yu., Shcherbakova S.A., Sharova I.N., Naydenova E.V., Bil'ko E.A., Chekashov V.N. et al. Studies of West Nile virus circulation in the territory of the Saratov Region in 2010. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2011; (3): 13—7. (in Russian)
  9. Urbakh V.Yu. *Mathematical Statistics for Biologists and Health Workers [Matematicheskaya statistika dlya biologov i medikov]*. Moscow: AN SSSR; 1963. (in Russian)
  10. Porshakov A.M., Yakovlev S.A., Zakharov K.S., Matrosov A.N., Knyazeva T.V., Kuznetsov A.A. et al. Role of mosquitoes, *Culex pipiens* complex, in West Nile fever virus persistence in urbanized biocoenoses of Saratov. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2014; (2): 66—8. (in Russian)
  11. Nelms B.M., Fechter-Leggett E., Carroll B.D., Macedo P., Klueh S., Reisen W.K. Experimental and Natural Vertical Transmission of West Nile Virus by California *Culex* (Diptera: Culicidae) Mosquitoes. *J. Med. Entomol.* 2013; 50(2): 371—8.
  12. Vasil'ev A.V., Shchelkanov M.Yu., Dzhar'kenov A.F., Aristova V.A., Galkina I.V., L'vov D.N. et al. Susceptibility of live-stock animals to West Nile virus in Astrakhan Region according to the data of serological examination (2001—2004). *Voprosy virusologii*. 2005; 50(6): 36—41. (in Russian)
  13. Kulasekera V.L., Kramer L., Nasci R.S., Mostashari F., Cherry B., Trock S.C. et al. West Nile virus infection in mosquitoes, birds, horses and humans. Staten Island, New York, 2000. *Emerg. Infect. Dis.* 2001; (7): 722—5.
  14. Briko N.I., Zueva L.P., Pokrovskiy V.I., Sergiev V.P., Shkarin V.V. *Epidemiology. Vol. 2 [Epidemiologiya. Tom 2]*. Moscow: Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo; 2013. (in Russian)
  15. L'vov D.K., Pisarev V.B., Petrov V.A., Grigor'eva N.V. *West Nile Fever: Following Outbreaks in the Volgograd Region in 1999—2002 [Likhoradka Zapadnogo Nila: po materialam vspyshek v Volgogradskoy oblasti v 1999—2002 gg.]*. Volgograd: Izdatel'; 2004. (in Russian)
  16. Kazorina E.V., Krasovskaya T.Yu., Naydenova E.V., Kazantsev A.V., Kalinina E.N., Fedotov E.A. et al. Feasibility study on hemotransfusion transmission of West Nile fever virus in the territory of the Saratov Region. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2015; (4): 70—3. (in Russian)

## REFERENCES

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017  
УДК 578.824.11:578.242].083.2

Генералов С.В., Ерохин П.С., Красовская Т.Ю., Осина Н.А., Абрамова Е.Г., Никифоров А.К., Щербакова С.А.

## ИЗУЧЕНИЕ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ ПОВЕРХНОСТИ КЛЕТОК ЛИНИИ VERO, ИНФИЦИРОВАННЫХ ВИРУСОМ БЕШЕНСТВА (RABV, LISSAVIRUS, RHABDOVIRIDAE)

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»» Роспотребнадзора, 410005, г. Саратов

Методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) изучены особенности влияния аттенуированного вируса бешенства штамма «Москва 3253» на морфологические параметры клеток перевиваемой линии Vero. Для подтверждения специфичности взаимодействия и определения инфекционной активности вируса бешенства использовали методы, основанные на фазово-контрастной микроскопии и иммунофлюоресценции. Получены изображения интактных и инфицированных вирусом бешенства клеток Vero в различные сроки культивирования вируса. Установлен характер изменения геометрических размеров клеток (длины, ширины, высоты) и шероховатости клеточной мембраны в зависимости от времени культивирования вируса бешенства. На протяжении наблюдения регистрировали как увеличение, так и уменьшение размеров клеток, при этом размеры инфицированной клетки превышали размеры интактной. Возрастание значений шероховатости клеточной мембраны при воздействии вируса бешенства наблюдалось в течение всего наблюдения, начиная с первых часов взаимодействия вируса с клеткой, при этом у интактных клеток Vero отмечали лишь незначительные изменения шероховатости мембраны, которые не зависели от возраста культуры. Установлена зависимость увеличения шероховатости клеточной мембраны от заражающей дозы вируса бешенства. Полученные результаты открывают перспективу разработки методического подхода к количественной оценке вируса бешенства *in vitro* с применением АСМ, при этом наиболее показательным параметром для учета результата представляется изменение шероховатости клеточной мембраны.

Ключевые слова: вирус бешенства; клеточная культура Vero; атомно-силовая микроскопия; шероховатость, ультраструктура поверхности клетки.

**Для цитирования:** Генералов С.В., Ерохин П.С., Красовская Т.Ю., Осина Н.А., Абрамова Е.Г., Никифоров А.К., Щербакова С.А. Изучение ультраструктуры поверхности клеток линии Vero, инфицированных вирусом бешенства (RABV, *Lissavirus*, *Rhabdoviridae*). *Вопросы вирусологии*. 2017; 62(5): 227-232.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-5-227-232>

**Generalov S.V., Erokhin P.S., Krasovskaya T.Yu., Osina N.A., Abramova E.G., Nikiforov A.K., Shcherbakova S.A.**

### A STUDY OF THE ULTRASTRUCTURE OF THE SURFACE OF THE TRANSPLANTABLE LINE VERO CELLS INFECTED WITH THE RABIES VIRUS (RABV, LISSAVIRUS, RHABDOVIRIDAE)

Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, 410005, Russian Federation

Characteristics of the effect of attenuated rabies virus strain «Moscow 3253» on morphological parameters of transplantable line Vero cells were studied by atomic force microscopy (AFM). Methods based on phase contrast microscopy and immunofluorescence were used to confirm the specificity of interaction and to identify the infectious activity of the rabies virus. Images of intact Vero cells and Vero cells infected with rabies virus were obtained at different periods of cultivation. The character of changes in the cell dimensions (length, width, height) and the cell membrane roughness depending on the rabies virus cultivation time was determined. During the observation period both increases and decreases in the size of the cells were recorded. The size of the infected cells exceeded that of the intact. An increase in the membrane roughness in cells exposed to rabies occurred during the entire period of observation, since the first hours of the interaction of the virus with the cell, while the intact Vero cells exhibited only minor changes in the membrane surface roughness, which were not dependent on the age of the culture. The dependence of the increase in the cell membrane roughness on the infecting dose of the rabies virus was determined. The obtained results open up the prospect of developing a methodological approach to the quantitative *in vitro* evaluation of the rabies virus using AFM. Changes in the cell membrane roughness appear to be the most indicative parameter for such evaluation.

**Key words:** Rabies virus; cell culture Vero; atomic force microscopy; roughness; surface ultrastructure of cells.

**For citation:** Generalov S.V., Erokhin P.S., Krasovskaya T.Yu., Osina N.A., Abramova E.G., Nikiforov A.K., Shcherbakova S.A. A study of the ultrastructure of the surface of the transplantable line Vero cells infected with the rabies virus (RABV, *Lissavirus*, *Rhabdoviridae*). *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2017; 62(5): 227-232. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-5-227-232>

**For correspondence:** Sergey V. Generalov, Candidate of biological sciences, leading researcher of the Prophylactic Immunoglobulin Laboratory, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: [svgeneraloff@gmail.com](mailto:svgeneraloff@gmail.com)

#### Information about authors:

Generalov S.V., <http://orcid.org/0000-0003-1461-5383>; Erokhin P.S., <http://orcid.org/0000-0001-9525-8327>; Krasovskaya T.Yu., <http://orcid.org/0000-0001-7663-5502>

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

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

Received 03 February 2017  
Accepted 28 February 2017

**Для корреспонденции:** Генералов Сергей Вячеславович, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории профилактических иммуноглобулинов ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, 410005, г. Саратов. E-mail: [svgeneraloff@gmail.com](mailto:svgeneraloff@gmail.com)

## Введение

Вирус бешенства, принадлежащий к семейству *Rhabdoviridae* и роду *Lyssavirus*, способен вызывать смертельно опасное заболевание, характеризующееся поражением центральной нервной системы. Проникновение вируса бешенства в клетку происходит главным образом путем эндоцитоза, а размножение — в цитоплазме клеток восприимчивого организма или тканевой культуры [1]. При изучении взаимодействия вируса бешенства и клеточных культур экстраневрального происхождения методом фазово-контрастной микроскопии далеко не всегда наблюдается цитопатическое действие [2, 3], которое обычно предполагает деструктивные изменения отдельных клеток и клеточного монослоя. Тем не менее некоторые штаммы вируса бешенства проявляют цитопатические свойства, которые обнаруживаются методом фазово-контрастной микроскопии в поздние сроки культивирования вируса [4]. На наш взгляд, при исследовании цитопатического действия вируса бешенства методом фазово-контрастной микроскопии инфицированный клеточный монослой в ряде случаев сложно отличить от интактного, особенно в поздние сроки культивирования, когда происходит отмирание и не инфицированных вирусом клеток.

Более полную характеристику взаимодействия вируса с клеткой позволяют получить методы атомно-силовой микроскопии (АСМ), которые в последние годы находят все большее применение для изучения поверхностной структуры микрообъектов: бактерий [5—7], вирусов и эукариотических клеток [8—12]. Эта технология дает возможность изучить процессы, происходящие на поверхности микрообъектов (экспрессию биомолекул, адгезивные свойства, упругость и шероховатость) при различных условиях, а также оценить и описать изменение морфофункциональных характеристик микрообъекта в целом в зависимости от влияния различных условий (изменение pH, температуры, присутствие антибиотиков и т. д.) [5, 7]. Методы АСМ широко используются для изучения процессов взаимодействия вирусов как с эукариотическими, так и с прокариотическими клетками [6, 8—12].

Цель исследования заключалась в изучении изменения ультраструктуры поверхности клеток перевиваемой линии Vero, инфицированных вирусом бешенства, методом АСМ в зависимости от длительности и степени воздействия вируса на клетку.

## Материал и методы

**Вирусы.** Для исследования использовали аттенуированный штамм вируса бешенства «Москва 3253», используемый в производстве антирабического иммуноглобулина. Штамм изначально получен из коллекции Научного центра экспертизы средств медицинского применения (Москва) и адаптирован в РосНИПЧИ «Микроб» к репродукции на перевиваемой линии клеток Vero.

