

**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 доб. 101  
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*  
Технический редактор  
*Л.В. Зюкина*  
Корректор *В.С. Смирнова*  
Верстка *Е.М. Архипова*

Сдано в набор 28.12.2017.  
Подписано в печать 26.02.2018.  
Формат 60 × 88%.  
Печать офсетная.  
Печ. л. 6,00.  
Усл. печ. л. 5,88.  
Уч.-изд. л. 6,36.

Отпечатано в ООО "ПОЛИ ПРИНТ  
СЕРВИС", 119049, г. Москва,  
Калужская пл., д. 1, корп. 2  
ISSN 0507-4088. *Вопр. вирусологии*. 2018.  
Т. 63. № 2. 49-96.

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

Свидетельство о регистрации № 1170  
от 11 декабря 1990 г.



**МОСКВА  
«ИЗДАТЕЛЬСТВО  
"МЕДИЦИНА"»**

# ВОПРОСЫ ВИРУСОЛОГИИ

**ДВУХМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ**

Основан в 1956 г.

**2**

**Том 63 · 2018**

**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.б.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)

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

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

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

**Кузин А.А.** (д.м.н.; СПб, Россия)

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

**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)

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

**Щелканов М.Ю.** (д.б.н., проф.; Владивосток, Россия)

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

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

## ИНОСТРАННЫЕ ЧЛЕНЫ РЕДАКЦИОННОГО СОВЕТА

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

**Грибкова Н.В.** (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, M.Sc.; Frederick, USA)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

RUSSIAN ACADEMY OF SCIENCES  
**VOPROSY VIROSOLOGII**

PROBLEMS OF VIROLOGY (Russian Journal)

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

**Volume 63 • 2 • 2018**

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.; **Ershov F.I.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS; **Zverev V.V.** – Doctor of Biological Sciences, Prof., Academician of RAS; **Zuev V.A.** – MD, PhD, DSc, Prof.; **Ivanova O.E.** – MD, PhD, DSc, Prof.; **Karganova G.G.** – Doctor of Biological Sciences, Prof.; **Lashkevich V.A.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS; **Onishchenco 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, Russia)

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

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

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

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

**Borisevich S.V.** – Sc.D., Prof., corr. member of RAS (Sergiev Posad, Russia)

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

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

**Garbuz Yu.A.** – MD (Khabarovsk, Russia)

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

**Grigor'ev S.N.** – MD (Magadan, Russia)

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

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

**Ivanov L.I.** – MD (Khabarovsk, Russia)

**Kuzin A.A.** – MD, PhD, DSc (St. Petersburg, Russia)

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

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

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

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

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

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

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

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

**Pokrovskiy A.G.** – MD, PhD, DSc, Prof., corr. member of RAS (Novosibirsk, Russia)

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

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

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

**Stepanova T.F.** – MD, PhD, DSc, Prof. (Tyumen, Russia)

**Tutel'yan A.V.** – MD, PhD, DSc, Prof., corr. member of RAS (Moscow, Russia)

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

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

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

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

**Yashkulov K.B.** – MD, PhD (Elista, Russia)

Advisory Board

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

**Gribkova N.V.** – 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)

**Berencsi 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

- Борисевич С.В., Стомба Л.Ф., Павелъев Д.И.** Оспа белок (Poxviridae, Chordopoxvirinae, SQPV – squirrel poxvirus) ..... 53
- Сизикова Т.Е., Лебедев В.Н., Карулина Н.В., Борисевич С.В.** Вирус Ллови – новый филовирус, эндемичный для Европы ..... 58

### ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Львов Д.К., Бурцева Е.И., Кириллова Е.С., Колобухина Л.В., Мукашева Е.А., Трушаклова С.В., Феодоритова Е.Л., Меркулова Л.Н., Краснослободцев К.Г., Гарина Е.О., Федякина И.Т., Аристова В.А., Вартамян Р.В., Кистенёва Л.Б., Дерябин П.Г., Прилипов А.Г., Росаткевич А.Г., Бреслав Н.В., Кружкова И.С., Беляев А.Л., Аксельрод Э.В., Садыкова Г.К., Шляпникова О.В., Базарова М.В., Девяткин А.В.** Дрейфовая изменчивость вируса гриппа А(Н3N2): биологические, антигенные и генетические свойства в эпидемическом сезоне 2016-2017 гг. в России и странах Северного полушария ..... 61
- Цыбалова Л.М., Степанова Л.А., Шуклина М.А., Петров С.В., Ковалёва А.А., Потапчук М.В., Шалдзян А.А., Забродская Я.А., Егоров В.В.** Кросс-протективные свойства противогриппозной вакцины на основе рекомбинантного белка НВс4М2е ..... 68
- Кондратова В.Н., Ломая М.В., Игнатова А.В., Душенькина Т.Е., Смирнова К.В., Мудунов А.М., Лихтенштейн А.В., Гурцевич В.Э., Сенюта Н.Б.** Вирус Эпштейна–Барр и рак носоглотки: вирусные маркёры для диагностики и оценки клинического статуса больных ..... 77
- Ярославцева Н.Г., Тихомиров Д.С., Романова Т.Ю., Игнатова Е.Н., Туполева Т.А., Филатов Ф.П., Гапонова Т.В.** Лабораторная диагностика активной и латентной инфекции, вызванной вирусом герпеса человека 6-го типа, у пациентов с заболеваниями системы крови ..... 84
- Юнаслова Т.Н., Бинятова А.С., Фадейкина О.В., Саркисян К.А., Мовсесянц А.А., Игнатъев Г.М., Волкова Р.А., Терешкина Н.В., Сидоренко Е.С., Ильясова Т.Н., Суханова Л.Л.** Анализ качества отечественной вакцины для профилактики краснухи ..... 90

### ЮБИЛЕЙ

**Владимир Игоревич Злобин (к 75-летию со дня рождения)**

## CONTENTS

### REVIEWS

- Borisevich S.V., Stovba L.F., Paveliev D.I.** Poxvirus disease of squirrels (Poxviridae, Chordopoxvirinae, SQPV – Squirrel poxvirus) ..... 53
- Sizikova T.E., Lebedev V.N., Karulina N.V., Borisevich S.V.** Lloviu virus – a novel filovirus, endemic in Europe ..... 58

### ORIGINAL RESEARCH

- Lvov D.K., Burtseva E.I., Kirillova E.S., Kolobukhina L.V., Mukasheva E.A., Trushakova S.V., Feodoritova E.L., Merkulova L.N., Krasnoslobodtsev K.G., Garina E.O., Fedyakina I.T., Aristova V.A., Vartanyan R.V., Kisteneva L.B., Deryabin P.G., Prilipov A.G., Rosatkevich A.G., Breslav N.V., Kruzhkova I.S., Belyaev A.L., Akse'rod E.V., Sadykova G.K., Shlyapnikova O.V., Bazarova M.V., Devyatkin A.V.** Drift of influenza A(H3N2) virus: biological, antigenic and genetic properties in epidemic season 2016-2017 in Russia and countries of the Northern hemisphere ..... 61
- Tsybalova L.M., Stepanova L.A., Shuklina M.A., Petrov S.V., Kovaleva A.A., Potapchuk M.V., Shaldzhan A.A., Zabrodskaya Y.A., Egorov V.V.** Cross-protective properties of an influenza vaccine based on HBc4M2e recombinant protein ..... 68
- Kondratova V.N., Lomaya M.V., Ignatova A.V., Dushenkina T.E., Smirnova K.V., Mudunov A.M., Lichtenstein A.V., Gurtsevitch V.E., Senyuta N.B.** Epstein–Barr virus and nasopharyngeal carcinoma: viral markers for diagnostics and assessment of clinical status of patients ..... 77
- Yaroslavtseva N.G., Tikhomirov D.S., Romanova T.Yu., Ignatova E.N., Tupoleva T.A., Filatov F.P., Gaponova T.V.** Laboratory diagnostics of active and latent HHV 6-infection in patients with hematological malignancies ..... 84
- Unasova T.N., Binyatova A.S., Phadeykina O.V., Sarkisyan K.A., Movsesyants A.A., Ignatyev G.M., Volkova R.A., Tereshkina N.V., Sidorenko E.S., Ilyasova T.N., Sukhanova L.L.** Analysis of the quality of national vaccine against rubella ..... 90

### ANNIVERSARIES

**Vladimir Igorevich Zlobin (to the 75th anniversary)**

#### Уважаемые авторы и читатели журнала!

Обращаем Ваше внимание на то, что мы обновили сайт журнала «Вопросы вирусологии».

**Новый адрес сайта:** [www.medlit.ru/journalsview/virology](http://www.medlit.ru/journalsview/virology)

Вы можете подписаться через наш сайт на электронную версию журнала или купить отдельные статьи по издательской цене. Для этого нужно пройти регистрацию на сайте.

## ОБЗОРЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018  
УДК 578.821.5:578.1

*Борисевич С.В., Стомба Л.Ф., Павельев Д.И.*

## ОСПА БЕЛОК (POXVIRIDAE, CHORDOPOXVIRINAE, SQPV – SQUIRREL POXVIRUS)

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

Впервые в отечественной литературе рассмотрен новый таксон в подсемействе Chordopoxvirinae, который, возможно, представляет собой новый род оспенных вирусов. Описаны эпизоотологические проявления оспы белок у североамериканских серых и европейских рыжих белок. Расселение серых белок (*Sciurus carolinensis*) по Великобритании на протяжении XX столетия и снижение численности популяции рыжих белок (*Sciurus vulgaris*) относятся к наиболее известным документальным подтверждениям экологической смены местной фауны интродуцированным видом. Отмечена тенденция к расширению ареала распространения вируса оспы белок из Великобритании на западную часть Европы. В обзоре отдельно изложены генетические особенности генома вируса оспы белок, определяющие его биологические свойства, а также эволюционные взаимосвязи с другими поксвирусами. Определение величины генома с помощью рестриктового анализа, секвенирование всего генома, определение содержания Г/Ц-нуклеотидных пар и функциональное картирование большей части генов позволили построить филогенетическое древо. Филогенетический анализ показал, что это новый представитель подсемейства Chordopoxvirinae, расположенный между вирусами контагиозного моллюска и парапоксвирусами. Для выявления и идентификации возбудителя оспы белок используются серологические и молекулярно-биологические методы. Применение электронной микроскопии ограничено у серых белок вследствие поражения органов и репродукции вируса. Идентификация ДНК возбудителя оспы белок, основанная на использовании разных видов полимеразной цепной реакции (гнездовой и в реальном времени) преодолевает все эти ограничения.

Ключевые слова: обзор; вирус оспы белок; парапоксвирусы; вирус контагиозного моллюска; филогенетический анализ; полимеразная цепная реакция.

**Для цитирования:** Борисевич С.В., Стомба Л.Ф., Павельев Д.И. Оспа белок (Poxviridae, Chordopoxvirinae, SQPV – Squirrel poxvirus). *Вопросы вирусологии*. 2018; 63(2): 53-57.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-2-53-57>

*Borisevich S.V., Stovba L.F., Paveliev D.I.*

## POXVIRUS DISEASE OF SQUIRRELS (POXVIRIDAE, CHORDOPOXVIRINAE, SQPV – SQUIRREL POXVIRUS)

48th Central Scientific Research Institute, Sergiev Posad-6, 141306, Russian Federation

A new taxon of the subfamily Chordopoxvirinae that may represent a new genus of smallpox viruses is considered in this review. The distribution of gray squirrels (*Sciurus carolinensis*) throughout the UK during the 20th century and the decrease in the population of red squirrels (*Sciurus vulgaris*) is one of the most well-documented cases of ecological change of local fauna by the introduced species. The tendency to expand the distribution of the smallpox virus from Great Britain to the Western part of Europe has been noted.

The genetic peculiarities of the genome of the poxvirus of squirrels, which determine its biological properties, as well as evolutionary relationships with other poxviruses, are separately described. Determination of the size of the genome by restriction analysis, sequencing of the whole genome, determination of the content of G/C nucleotide pairs, and functional mapping of the majority of genes made it possible to construct a phylogenetic tree. Phylogenetic analysis shows that this is a new representative of the subfamily Chordopoxvirinae located between the viruses of the molluscum contagiosum and parapoxviruses.

Serological and molecular biological methods are used to reveal and identify the causative agent of smallpox. The use of electron microscopy is limited in grey squirrels, due to the absence of organ damage and reproduction of the virus. Identification of the DNA of the causative agent of poxvirus of squirrels based on the use of different types of polymerase chain reaction (nested and in real time) overcomes all these limitations.

Key words: review; SQPV; smallpox virus; parapoxviruses; molluscum contagiosum virus; phylogenetic analysis; polymerase chain reaction.

**For citation:** Borisevich S.V., Stovba L.F., Paveliev D.I. Poxvirus disease of squirrels (Poxviridae, Chordopoxvirinae, SQPV – Squirrel poxvirus). *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2018; 63(2): 53-57. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-2-53-57>

**For correspondence:** Sergey V. Borisevich, Dr. Biol. Sci., Professor, Corresponding member of the Russian Academy of Sciences, 48th Central Scientific Research Institute, Sergiev Posad-6, 141306, Russian Federation. E-mail: 48cnii@mil.ru

**Information about authors:**

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

**Acknowledgment.** The study had no sponsorship.

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

Received 20 April 2017  
Accepted 20 June 2017

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

Возбудитель оспы белок (squirrel poxvirus, SQPV) является типичным представителем семейства Poxviridae. Первоначально вирус оспы белок был описан как Parapoxvirus, однако в последующем отнесен к неклассифицированным вирусам подсемейства Chordopoxvirinae [1 – 3].