**Клетки.** В работе использовали перевиваемую клеточную линию Vero (клетки почек зеленой мартышки), проверенную на отсутствие микоплазм. Клеточная линия получена из коллекции компании «Биолот» (Санкт-Петербург).

Культивирование клеток и вируса осуществляли на питательной среде Игла МЕМ с добавлением 10% сыворотки крупного рогатого скота (КРС) во флаконах с площадью поверхности 25 см<sup>2</sup>, а также 24- и 96-луночных

планшетах при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Состояние клеточного монослоя оценивали методом фазово-контрастной микроскопии с помощью инвертированного микроскопа Биомед-3И (Россия). После формирования монослоя, занимающего от 80 до 90% ростовой поверхности, клетки открепляли от поверхности флакона раствором трипсина и версена, взятых в соотношении 1:2, и суспендировали в питательной среде. Затем к клеточной суспензии добавляли вирусодержащую жидкость. Для инфицирования клеток вирус вносили в дозе от 0,01 до 1 ИД<sub>50</sub>/кл. Конечная концентрация клеток при этом составляла от 1,5 • 10<sup>5</sup> до 2,2 • 10<sup>5</sup> кл/мл. Отрицательным контролем являлась культура клеток, подготовленная аналогичным образом, но без добавления вирусодержащей жидкости. Активность вирусодержащей жидкости (титр) и специфичность взаимодействия вируса с клеточной культурой Vero оценивали методом иммунофлюоресценции с помощью люминесцентного микроскопа Nikon (Япония) [13, 14]. Для окрашивания использовали специфичный к вирусу бешенства иммуноглобулин, меченный ФИТЦ (г. Владимир).

**Атомно-силовая микроскопия.** Исследования проводили с помощью сканирующего зондового микроскопа Solver P47-PRO (NT-MDT, Россия) в режиме прерывистого контакта полуконтактным методом и методом расогласования [5]. При этом использовали кремниевые зонды серии NSG01 (NT-MDT, Россия) жесткостью 5,1 Н/м с радиусом кривизны 10 нм и резонансной частотой 150 кГц. Исследования проводили при оптимальных значениях основных параметров сканирования: амплитуды колебаний кантилевера Resonance 22 ед., начальной фазы его колебаний Phase 240°, скорости сканирования Frequency 0,75 Гц, коэффициента усиления цепи обратной связи FB Gain 0,3 ед., Set Point 19 ед. (величина Set Point и начальный уровень сигнала DFL определяли величину силы взаимодействия зонда с поверхностью образца). Среднюю арифметическую шероховатость поверхности клеточной стенки определяли методом Roughness analysis по 10 значениям, полученным в эксперименте, с указанием абсолютной погрешности [7].

Образцы для исследования методом АСМ готовили следующим образом. В стерильную пробирку из флакона переносили питательную среду, на которой культивировали клетки. Затем клетки промывали раствором DPBS, открепляли раствором трипсина и версена (1:2) и переносили в указанную пробирку. После центрифугирования при 1500 об/мин удаляли супернатант, а осадок для фиксации суспендировали в растворе глутарового альдегида (2,5%) и инкубировали в течение 2 ч при 4°C. Затем клетки осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 1500 об/мин, удаляли надосадочную жидкость и добавляли бидистиллированную воду в объеме 1 мл, ресуспендировали и повторно центрифугировали. На покровное стекло наносили 4 мкл суспензии и высушивали при комнатной температуре.

Обработку и анализ изображений проводили с использованием программы Image Analysis (NT-MDT, Россия). Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью программ Nova (NT-MDT, Россия), Microsoft Excel.

## Результаты

На первом этапе эксперимента оценивали динамику изменений исследуемых параметров с момента инфицирования клеточного монослоя до гибели клеток. Среднее время наблюдения составляло 96 ч.

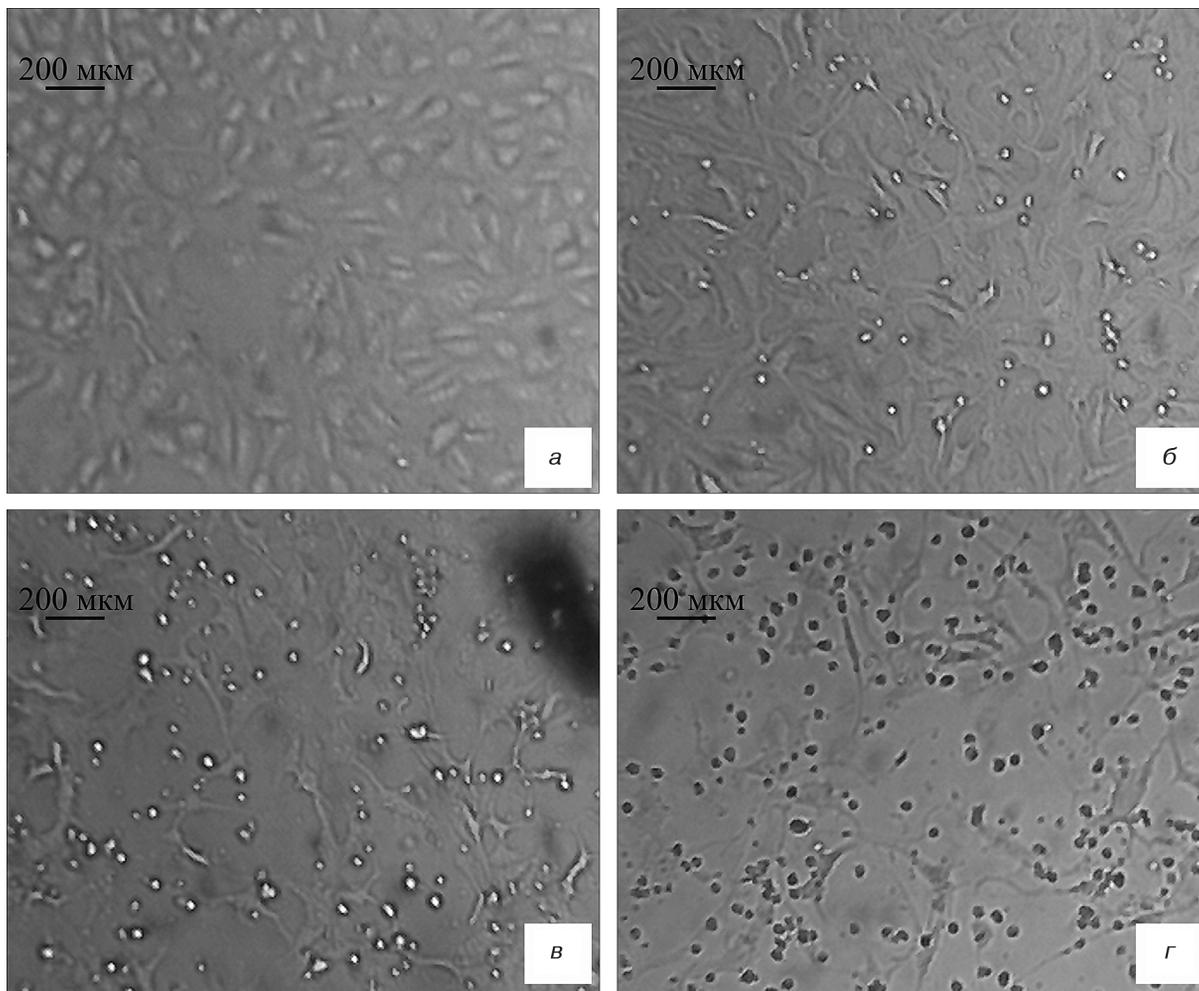


Рис. 1. Фазово-контрастная микроскопия интактного и инфицированного вирусом бешенства монослоя клеточной культуры Vero (ув. 100): *а* — интактный монослой (отрицательный контроль), 72 ч культивирования; *б* — интактный монослой (отрицательный контроль), 96 ч культивирования; *в* — инфицированный монослой, 72 ч культивирования; *г* — инфицированный монослой, 96 ч культивирования.

При оценке клеточного монослоя методом фазово-контрастной микроскопии через 48 ч культивирования не установлено различий между интактными и инфицированными клетками. Начало отмирания клеток инфицированного монослоя регистрировали на 3—4-е сутки культивирования (рис. 1). В интактном монослое мертвые клетки появлялись на 1 или 2 сут позже, при этом процесс отмирания инфицированного клеточного монослоя происходил быстрее. Методом люминесцентной микроскопии обнаруживали появление фокусов флюоресценции в инфицированном монослое через 48 ч после заражения, что свидетельствовало о репродукции вируса в клетке (рис. 2).

При анализе клеток Vero методом АСМ установлено, что вирус бешенства вызывал изменение ультраструктуры поверхности клетки (рис. 3). Уже после нескольких часов инфицирования на поверхности клетки регистрировали изменения, вызванные адсорбцией вируса и его внедрением в клетку. Через несколько суток после инфицирования наблюдали выпячивание клеточной мембраны, разрушения мембранной границы и экструзию содержимого клетки. Размеры инфицированной клетки варьировали на протяжении всего периода наблюдения в сторону как увеличения, так и

уменьшения, превышая при этом размеры интактной клетки (табл. 1).

Значения шероховатости клеточной стенки возрастали при воздействии вируса бешенства на протяжении всего эксперимента начиная с первых часов взаимодействия вируса с клеткой (рис. 4).

В первые 4 ч значение шероховатости инфицированных клеток возрастало в 2,5 раза относительно интактных клеток. К завершению эксперимента шероховатость инфицированных клеток увеличивалась более чем в 8 раз относительно исходного значения. При этом у интактных клеток Vero происходило незначительное изменение шероховатости. Таким образом, возраст культуры практически не оказывал влияния на состояние шероховатости клеточной мембраны.