Впервые проблему гибели европейских рыжих белок подняли ветеринарные специалисты сначала Англии, а затем по мере проникновения инфекции – Северной Ирландии, Шотландии и Уэльса. Клинические проявления заболевания (оспоподобная сыпь вокруг глаз, рта, носа, ушей и нередко половых органов, язвенные повреждения кожи и замедление дыхательной и двигательной активности животных по мере развития инфекции (летаргия)) были выявлены у рыжих белок *Sciurus vulgaris*. Животные обычно погибали в пределах 2 недель от момента заражения [4]. У серых белок в отличие от рыжих не регистрировались клинические проявления заболевания [5]. Только единичный случай заболевания выявлен с использованием электронной микроскопии у серых белок вида *Sciurus carolinensis*, интродуцированных в Европу из Северной Америки [6].

Серые белки были впервые завезены в Британию в 1876 г., а наибольшее количество пришлось на период между 1900 и 1920 гг. [7]. Первое описание крупных эпизоотий оспоподобного заболевания среди местных популяций рыжих белок было описано в Англии в 1930 г. [цит. по 8].

Важно отметить, что рыжие белки широко распространены по всей территории Евразии [9, 10].

В настоящее время установлено, что распространение возбудителя оспы белок происходит вследствие выделения этого поксвируса с мочой, фекалиями, слюной и, возможно, переносчиками (блохи и клещи). Анализ сывороток от обитающих в Великобритании лесных грызунов не выявил наличия антител к вирусу оспы белок у полёвок, что позволило исключить их как резервуар инфекции [11].

Следует отметить, что на территории Великобритании болеет и гибнет только та популяция местных рыжих белок, которая контактирует с завезёнными из Северной Америки серыми белками. При этом в Северной Америке не регистрировались вспышки заболевания [12]. Очевидно, завезённые в Великобританию североамериканские серые белки являются на своей родине резервуаром и носителями инфекции без каких-либо клинических проявлений заболевания. В пользу этого свидетельствуют исследования американских специалистов, в ходе которых было установлено, что у 100% отобранных серых белок на территории штата Висконсин (США) была выявлена сероконверсия [2, 8].

В настоящее время популяции серых белок сосуществуют с рыжими белками на территории Великобритании и Северной Ирландии и являются иммунными по отношению к поксвирусу белок в 61% случаев [4].

Отдельные исторические периоды, свидетельствующие об установлении роли возбудителя оспы белок в патологии рыжих и серых белок, приведённые в табл. 1, позволяют судить о постепенных изменениях представления о возникновении, существовании и дальнейшей эволюции оспоподобной патологии для белок. Следует отметить, что до настоящего времени случаев заболевания оспой белок у людей не зарегистрировано.

Рассмотрены этиология, эпизоотология и клиника заболевания, изучены генетические особенности генома

вируса оспы белок, определяющие его биологические свойства, а также эволюционные взаимосвязи с другими поксвирусами, особенно с представителями рода парапоксвирусов.

С помощью рестриктового анализа определена величина генома вируса оспы белок (на основании величин BamHI, KpnI, HindIII и EcoRI рестриктных фрагментов), составляющая около 158 тыс. пар оснований (т. п. о.), а инвертированных терминальных повторов (ИТП) – приблизительно 5 т. п. о. С помощью секвенирования двух концевых фрагментов генома определено содержание Г/Ц-нуклеотидных пар, равное 66%. Секвенирование двух областей – в 23 т. п. о. с левого конца генома и в 37 т. п. о. с правого конца генома – позволило идентифицировать 59 генов [2].

Детальный анализ последовательности этих концевых фрагментов генома дал возможность выявить их отличия от других поксвирусов. Так, ни один из генов, таких как *v/EGF*, *v/L-10* или анкиринподобный, найденных у вирусов контагиозного моллюска и везикулярного стоматита крупного рогатого скота, не присутствует в соответствующих областях генома вируса оспы белок. Часть последовательностей соответствовала ортологичным генам вируса вакцины (штамм Копенгаген), которые были локализованы в точках генома, предполагающих коллинеарную связь с вирусом Орф и другими поксвирусами. На левом конце генома вируса оспы белок между ИТП и ортологом F9L гена вируса вакцины штамма Копенгаген имеется 9 генов, 6 из которых не являются копиями других генов, а оставшиеся 3 – подобны 3 генам, найденным только у вируса контагиозного моллюска [2].

На правом конце генома имеется область в 8200 п. о., которая соответствует фрагменту на правом конце генома вируса оспы коров, кодирующему тельца включения А-типа. В целом в этой области между ИТП и ортологом A34R вируса вакцины (штамм Копенгаген) имеется 19 генов, из которых 4 – это ортологи вируса вакцины штамма Копенгаген и 9 до определенной степени подобны другим поксвирусным генам [2].

Следовательно, нет очевидных доказательств того, что вирус оспы белок классифицируется как парапоксвирус. Длина и состав генов неконсервативных областей на правом и левом концах генома отличаются от таковых парапоксвирусов. Кроме того, другие поксвирусные сочетания для оставшихся белков редко являются парапоксвирусными ортологами.

После секвенирования концевых фрагментов была определена последовательность центральной части генома. На основании данных секвенирования практически всего генома была уточнена его величина, равная 152 186 п.о., а соотношение Г/Ц- нуклеотидных пар составило 66,7%, что соответствует таковым парапоксвирусов (64,5%) и контагиозного моллюска (63,4 %) [16].

Центральная часть генома вируса оспы белок содержит 88 генов, консервативных для всего подсемейства Chordopoxvirinae. Эти гены существенны для репродукции возбудителя и кодируют белки, необходимые для репликации ДНК, транскрипции и сборки вируса. Гены всех белков, определяющих эти функции, присутствуют в геноме вируса оспы белок, а также имеется 2 гена (гомологи генов *F15* и *D9* вируса вакцины штамма Копенгаген), общих для всех представителей подсемейства за исключением парапоксвирусов. Кроме того, в центральной области генома вируса оспы белок находится 15 дополнительных генов, 10 из которых уникальны для

Таблица 1

**Исторические аспекты изучения возбудителя оспы белок (цит. по [11] с дополнениями [13–15])**

Год(ы)	Значимые периоды исследований
1930	Регистрировались многочисленные эпизоотии с 1900 г. с высокой летальностью среди рыжих белок. Причина этих эпизоотий тогда не была выявлена
1962–1974	Выявление заболевания среди рыжих белок в период эпизоотий в Шропшире и Восточной Англии. Подтверждена схожесть заболевания на этих территориях
1981	Впервые идентифицирован возбудитель, отнесённый к парапоксвирусам на основе внутренней морфологии вируса
1984	Выделение поксвируса от рыжих белок в культуре клеток
1985	Уменьшение популяции рыжих белок в Восточной Англии из-за вирусного заболевания. Роль серых белок в этом не установлена
1995	Получено доказательство патогенности для рыжих белок, вызванной вирусом оспы белок
1997	Первое выявление антител к вирусу оспы белок у серых белок в Ирландии
2000	Доказана роль серых белок в распространении инфекции на север Англии. Свыше 60% исследованных сывороток от серых белок в Англии и Уэльсе оказались иммунными. При этом эпизоотий среди этих белок не было выявлено
2001	Экспериментально воспроизведена оспа белок при скарификации и доказана степень патогенности заболевания для рыжих белок, а у серых белок заболевание протекало бессимптомно
2003	Доказана ведущая роль вируса оспы белок в снижении популяции рыжих белок
2006	Уменьшение популяции рыжих белок в 17–25 раз на территории Шотландии и Италии, где циркулирует вирус оспы белок
2007	Регистрация первого случая оспы белок среди рыжих белок в Южной Шотландии
2008	Вирус оспы белок у рыжих белок пространственно связан с присутствием серых белок
2011	Регистрация первого летального случая оспы белок среди рыжих белок в Северной Ирландии
2014	Высокая плотность рыжих белок (2,5–4,0 особи на 1 га) вызывает в очаге инфекции 80% летальность. Средняя плотность белок (0,5–0,8 особи на 1 га) приводит в очаге инфекции к 60% летальности. Низкая плотность белок (0,05–0,25 особи на 1 га) способствует прекращению эпизоотии

этого вируса. Из этих 10 генов два кодируют молекулы, подобные белкам главного комплекса гистосовместимости (МНС) I класса, третий – ортолог 2'5'- олигоаденилатсинтеазы, а четвертый – белок, подобный белкам А-типа включений поксвирусов. Функция оставшихся генов пока неизвестна [16].

Многие вирусы часто кодируют белки, способствующие ускользанию от иммунной системы хозяина и улучшающие выживание вируса. Поксвирускодируемые факторы вирулентности нацелены на многие аспекты иммунитета хозяина. В основном они блокируют или разрушают антивирусный ответ

хозяина, манипулируют апоптозом хозяйских клеток, ингибируют активность естественных киллерных и цитотоксических Т-клеток и связывают и/или ингибируют хозяйские цитокины. [17–20]. Очень важное значение имеют факторы, влияющие на действие интерферона (ИФН) [21]. У поксвирусов имеются гены, кодирующие белки, которые либо связывают ИЛ-18 (индуктор ИФН II типа), либо являются гомологами рецепторов ИФН I и II типов [19, 21]. Поксвирусы также имеют специфические энзимы, которые нацелены на зависящие от ИФН пути [22]. Так, вирус вакцины способен ингибировать активацию ИФН, а вирус контагиозного моллюска ингибирует ИФН-индуцированную NF-kB [23]. Кроме того, оспенные вирусы кодируют транскрипционные супрессоры системы ИФН, а те вирусы, которые кодируют РНК-связывающие белки, предотвращают активацию протеинкиназы R и олигоаденилатсинтеазы OAS/РНКазы L [24]. У вируса оспы белок нет подобных генов, однако он кодирует гомолог протеинкиназы R и 2'5'-олигоаденилатсинтеазоподобный белок, которые также репрессируют действие ИФН. Этот гомолог 2'5'-олигоаденилатсинтеазы у вируса оспы белок кодируется геном *SQPV\_085* и способен предотвращать или по крайней мере уменьшать активацию РНКазы L, которая может деградировать и вирусную, и клеточную ДНК. Ген *SQPV\_025* гомологичен гену *E3L* вируса вакцины штамма Копенгаген, который у этого вируса опосредует круг хозяев и патогенез [25].

В геноме вируса оспы белок имеется *CD47*-ген, белок которого гомологичен *CD47*-молекуле млекопитающих и белку *A38L* вируса вакцины штамма Копенгаген и ряда других поксвирусов. У млекопитающих белок *CD47* осуществляет комплексную функцию, включая Т-клеточную регуляцию [26] и запуск апоптоза [27]. Так, делеция гена гомолога *CD47* вируса миксомы кроликов показала, что этот ген является фактором вирулентности, вызывающим летальную инфекцию у чувствительных кроликов, и полностью несущественен для репликации этого вируса *in vivo* [28].

Филогенетический анализ 15 генов, консервативных для всех родов подсемейства *Chordoroxvirinae*, подтвердил, что геном вируса оспы белок не группируется в пределах рода *Pararoxvirus*, а выступает как собственный отдельный клайд поксвирусов [2].

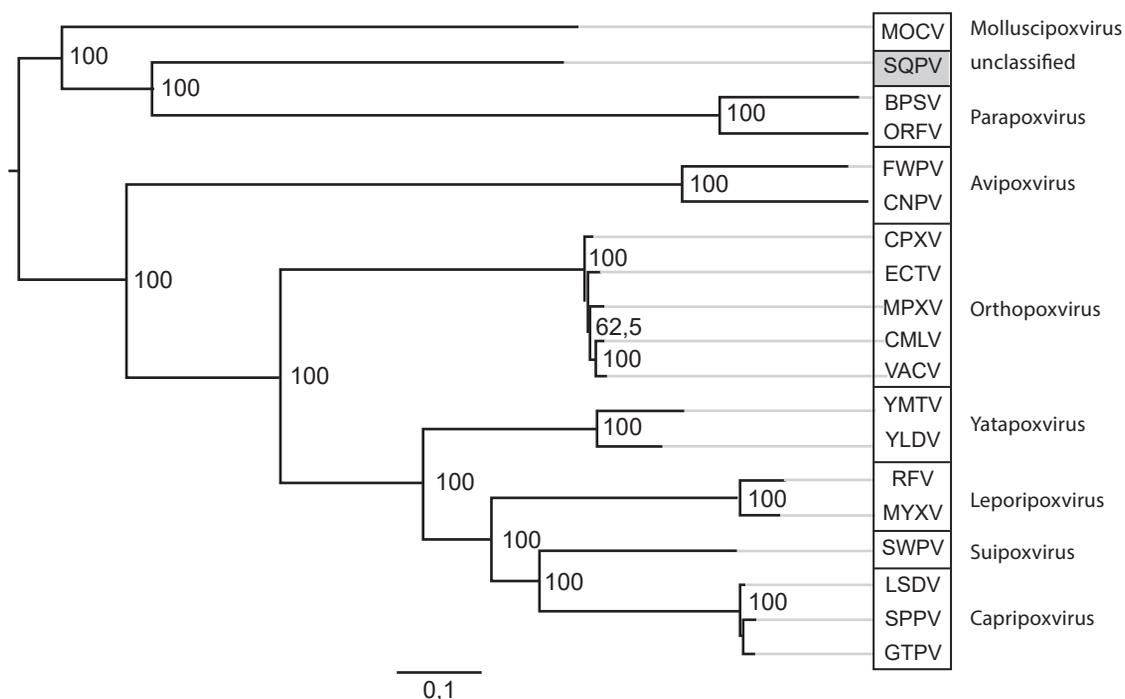
Результаты филогенетического анализа генов, кодирующих вирусный мажорный мембранный белок и субъединицу в 10 кД вирусной РНК-полимеразы, также не позволили отнести его к парапоксвирусам [1].

Последние данные о величине и структуре генома, функционально картированным генам представителей

Таблица 2

**Структура праймеров для гнездовой ПЦР и ПЦР-РВ с целью определения ДНК возбудителя оспы белок [7]**

Вид ПЦР	Праймеры	Структура праймеров (5'→3')
1-й раунд гнездовой ПЦР	SqP1– прямой	GCGGCCGCGCTGACCGCCATCG
	SqP2– обратный	CCAGCACGACTTCTTCTGGAG
2-й раунд гнездовой ПЦР	SqP3– прямой	CGTCTCGGTGTCTACAGCCTG
	SqP4– обратный	GCAGTCCGACGCGCGCAGAT
ПЦР-РВ	SP-7	GGGCGATCGTGCCGCTCAG
	SP-8	CGCCTCGAGGTCCGGCTC



Филогенетическое древо представителей подсемейства Chordopoxvirinae (по [15]). Вирусы: MOCV—контагиозного моллюска, BPSV—папулезного стоматита крупного рогатого скота, ORFV—Орф, FWPV—оспы птиц, CNPV—оспы канареек, CPXV—оспы коров, ECTV—эктромелии, MPXV—оспы обезьян, штамм Заир-96-1-17g, CMLV—оспы верблюдов, VACV—вирус вакцины, YMTV—опухоль обезьян Яба, YLDV—Яба-подобный вирус, RFV—фибромы кролика, MYXV—миксомы, SWPV—оспы свиней, LSDV—болезни рябой кожи, SPPV—оспы овец 17077-99, GTPV—оспы коз.

подсемейства Chordopoxvirinae дали возможность построить филогенетическое древо (см. рисунок) [15].

Филогенетический анализ свидетельствует о том, что вирус оспы белок имеет общего предшественника с вирусом контагиозного моллюска и парапоксвирусами, но представляет собой отдельный новый, пока не названный род. Хотя вирус оспы белок относительно тесно связан с обоими этими возбудителями, наличие генов-гомологов *F15* и *D9* и сохранение *F9*- и *F10*-генов вируса вакцины, штамм Копенгаген, выделяют этот вирус из рода парапоксвирусов. Предполагается, что он мог дивергировать перед перестановками и делециями, происходящими у парапоксвирусов.

В целях выявления и идентификации возбудителя оспы белок в различных лабораториях США, Канады, Великобритании были разработаны диагностические наборы для обнаружения ИФА-антител к нему и его ДНК с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Для выявления ДНК вируса оспы белок зарубежными специалистами была обоснована структура праймеров на ген белка оболочки вируса оспы белок – ортолога гена мажорного оболочечного белка вируса вакцины. При этом амплифицируется фрагмент величиной 368 п. о. С помощью еще двух пар праймеров, рассчитанных на РНК-полимеразный ген, амплифицируются фрагменты в 239 и 690 п. о. Эти пары праймеров дифференцировали вирус оспы белок от вируса фибромы белок, члена рода *Leporipoxvirus* [29].

В дальнейшем для определения наличия ДНК возбудителя в органах серых и рыжих белок и их эктопаразитах, изучения путей трансмиссии заболевания, скоро-

сти деградации вируса при влажной и сухой погоде при различных температурах были применены 2 вида ПЦР: гнездовая и ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) [8, 30].

Праймеры, использованные для гнездовой ПЦР, рассчитаны на высококонсервативную субъединицу RPO147 РНК-полимеразы [31] (табл. 2). После 2-го раунда гнездовой ПЦР амплифицировался фрагмент в 275 п. о., условия реакции оптимизированы опытным путем.

Мишенью для ПЦР-РВ была выбрана последовательность генома вируса оспы белок, гомологичная *G8R*-гену вируса вакцины, специфичная для многих оспенных вирусов и представляющая собой поздний ген транскрипционного фактора. Последовательность этого гена вируса оспы белок для ПЦР-РВ сравнивали с последовательностью аналогичного гена АУ386264 вируса Орф. Для праймеров выбирали области, которые высококонсервативны между двумя возбудителями.

Для оптимизации условий ПЦР-РВ были оценены 4 пары праймеров и выбрана наиболее эффективная. Состав праймеров приведен в табл. 2.

Сравнительная характеристика чувствительности двух методов показала, что в ПЦР-РВ определяется 144 геномных копии на 1 мг ткани. Чувствительность гнездовой ПЦР в 10 раз меньше.

Таким образом, в Великобритании возникла проблема существования популяций европейских рыжих белок, издревле населявших Британские острова, вследствие заражения вирусом оспы белок, распространяемым их североамериканскими сородичами — серыми белками, завезёнными в Англию из Америки в XIX веке. Зарубежными ветеринарными специалистами намечены 2

основных комплекса мер, предпринимаемых для сохранения в природе рыжих белок. Один из них – работа по улучшению среды их обитания, превращению лесов, где они обитают, в более комфортные для них убежища. Английские белки ничем не отличаются от своих сородичей, живущих в других европейских странах и России. Однако для Европы, в том числе для Российской Федерации, существует смертельная опасность для популяции рыжих белок в связи с возможностью заражения SQPV от серых белок, которые, вероятно, уже попали в Европу из Англии в XX веке. Второй комплекс мер по спасению рыжих белок включает разработку эффективного контроля за размножением и отбраковкой больных серых белок. Проводящиеся в настоящее время в Великобритании исследования по созданию вакцины для рыжих белок позволяют надеяться, что их популяции будут защищены [29].

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

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

#### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1, 2, 4–31 см. REFERENCES)

- Львов Д.К., Альховский С.В., Щелканов М.Ю. Поксвирусы (Poxviridae). В кн.: Львов Д.К., ред. *Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных*. М.: МИА; 2013: 179-85.

#### REFERENCES

- Thomas K., Tompkins D.M., Sainsbury A.W., Wood A.R., Dalziel R., Nettleton P.F., McInnes C.J. A novel poxvirus lethal to red squirrel (*Sciurus vulgaris*). *J. Gen. Virol.* 2003; 84(Pt. 12): 3337-41.
- McInnes C.J., Wood A.R., Thomas K., Sainsbury A.W., Furnell J., Dein F.J., et al. Genomic characterization of a novel poxvirus contributing to the decline of the red squirrel (*Sciurus vulgaris*) in the UK. *J. Gen. Virol.* 2006; 87(Pt. 8): 2115-25.
- L'vov D.K., Al'khovskiy S.V., Shchelkanov M.Yu. Poxviruses (Poxviridae). In: L'vov D.K., ed. *A Guide to Virology. Viruses and Viral Infections of Humans and Animals [Руководство по вирусологии. Вирус и вирусные инфекции человека и животных]*. Moscow: MIA; 2013: 179-85. (in Russian)
- Sainsbury A.W., Nettleton P.F., Gilray J., Gurnell J. Gray squirrel have high seroprevalence to a parapox virus associated with red squirrel. In: *Animal Conservation Forum*. Cambridge: Cambridge University Press; 2000; 3(3): 229-33.
- Tompkins D.M., Sainsbury A.W., Nettleton P., Bucston D., Gurnell J. Parapoxvirus causes a deleterious disease in red squirrels associated with UK population declines. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 2002; 269(1490): 529-33.
- Duff J.P., Scott A., Keymer I.F. Parapox virus infection of the grey squirrels. *Vet. Rec.* 1996; 138(21): 527.
- Usher M.B., Crawford T.J., Banwell J.L. An American invasion of Great Britain – the case of the native and alien squirrel (*Sciurus*) species. *Cons. Biol.* 1992; 6(1): 108-15.
- Atkin J.W., Radford A.D., Coyne K.P., Stavisky J., Chantrey J. Detection of squirrel poxvirus by nested and real-time PCR from red (*Sciurus vulgaris*) and grey (*Sciurus carolinensis*) squirrels. *BMC Vet. Res.* 2010; 6: 33-41.
- Waters C. *Post-release monitoring of two translocated red squirrel (*Sciurus vulgaris* L.) populations*: Diss. Galway; 2012.
- Harris S., Yalden D.W. *Mammals of the British Isles: Handbook*. London: The Mammal Society; 2008.
- Lurz P.W.W., White A., Meredith A., McInnes C., Boots M. Living with pox project: Forest management for areas affected by squirrelpox virus. In: *Forestry Commission Scotland Report*. Edinburgh; 2015.
- Sainsbury A.W., Gurnell J. An investigation into the health and welfare of red squirrels, *Sciurus vulgaris*, involved in reintroduction studies. *Vet. Rec.* 1995; 137(15): 367-70.
- White A., Lurz P.W.W. A modeling assessment of control strategies to prevent/reduce squirrelpox spread. In: *Scottish Natural Heritage Commissioned Report № 627*. Inverness; 2014.
- Chantrey J., Dale T.D., Read J.M., White S., Whitfield F., Jones D., et al. European red squirrels population dynamics driven by squirrelpox at a gray squirrel invasion interface. *Ecol. Evol.* 2014; 4(19): 3788-99.
- Naulty F., Everest D., Warnock N.D., Phelan K., Callanan J.J. Squirrelpox virus in red squirrels (*Sciurus vulgaris*) in the Republic of Ireland. *J. Wildlife Dis.* 2013; 49(4): 1070-3.
- Darby A.C., McInnes C.J., Kjaer K.H., Wood A.R., Hughes M., Martensen P.M., et al. Novel host-related virulence factors are encoded by squirrelpox virus, the main causative agent of epidemic disease in red squirrels in the UK. *Plos One.* 2014; 9(7): e96439.
- Alcami A. Viral mimicry of cytokines, chemokines and their receptors. *Nat. Rev. Immunol.* 2003; 3(1): 36-50.
- Haga I.R., Bowie A.G. Evasion of innate immunity by vaccinia virus. *Parasitology.* 2005; 130: 11-25.
- Seet B.T., Johnston J.B., Brunetti C.R., Barrett J.W., Everett H., Cameron C.M., et al. Poxviruses and immune evasion. *Annu. Rev. Immunol.* 2003; 21: 377-423.
- Taylor J.M., Barry M. Near death experiences: poxvirus regulation of apoptotic death. *Virology.* 2006; 344(1): 139-50.
- Perdiguerro B., Esteban M. The interferon system and vaccinia virus evasion mechanisms. *J. Interferon Cytokine Res.* 2009; 29(9): 581-98.
- Garcia M.A., Gil J., Ventoso I., Guerra S., Domingo E., Rivas C., et al. Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2006; 70(4): 1032-60.
- Gil J., Rullas J., Alcam J., Esteban M. MG159L protein from the poxvirus molluscum contagiosum virus inhibits NF-kappaB activation and apoptosis induced by PKR. *J. Gen. Virol.* 2001; 82(pt. 12): 3027-34.
- Haller O., Kochs G., Weber F. Interferon, Mx, and viral countermeasures. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2007; 18(5-6): 425-33.
- Brandt T.A., Jacobs B.L. Both carboxy- and amino-terminal domains of the vaccinia virus interferon resistance gene, E3L, are required for pathogenesis in a mouse model. *J. Virol.* 2001; 75(2): 850-6.
- Gardai S.J., Bratton D.L., Ogden G.A., Henson P.M. Recognition ligands on apoptotic cells: a perspective. *J. Leukoc. Biol.* 2006; 79(5): 896-903.
- Petersen R.D. CD47 and death signaling in the immune system. *Apoptosis.* 2000; 5(4): 299-306.
- Cameron C.M., Barrett J.W., Mann M., Lucas A., McFadden G. Myxoma virus M128L is expressed as a cell surface CD47-like virulence factor that contributes to the down regulation of macrophage activation in vivo. *Virology.* 2005; 337(1): 55-67.
- Himsworth C.G., Musil K.M., Bryan L., Hill J.E. Poxvirus infections in an American red squirrel (*Tamiasciurus hudsonicus*) from northwestern Canada. *J. Wildl. Dis.* 2009; 45(4): 1143-9.
- Collins L.M., Warnock N.D., Tosh D.G., McInnes C., Everest D., Montgomery W.I., et al. Squirrelpox virus: assessing prevalence, transmission and environmental degradation. *Plos One.* 2014; 9(2): e89521.
- McLysaght A., Baldi P.F., Gaut B.S. Extensive gene gain associated with adaptive evolution of poxviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003; 100(26): 15655-60.

Поступила 20.04.17

Принята в печать 20.06.17

Сизикова Т.Е., Лебедев В.Н., Карулина Н.В., Борисевич С.В.

**ВИРУС ЛЛОВИ – НОВЫЙ ФИЛОВИРУС, ЭНДЕМИЧНЫЙ ДЛЯ ЕВРОПЫ**

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

В обзоре рассмотрены сведения о выявлении нового филловируса, вируса Ллови (семейство Filoviridae, род Cuevavirus) на территории Европы. Изучены молекулярно-биологические свойства фрагментов генома вируса Ллови, выделенных от погибших летучих мышей *Miniopterus schreibersii*. Поскольку инфекционный вирус Ллови до настоящего времени не выделен, его способность инфицировать различные клетки и потенциальная опасность как агента инфекционного заболевания человека остаётся неясной. Для изучения характеристик различных элементов вируса используют рекомбинантные векторы (вирус везикулярного стоматита и плазмиды), экспрессирующие структурные белки вируса Ллови. Исследованы вопросы взаимодействия структурных белков вируса Ллови, экспрессированных с использованием рекомбинантных векторов с рецепторами клеток летучих мышей и человека. Рассмотрена возможная патогенность нового возбудителя по отношению к человеку. Сделан вывод о необходимости постоянного эпидемиологического и эпизоотического мониторинга за новой филловиральной инфекцией.

**Ключевые слова:** обзор; вирус Ллови; филловирусы; структурные белки вируса; векторы; проникновение вируса; эндоцитоз; факторы клетки хозяина.

**Для цитирования:** Сизикова Т.Е., Лебедев В.Н., Карулина Н.В., Борисевич С.В. Вирус Ллови – новый филловир, эндемичный для Европы. *Вопросы вирусологии*. 2018; 63(2): 58-61.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-2-58-61>

Sizikova T.E., Lebedev V.N., Karulina N.V., Borisevich S.V.