Следующим этапом эксперимента являлся анализ изменений исследуемых параметров в зависимости от дозы вируса. Для заражения клеток использовали вирусосодержащую жидкость, активность которой составила 4,8 lg ИД<sub>50</sub>/мл. Из указанной вирусосодержащей жидкости готовили серию десятикратных разведений на питательной среде Игла MEM с 10% содержанием сыворотки

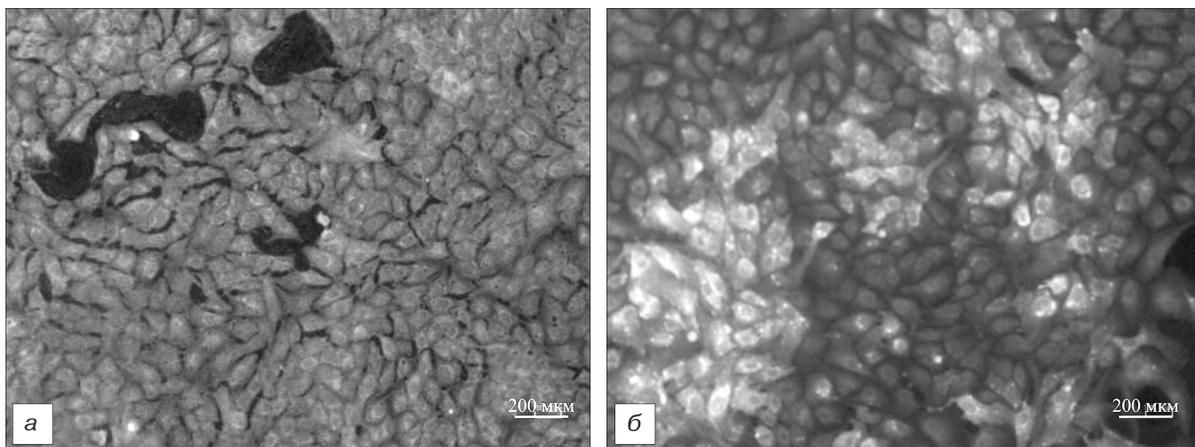


Рис. 2. Люминесцентная микроскопия intactного (а) и инфицированного вирусом бешенства монослоя (б) клеточной культуры Vero после 48 ч культивирования (ув. 200; окрашивание специфической сывороткой, меченной ФИТЦ).

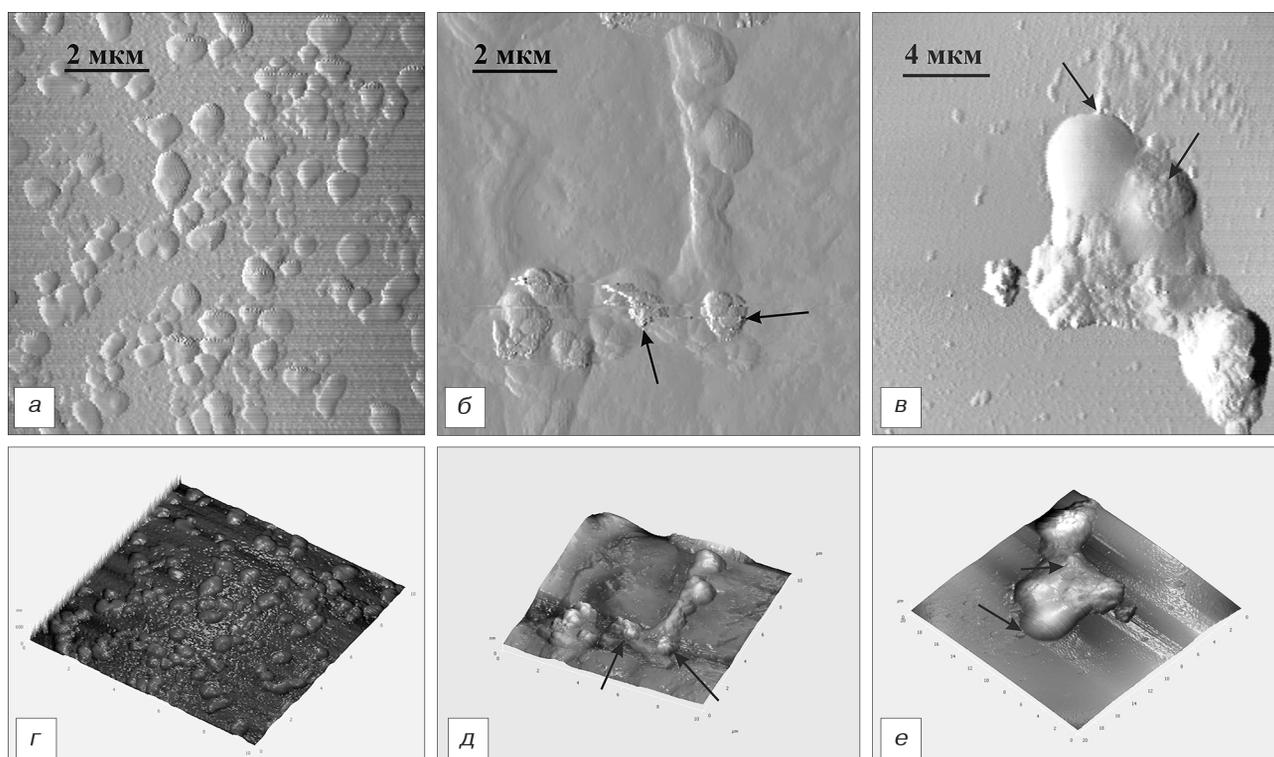


Рис. 3. АСМ intactного и инфицированного вирусом бешенства монослоя клеточной культуры Vero: а, г — intactные клетки Vero (отрицательный контроль) после 72 ч культивирования; б, д — клетки Vero через 4 ч после инфицирования; в, е — клетки Vero через 72 ч после инфицирования.

Стрелками показаны изменения на поверхности клеток, вызванные вирусом бешенства.

КРС в разведениях от  $10^0$  до  $10^{-7}$ . Затем к вирусосодержащей жидкости в указанных выше разведениях добавляли клеточную суспензию до конечной концентрации от  $0,5 \cdot 10^5$  до  $1,0 \cdot 10^5$  кл/мл. Значения геометрических размеров клетки и шероховатости поверхности клеточной мембраны оценивали через 4 ч. Результаты представлены в табл. 2 и на рис. 5.

### Обсуждение

Проведенное исследование с использованием методов АСМ показало, что фиксированный вирус бешенства «Москва 3253» при заражении клеток перевиваемой

линии Vero способствовал изменению их размеров. Установлено, что увеличение инфицирующей дозы приводило к более резким изменениям геометрических размеров клеток. Следует отметить, что увеличение размеров эукариотических клеток при их взаимодействии с вирусами, зарегистрированное методами АСМ, описано в ряде работ [10, 11]. Так, G. Lee и соавт. [10] наблюдали увеличение диаметра и периметра клеток Sf9 при инфицировании бакуловирусами, M. Moloney и соавт. [11] описывают увеличение геометрических размеров клетки ВНК-21, инфицированной вирусами леса Семлики и энцефаломиелита мышей. Увеличение размеров ин-

Таблица 1

**Характеристика размеров клеток Vero в зависимости от времени культивирования вируса бешенства «Москва 3253»**

Время, ч	Длина ( $M \pm m$ ), мкм		Ширина ( $M \pm m$ ), мкм		Высота ( $M \pm m$ ), мкм	
	интактные клетки	инфицированные клетки	интактные клетки	инфицированные клетки	интактные клетки	инфицированные клетки
0	8,5 ± 0,8	8,5 ± 0,8	2,5 ± 0,1	2,5 ± 0,1	0,80 ± 0,01	0,80 ± 0,01
1	8,5 ± 0,9	8,5 ± 0,7	3,0 ± 0,1	5,5 ± 0,2	1,70 ± 0,03	2,00 ± 0,01
4	9,0 ± 1,0	9,5 ± 1,1	5,5 ± 0,2	4,3 ± 0,1	1,90 ± 0,02	1,60 ± 0,01
24	13,0 ± 0,5	25,0 ± 1,1	6,5 ± 0,3	8,0 ± 0,3	2,10 ± 0,02	3,20 ± 0,04
48	15,0 ± 0,9	23,0 ± 1,3	4,0 ± 0,2	8,5 ± 0,1	1,70 ± 0,02	8,50 ± 0,03
72	7,0 ± 0,5	12,5 ± 0,8	3,0 ± 0,1	7,5 ± 0,2	1,40 ± 0,01	6,40 ± 0,02
96	7,0 ± 0,5	9,0 ± 0,5	3,2 ± 0,1	9,0 ± 0,3	2,20 ± 0,02	5,50 ± 0,04

Таблица 2

**Характеристика размеров клеток Vero в зависимости от инфицирующей дозы вируса бешенства (штамм «Москва 3253»)**

Исследуемый образец	Длина ( $M \pm m$ ), мкм	Ширина ( $M \pm m$ ), мкм	Высота ( $M \pm m$ ), мкм
Исходная (интактная) культура клеток Vero	7,0 ± 0,1	3,6 ± 0,1	0,80 ± 0,01
Отрицательный контроль (интактная культура клеток Vero)	6,0 ± 0,1	3,0 ± 0,1	0,80 ± 0,01
Культура клеток Vero, инфицированная вирусом в разведении $10^0$	41,0 ± 1,1	1,3 ± 0,1	2,8 ± 0,06
Культура клеток Vero, инфицированная вирусом в разведении $10^{-1}$	37,0 ± 1,5	9,2 ± 0,3	1,5 ± 0,03
Культура клеток Vero, инфицированная вирусом в разведении $10^{-2}$	33,0 ± 1,0	11,5 ± 0,4	2,5 ± 0,04
Культура клеток Vero, инфицированная вирусом в разведении $10^{-3}$	18,0 ± 0,7	11,0 ± 0,2	2,5 ± 0,03
Культура клеток Vero, инфицированная вирусом в разведении $10^{-4}$	12,0 ± 0,3	8,5 ± 0,2	1,7 ± 0,03
Культура клеток Vero, инфицированная вирусом в разведении $10^{-5}$	6,0 ± 0,1	2,5 ± 0,1	1,0 ± 0,01
Культура клеток Vero, инфицированная вирусом в разведении $10^{-6}$	8,5 ± 0,3	3,5 ± 0,1	1,5 ± 0,01
Культура клеток Vero, инфицированная вирусом в разведении $10^{-7}$	6,5 ± 0,2	2,5 ± 0,1	1,7 ± 0,02

фицированной клетки, по-видимому, связано с изменением структуры клеточной мембраны и как следствие с нарушением водно-солевого обмена. Увеличение размеров клетки также может быть обусловлено изменениями строения цитоскелета, нарушением цикла деления клетки, накоплением и выходом вирусных частиц [9, 12].