**LLOVIU VIRUS – A NOVEL FILOVIRUS, ENDEMIC IN EUROPE**

48th Central Scientific Research Institute, Sergiev Posad-6, 141306, Russian Federation

The data on a recently revealed novel filovirus (Lloviu virus, family Filoviridae, genera Cuevavirus) in Europe are viewed in this issue. The molecular-biological properties of genome fragments of Lloviu virus were isolated from perished bats (*Miniopterus schreibersii*). Because infectious Lloviu virus has not been isolated yet, the capacity of virus to infect cells of different species and its potential to cause disease in humans is unclear.

The recombinant vectors (vesicular stomatitis virus and plasmids) expressing structural proteins of Lloviu virus were used to study different elements of the virus. The question of interaction of structural proteins of Lloviu virus expressed by recombinant vectors with receptors of bat and human cells is considered. The possibility of pathogenicity of the novel agent for humans is considered. The conclusion is made about the necessity of continuous epidemical and epizootical monitoring of the new filovirus infection.

**Key words:** review; Lloviu virus; filoviruses; viral structural proteins; RNA, vectors; virus entry; endocytosis; host cell factors.

**For citation:** Sizikova T.E., Lebedev V.N., Karulina N.V., Borisevich S.V. Lloviu virus – a novel filovirus, endemic in Europe. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2018; 63(2): 58-61. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-2-58-61>

**For correspondence:** Sergey V. Borisevich, Dr. Biol. Sci., Professor, Corresponding member of the Russian Academy of Sciences, 48th Central Scientific Research Institute, Sergiev Posad-6, 141306, Russian Federation. E-mail: 48cnii@mil.ru

**Information about authors:**

Sizikova T.E., <http://orcid.org/0000-0002-1817-0126>; Lebedev V.N., <http://orcid.org/0000-0002-6552-4599>;

Karulina N.V., <http://orcid.org/0000-0001-7781-5249>; Borisevich S.V., <http://orcid.org/0000-0002-5742-3919>

**Acknowledgment.** The study had no sponsorship.

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

Received 28 March 2017

Accepted 20 June 2017

Филловирусы вызывают геморрагическую лихорадку у человека и приматов. Семейство Filoviridae представлено родом Marburgvirus, включающим различные штаммы относящегося к данному роду вируса Lake Victoria, и родом Ebolavirus, включающим вирусы Эбола-Zaire, Эбола-Sudan, Эбола-Reston, Эбола-Tai Forest и Эбола-Bundibugyo [1]. За исключением вируса Эбола-Reston, который является патогенным для низших приматов, но не для людей, все известные филловирусы, патогенные для приматов (включая человека), являются эндемичными для Африки [2].

В эндемический цикл филловирусов вовлечены представители семейства рукокрылых, которые являются резервуаром и вектором передачи возбудителей [3].

Фрагменты РНК вируса Ллови (Lloviu (LLOV)) впервые были обнаружены в погибших летучих мышах *Miniopterus schreibersii*, ареал которых находится в Океании, Южной Африке, Юго-Восточной Азии и на юге Европы (Испания, Португалия, Франция). Вирус получил название по месту своего первичного выделения – пещере Куэва-дель-Ллови (Cueva del Lloviu), расположенной в

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

автономной области Астурия на севере Испании) [4].

В соответствии с решением Международного комитета по таксономии вирусов вирус Ллови является представителем нового рода *Suevavirus* семейства *Filoviridae* (отряд *Mononegavirales*) [5, 6].

Фрагменты РНК вируса Ллови были выделены от погибших летучих мышей, при вскрытии которых анатомический и микробиологический анализ указал на ряд признаков (инфильтраты в лёгких, лимфоцитарные и лимфоидные фолликулы в селезёнке), характерных для перенесённой вирусной инфекции.

Нуклеиновая кислота, выделенная из селезёнки и лёгких погибших летучих мышей, была проанализирована в обратнo-транскриптазной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) с праймерами, специфичными по отношению к лисса-, парамиксо-, хенипа-, корона-, герпес- и филовирuсам. В пробах, выделенных от 5 животных, обнаружены последовательности РНК, характерные для филовирuсов. Анализ участка РНК из выделенной пробы размером 186 нуклеотидов выявил уровень гомологии 73,7% с соответствующим участком геномной РНК вируса Эбола [4]. В последующем подобная последовательность была обнаружена ещё у 15 летучих мышей, пойманных в той же пещере.

Вероятно, органом-мишенью возбудителя Ллови в летучих мышах является печень. С помощью ОТ-ПЦР именно там обнаружено максимальное накопление вируса ( $4,0 \cdot 10^6$  геном-эквивалентов на 1 г). При анализе РНК, выделенной из пробы печени, идентифицирована последовательность размером 12 100 нуклеотидов, с применением быстрой амплификации концевых участков кДНК геномной РНК получена близкая к полной последовательность последней [4].

Следует отметить, что образцы РНК, специфичной для филовирuсов, были выявлены только в пробах от летучих мышей *Miniopterus schreibersii*, но не обитающих в том же регионе летучих мышей вида *Myotis myotis* [4].

Последовательности геномной РНК вируса Ллови (гены нуклеопротеина (NP) и гликопротеина (GP)), выделенного из различных источников, были практически идентичны.

Геномная РНК вируса Ллови представляет собой «минус РНК» размером приблизительно 19 000 нуклеотидов, содержащих 7 открытых рамок считывания. Однако характер транскрипции РНК вируса Ллови отличается от такового для других филовирuсов [4]. Анализ консервативных участков инициации и терминции свидетельствует о том, что 7 открытых рамок считывания РНК вируса Ллови кодируются только 6 транскриптами информационной РНК, один из которых является дицистронным и содержит открытые рамки считывания для генов матричного белка (VP24) и РНК-зависимой РНК-полимеразы (L). Сигнал терминции аналогичен таковому для других представителей рода *Ebolavirus*, сигнал инициации (3'-CUUCUU (A/G) UAAAUU-5') является уникальным для вируса Ллови.

Полноразмерная последовательность геномной РНК вируса Ллови не определена ввиду наличия на 5'-концевом участке нетранслируемой последовательности размером приблизительно 700 нуклеотидов [4].

Схема строения генома и мРНК генов структурных белков вируса Ллови представлена на рисунке.

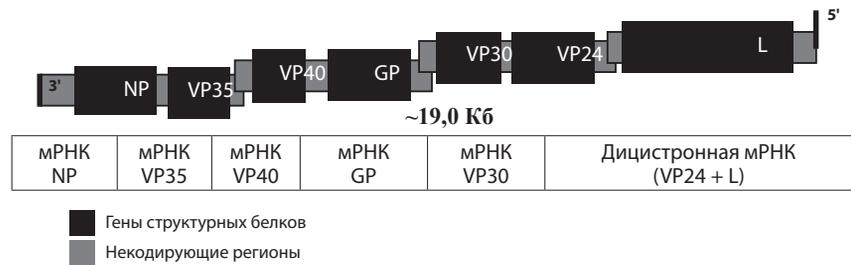


Схема генома и мРНК генов структурных белков вируса Ллови [4].

NP – нуклеопротеин, VP35 – кофактор полимеразы, VP40 – основной матричный белок, GP – гликопротеин, VP30 – активатор транскрипции, VP24 – минорный матричный белок.

По первичной структуре последовательности геномной РНК вирус Ллови на 57,3–57,7% отличается от вируса Марбург и на 51,8–52,6% – от вируса Эбола [4].

Сравнительный анализ последовательности структурных белков вируса Ллови (по отношению к вирусам Марбург и Эбола) свидетельствует о том, что С-концевой участок белка VP35 связывается с двухцепочечной РНК и в силу этого является антагонистом интерферона I типа. Данный участок является высококонсервативным. У вирусов с геномной несегментированной «минус РНК» матричные белки являются неключевыми структурными компонентами вириона, но играют важную роль в процессах созревания и сборки жизненного цикла вируса. В этих событиях критическое значение имеют короткие аминокислотные участки (так называемые L-участки). Так, N-концевая последовательность белка VP40 вируса Эбола содержит перекрывающиеся L-участки, характеризующиеся структурой пролин-(треонин или серин)-аланин-пролин и пролин-пролин-X-тирозин (здесь и далее X – любая аминокислота). С-концевая последовательность данного белка содержит L-участок, имеющий структуру тирозин-X-X-лейцин [7]. Белок VP40 вируса Марбург содержит только участок пролин-пролин-X-тирозин, следовательно, в этом отношении вирус Ллови является более близким к вирусу Марбург, чем к вирусу Эбола [4, 8].

GP филовирuсов относится к классу 1 белков, проникающих через мембрану. Данный белок в процессе репродукции филовирuсов в клетке формируется из гликопротеина-предшественника ( $GP_0$ ). При транспорте последнего в аппарат Гольджи происходит преобразование предшественника белка в две субъединицы (поверхностная субъединица  $GP_1$  и трансмембранная субъединица  $GP_2$ ). Обе субъединицы остаются связанными дисульфидными связями ( $GP_{1,2}$ ), и тримеры гетеродимеров  $GP_1$ - $GP_2$  образуют шипики на оболочке вириона. Субъединица  $GP_1$  гликопротеина  $GP_{1,2}$  позволяет филовирuсам проникать в эндосому при условиях, благоприятных для формирования активной формы гликопротеина  $GP_{1,2}$  [9].

Ген GP вируса Марбург кодирует только один белок ( $GP_{1,2}$ ). Ген GP вирус Эбола и Ллови содержит 4 открытые рамки считывания (белки sGP, Δ-,  $GP_{1,2}$ , ssGP). Гликопротеин  $GP_2$  филовирuсов содержит иммуносупрессивный участок, являющийся высококонсервативным для вирус Эбола и Ллови [4, 10].

Белок VP24 вирус Ллови и Эбола имеет сходную организацию и функции, однако участки, обеспечивающие взаимодействие данного белка с другими молекулами в процессе сборки вируса, не характеризуются высоким уровнем консервативности [4]. Анализ структуры высококонсервативных участков гена РНК-зависимой

РНК-полимеразы филовирюсов свидетельствует о том, что вирус Ллови является наиболее близкородственным вирусу Эбола, чем вирусу Марбург.

Филогенетический анализ геномной последовательности вируса Ллови свидетельствует о том, что данный возбудитель может представлять комплекс вирусов, родственных вирусу Эбола. В настоящее время на основании результатов математического моделирования считают, что все филовирюсы произошли от общего предка, доверительный интервал начала дивергенции с уровнем надежности  $p = 0,05$  составляет 87 400—249 600 лет тому назад. Дивергенция между вирусами Ллови и Эбола началась примерно 68 400 лет назад (доверительный интервал 38 900—109 500 лет). А. Negrodo и соавт. [4] полагают, что вирус Ллови является прототипным представителем нового рода (*Cuevavirus*) семейства *Filoviridae*.

Поскольку возбудитель Ллови филогенетически отличается от представителей родов *Marburgvirus* и *Ebolavirus* по региону распространения, потенциальной патогенности для летучих мышей, существует вероятность того, что он отличается от других филовирюсов по фундаментальным механизмам инфицирования клеток, репродукции в чувствительных клетках и патогенезу *in vivo* [11].

Необходимо отметить, что изучению биологических свойств возбудителя Ллови препятствует то, что до настоящего времени нативный возбудитель не выделен. Для изучения характеристик различных структурных элементов вируса используют рекомбинантные векторы (на основе вируса везикулярного стоматита и плазмид), экспрессирующие структурные белки вируса Ллови.

М. Ng и соавт. [11] провели изучение процесса адсорбции белков вируса Ллови на чувствительные клетки. В экспериментах был использован рекомбинантный вирус везикулярного стоматита, экспрессирующий белок GP вируса Ллови. Установлено, что GP вируса Ллови по структуре и функциям сходен с GP других филовирюсов. Как и GP вируса Эбола, GP вируса Ллови при адсорбции на клетку должен подвергаться расщеплению эндосомальной цистеиновой протеазой при низких значениях эндосомального pH, но он является значительно более чувствительным к действию протеаз по сравнению с GP вируса Эбола.

Проникновение филовирюсов в инфицированные клетки обеспечивают:

- факторы, ответственные за прикрепление вируса к клеточной мембране (клеточные лектины DC-SIGN (в дендритных клетках, макрофагах, тромбоцитах), DC-SIGNR (в эндотелиальных клетках плаценты, печени, лимфатических узлов), LSECtin (в синусоидальных эндотелиальных клетках печени, лимфатических узлов и костного мозга), ASPGR-1 (в гепатоцитах), hMCL (в моноцитах и предшественниках макрофагов), человеческий T-клеточный муцин (TIM-1) (в эпителиальных клетках) [12];

- сигнальные факторы, к которым относятся рецепторы тирозинкиназы и  $\alpha_5\beta_1$ -интегрин (трансмембранный GP, состоящий из двух субъединиц ( $\alpha$  и  $\beta$ )) [6, 13];

- эндолизосомальные хозяйские клеточные факторы (катепсины B и L, белок Неймана–Пика) [7, 13].

Критическим рецептором для вирусов Эбола и Марбург является белок Неймана–Пика. Предполагается, что данный белок необходим и для связывания вируса Ллови с чувствительными клетками. Это указывает на то, что использование белка Неймана–Пика в качестве рецептора является универсальной характеристикой всех филовирюсов.

Еще одним эндолизосомальным хозяйским клеточным

фактором, определяющим возможность взаимодействия белков вируса Ллови с клетками, является катепсин L, в состав которого входят сериновая, аспарагиновая и цистеиновая протеазы [14, 15].