Интересным фактом, выявленным при изучении поверхности инфицированной клетки Vero, является резкое возрастание ее шероховатости в течение первых часов после заражения. Значительное увеличение шероховатости, на наш взгляд, можно объяснить адсорбцией вируса и проникновением его в клетку, а дальнейшее повыше-

ние значений шероховатости связано с выходом вируса из клетки и разрушением мембраны. В аналогичных исследованиях, посвященных изучению взаимодействия вирусов с клетками методами АСМ, также зарегистрированы различные изменения в морфологии мембраны [8—12], в том числе факт увеличения ее шероховатости [10, 11]. При этом М. Moloney и соавт. [11] отмечали сначала уменьшение значений шероховатости в течение первых часов взаимодействия клетки ВНК-21 с вирусом, а затем ее возрастание, связав это с репродукцией вирусов. В исследованиях G. Lee и соавт. [10] также продемонстрировано увеличение шероховатости клеточной мембраны при культивировании бакуловируса на клетках Sf9, при этом авторы предложили использовать изменения значенй шероховатости мембраны клетки для оценки выхода образующихся вирусных частиц.

В настоящем исследовании изменение шероховатости клеточной мембраны наглядно демонстрирует зависимость данного показателя от дозы заражения: ее повышение приводило к более заметному увеличению шероховатости. При анализе исследуемых образцов вирусосодержащей жидкости установлено, что максимальное разведение, которое вызвало достоверное изменение шероховатости мембраны клетки, соответствовало  $10^{-5}$ . Следует отметить, что аналогичный результат был получен при исследовании вышеуказанных образцов вирусосодержащей жидкости методом иммунофлюоресценции. Наибольшие разведения, при которых обнаруживали

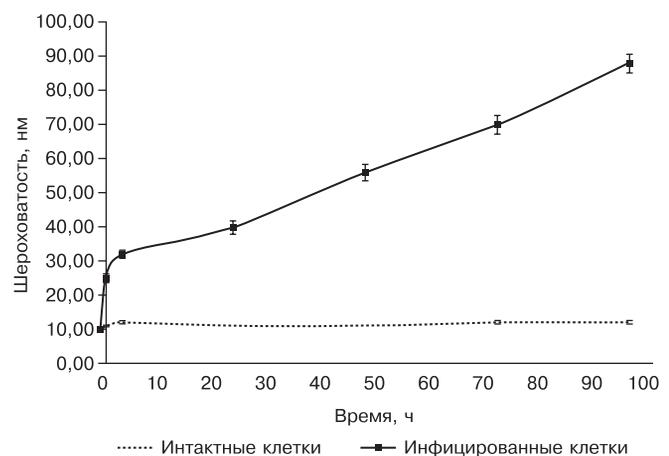


Рис. 4. Изменение шероховатости мембраны клеток Vero в процессе культивирования вируса бешенства.

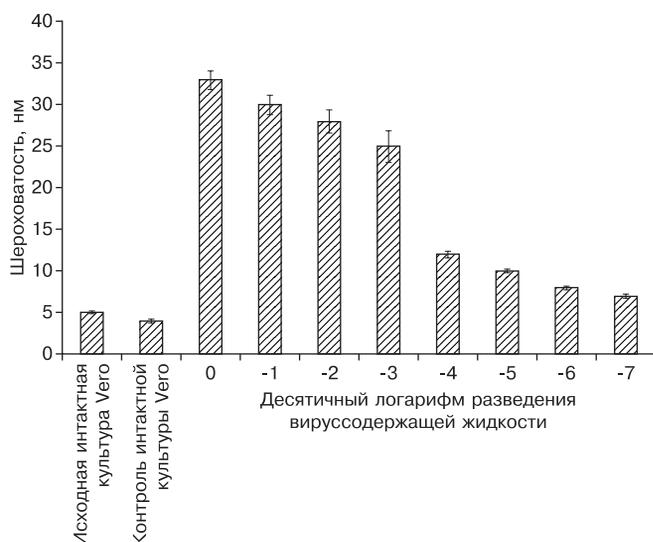


Рис. 5. Влияние заражающей дозы вируса бешенства на шероховатость мембраны клеток Vero.

фокусы флуоресценции при учете результата через 48 ч после инфицирования, также имели значения от  $10^{-4}$  до  $10^{-5}$ . Полученные результаты свидетельствуют о том, что параметр шероховатости клеточной мембраны является перспективным для разработки метода количественной оценки содержания вируса с применением АСМ.

### Выводы

1. Исследована ультраструктура поверхности клеток перевиваемой линии Vero при взаимодействии с аттенуированным штаммом вируса бешенства «Москва 3253» методом АСМ, получены изображения интактных и инфицированных вирусом бешенства клеток Vero в различные сроки культивирования вируса.

2. При исследовании влияния вируса бешенства на структуру клеточной мембраны в течение инфекционного процесса установлена зависимость изменения размеров клетки и шероховатости клеточной мембраны от заражающей дозы и времени культивирования вируса на клеточной культуре.

3. Полученные данные открывают перспективу для разработки методического подхода к количественной оценке вируса бешенства *in vitro*, при этом наиболее показательным параметром для учета результата представляется изменение шероховатости клеточной мембраны.

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

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

### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 3, 9—12, 14 см. В REFERENCES)

- Барышников П.И., Грязин В.Н., Зайковская А.В. *Современные проблемы бешенства животных*. М.: КолосС; 2007.
- Груздев К.Н., Недосеков В.В. *Бешенство животных*. М.: Аквариум; 2001.
- Сливко И.А., Недосеков В.В., Жестерев В.И., Горшкова Т.Ф., Курильчук Ю.Н., Анисимова Л.И. и др. Способ титрования антирабических вируснейтрализующих антител. Патент РФ 2254575; 2005.
- Уткин Д.В., Кузнецов О.С., Ерохин П.С., Спицын А.Н., Волох

О.А., Осина Н.А. Разработка методических подходов изучения возбудителей особо опасных инфекционных болезней с использованием атомно-силовой микроскопии. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2012; (2): 62—4.

- Уткин Д.В., Ерохин П.С., Осина Н.А., Коннов Н.П. Оценка фаголизальности штаммов холерных вибрионов с использованием атомно-силовой микроскопии. *Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология*. 2013; 13(3): 81—4.
- Артамонова М.Н., Потатуркина-Нестерова Н.И. Исследование топографии поверхности *Bacillus subtilis* в условиях гипотермии. *Фундаментальные исследования*. 2014; 11(5): 1035—9.
- Яковлева В.А., Лисицын Ф.В., Манькин А.А., Коньшева Т.А. Использование атомно-силовой микроскопии для исследования цитоморфологических признаков папилломовирусной инфекции. *Вопросы вирусологии*. 2009; (4): 32—6.
- Баркова И.П., Нагиева Ф.Г., Никулина В.Г., Лисаков А.Н. Быстрый культуральный метод для индикации антигенов вируса бешенства в инфицированных клеточных культурах. *Инфекция и иммунитет*. 2013; 3(4): 323—6.

### REFERENCES

- Baryshnikov P.I., Gryazin V.N., Zaykovskaya A.V. *Current Problems of Rabies in Animals [Sovremennye problemy beshenstva zhivotnykh]*. Moscow: KolosS; 2007. (in Russian)
- Gruzdev K.N., Nedosekov V.V. *Animal Rabies [Beshenstvo zhivotnykh]*. Moscow: Akvarium; 2001. (in Russian)
- Nagarajan T., Ramya R., Sivakumar S. The mouse neutralisation test. In: Rupprecht C., Nagarajan T., eds. *Current Laboratory Techniques in Rabies Diagnosis, Research and Prevention, Vol 2*. San Diego: Elsevier Academic Press; 2015: 189—98.
- Slivko I.A., Nedosekov V.V., Zhesterev V.I., Gorshkova T.F., Kuril'chuk Yu.N., Anisimova L.I. et al. Method for titration of antirabic virus-neutralizing antibodies. Patent RF 2254575; 2005. (in Russian)
- Utkin D.V., Kuznetsov O.S., Erokhin P.S., Spitsyn A.N., Volokh O.A., Osina N.A. Development of methodological approaches for examination of particularly dangerous infectious diseases agents by means of atomic power microscopy. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2012; (2): 62—4. (in Russian)
- Utkin D.V., Erokhin P.S., Osina N.A., Konnov N.P. Assessment of phage lysis of cholera vibrios strains using atomic force microscopy. *Izvestiya Saratovskogo universiteta. Novaya seriya. Seriya: Khimiya. Biologiya. Ekologiya*. 2013; 13(3): 81—4. (in Russian)
- Artamonova M.N., Potaturkina-Nesterova N.I. Research of *Bacillus subtilis* surface topography in hypothermia. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2014; 11(5): 1035—9. (in Russian)
- Yakovleva V.A., Lisitsyn F.V., Manykin A.A., Konyshcheva T.A. Use of atomic force microscopy to study the cytomorphological signs of papillomavirus infection. *Voprosy virusologii*. 2009; (4): 32—6. (in Russian)
- Lee J.V., Ng M.L. A nano-view of West Nile virus-induced cellular changes during infection. *J. Nanobiotechnology*. 2004; 2(1): 6.
- Lee G., Lee S., Young J., Quan F. Nanostructural Characterization of S19 Cells During Virus-Like Particles Generation. *Scanning*. 2016; 38(6): 735—42.
- Moloney M., McDonnell L., O'Shea H. Atomic force microscopy analysis of enveloped and non-enveloped viral entry into, end egress from, cultured cells. *Ultramicroscopy*. 2004; 100: 163—9.
- Tiwari P.M., Eroglu E., Buyoglu-Barnum S., He Q., Willing G.A., Vig K. et al. Atomic force microscopic investigation of respiratory syncytial virus infection in Hep-2 cells. *J. Microsc.* 2014; 253(1): 31—41.
- Barkova I.P., Nagieva F.G., Nikulina V.G., Lisakov A.N. The rapid culture method for the indication of rabies virus antigen in infected cell cultures. *Infektsiya i immunitet*. 2013; 3(4): 323—6. (in Russian)
- Dacheux L., Bourhy H. Virus isolation in cell culture: the rabies tissue culture infection test. In: Rupprecht C., Nagarajan T., eds. *Current Laboratory Techniques in Rabies Diagnosis, Research and Prevention, Vol 2*. San Diego: Elsevier Academic Press; 2015: 25—31.

Поступила 03.02.17

Принята в печать 28.02.17

## В ПОМОЩЬ ВИРУСОЛОГУ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017  
УДК 615.371:616.36-002-022-084

*Постнова Е.Л., Шалунова Н.В., Саркисян К.А., Мовсесянц А.А.*

### МЕТОДЫ ОЦЕНКИ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ГЕПАТИТА В

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, 127051, г. Москва

Одним из основных показателей качества вакцин для профилактики гепатита В наряду с их безопасностью является иммунологическая активность — специфическая активность. Проведен ретроспективный анализ применения лабораторных методов оценки специфической (иммуногенной) активности современных вакцин гепатита В по показателям содержания HBsAg методом *in vitro* и иммуногенной активности методом *in vivo* на мышах. Оба метода стандартизованы и содержатся в нормативных документах на зарегистрированные в РФ вакцины гепатита В отечественного производства. По показателям специфической (иммуногенной) активности вакцин гепатита В в период с 2013 по 2015 г. методом иммуноферментного анализа (ИФА) исследовано более 170 серий вакцин. На основании полученных результатов контроля подтверждены целесообразность и эффективность применения метода ИФА для определения содержания HBsAg, а также допустимость применения для испытаний методом ИФА вакцин гепатита В готовых наборов тест-систем Murex HBsAg Version 3. Анализ результатов лабораторного контроля серий вакцин гепатита В с применением биологического метода оценки иммуногенности по ED<sub>50</sub> подтверждает стабильно высокую иммуногенную активность российских коммерческих вакцин, предназначенных для профилактики гепатита В. Подтвержденная сопоставимость методов позволяет в дальнейшем уменьшить количество испытаний методом *in vivo* в пользу ИФА, достоверно характеризующего выпускаемый препарат.

Ключевые слова: *вирусный гепатит В; вакцина гепатита В; поверхностный антиген вируса гепатита В; HBsAg; специфическая активность; иммуноферментный анализ.*

*Для цитирования:* Постнова Е.Л., Шалунова Н.В., Саркисян К.А., Мовсесянц А.А. Методы оценки специфической активности препаратов для профилактики гепатита В. *Вопросы вирусологии*. 2017; 62(5): 233-240.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-5-233-240>

*Postnova E.L., Shalunova N.V., Sarkisyan K.A., Movsesyants A.A.*

### METHODS FOR ASSESSMENT OF THE SPECIFIC ACTIVITY OF DRUGS FOR PREVENTION OF HEPATITIS B

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, 127051, Russian Federation

The immunologic activity (specific activity) is one of the main indicators of quality of vaccines for prophylaxis of hepatitis B, along with their safety. Retrospective analysis of the use of laboratory methods for assessment of specific (immunogenic) activity of modern vaccines against hepatitis B using indicators was carried out: *in vitro* method based on evaluation of HBsAg content and *in vivo* method based on evaluation of immunogenic activity in mice. Both methods are standardized and described in normative documents on the vaccines against hepatitis B of domestic production registered in the Russian Federation. Indicators of specific (immunogenic) activity of vaccines against hepatitis B were used to investigate more than 170 vaccine series using the ELISA method in the period from 2013 to 2015. The obtained control results confirmed the expediency and efficiency of enzyme immunoassay for determination of HBsAg content, as well as permissibility of use of ready sets of the Murex HBsAg Version 3 test systems for testing vaccines against hepatitis B by the ELISA method. Analysis of the results of laboratory control of series of vaccines against hepatitis B using a biological method for immunogenicity evaluation based on ED<sub>50</sub> analysis confirms persistently high immunogenic activity of the Russian commercial vaccines intended for prophylaxis of hepatitis B. The confirmed comparability of methods allows the number of *in vivo* tests to be further reduced in favor of the enzyme immunoassay authentically characterizing the produced drug.

**Key words:** *viral hepatitis B; hepatitis B vaccine; surface antigen of a virus of hepatitis B; HBsAg; specific activity; ELISA.*

*For citation:* Postnova E.L., Shalunova N.V., Sarkisyan K.A., Movsesyants A.A. Methods for assessment of the specific activity of drugs for prevention of hepatitis B. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2017; 62(5): 233-240. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-5-233-240>

*For correspondence:* Evgeniya L. Postnova, Chief expert of Viral Vaccines Laboratory, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, 127051, Russian Federation. E-mail: [postnova@expm.ru](mailto:postnova@expm.ru)

*Для корреспонденции:* Постнова Евгения Леонидовна, канд. биол. наук, главный эксперт лаборатории вирусных вакцин ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, 127051, г. Москва. E-mail: [postnova@expm.ru](mailto:postnova@expm.ru)

**Information about authors:**Postnova E.L., <http://orcid.org/0000-0002-1798-4910>**Acknowledgments.** The study had no sponsorship.**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 13 June 2017

Accepted 20 June 2017

**Введение**

Вирусный гепатит В (ВГВ) вызывает разнообразные патологические процессы с поражением печени: острый циклический гепатит, хронический гепатит, носительство ВГВ, первичный рак печени, и в отличие от гепатита А значительно чаще наблюдаются среднетяжелые и тяжелые формы заболевания, возможен и фульминантный вариант [1]. Огромное число источников гепатита В и многообразие путей передачи этой инфекции обуславливают важность разработки возможных стратегий контроля и эрадикации вируса, среди которых главную роль в данный момент играет вакцинация. Длительные наблюдения за массовой вакцинацией в эндемичных районах показали, что применение вакцин на основе рекомбинантного HBsAg позволило снизить заболеваемость гепатитом В в несколько раз [2—4].

В настоящее время на территории Российской Федерации для профилактики ВГВ используются рекомбинантные дрожжевые вакцины, характеризующиеся слабой реактогенностью, выраженной протективной активностью и безопасностью. Вакцины против гепатита В даже при введении новорожденным в первые часы после рождения хорошо переносятся, давая выраженный защитный эффект. При этом отсутствует интерференция с материнскими антителами или пассивными антителами, содержащимися в специфическом иммуноглобулине против гепатита В. Полностью отсутствует интерференция и с другими вакцинами, в том числе входящими в календари профилактических прививок [5].

На современном этапе вакцина против гепатита В отечественного производства представляет собой сорбированный на адьюванте рекомбинантный поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) — белок, образующий наружную оболочку вируса и активно стимулирующий вирусспецифическую Т-клеточную реакцию. Вакцинный HBsAg получают путем культивирования генетически модифицированных дрожжевых клеток, содержащих рекомбинантную ДНК, с последующим их разрушением и выделением белка с использованием физико-химических методов, что исключает необходимость инактивации и контроля специфической безвредности. Используемый в вакцине антиген производится культурой генетически трансформированных дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* или *Hansenula polymorpha*.

На территории РФ на данный момент зарегистрировано 7 моновалентных вакцин для профилактики ВГВ различных производителей [6], две из которых отечественного производства: препарат Регевак® В производства ЗАО «Биннофарм» и «Вакцина гепатита В рекомбинантная дрожжевая» производства ЗАО «НПК Комбиотех». Поскольку циркулирующие в мире штаммы ВГВ однородны по антигенной характеристике HBsAg (известно несколько подтипов, различающихся субдетерминантами: ad, ay, adw, adr и другие), а наибольшее распространение (95—98%) на территории РФ имеет вирус с субтипом ayw [7], отечественные вакцины против ВГВ

содержат преимущественно HBsAg субтипа ayw либо субтипы adw и ayw одновременно.

Одним из основных показателей качества вакцин для профилактики гепатита В наряду с их безопасностью является иммунологическая активность — специфическая активность. Оценку данного показателя, согласно ФС.3.3.1.0026.15 «Вакцина гепатита В рекомбинантная» [8], проводят с использованием двух методов: твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА), в основе которого лежит принцип прямого определения концентрации антигена по отношению к референс-препарату, и определения иммуногенности препарата биологическим методом *in vivo* на мышах линии Balb/c. С одной стороны, система *in vivo* наиболее приближена к естественным условиям организма, однако вследствие сложности и многоплановости происходящих в живом организме процессов, огромного количества неизвестных и неконтролируемых клеточных взаимодействий нередко невозможно дать однозначное объяснение результатов. Экспериментальные системы *in vitro* являются более определенными [9]. В соответствии с рекомендациями ВОЗ определение специфической активности методом ИФА проводится для каждой серии конечной продукции, а при разработке и внедрении новых препаратов, регистрации или внесении изменений в технологию производства обязательным условием, определяющим качество, является изучение специфической активности *in vivo* на мышах или морских свинках [10]. Для отечественных препаратов использование метода *in vivo* показано только для каждой 10-й серии [11, 12].

Гарантией качества вакцин является биологическая стандартизация, регламентирующая комплекс требований к иммунобиологическому лекарственному препарату на всех этапах производства начиная с сырья, субстрата репродукции возбудителя и заканчивая методами контроля серии готового препарата [13]. К факторам, непосредственно обуславливающим качество вакцин, относятся адекватность, эффективность и стандартность используемых для подтверждения соответствия методик. Если первые два требования можно оценить при валидации методики, для подтверждения стандартности необходимо проведение ретроспективного анализа на выборке значительного объема.

Целями данного исследования являлись ретроспективный сравнительный анализ методов *in vitro* и *in vivo*, используемых для определения специфической активности вакцин гепатита В отечественного производства, оценка сопоставимости используемых методик, определение степени корреляции между содержанием HBsAg, установленным в ИФА, и иммуногенностью на мышах.

**Материал и методы**

**Препараты.** Для исследования были использованы результаты испытаний следующих коммерческих препаратов:

— 41 серия вакцины против гепатита В рекомбинантной «Вакцина гепатита В рекомбинантная дрожжевая» (ЗАО «НПК Комбиотех») субтипов ауw и адw, поступавшая на контроль с 2013 по 2015 г.;

— 138 серий вакцины против гепатита В рекомбинантной Регевак® В (ЗАО «Биннофарм», Зеленоград, Москва) субтипа ауw, поступавших на контроль с 2013 по 2015 г.;

— серии референс-препаратов.

Оценку методом *in vitro* осуществляли с использованием коммерческой тест-системы Murex HBsAg Version 3 производства «DiaSorin», Великобритания, РУ № ФСЗ 2012/12279. Данный набор является чувствительным средством ферментного иммуноанализа для определения поверхностного антигена вируса гепатита В в сыворотке или плазме крови человека.

Входной контроль тест-системы Murex HBsAg Version 3, а именно определение аналитической и диагностической чувствительности, проводили с использованием следующих стандартных образцов и панели сывороток:

— третьего международного стандарта HBsAg (HBV genotype B4, HBsAg subtypes ауw1/adw2) 12/226 NIBSC;

— набора реагентов ДС-СО-HBsAg (стандартный образец поверхностного антигена вируса гепатита В ТУ 9398-035-05941003—2009);

— панели сывороток крови, содержащих разные субтипы и мутантные формы HBsAg вируса гепатита В ТУ 9398-136-23548172—2011.