Для изучения функций GP вируса Ллови также использовали рекомбинантный вирус везикулярного стоматита, экспрессирующий данный белок [3]. Установлено, что GP вируса Ллови характеризуется повышенным (по отношению к другим филовирюсам) тропизмом к клеткам почки летучих мышей (линии BKT1, FBKT1, YobFKT1, IndFSPT1, DemKT1). Отмечено, что GP вируса Ллови потенциально может обеспечить проникновение вируса в клетки почки эмбриона человека (HEK293, HEK293T) и африканской зеленой марышки (*Vero E6*).

A.R. Feagins и C.F. Basler [16] при использовании рекомбинантных плазмид, экспрессирующих белки VP24 и VP35 вируса Ллови, обнаружили, что данные белки подавляют клеточный противовирусный эффект в клетках человека и летучих мышей, причем механизм действия сходен с таковым для вируса Эбола.

Таким образом, несмотря на отсутствие до настоящего времени зарегистрированных случаев заболевания человека, вызванного новым филовирюсом Ллови, видовой барьер (с учётом возможной эволюции вируса) может считаться потенциально преодолемым. В этой связи необходимо проведение постоянного эпидемиологического и эпизоотологического мониторинга в эндемичных для вируса Ллови регионах.

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

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

#### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1-5, 7-16 см. REFERENCES)

6. Львов Д.К., Щелканов М.Ю., Альховский С.В., Дерябин П.Г. Филовирюсы (*Filoviridae*). В кн.: Львов Д.К., ред. *Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных*. М.: МИА; 2013: 202-5.

#### REFERENCES

1. Towner J.S., Sealy T.K., Khristova M.L., Albariño C.G., Conlan S., Reeder S.A., et al. Newly Discovered Ebola Virus Associated with Hemorrhagic Fever Outbreak in Uganda. *PLoS Pathog.* 2008; 4(11): 1-6.
2. Barrette R.W., Metwally S.A., Rowland J.M., Xu L., Zaki S.R., Nichol S.T., et al. Discovery of Swine as a Host for the Reston ebolavirus. *Science.* 2009; 325(5937): 204-6.
3. Leroy E.M., Epelboin A., Mondonge V., Pourrut X., Gonzalez J.P., Muyembe-Tamfum J.J., et al. Human Ebola Outbreak Resulting from Direct Exposure to Fruit Bats in Luebo, Democratic Republic of Congo, 2007. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 2009; 9(6): 723-8.
4. Negrodo A., Palacios G., Vazquez-Moron S., Gonzalez F., Dopazo H., Molero F., et al. Discovery of an Ebolavirus-like filovirus in Europe. *PLoS Pathog.* 2011; 7(10): 1-8.
5. Adams M.J., Lefkowitz E.J., King A.M.Q., Bamford D.H., Breitbart M., Davison A.J., et al. Ratification vote on taxonomic proposals to the international Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol.* 2015; 160(7): 1837-50.
6. L'vov D.K., Shchelkanov M.Yu., Al'khovskiy S.V., Deryabin P.G. Filoviruses (*Filoviridae*). In: L'vov D.K., ed. *A Guide to Virology. Viruses and Viral Infections of Humans and Animals [Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных]*. Moscow: MIA; 2013: 202-5. (in Russian)
7. Harty R.X., Brown M.E., Wang G., Huijbregtse J., Hayes F.P. A PpX motif within VP40 protein of Ebola virus interacts physically and functionally with a ubiquitin ligase: implication for filovirus budding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000; 97(25): 13871-6.
8. Muller E.H., Obernoster G., Raaben M., Herbert A.S., Deffieu M.S., Krishnan A., et al. Ebola virus entry requires the host-programmed

- recognition of an intracellular recognition of an intracellular receptor. *EMBO J.* 2012; 31(8): 1947-60.
9. Volchkov V.E., Feldmann H., Volchkova V.A., Klenk H.D. Processing of Ebola virus glycoprotein by polyprotein convertase furin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998; 95(10): 5762-7.
  10. Volchkov V.E., Blinov V.M., Netesov S.V. The envelope glycoprotein of Ebola virus contains an immunosuppressive-like domain similar to oncogenic retroviruses. *FEES Lett.* 1992; 305(3): 181-4.
  11. Ng M., Ndungo E., Jangra R.K., Cai Y., Postnikova E., Radoshitzky S.R., et al. Cell entry by a novel European filovirus requires host endosomal cysteine proteases and Niemann-Pick C1. *Virology.* 2014; 468-470: 637-46.
  12. Hunt C.L., Lennenmann N.J., Maury W. Filovirus entry: a novelty in the viral fusion world. *Viruses.* 2012; 4(2): 258-75.
  13. Hofmann-Winkler H., Kaup F., Pohlmann S. Host cell factors in filovirus entry: novel players, new insights. *Viruses.* 2012; 4(12): 3336-62.
  14. Maruyama J., Miyamoto H., Kajihara M., Ogawa H., Maeda K., Sakoda Y., et al. Characterization of the envelope glycoprotein of a novel filovirus, Lloviu virus. *J. Virol.* 2014; 88(1): 99-109.
  15. Marzi A., Reinheckel T., Feldmann H. Cathepsin B and L are not required for Ebola virus replication. *PLOS Negl. Trop. Dis.* 2012; 6(12): 1-9.
  16. Feagins A.R., Basler C.F. Lloviu virus VP24 and VP35 proteins function as innate immune antagonists in human and bat cells. *Virology.* 2015; 485: 145-52.

Поступила 28.03.17

Принята в печать 20.06.17

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018  
УДК 578.832:578.53

*Львов Д.К.<sup>1</sup>, Бурцева Е.И.<sup>1</sup>, Кириллова Е.С.<sup>1</sup>, Колобухина Л.В.<sup>1</sup>, Мукашева Е.А.<sup>1</sup>, Трушакова С.В.<sup>1</sup>, Феодоритова Е.Л.<sup>1</sup>, Меркулова Л.Н.<sup>1</sup>, Краснослободцев К.Г.<sup>1</sup>, Гарина Е.О.<sup>1</sup>, Федякина И.Т.<sup>1</sup>, Аристова В.А.<sup>1</sup>, Вартамян Р.В.<sup>1</sup>, Кистенёва Л.Б.<sup>1</sup>, Дерябин П.Г.<sup>1</sup>, Прилипов А.Г.<sup>1</sup>, Росаткевич А.Г.<sup>1</sup>, Бреслав Н.В.<sup>1</sup>, Кружкова И.С.<sup>1</sup>, Беляев А.Л.<sup>1</sup>, Аксельрод Э.В.<sup>1</sup>, Садыкова Г.К.<sup>1</sup>, Шляпникова О.В.<sup>1</sup>, Базарова М.В.<sup>2</sup>, Девяткин А.В.<sup>2</sup>*

### ДРЕЙФОВАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ВИРУСА ГРИППА А(Н3N2): БИОЛОГИЧЕСКИЕ, АНТИГЕННЫЕ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА В ЭПИДЕМИЧЕСКОМ СЕЗОНЕ 2016-2017 гг. В РОССИИ И СТРАНАХ СЕВЕРНОГО ПОЛУШАРИЯ

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

<sup>2</sup>ГБУЗ «Инфекционная клиническая больница № 1» ДЗ г. Москвы, 125367, г. Москва

Представлены данные о циркуляции вирусов гриппа в период с октября 2016 г. по май 2017 г. в отдельных регионах России, сотрудничающих с Институтом вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи». Отличительной особенностью эпидемического сезона 2016—2017 гг. в России и странах Северного полушария стало раннее начало роста заболеваемости, пиковые значения которой регистрировали уже с конца декабря 2016 г. – в январе 2017 г. В этот период наибольшую активность проявил вирус гриппа А(Н3N2), на смену которому в феврале–марте 2017 г. пришел вирус гриппа В. Показатели заболеваемости были несколько выше по сравнению с прошлым эпидемическим сезоном 2015—2016 гг., в то же время число госпитализаций и летальных случаев было значительно меньше, и в основном их регистрировали в возрастной группе 65 лет и старше. Эпидемические штаммы вируса гриппа А(Н3N2) принадлежали к генетической группе 3С.2а, представленной А/Гонконг/4508/2014, и его подгруппе 3С.2а1, представленной А/Большано/7/2016, которые по антигенным свойствам имели близкое родство друг с другом. Штаммы вируса гриппа В были близкородственны вакцинному штамму В/Брисбен/60/2008. Эпидемические штаммы были чувствительными к препаратам с антинейраминидазной активностью. Долевое участие возбудителей ОРВИ негриппозной этиологии было сравнимо с аналогичным показателем в предыдущих эпидемических сезонах. Представлены рекомендации по составу гриппозных вакцин для стран Северного полушария на 2017-2018 гг.

Ключевые слова: *эпидемический сезон 2016-2017 гг.; вирус гриппа А(Н3N2); антигенные свойства; генетические свойства; чувствительность к антинейраминидазным препаратам; рекомендации по составу гриппозных вакцин в сезоне 2017-2018 гг.*

**Для цитирования:** Львов Д.К., Бурцева Е.И., Кириллова Е.С., Колобухина Л.В., Мукашева Е.А., Трушакова С.В., Феодоритова Е.Л., Меркулова Л.Н., Краснослободцев К.Г., Гарина Е.О., Федякина И.Т., Аристова В.А., Вартамян Р.В., Кистенёва Л.Б., Дерябин П.Г., Прилипов А.Г., Росаткевич А.Г., Бреслав Н.В., Кружкова И.С., Беляев А.Л., Аксельрод Э.В., Садыкова Г.К., Шляпникова О.В., Базарова М.В., Девяткин А.В. Дрейфовая изменчивость вируса гриппа А(Н3N2): биологические, антигенные и генетические свойства в эпидемическом сезоне 2016-2017 гг. в России и странах Северного полушария. *Вопросы вирусологии.* 2018; 63(2): 61-68. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-2-61-68>

**Для корреспонденции:** Бурцева Елена Ивановна, д-р мед. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории этиологии и эпидемиологии гриппа Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва. E-mail: [elena-burtseva@yandex.ru](mailto:elena-burtseva@yandex.ru)

Lvov D.K.<sup>1</sup>, Burtseva E.I.<sup>1</sup>, Kirillova E.S.<sup>1</sup>, Kolobukhina L.V.<sup>1</sup>, Mukasheva E.A.<sup>1</sup>, Trushakova S.V.<sup>1</sup>, Feodoritova E.L.<sup>1</sup>, Merkulova L.N.<sup>1</sup>, Krasnoslobodtsev K.G.<sup>1</sup>, Garina E.O.<sup>1</sup>, Fedyakina I.T.<sup>1</sup>, Aristova V.A.<sup>1</sup>, Vartanyan R.V.<sup>1</sup>, Kisteneva L.B.<sup>1</sup>, Deryabin P.G.<sup>1</sup>, Prilipov A.G.<sup>1</sup>, Rosatkevich A.G.<sup>1</sup>, Breslav N.V.<sup>1</sup>, Kruzhkova I.S.<sup>1</sup>, Belyaev A.L.<sup>1</sup>, Akse'rod E.V.<sup>1</sup>, Sadykova G.K.<sup>1</sup>, Shlyapnikova O.V.<sup>1</sup>, Bazarova M.V.<sup>2</sup>, Devyatkin A.V.<sup>2</sup>

## DRIFT OF INFLUENZA A(H3N2) VIRUS: BIOLOGICAL, ANTIGENIC AND GENETIC PROPERTIES IN EPIDEMIC SEASON 2016-2017 IN RUSSIA AND COUNTRIES OF THE NORTHERN HEMISPHERE

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

<sup>2</sup>Clinical Hospital for Infectious Diseases No. 1, Moscow, 125367, Russian Federation

The article presents the features of the influenza virus circulation for the period from October 2016 to May 2017 in some territories of Russia collaborating with the D.I. Ivanovsky Institute of Virology, Federal State Budgetary Institution "N.F. Gamaleya Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology", Ministry of Health of the Russian Federation. One of the 2016-2017 season's peculiarities in Russia and countries of the Northern hemisphere was the earlier start of an increase in ARD morbidity with peak indexes reached towards the end of December 2016 – January 2017. First, influenza A(H3N2) virus was predominant; then, it was followed by influenza B virus activity observed until the end of the season. The indexes of morbidity were higher than in the previous season, while the rates of hospitalization and mortality were lower, lethal cases being detected in persons 65 years old and older. Epidemic strains of influenza A(H3N2) virus belonged to 3c.2a genetic group, reference strain A/Hong Kong/4408/2014, and its subgroup 3c.2a1, reference A/Bolzano/7/2016, that are antigenically similar. Strains of influenza B virus were antigenically similar to the B/Brisbane/60/2008 vaccine virus. Strains were sensitive to oseltamivir and zanamivir. The share participation of non-influenza ARI viruses was similar to preliminary epidemic seasons. WHO has issued recommendations for influenza virus vaccines composition for 2017-2018 for the Northern hemisphere.

**Key words:** epidemic season 2016-2017; influenza A(H3N2) virus; antigenic properties; genetic properties; susceptibility to anti-neuraminidase inhibitors; influenza virus vaccines composition 2017-2018 for the Northern hemisphere.