**Пробоподготовка.** Разведение исследуемых образцов вакцины и референс-препаратов готовили в трех независимых повторностях. В качестве разбавителя использовали буфер из тест-системы с добавлением 0,1—0,2% бычьего сывороточного альбумина. Каждое разведение готовили последовательно в соответствии с указаниями нормативной документации [11, 12]. Содержимое каждой пробирки после внесения пробы перемешивали на шейкере типа Vortex в течение 10—15 с. При исследовании использовали разведения, содержащие от 10 до 0,25 нг/мл.

Постановку ИФА и учет результатов проводили в соответствии с инструкцией по применению тест-системы Murex HBsAg Version 3. Статистическую обработку результатов выполняли методом параллельных линий с использованием программы PARALINE [14], разработанной непосредственно для определения специфической активности препаратов в сравнении с референс-образцами. Используя дисперсионный анализ, получали значения относительной активности вакцинного HBsAg по отношению к референс-препарату. Одновременно оценивали соответствие критериям валидности: соблюдение линейности, параллельности, значимости регрессии. Коэффициент корреляции, коэффициент вариации, стандартное отклонение и суммарные средние показатели ( $M \pm m$ ) определяли на основании значений полученных показателей для каждой исследованной серии ( $n$ ) вакцины с использованием компьютерной программы Microsoft Office Excel, где  $M$  — среднееарифметическое значение определяемого показателя,  $m$  — ошибка среднего.

Оценку методом *in vivo* осуществляли на самках мышей линии Balb/c массой 12—14 г. Иммунизацию проводили внутривенно в объеме 1 мл последовательными разведениями вакцины, приготовленными в соответствии с указаниями нормативной документации. Аналогично разводили соответствующие референс-препараты. В качестве разбавителя использовали 0,9%

раствор натрия хлорида, содержащий 0,35—0,65 мг/мл алюминия гидроксида (адьюванта). Данный раствор использовали и при иммунизации животных в качестве отрицательного контроля.

Иммунизацию проводили на группах мышах по 10 особей для каждого разведения. На 30-е сутки индивидуально от каждого животного брали кровь для получения сыворотки. Полученные сыворотки контролировали на наличие антител методом ИФА с использованием зарегистрированной в РФ иммуноферментной тест-системы, предназначенной для качественного и количественного определения антител к HBsAg ВектоHBsAg-антитела производства ЗАО «Вектор-Бест», РУ ФСР 201/13922. Затем вычисляли среднее арифметическое значение оптической плотности сывороток животных, которым вводили только разбавитель (отрицательный контроль). Положительными считали сыворотки, показатели оптической плотности (ОП) которых равны или выше среднего арифметического отрицательного контроля + 2 стандартных отклонения. Для каждой группы мышей вычисляли процент эффективности (показатель сероконверсии в %), которая выражается как отношение количества сероположительных мышей в группе к общему количеству мышей в группе, умноженному на 100.

Методом пробит-анализа (Statistica 10) рассчитывали  $ED_{50}$  испытуемой серии вакцины и референс-образца. Затем находили отношение  $ED_{50}$  референс-препарата к  $ED_{50}$  испытуемой вакцины.

Все испытания проведены на базе ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава РФ.

## Результаты

### Иммуноферментный анализ

Первоначально для испытаний вакцин гепатита В использовали тест-системы Abbott Auszyme Monoclonal фирмы «Abbott». Однако, поскольку наборы были сняты с производства, в 2011 г. была валидирована тест-система «Гепастрип» производства ООО «Ниармедик Плюс» [15]. В настоящее время используются наборы Murex HBsAg Version 3 производства «DiaSorin», валидированные производителями вакцин против ВГВ. Все указанные тест-системы имеют сходный и достаточно простой принцип применения. Методика основана на связывании исследуемого белка и специфических антител, сорбированных на твердой фазе — полистироловом планшете, с последующим выявлением образовавшегося комплекса антиген—антитело благодаря метке, которая в свою очередь детектируется спектрофотометрически.

Для испытаний готовили ряд разведений испытуемого образца и референс-препарата в зависимости от чувствительности используемого набора. На данный момент для готовых наборов тест-систем используют разведения HBsAg, содержащегося в вакцине, в диапазоне от 10 до 0,25 нг/мл. Чувствительность тест-системы должна быть адекватна количеству HBsAg в разведениях.

Поскольку чувствительность наборов Murex HBsAg Version 3 не указана в инструкции по применению, выполняли процедуру установления аналитической чувствительности. Экспериментально было установлено, что с использованием третьего международного стандарта HBsAg (HBV genotype B4, HBsAg subtypes ауw1/adw2) аналитическая чувствительность набора составляет 0,05 МЕ, а с использованием набора реагентов ДС-СО-HBsAg «Стандартный образец поверхностного

Таблица 1

Результаты анализа специфической активности (содержания HBsAg) методом ИФА

Препарат	Год/число серий	Норма по нормативной документации, мкг/мл	Средние показатели специфической активности, установленные методом ИФА, мкг/мл		
			$M \pm m$	$\sigma$	$V_\sigma, \%$
Вакцина гепатита В рекомбинантная дрожжевая	2013/16	Не менее 17	21,2 ± 0,63	2,53	11,9
	2014/7		22,5 ± 1,1	2,78	12,4
	2015/18		23,9 ± 0,69	2,91	12,2
Регевак® В	2013/53	От 17 до 23	19,7 ± 0,21	1,5	7,6
	2014/61		19,5 ± 0,2	1,65	8,5
	2015/24		19,6 ± 0,22	1,1	5,27

Примечание.  $M$  — среднее за год;  $\sigma$  — стандартное отклонение;  $V_\sigma$  — коэффициент вариации.

антигена вируса гепатита В» — 0,01 МЕ, что, согласно нормативной документации, позволяет использовать данную тест-систему.

Отечественные вакцины содержат как ауw-, так и адw-субтипы поверхностного антигена ВГВ, поэтому специфичность используемых наборов тест-систем также должна быть установлена в обязательном порядке. С этой целью было проведено тестирование образцов сывороток крови, содержащих разные субтипы и мутантные формы HBsAg ВГВ, входящие в набор «HBsAg — стандартная панель сывороток» производства ЗАО «Вектор-Бест». Каждая сыворотка представлена в трех разведениях (0,1, 0,5, < 0,05 МЕ/мл). Результаты тестирования сывороток показали, что специфичность тест-системы Murex HBsAg Version 3 составляет 100%.

Определение содержания HBsAg методом ИФА

Методом ИФА с использованием тест-системы Murex HBsAg Version 3 были проанализированы 138 серий препарата Регевак® В и 41 серия препарата «Вакцина гепатита В рекомбинантная дрожжевая».

Полученные результаты оценки представлены в табл. 1 как среднее значение содержания HBsAg за год.

Для препаратов «Вакцина гепатита В рекомбинантная дрожжевая» и Регевак® В среднее значение содержания

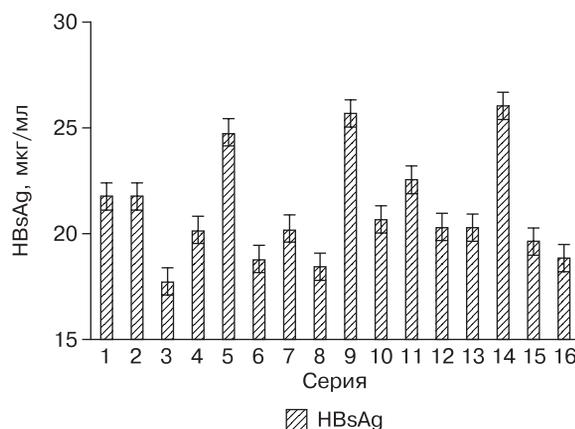


Рис. 1. Результаты оценки специфической активности методом ИФА препарата «Вакцина гепатита В рекомбинантная дрожжевая» за 2013 г.

HBsAg за 3 года составило 22,5 и 19,6 мкг/мл соответственно. Коэффициенты вариации для препарата Регевак® В находились в диапазоне от 5,27 до 7,6%, что говорит о незначительной степени рассеяния данных. Для препарата «Вакцина гепатита В рекомбинантная дрожжевая» коэффициент составил 11,9—12,4%, степень рассеяния данных в этом случае считается средней.

На рис. 1—6 отражены результаты посерийного контроля. Полученные данные наглядно демонстрируют, что все испытанные серии соответствуют допустимым пределам, предусмотренным требованиями утвержденных нормативных документов.

Определение иммуногенной активности на мышцах биологическим методом (тест in vivo)

Проанализированы результаты испытаний иммуногенности 11 серий препарата Регевак® В и 4 серий препарата «Вакцина гепатита В рекомбинантная дрожжевая». Полученные за 3 года результаты подтверждают соответствие изученных серий вакцин требованиям нормативных документов: для препарата «Вакцина гепатита В рекомбинантная дрожжевая» отношение  $ED_{50}$  референс-вакцины к  $ED_{50}$  серии испытуемого препарата варьировало от 0,7 до 2,27, для препарата Регевак® В — от 0,69 до 1,97; установленные коэффициенты ва-

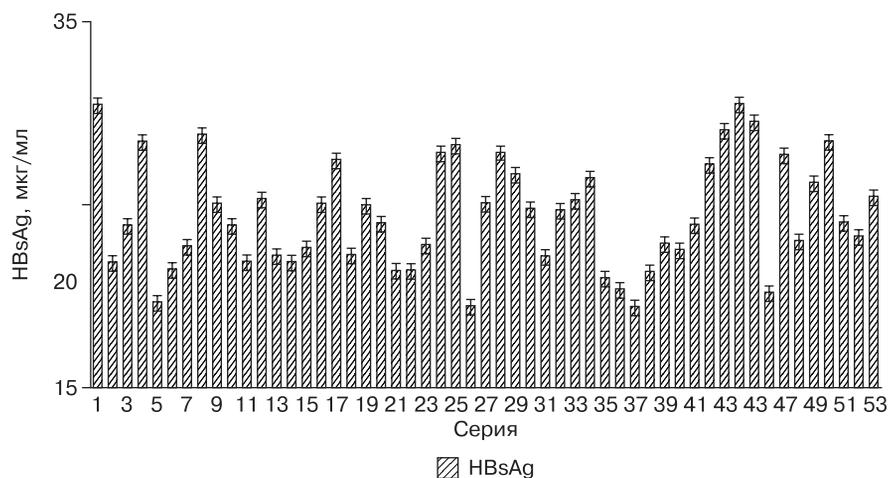


Рис. 2. Результаты оценки специфической активности методом ИФА препарата Регевак® В за 2013 г.