**For citation:** Lvov D.K., Burtseva E.I., Kirillova E.S., Kolobukhina L.V., Mukasheva E.A., Trushakova S.V., Feodoritova E.L., Merkulova L.N., Krasnoslobodtsev K.G., Garina E.O., Fedyakina I.T., Aristova V.A., Vartanyan R.V., Kisteneva L.B., Deryabin P.G., Prilipov A.G., Rosatkevich A.G., Breslav N.V., Kruzhkova I.S., Belyaev A.L., Akse'rod E.V., Sadykova G.K., Shlyapnikova O.V., Bazarova M.V., Devyatkin A.V. Drift of influenza A(H3N2) virus: biological, antigenic and genetic properties in epidemic season 2016-2017 in Russia and countries of the Northern hemisphere. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2018; 63(2): 61-68. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-2-61-68>

**For correspondence:** Elena I. Burtseva, Leading researcher of the Laboratory of influenza etiology and epidemiology, D.I. Ivanovsky Institute of Virology, Federal State Budgetary Institution «National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation. E-mail: [elena-burtseva@yandex.ru](mailto:elena-burtseva@yandex.ru)

### Information about authors:

Lvov D.K., <http://orcid.org/0000-0001-8176-6582>; Deryabin P.G., <http://orcid.org/0000-0002-8522-9554>  
Burtseva E. I., <http://orcid.org/0000-0003-2518-6801>;

**Acknowledgments for the longstanding collaboration in surveying the influenza virus circulation in the Russian Federation.** The authors are grateful to the staff of regional offices of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing and the FBHI "Federal Hygienic and Epidemiological Center" (Novgorod Region, Yaroslavl Region, Vladimir Region, Chuvash Republic, Tomsk Region, Penza Region, Jewish Autonomous Region, Orenburg Region, Primorski Krai) collaborating with the Center for Influenza Ecology and Epidemiology. We are also grateful to the staff of the Clinical Hospital for Infectious Diseases No. 1, Moscow, for data and clinical samples used to survey the influenza virus circulation in the Russian Federation in the 2016-2017 season. This work was supported by the Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA. CoAg: U51IPOO527-05.

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

Received 29 November 2017  
Accepted 12 December 2017

## Введение

Вирус гриппа А(Н3N2), вызвав пандемию «гонконгского гриппа» в 1968 г., в последующие годы доминировал как минимум в 30 эпидемических сезонах. Срок его непрерывной циркуляции в качестве эпидемического/сезонного вируса уже превысил продолжительность активности других вирусов гриппа А, вызвавших пандемии XX столетия, - А(Н1N1) («испанки»), период циркуляции которого составил 39 лет, его возврат в циркуляцию произошёл в 1977 г. с последующим периодом достаточно низкой активности до 2009 г., и А(Н2N2) («азиатского гриппа»), период циркуляции которого длился с 1957 г. всего 11 лет.

Современные штаммы вируса гриппа А(Н3N2) полностью утратили антигенное родство с родоначальником пандемического цикла А/Гонконг/1/68. Кроме того, в отличие от других вирусов гриппа его эволюционная изменчивость имела линейный, поступательный характер, хотя в отдельные периоды были выявлены реверсии некоторых его дрейф-вариантов, примерами которых могут служить штаммы, выделенные в Австралии в 1979 г. и на Кубе в 1985 г. [1].

Дрейф вируса гриппа А(Н3N2), наблюдаемый с 1968 г., обусловил изменения его биологических свойств, среди которых рост числа штаммов с термолабильным гемагглютинином, резистентность к ингибиторам сывороток

животных, изменение тропности к тканям куриного эмбриона (КЭ) и культуре клеток MDCK, в том числе снижение способности агглютинировать эритроциты кур и человека, а также их низкая иммуногенность, что затрудняло изоляцию штаммов из клинических образцов, их типирование и отбор кандидатов в вакцинные штаммы. Популяция вируса гриппа А(Н3N2) резистентна к препаратам адамантанового ряда, но сохранила чувствительность к умифеновиру и препаратам с антинейраминидазной активностью.

В сезоне 2014—2015 гг. произошли аминокислотные замены в поверхностных белках вируса гриппа А(Н3N2), что привело к появлению новых генетических групп, различавшихся также по антигенным свойствам. Именно в этом сезоне регистрировали высокую интенсивность эпидемии как в России, так и в других странах мира, в период которой были отмечены случаи заболеваний у привитых людей, а также случаи гриппа с летальными исходами у детей и лиц пожилого возраста [2–4].

В настоящее время популяция вируса гриппа А(Н3N2) представлена следующими референс-штаммами: А/Техас/50/2012 (группа 3С.1), А/Гонконг/4801/2014 (группа 3С.2а), А/Самара/73/2013 (группа 3С.3а), А/Швейцария/9715293/2013 (группа 3С.3а) и А/Нидерланды/525/2014 (группа 3С.3b); долевое участие в период сезонов также различается. Кроме того, к началу эпидемического сезона 2016—2017 гг. были выявлены аминокислотные замены в гемагглютинине (НА1) группы 3С.2а с выделением новой подгруппы 3С.2а1, представленной референс-штаммом А/Большано/7/2016 (N171K, N121K).

В статье представлены данные о развитии эпидемий гриппа на отдельных территориях РФ и в странах Северного полушария, результаты изучения биологических и молекулярно-генетических свойств вируса гриппа А(Н3N2), а также проблемы применения традиционных методов исследований.

### Материал и методы

*Сбор данных о заболеваемости и лабораторной диагностике гриппа и ОРВИ.* В рамках эпидемиологического надзора за циркуляцией вирусов гриппа в РФ Центр экологии и эпидемиологии гриппа (ЦЭЭГ) Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» в сотрудничестве с 10 опорными базами, представленными территориальными управлениями и ФБУЗ «Центры гигиены и эпидемиологии» Роспотребнадзора в европейской части, на Урале, Сибири и Дальнем Востоке, провели анализ показателей заболеваемости, госпитализации и случаев с летальными исходами, этиологически связанных с вирусами гриппа и ОРВИ, в различных возрастных группах населения, а также результатов лабораторной диагностики, полученных с использованием метода иммунофлюоресцирующих антител (МИФ), полимеразной цепной реакции (ПЦР), изоляции вирусов гриппа. Исследование охватывало период с 40-й недели (начало октября) 2016 г. до 21-й недели (май) 2017 г.

*Отбор пациентов и взятие материала.* В исследование были включены пациенты, госпитализированные в 1-ю инфекционную клиническую больницу г. Москвы, а также амбулаторные и госпитализированные пациенты с опорных баз ЦЭЭГ. При подозрении на гриппозную инфекцию у заболевших проводили забор назальных смывов не позднее 3—4-го дня от начала болезни. Кро-

ме того, в случае летального исхода в ЦЭЭГ поступал секционный материал (ткани бронхов, трахеи, легких, селезенки).

*Изоляцию вирусов гриппа* проводили по общепринятым методикам из клинических материалов в КЭ, на клетках культуры ткани MDCK (вирусы гриппа А(Н1N1)pdm09 и В) и MDCK-SIAT1 (грипп А(Н3N2)), любезно предоставленной для научных целей автором линии, д-ром биол. наук М. Матросовичем [5–7].

*Типирование изолятов* выполняли в реакции торможения гемагглютинирующей активности (РТГА) по общепринятой методике с диагностическими сыворотками к эталонным и эпидемическим вирусам: А/Калифорния/7/2009 (Н1N1)pdm09, А/Гонконг/5738/2014 (Н3N2), выделенный на КЭ и MDCK, В/Пхукет/3073/2013 (линия В/Ямагата-подобных) и В/Брисбен/60/08 (линия В/Виктория-подобных) [6, 7]. При постановке РТГА с изолятами вируса гриппа А(Н3N2) использовали её модификацию с учётом рекомендаций ВОЗ [5–7].

*Детекцию РНК вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09, А(Н3N2) и В* проводили с помощью тест-систем «АмплиСенс Influenza viruses А/В», «АмплиСенс Influenza virus А/Н1-swine-FL», «АмплиСенс Influenza virus А-тип-FL» («ИнтерЛабСервис», Москва) согласно рекомендациям производителя.

*Аmplификацию и секвенирование* штаммов вируса гриппа А(Н3N2) выполняли путём выделения РНК по методу Хомчинского. Использовали следующие праймеры: НА3\_448F - GAAAGCTTCAATGGACTGGAG; НА3\_640R - TGAGCATACAGGAAGATTTGGTC; НА3\_1128F - TGGTACGGTTTCAGGCATCA; НА3\_10Funi - AAGCAGGGGAGAATTCTATTAACC; НА3\_1740R - TAATGCACTCAAATGCAAATGTT. Первичную нуклеотидную последовательность фрагментов ПЦР определяли методом Сэнгера на автоматическом секвенаторе ABI Prism 3130xl («Applied Biosystems», США) согласно рекомендациям производителя. Анализ нуклеотидных и соответствующих им аминокислотных последовательностей проводили с использованием пакета прикладных программ Lasergene («DNASTAR Inc.», США).

Чувствительность штаммов к противогриппозным препаратам оценивали с помощью молекулярно-генетических методов, описанных ранее [8].

### Результаты

На сотрудничающих с Институтом вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» территориях превышение эпидемического порога заболеваемости ОРВИ по отношению к среднему показателю по РФ (69,5 на 10 тыс. населения) регистрировали в более ранние сроки по сравнению с предыдущим сезоном: на 49-й неделе 2016 г. показатель составил 73,8 на 10 тыс. населения с последующим быстрым ростом и достиг пиковых значений уже через 2 нед (98,8). Каникулы, отпуска и выходные дни в начале января 2017 г., по-видимому, повлияли на снижение показателей, что подтверждается их динамикой: снижением до 53,4 в 1-ю неделю 2017 г. с последующим ростом на 2—7-й неделе 2017 г. (с 77,0 до 93,9 соответственно). Тенденция к стойкому снижению показателей, ниже пороговых значений, наблюдалась с 13-й недели 2017 г.

Наиболее вовлеченными в эпидемию были дети 0—2 лет (403,2 на 10 тыс. населения) и 3—6 лет (363,3), в то же время заболеваемость гриппом и ОРВИ взрослого населения была значительно ниже и составила 23,9 (табл. 1).

Таблица 1

**Средняя заболеваемость гриппом и ОРВИ в городах РФ, сотрудничающих с Институтом вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, в период с октября 2016 г. до июня 2017 г.**

Города	Возрастные группы				
	всё население	0–2 года	3–6 лет	7–14 лет	15 лет и старше
Великий Новгород	85,2	638,3	424,1	280,2	25,7
Липецк	77,3	508,6	558,4	224,7	21,9
Владимир	89,3	571,6	511,1	264	36,1
Ярославль	50,9	267,4	256,6	145,1	24,1
Пенза	16,3	7,8	11,1	7,8	17,4
Чебоксары	78,5	349,4	322,2	177,6	37,9
Оренбург	73,8	464,6	430,7	151,5	26,4
Томск	48,1	260	240,7	98,8	22,9
Владивосток	42,0	309,7	326,5	110,2	11,1
Биробиджан	86	654,9	551,2	210,2	15,5
Среднее значение	64,7	403,2	363,3	167,0	23,9
Разброс значения	16,3-86,0	7,8 – 654,9	11,1 – 558,4	7,8 – 280,2	11,1 – 37,9

Несмотря на более низкие значения показателей на пике эпидемии (98,8), по сравнению с предыдущим сезоном (136,6) средние показатели заболеваемости были даже несколько выше как в отдельных возрастных группах (7–14 и 15 лет и старше), так и по совокупному населению (64,7 и 58,2 соответственно).

4320 пациентам (5268 в 2016 г.) был поставлен клинический диагноз гриппа, 583 (14%) из них была показана госпитализация, что значительно меньше по сравнению с предыдущим сезоном (66%). Частота случаев в возрастных группах распределилась следующим образом: 0–2 года – 14% (в прошлом 15%), 3–6 лет – 13% (14%), 7–14 лет – 14% (7%), 15 лет и старше – 59% (64%). Сохраняется тенденция регистрации большего числа случаев госпитализации в возрастной группе 15 лет и старше.

Результаты клинико-эпидемиологического анализа 11 случаев с летальными исходами подтвердили наличие РНК вируса гриппа А(Н3N2) в 10 из них, РНК вируса гриппа В – в 1 случае. Материалы были представлены из Владимира (1 пациент: мальчик, 13 лет, январь 2017 г.), Ярославля (5 пациентов: ребёнок, 2 лет, декабрь 2016 г.; мужчина, 69 лет, декабрь 2016 г.; женщина, 82 лет, декабрь 2016 г.; мужчина, 52 лет, февраль 2017 г.; мужчина, 60 лет, февраль 2017 г.), Пензы (1 пациент: мужчина, 38 лет, декабрь 2016 г.), Владивостока (2 пациента: девочка, 12 лет, январь 2016 г.; мужчина, 66 лет, январь 2017 г.) и Биробиджана (2 пациента: женщина, 72 лет, январь 2017 г.;

женщина, 85 лет, февраль 2017 г.). От двух пациентов удалось выделить штаммы вируса гриппа А(Н3N2) – А/Ярославль/48-Т/2016 (трахея) и А/Ярославль/48-С/2016 (селезёнка), а также А/Владивосток/80/2016 (смыв).

Средний возраст пациентов составил 57 лет (2 – 85), 7 пациентов – мужчины, средняя длительность заболевания до летального исхода – 9 дней (3 – 16). У всех умерших в анамнезе не было указаний на вакцинацию против гриппа и раннее лечение противовирусными препаратами, у 7 из них была диагностирована вирусная пневмония.

Первые случаи гриппа были детектированы в ноябре 2016 г. (на 45-й неделе – 2 случая гриппа А(Н3N2) в Ярославле). В течение декабря число случаев гриппа стало резко нарастать и к концу месяца достигло максимальных показателей (40,5% положительных на грипп из числа обследованных), при этом 38,6% из них были диагностированы как грипп А(Н3N2). На 7-й неделе 2017 г. структура циркулировавших штаммов изменилась (16,7% было типировано как грипп А(Н3N2) и 22% – как грипп В), и в последующие недели регистрировали доминирование штаммов вируса гриппа В. Максимальное количество положительных на грипп В проб (29,7%) было зафиксировано на 10-й неделе 2017 г. Последние случаи гриппа А(Н3N2) детектировали на 16-й неделе 2017 г. (Владивосток), гриппа В – на 21-й неделе 2017 г. (Ярославль, Пенза, Томск).

В период всего эпидемического сезона долевое участие вирусов гриппа по совокупности результатов применения всех лабораторных методов составило: А(Н3N2) – 60%, В – 39% и А(Н1N1)pdm09 – 1% (всего 11 случаев).

Таблица 2

**Диагностика гриппа и ОРВИ в городах РФ, сотрудничающих с Институтом вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, в период с октября 2016 г. до июня 2017 г.**

ОРВИ	Число положительных результатов/% при исследовании методами:				
	ОТ-ПЦР	МИФ	изоляция штаммов	серологическими	любым из методов
Число обследованных на грипп/ОРВИ	10 047/4628	3 897	1584	68	12 173
А (не типирован)	5/0,05			0	5/0,04
А(Н1N1)pdm09	4/0,04			7/10,3	11/0,1
А(Н3N2)	1767/17,6	276/7,1	154/9,7	10/14,7	1870/15,4
В	1127/11,2	225/5,8	235/14,8	10/14,7	1258/10,3
Грипп в целом	2 903/28,9	501/12,9	389/24,5	27/39,7	3137/25,8
Парагрипп	118/2,5	608/15,6	н/и	0	н/и
Аденовирусы	121/2,6	267/6,8	н/и	0	н/и
РС-вирус	108/2,3	185/4,7	н/и	0	н/и
Риновирус	369/8,0			0	
Другие ОРВИ	192/4,1*		н/и	0	н/и
ОРВИ в целом	908/19,6	1060/27,2	н/и	0	н/и

Примечание. \* – в том числе 87 случаев метапневмовирусной инфекции, 29 – бокавирусной инфекции, 20 – коронавирусной инфекции, 49 – микоплазменной пневмонии, 7 – хламидийной инфекции; н/и - не исследовали; ОТ-ПЦР – обратнотранскрип-тазная ПЦР.

Таблица 3

Суммарная диагностика гриппа (МИФ, ПЦР и изоляция) в городах РФ, сотрудничающих с Институтом вирусологии им. Д.И. Иванова ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, в период с октября 2016 г. до июня 2017 г.

Города	Число проб	A (H1N1) pdm09	A (H3N2)	A в целом	B
Великий Новгород	619		85	85	57
Липецк	877		66	66	65
Владимир	1007	4	157	161	106
Ярославль	1053		276	276	157
Пенза	1223		53	53	36
Чебоксары	845		140	140	169
Оренбург	1226		97	97	48
Томск	1118		102	102	123
Владивосток	844		132	132	72
Биробиджан	1160		180	181	32
Абс.	12 173	4	1 870	1 879	1 258
%	100	0,03	15,4	15,4	10,3

В табл. 2 представлен объём проведённых исследований. Частота положительных на грипп проб, по данным применения всех методов, составила 25,8%, при этом более часто грипп детектировали методом ПЦР (28,9%); эффективность изоляции в чувствительных культурах была высокой и составила 24,5%, что связано с предварительным отбором положительных проб для выделения в чувствительных системах по данным ПЦР.

В структуре детектированных случаев ОРВИ негриппозной этиологии, по данным МИФ, парагрипп выявлен в 15,6% (в предыдущем сезоне – в 18,1%), аденовирусы – в 6,8% (7,4%) и РС-вирус – в 4,7% (2,7%); по данным ПЦР, в 8% случаев (3%) была детектирована риновирусная инфекция.

Этиологию эпидемических подъёмов заболеваемости определяли 2 вируса гриппа – A(H3N2) и B; вирус гриппа A(H1N1)pdm09 был детектирован в единичных случаях. Их долевое участие на разных территориях РФ представлено в табл. 3. На большинстве сотрудничающих территорий доминировал вирус гриппа A(H3N2), долевое участие которого в структуре ОРВИ составило 15,4%, в структуре циркулирующих вирусов гриппа – 60%. В то же время его активность была несколько ниже в Чебоксарах и Томске и равнозначная с активностью вируса гриппа B – в Липецке.

Антигенная характеристика 131 штамма вируса гриппа A(H3N2), выделенного в декабре 2016 г. – мае 2017 г., определила родство этих штаммов с эталоном A/Гонконг/5738/2014 (подобный вакцинному), они взаимодействовали с сывороткой к этому вирусу от 1/4 до полного гомологичного титра; 209 штаммов гриппа типа B имели близкое родство с эталоном B/Брисбен/60/2008 (вакцинный) и взаимодействовали с сывороткой к этому вирусу от 1/4 до полного гомологичного титра.

При генетическом анализе 29 штаммов вируса гриппа A(H3N2), выделенных в декабре 2016 г. – марте 2017 г., установлена принадлежность 43 из них к A/Гонконг/4801/2014 (группа 3С.2а) и штамма A/Липецк/188/2016 – к генетической подгруппе 3С.2а1,

представленной A/Большано/7/2016 (см. рисунок). 5 штаммов вируса гриппа B были отнесены к линии B/Брисбен/60/2008, входившей в состав гриппозных вакцин.

Изучение чувствительности 31 эпидемического штамма вирусов гриппа (21 – A(H3N2) и 10 – B) к препаратам с антигептаминидазной активностью не выявило специфических мутаций, ответственных за снижение их активности.

### Обсуждение

Представленные в настоящей работе данные во многом согласуются с результатами, полученными в других странах Северного полушария [9]. В Европейском регионе и странах Азии высокую активность вируса гриппа A(H3N2) детектировали с 52-й недели 2016 г. до 4-й недели 2017 г., в США – несколько позже (с 6-й по 10-ю неделю 2017 г.). Некоторый рост активности вируса гриппа A(H1N1)pdm09 отмечали страны Юго-Восточной и Южной Азии в марте 2017 г. В странах Африки была отмечена высокая активность вируса гриппа B, а к марту 2017 г. зафиксирована активность и вируса гриппа A(H3N2). В апреле 2017 г. активность вирусов гриппа в странах Северного полушария продолжала снижаться и во многих из них достигла значений ниже пороговых.

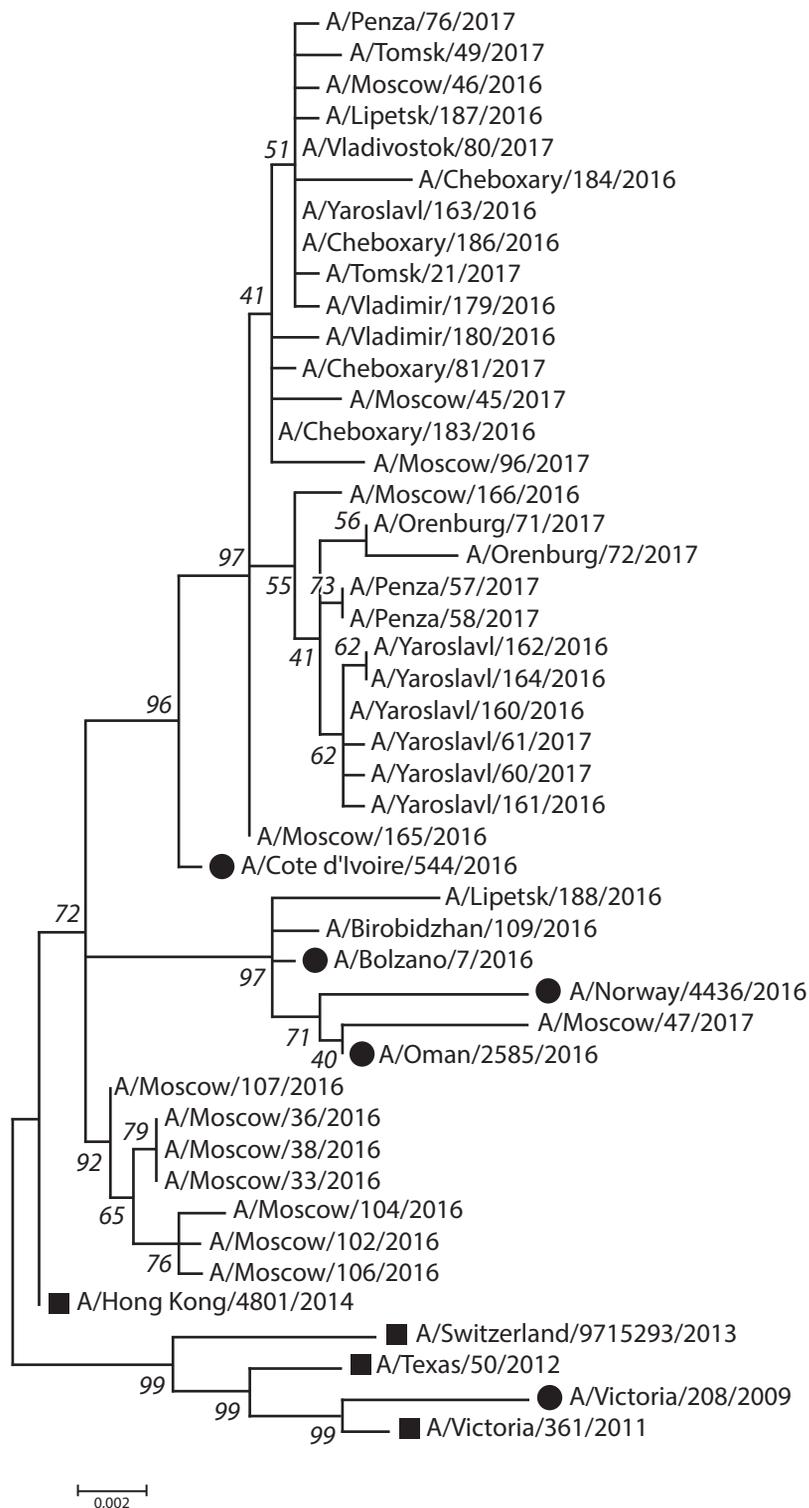
Оценки рисков инфицирования и тяжелых форм гриппозной инфекции, проведённые в странах Европейского региона и США, показали высокую частоту диагностирования гриппа A(H3N2) у госпитализированных лиц (до 98% от числа детектированных случаев гриппа A, США), у пациентов с тяжелой острой респираторной инфекцией (до 33%, из них A(H3N2) – 92%, Европейский регион) и в случаях с летальными исходами (99%, США). Многие страны отмечали большее число тяжелых и летальных форм гриппозной инфекции в возрастной группе 65 лет и старше [10–12].

Популяция циркулировавших штаммов была представлена в основном, как и в России, вирусами гриппа A(H3N2) и B, однако их активность и антигенные свойства имели в некоторых странах свои особенности.

Долевое участие вирусов гриппа в Европейском регионе, по данным дозорного эпиднадзора, составило по гриппу A – 89% (A(H3N2) – 99% и A(H1N1)pdm09 – 1%), по гриппу B – 11% (линии B/Виктория-подобных – 45% и линии B/Ямагата-подобных – 55%).

Популяция вируса гриппа A(H3N2) была представлена несколькими генетическими группами, при этом большинство из них были отнесены к генетической группе 3С.2а (A/Гонконг/4801/2014) и генетической подгруппе 3С.2а1 (Большано/7/2016), которые имеют близкое родство друг с другом, и, таким образом, соответствовали свойствам вакцинного вируса. По данным ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, из 75 штаммов, выделенных в начале эпидемического сезона и изученных с использованием полногеномного секвенирования, 69 (92%) были отнесены к генетической группе 3С.2а [13]. В то же время в странах Европейского региона установлена высокая частота представителей новой генетической подгруппы вируса гриппа A(H3N2) – 3С.2а1, которая в популяции вируса составила 70% [12].

В отличие от России популяция штаммов вируса гриппа B была гетерогенна и представлена обеими эволюционными линиями практически с равнозначной активностью (Европейский регион) или небольшим доминированием штаммов линии B/Ямагата-подобных (57%,



Филогенетическое древо штаммов вируса гриппа А(Н3N2), выделенных в эпидемиологические сезоны 2015–2016 и 2016–2017 гг.

США). Определённый интерес представляют данные об изоляции штаммов вируса гриппа В линии В/Виктория-подобных (так называемая подгруппа с аминокислотными заменами в позициях I180V и R498K и делецией в позиции 162/163), которые отличаются по антигенным свойствам от референс-вируса (В/Брисбен/60/2008), что

указывает на наметившийся дрейф этого вируса впервые с 2008 г. Однако оценить активность и широту географического распространения таких вариантов пока не представляется возможным.

В ряде стран проведена оценка эффективности гриппозных вакцин, которая, по данным раннего мониторинга, составила 32% (Финляндия) и 28% (Швеция) у лиц 65 лет и старше; 42% (Канада), 43% (США) и 38% (Европа) – у лиц всех возрастных групп [12].

К маю 2017 г. странами было протестировано более 7 тыс. штаммов вирусов гриппа на чувствительность к препаратам с противогриппозной активностью [10–13]. 23 из 693 изученных штаммов вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 проявили пониженную чувствительность. Один из штаммов, выделенный в Австралии от пациента, принимавшего озельтамивир, содержал мутацию H275Y, с которой связывают резистентность к озельтамивиру и перамивиру. Другие штаммы, выявленные в США, содержали мутацию D199G, с которой связывают резистентность только к озельтамивиру. Все изученные штаммы вируса гриппа А(Н3N2) были чувствительными к ингибиторам нейраминидазы. Из изученных 1143 штаммов вируса гриппа В только 2 штамма линии В/Виктория-подобных проявили пониженную чувствительность к ингибиторам нейраминидазы. Один из штаммов имел замену A200T (США), второй – H431Y (Малайзия), причём последняя из этих замен определяет высокую резистентность ко всем 4 ингибиторам нейраминидазы. Все изученные штаммы сохранили резистентность к ремантадину.