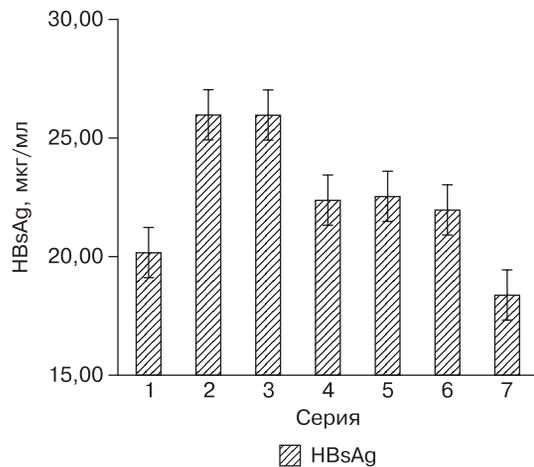


Рис. 3. Результаты оценки специфической активности методом ИФА препарата «Вакцина гепатита В рекомбинантная дрожжевая» за 2014 г.

риации позволяют сделать вывод о неоднородности анализируемых данных (табл. 2).

Сопоставление результатов, полученных с помощью ИФА и биологического метода с использованием мышей (см. табл. 2), показало, что для препарата Регевак® В коэффициент корреляции составил 0,7, для препарата «Вакцина гепатита В рекомбинантная дрожжевая» — 0,98.

Одним из подтверждений стандартности методики является воспроизводимость результатов. В связи с отсутствием международного стандарта вакцинного HBsAg была проведена статистическая обработка значений ОП, полученных для референс-препарата вакцины гепатита В на основе 17 независимых испытаний с использованием метода ИФА. Статистической обработке подвергли также полученные методом *in vivo* значения ЕД<sub>50</sub> референс-препарата Регевак® В. Результаты представлены в табл. 3.

### Обсуждение

ИФА основан на прямом выявлении вакцинного HBsAg и последующей обработке полученных результатов методом параллельных линий с использованием дисперсионного анализа [15]. Определение содержания HBsAg в испытуемых образцах вакцины проводят параллельно с определением содержания антигена в

референс-вакцине. Ввиду отсутствия международного стандарта для оценки иммуногенности рекомбинантных вакцин против гепатита В в качестве препаратов сравнения используют аналогичные вакцины того же производства — вакцинные референс-препараты, представляющие собой часть серии, иммуногенная активность которой первоначально была подтверждена в клинических испытаниях [10]. Испытания на специфическую активность проводят с использованием иммуноферментных тест-систем, предназначенных для определения HBsAg, зарегистрированных в РФ и валидированных для применения относительно конкретного препарата [16—18]. Получаемые с помощью ИФА данные позволяют в течение одного дня оценить иммуногенность производственных серий вакцины и подтвердить заявленное количество HBsAg.

В настоящем исследовании для испытаний использовали наборы тест-системы Murex HBsAg Version 3, чувствительность и специфичность которых были подтверждены и составили 0,05 МЕ/мл и 100% соответственно. Среднее значение содержания HBsAg за 3 года составило 22,5 мкг/мл для 41 серии препарата «Вакцина гепатита В рекомбинантная дрожжевая» и 19,6 мкг/мл для 138 серий препарата Регевак® В. Установленные коэффициенты вариации подтверждают низкую вариабельность данных. Все испытанные серии также соответствуют допустимым пределам, предусмотренным требованиями утвержденных нормативных документов. Более узкий разброс полученных значений активности для препарата Регевак® В, а именно 19,5—19,7 мкг/мл HBsAg, связан с обусловленными фармакопейной статьей предприятия более жесткими требованиями — ограничением верхнего предела содержания антигена — не более 23 мкг/мл. Полученные результаты свидетельствуют о стабильности технологии производства.

Другим способом оценки специфической активности вакцин гепатита В является исследование иммуногенности биологическим методом с использованием самок белых линейных мышей Balb/c массой 12—14 г. Исследование антигенной активности вакцин гепатита В проводят посредством оценки гуморального иммунитета в серологической реакции. Активность испытуемого вещества в этом случае выражается в единицах действия (ЕД). Согласно требованиям ФС.3.3.1.0026.15 «Вакцина гепатита В рекомбинантная дрожжевая», вакцина должна стимулировать выработку антител к HBsAg у однократно иммунизированных мышей. Отношение дозы иммуногенной активности референс-

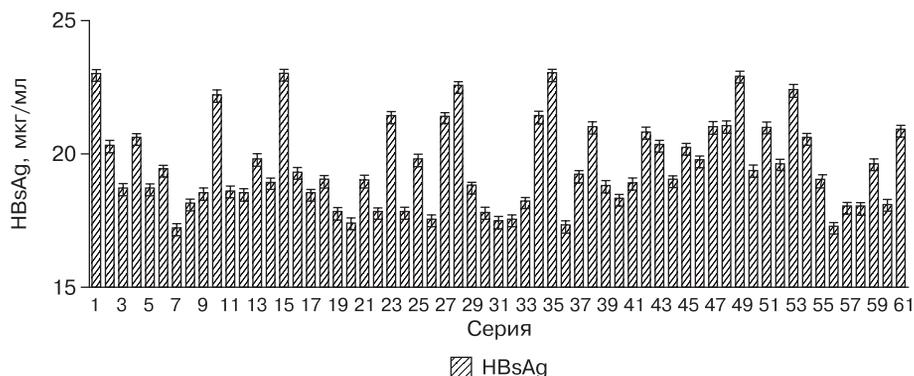


Рис. 4. Результаты оценки специфической активности методом ИФА препарата Регевак® В за 2014 г.

Таблица 2

Сравнение результатов испытания методом ИФА и на мышах

Препарат	Серия вакцины	ИФА, мкг/мл	Отношение ЕД <sub>50</sub> референс-вакцины к ЕД <sub>50</sub> испытуемой серии	Коэффициент корреляции	Коэффициент вариации ИФА/ коэффициент вариации «отношение ЕД <sub>50</sub> референс-вакцины к ЕД <sub>50</sub> испытуемой серии», %
Регевак® В	1	19,4	0,69	0,7	8,6/41,9
	2	20,0	1,6		
	3	17,2	0,63		
	4	17,66	0,62		
	5	17,58	0,7		
	6	19,8	1		
	7	21,44	1,1		
	8	18,16	0,79		
	9	20,32	1,97		
	10	22,4	1,4		
	11	20,3	1,1		
«Вакцина гепатита В рекомбинантная дрожжевая»	1	19,4	0,7	0,98	12,3/50,2
	2	26,1	2,27		
	3	22,0	1,0		
	4	23,14	1,5		

препарата вакцины гепатита В, вызывающей выработку антител у 50% мышей (ЕД<sub>50</sub> референс-препарата), к ЕД<sub>50</sub> испытуемой вакцины должно быть не менее 0,5. В качестве препарата сравнения также используют референс-препарат производителя. Анализ полученных с использованием метода *in vivo* результатов подтвердил соответствие изученных серий требованиям фармакопейных статей предприятий. Установленные коэффициенты вариации позволяют сделать вывод о низкой однородности результатов испытаний.

Сравнительная оценка результатов испытаний 15 серий вакцин гепатита В позволила установить зависимость иммуногенности препарата при определении на мышах от количества HBsAg, определенного в ИФА. Для препарата Регевак® В коэффициент корреляции составил 0,7, для препарата «Вакцина гепатита В реком-

бинантная дрожжевая» — 0,98. Различия в полученных значениях коэффициентов корреляции могут быть связаны как с объемом выборки, так и с различиями в составе вакцин.

Ввиду невозможности увеличения кратности испытаний одних и тех же серий вакцин воспроизводимость применяемых методик оценивали, используя результаты, полученные для референс-препарата вакцины Регевак® В. Коэффициент вариации для ОП референс-препарата вакцины гепатита В составил 11,4%, что подтверждает однородность совокупности и позволяет сделать вывод о воспроизводимости используемой методики ИФА для оценки специфической активности. Коэффициент вариации для ЕД<sub>50</sub> референс-препарата составил 55%, что говорит о значительной вариабельности данных.

**Заключение**

Мировая тенденция развития вакцинологии диктует необходимость максимального сокращения количества экспериментальных животных, используемых в процессе производства и контроля препаратов [19]. Одним из факторов гармонизации российских требований с требованиями международных фармакопей является отказ от практики использования лабораторных животных при

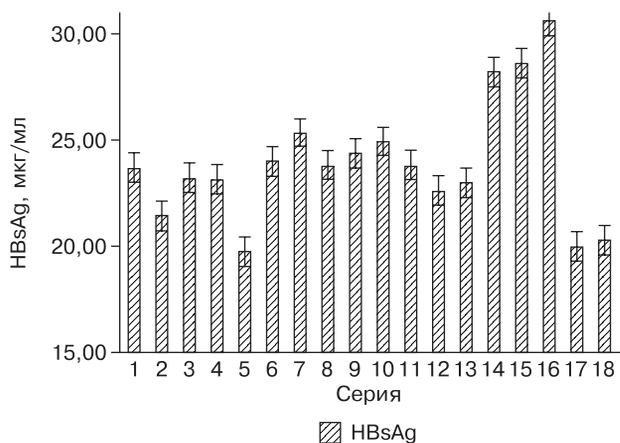


Рис. 5. Результаты оценки специфической активности методом ИФА препарата «Вакцина гепатита В рекомбинантная дрожжевая» за 2015 г.

Таблица 3

Результаты статистической обработки значений ОП и ЕД<sub>50</sub>, полученных для референс-препарата Регевак® В в испытаниях

Статистический параметр	Значения ОП, полученные для 1 нг/мл HBsAg	ЕД <sub>50</sub> референс-препарата
Среднее значение ( $M \pm m$ )	1,187 ± 0,287	1,945 ± 0,406
Стандартное отклонение	0,172961	1,07
Коэффициент вариации, %	11,4	55
Дисперсия	0,03158	1,15

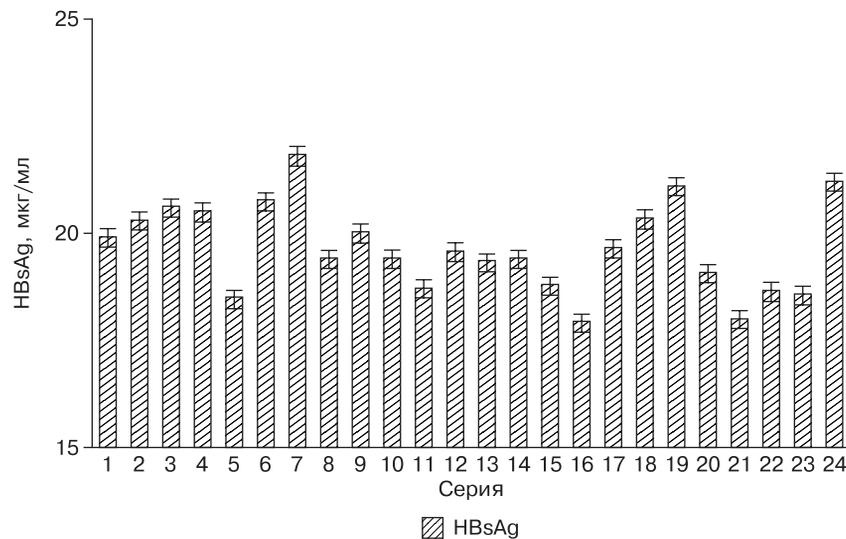


Рис. 6. Результаты оценки специфической активности методом ИФА препарата Регевак® В за 2015 г.

определении таких показателей качества, как иммунная активность, специфическая активность, токсичность, безвредность, и переход на методы *in vitro* [20]. Полученные результаты позволяют сделать вывод о сопоставимости методов и возможности уменьшения использования теста *in vivo* при рутинном анализе в пользу ИФА как основного метода для оценки специфической активности вакцин гепатита В.

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

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

#### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 2, 10, 17, 18 см. REFERENCES)

- Зверев В.В., Юминова Н.В. Вакцинопрофилактика вирусных инфекций от Э. Дженнера до настоящего времени. *Вопросы вирусологии*. 2012; (S1): 33—42.
- Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2014 году». Available at: [http://rosпотреbnadzor.ru/upload/iblock/22c/gd\\_2014\\_seb\\_dlya-sayta.pdf](http://rosпотреbnadzor.ru/upload/iblock/22c/gd_2014_seb_dlya-sayta.pdf)
- Грачев В.П., Карганова Г.Г., Хапчаев Ю.Х. Критерии оценки качества вирусных вакцин для профилактики актуальных вирусных инфекций. *Биопрепараты*. 2005; (1): 2—3.
- Бектимиров Т.А., Горбунов М.А., Шалунова Н.В., Павлова Л.И. Результаты регистрационных испытаний вакцины Эувак В для профилактики гепатита В. *Вирусный гепатит В: 350 млн. хронических носителей*. 1999; №4(4). Available at: <https://medi.ru/info/6079>
- Государственный реестр лекарственных средств. Available at: <http://grls.rosminzdrav.ru/default.aspx>
- Комбиотех. Справка о значении соответствия вакцины субтипу поверхностного антигена вируса гепатита В. Available at: <http://www.combiotech.com/serotypes.htm>
- ФС.3.3.1.0026.15. Вакцина гепатита В рекомбинантная. М.; 2015.
- Кондратьева И.А., Ярилин А.А., Егорова С.Г., Фрезе К.В., Воробьева Н.В., Буракова О.В. и др. *Практикум по иммунологии: Учебное пособие для студентов высших учебных заведений*. М.; Академия; 2004.
- ФСП Р N003741/01-040310. «Регевак В», вакцина против гепатита В, рекомбинантная дрожжевая жидкая, суспензия для внутримышечного введения 20 мкг/мл.
- ФСП Р N000738/01-191107. Вакцина гепатита В рекомбинантная дрожжевая, суспензия для внутримышечного введения.
- Воробьева М.С., Афонина О.С., Бархалева О.А., Щербинина М.С., Саркисян К.А., Рукавишников А.В. и др. Анализ многолетнего опыта изучения инактивированных культуральных вакцин для профилактики клещевого энцефалита отечественного и зарубежного производства по показателю качества — специфическая активность (иммуногенность). *Биопрепараты*. 2015; (4): 4—10.
- Петухов В.Г. Метод параллельных линий для количественной оценки качества стандартных образцов и других МИБП в иммуноферментном анализе. *Биопрепараты*. 2004; (1): 19—23.
- Коровкин А.С., Шалунова Н.В. Изучение возможности применения отечественных коммерческих иммуноферментных тест-систем для определения специфической активности вакцин против гепатита В. *Биофармацевтический журнал*. 2011; 3(4): 34—40.
- Бектимиров Т.А. Международные требования к испытанию стабильности медицинских иммунобиологических препаратов. *Биопрепараты*. 2006; (3): 28—9.
- Эльберт Л.Б., Воронич М.Ф., Тимофеев А.В. Сравнительный анализ тестов *in vitro* и *in vivo* количественной оценки иммуногенности вакцины клещевого энцефалита. *Вопросы вирусологии*. 1998; 43(5): 23—8.
- Мовсесянц А.А., Бондарев В.П., Олефир Ю.В., Меркулов В.А., Шимчук Л.Ф. Стандарты качества иммунобиологических лекарственных препаратов — новое в Государственной фармакопее Российской Федерации. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2016; (2): 38—41.

#### REFERENCES

- Zverev V.V., Yuminova N.V. Vaccines. Prevention of viral infections from E. Jenner to date. *Problems of Virology. Voprosy virusologii*. 2012; (S1): 33—42. (in Russian)
- Ni Y.H., Chang M.H., Huang L.M., Chen H.L., Hsu H.Y., Chiu T.Y. et al. Hepatitis B virus infection in children and adolescents in a hyperendemic area: 15 years after mass hepatitis B vaccination. *Ann. Intern. Med.* 2001; 135(9): 796—800.
- State report «On the state of sanitary and epidemiological welfare of the population in the Russian Federation in 2014». Available at: [http://rosпотреbnadzor.ru/upload/iblock/22c/gd\\_2014\\_seb\\_dlya-sayta.pdf](http://rosпотреbnadzor.ru/upload/iblock/22c/gd_2014_seb_dlya-sayta.pdf) (in Russian)
- Grachev V.P., Karganova G.G., Khapchaev Yu.Kh. Criteria for assessing the quality of viral vaccines for the prevention of topical viral infections. *Biopreparaty*. 2005; (1): 2—3. (in Russian)
- Bektimirov T.A., Gorbunov M.A., Shalunova N.V., Pavlova L.I.

- Results of registration tests of the Euvax B vaccine for the prevention of hepatitis B. *Virusnyy gepatit B: 350 mln. khronicheskikh nositeley*. 1999; №4(4). Available at: <https://medi.ru/info/6079> (in Russian)
6. State Register of Medicinal Products. Available at: <http://grls.rosminzdrav.ru/default.aspx> (in Russian)
  7. Combiotech. Reference on the importance of vaccine compliance with the subtype of the surface antigen of the hepatitis B virus. Available at: <http://www.combiotech.com/serotypes.htm> (in Russian)
  8. Pharmacopoeia article 3.3.1.0026.15. Recombinant hepatitis B vaccine. Moscow; 2015. (in Russian)
  9. Kondrat'eva I.A., Yarin A.A., Egorova S.G., Freze K.V., Vorob'eva N.V., Burakova O.V., et al. *Practical Work on Immunology: Textbook for Students of Higher Educational Institutions [Praktikum po immunologii: Uchebnoe posobie dlya studentov vysshikh uchebnykh zavedeniy]*. Moscow: Akademiya; 2004. (in Russian)
  10. WHO. Recommendations to Assure the Quality, Safety and Efficacy of Recombinant Hepatitis B Vaccines. Available at: [http://www.who.int/biologicals/HEP\\_B\\_Recomm\\_after\\_ECBS\\_endorsment\\_final.pdf](http://www.who.int/biologicals/HEP_B_Recomm_after_ECBS_endorsment_final.pdf)
  11. Pharmacopoeial article N003741/01-040310. «Regevax B» Hepatitis B vaccine, recombinant yeast liquid, suspension for intramuscular injection of 20 µg/ml. (in Russian)
  12. Pharmacopoeial article N000738/01-191107. Hepatitis B recombinant yeast, suspension for intramuscular injection. (in Russian)
  13. Vorob'eva M.S., Afonina O.S., Barkhaleva O.A., Shcherbinina M.S., Sarkisyan K.A., Rukavishnikov A.V., et al. The analysis of long-term experience of studying inactivated culture vaccines for the prevention of tick-borne encephalitis of domestic and foreign production in terms of the quality index is a specific activity (immunogenicity). *Biopreparaty*. 2015; (4): 4—10. (in Russian)
  14. Petukhov V.G. Method of parallel lines for the quantitative evaluation of the quality of standard samples and other MIBP in enzyme immunoassay. *Biopreparaty*. 2004; (1): 19—23. (in Russian)
  15. Korovkin A.S., Shalunova N.V. Study of the possibility of using domestic commercial immunoenzyme test systems to determine the specific activity of vaccines against hepatitis B. *Biofarmatsevticheskiy zhurnal*. 2011; 3(4): 34—40. (in Russian)
  16. Bektimirov T.A. International requirements for testing the stability of medical immunobiological drugs. *Biopreparaty*. 2006; (3): 28—9. (in Russian)
  17. Expert committee on biological standardization. WHO GMP for Biological Products. Proposed replacement of: TRS 822, Annex 1. Geneva; 2015. Available at: [http://www.who.int/biologicals/BS2253\\_GMP\\_For\\_Biologicals\\_clean.pdf?ua=1](http://www.who.int/biologicals/BS2253_GMP_For_Biologicals_clean.pdf?ua=1)
  18. Giffroy D., Mazy C., Duchêne M. Validation of a new ELISA method for in vitro potency assay of hepatitis B-containing vaccines. *Pharmeuropa Bio*. 2006; (1): 7—14.
  19. El'bert L.B., Vorovich M.F., Timofeev A.V. Comparative analysis of in vitro and in vivo tests for the quantitative evaluation of the immunogenicity of tick-borne encephalitis vaccine. *Voprosy virusologii*. 1998; 43(5): 236—8. (in Russian)
  20. Movsesyants A.A., Bondarev V.P., Olefir Yu.V., Merkulov V.A., Shimchuk L.F. Quality standards for immunobiological medicinal products - new texts in the State Pharmacopoeia of the Russian Federation. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya*. 2016; (2): 38—41. (in Russian)

Поступила 13.06.17

Принята в печать 20.06.17