17 марта 2017 г. опубликованы материалы консультативного совещания экспертов ВОЗ по составу гриппозных вакцин для стран Северного полушария на 2017–2018 гг., в которых проведена замена только одного из трёх вирусов - компонента А(Н1N1)pdm09: А/Калифорния/7/2009 на А/Мичиган/45/2015 [14]. В состав трёхвалентных гриппозных вакцин включены штамм вируса гриппа А(Н3N2) – А/Гонконг/4805/2014 и вируса гриппа В – В/Брисбен/60/2008 (линии В/Виктория-подобных). В состав четырёхвалентных вакцин рекомендован вирус гриппа В/Пхукет/3973/2013 (линия В/Ямагата-подобных). Эти же вирусы были рекомендованы в сентябре 2016 г. для стран Южного полушария.

С октября 2016 г. продолжали детектировать случаи инфицирования людей вирусами гриппа птиц и свиней [15].

Особую обеспокоенность вызывают случаи инфицирования людей вирусом гриппа птиц А(Н7N9), который имел наибольшую распространённость (646 случаев), а также мутировал, проявив высокую патогенность для птиц [16].

На 01.07.2017 зарегистрировано 1533 случая инфицирования людей, не менее 573 с летальным исходом.

На фоне низкой активности вируса гриппа птиц А(Н5N1) – 2 случая в Египте (всего с 2003 г. детектировано 859 случаев, 453 из них с летальным исходом) и вируса гриппа птиц А(Н5N6) – 2 случая в Китае (всего с 2014 г. детектировано 16 случаев, 6 из них с летальным исходом) особую обеспокоенность вызвал высокопатогенный вирус гриппа птиц А(Н5N8), который достаточно быстро распространился в странах Европы и Азии, в том числе в России, вызвав эпизоотии среди птиц [17, 18]. Случаев инфицирования людей не регистрировали, однако остается опасность преодоления этим вирусом межвидового барьера.

Три случая инфицирования людей вирусами гриппа птиц А(Н9N2) были детектированы в Китае. Один из вирусов был изучен с помощью молекулярно-генетических методов, результаты определили его принадлежность к группе А/курица/Гонконг/У280/97 [9]. В США и Европе продолжают регистрировать случаи инфицирования людей вирусами гриппа свиней. В 2017 г. отмечены спорадические случаи в Европе (3 штамма А(Н1N1)v), США (1 – А(Н1N2)v, 1 – А(Н3N2)v и 1 – А(Н7N2)) [15].

### Заключение

В отличие от предыдущего сезона 2015—2016 гг., во время которого доминировал вирус гриппа А(Н1N1)pdm09, характерными для сезона 2016—2017 гг. в странах Северного полушария стали раннее начало роста показателей заболеваемости, пиковые значения которой регистрировали уже с конца декабря 2016 г. – в январе 2017 г., более высокая интенсивность эпидемии и регистрация тяжелых и летальных форм в возрастной группе 65 лет и старше.

Эпидемические штаммы вируса гриппа А(Н3N2) принадлежали к генетической группе 3С.2а, представленной А/Гонконг/4508/2014, и его подгруппе 3С.2а1, представленной А/Большано/7/2016, которые были близкородственными по антигенным свойствам и, следовательно, соответствовали свойствам вакцинного вируса.

Кроме того, определились трудности с изоляцией штаммов не только на КЭ, но также культуре клеток MDCK с последующим типированием в РТГА с эритроцитами человека. В период проведения исследований штаммы вируса гриппа А(Н3N2) изолировали на модифицированной линии клеток MDCK-SIAT1 с последующим типированием в РТГА с добавлением озельтамивира, согласно рекомендациям специалистов ВОЗ.

В отличие от России, где подавляющее большинство штаммов вируса гриппа В были подобными вакцинному вирусу В/Брисбен/60/2008 (линия В/Виктория-подобных), в других странах мира была отмечена равнозначная или доминирующая активность штаммов вируса гриппа линии В/Ямагата-подобных, что, по-видимому, могло определить низкую эффективность вакцин, особенно в группе лиц 65 лет и старше.

Популяция эпидемических штаммов вирусов гриппа А и В была чувствительна к озельтамивиру и занамивиру, в то же время штаммы вирусов гриппа А(Н3N2) и А(Н1N1)pdm09 сохранили резистентность к ремантадину.

Наиболее часто диагностировали случаи инфицирования людей вирусом гриппа птиц А(Н7N9), который мутировал в сторону большей патогенности для птиц.

Долевое участие возбудителей ОРВИ негриппозной этиологии по результатам МИФ было следующим:

парагриппа – 15,6%, аденовирусов – 6,8%, РС-вируса – 4,7%, что было сравнимо с предыдущими эпидемическими сезонами. По данным ПЦР в 8% случаев была детектирована риновирусная инфекция.

**Благодарность за многолетнее сотрудничество в надзоре за циркуляцией вирусов гриппа в Российской Федерации.** Авторы благодарны сотрудникам региональных управлений Роспотребнадзора и ФБУЗ «Центры гигиены и эпидемиологии», сотрудничающих с ЦЭЭГ: Новгородской области, Ярославской области, Владимирской области, Чувашской Республики, Томской области, Липецкой области, Пензенской области, Еврейской автономной области, Оренбургской области, Приморского края, а также сотрудникам ГБУЗ «Инфекционная клиническая больница № 1» ДЗ г. Москвы за предоставление данных и образцов клинических материалов, необходимых в проведении мониторинга циркуляции вирусов гриппа в сезоне 2016—2017 гг. в России.

**Финансирование.** Исследование было частично финансировано Центром по контролю и профилактике заболеваний, Атланта, США, договор CoAg: U51P000527-05.

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

### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 3-6, 9-12, 14, 17, 18 см. REFERENCES)

1. Литвинова О.М., Смородинцева Е.А., Деева Э.Г., Лобова Т.Г., Коновалова Н.И. Этиология современного гриппа. В кн.: Киселев О.И., Маринич И.Г., Сомнина А.А. *Грипп и другие респираторные инфекции: эпидемиология, профилактика, диагностика и терапия*. СПб.: Боргес; 2003: 55-69.
2. Львов Д.К., Бурцева Е.И., Колобухина Л.В., Дерябин П.Г., Кириллова Е.С., Трушаква С.В. и др. Особенности эпидемического сезона 2014/2015 гг. по гриппу в разных регионах России. *Инфекционные болезни*. 2015; 13(4): 59-67.
7. МР N.0100/4430-06-34. Выделение вирусов гриппа в клеточных культурах и куриных эмбрионах и их идентификация. М.; 2006.
8. Бурцева Е.И., Бреслав Н.В., Кириллова Е.С., Колобухина Л.В., Прилипов А.Г., Мальшев Н.А. и др. Ингибиторы нейраминидазы вирусов гриппа: эффективность в постпандемический период. *Эффективная фармакотерапия*. 2016; 44(2): 32-6.
13. Сайт ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России. Available at: <http://www.influenza.spb.ru>
15. Данные по случаям инфицирования людей вирусами гриппа птиц и свиней. Available at: [http://www.who.int/influenza/human\\_animal\\_interface/ru/](http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/ru/)
16. Случаи инфицирования людей вирусом гриппа птиц А(Н7N9). Available at: [http://who.int/influenza/human\\_animal\\_interface/influenza\\_h7n9/ru/index.html](http://who.int/influenza/human_animal_interface/influenza_h7n9/ru/index.html).

### REFERENCES

1. Litvinova O.M., Smorodintseva E.A., Deeva E.G., Lobova T.G., Konovalova N.I. Etiology of modern influenza. In: Kiselev O.I., Marinich I.G., Somnina A.A. *Influenza and Other Respiratory Infections: Epidemiology, Prophylaxis, Diagnostic and Treatment [Gripp i drugie respiratornye infektsii: epidemiologiya, profilaktika, diagnostika i terapiya]*. St.Petersburg; 2003: 55-69. (in Russian)
2. L'vov D.K., Burtseva E.I., Kolobukhina L.V., Deryabin P.G., Kirillova E.S., Trushakova S.V., et al. The peculiarities of influenza virus in epidemic season 2014/2015 in different regions of Russia. *Infektsionnye bolezni*. 2015; 13(4): 59-67. (in Russian)
3. Skowronski D., Chambers C., Sabaiduc S., Serres G. De., Dickinson J.A., Winter A.L., et al. Interim estimates of 2014/2015 vaccine effectiveness against influenza A(H3N2) from Canada's Sentinel Physician Surveillance network, January 2015. *Euro Surveill*. 2015; 20(4).
4. Pebody R., Warburton F., Ellis J., Andrews N., Thompson C., von Wissmann B., et al. Low effectiveness of seasonal influenza vaccine in preventing laboratory confirmed influenza in primary care in the United Kingdom: 2014/2015 mid-season results. *Euro Surveill*. 2015; 20(5).

5. Matrosovich M., Matrosovich T., Carr G., Roberts N.A., H.-D. Klenk. Overexpression of the alpha-2,6-sialyltransferase in MDCK cells increases influenza virus sensitivity to neuraminidase inhibitors. *J. Virol.* 2003; 77(15): 8418-25.
6. WHO Global Influenza Surveillance Network. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. Available at: [http://www.who.int/influenza/gisrs\\_laboratory/manual\\_diagnosis\\_surveillance\\_influenza/en/](http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/manual_diagnosis_surveillance_influenza/en/)
7. MR N.0100/4430-06-34. The isolation of influenza viruses in cell culture and embryonated eggs and their identification. Moscow; 2006. (in Russian)
8. Burtseva E.I., Breslav N.V., Kirillova E.S., Kolobukhina L.V., Pripilov A.G., Malyshev N.A., et al. The inhibitors of influenza virus neuraminidase: efficacy during postpandemic period. *Effektivnaya farmakoterapiya.* 2016; 44(2): 32-6. (in Russian)
9. Review of global influenza activity, 2015–2016. Available at: [http://www.who.int/influenza/surveillance\\_monitoring/updates/en/](http://www.who.int/influenza/surveillance_monitoring/updates/en/)
10. Global circulation of influenza viruses (GISRS-FluNet, snapshot 24 November 2017). Available at: [http://www.who.int/influenza/gisrs\\_laboratory/updates/summaryreport/en/](http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/updates/summaryreport/en/)
11. A weekly influenza surveillance report prepared by the Influenza Division, CDC, Atlanta, USA (FluView). Available at: <http://www.cdc.gov/flu/weekly/index.htm>
12. Joint ECDC-WHO/Europe weekly influenza updates. Available at: <http://www.flunews europe.org/>
13. Official website of FSBI «Research Institute of influenza» Ministry of Health of Russia. Available at: <http://www.influenza.spb.ru> (in Russian)
14. Weekly Epidemiological Record. 2017; 92(11): 117-28. Available at: <http://www.who.int/wer/2017/wer9211/en/>
15. Avian and other zoonotic. Available at: [http://www.who.int/influenza/human\\_animal\\_interface/en/](http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/en/)
16. Avian influenza A(H7N9) virus. Available at: [http://who.int/influenza/human\\_animal\\_interface/influenza\\_h7n9/en/index.html](http://who.int/influenza/human_animal_interface/influenza_h7n9/en/index.html)
17. Cumulative number of confirmed human cases of avian influenza A(H5N1) reported to WHO. Available at: [http://www.who.int/influenza/human\\_animal\\_interface/H5N1\\_cumulative\\_table\\_archives/en/](http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/H5N1_cumulative_table_archives/en/)
18. Assessment of risk associated with influenza A(H5N8) virus. Available at: [http://www.who.int/influenza/human\\_animal\\_interface/avian\\_influenza/riskassessment\\_AH5N8\\_201611/en/](http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/avian_influenza/riskassessment_AH5N8_201611/en/)

Поступила 29.11.17  
Принята в печать 12.12.17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 615.371:578.832].011

*Цыбалова Л.М., Степанова Л.А., Шуклина М.А., Петров С.В., Ковалёва А.А., Потапчук М.В., Шалджян А.А., Забродская Я.А., Егоров В.В.*

## КРОСС-ПРОТЕКТИВНЫЕ СВОЙСТВА ПРОТИВОГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА НВс4М2е

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

Одной из актуальнейших задач в области профилактики гриппа и предотвращения пандемий этой инфекции является создание вакцин, индуцирующих иммунный ответ против всех вирусов гриппа А, представляющих угрозу для человека. Разработка таких кросс-протективных вакцин ведется в мире более 10 лет. Несколько препаратов находятся в стадии клинических исследований. Нами был изучен рекомбинантный белок НВс4М2е, состоящий из 4 tandemно соединённых копий высококонсервативного наружного домена белка М2 вируса гриппа А, генетически слитого с белком-носителем – коровым антигеном вируса гепатита В. В качестве адъюванта в кандидатной вакцине использовался коммерческий препарат Деринат. Доклинические исследования на лабораторных животных (мыши, хорьки) показали, что иммунизация приводит к формированию высокого уровня специфических иммуноглобулинов в крови и бронхоальвеолярных лавжах. При этом вырабатываются иммуноглобулины субтипа IgG2a, наиболее важного медиатора антителозависимой цитотоксичности. Вакцина стимулирует пролиферацию Т-лимфоцитов и образование CD4+ и CD8+ Т-клеток, синтезирующих гамма-интерферон. При экспериментальном заражении летальными дозами (5 LD<sub>50</sub>) вирусов гриппа А субтипов Н1N1, Н2N2, Н3N2, Н1N1рdm09 иммунизированные животные перенесли инфекцию в лёгкой форме и практически полностью были защищены от гибели (90–100%). Репликация вируса в лёгких иммунизированных мышей снижалась на 1,8 - 4,8 log<sub>10</sub>. Высокая иммуногенность вакцины и снижение тяжести экспериментальной инфекции продемонстрировано также на хорьках. Разработанная рекомбинантная вакцина Унифлю обладает высокой специфической активностью и выраженной кросс-протективностью. При условии успешных клинических исследований она может рассматриваться как предпандемическая.

Ключевые слова: *грипп А; рекомбинантная вакцина; лабораторные животные; иммуногенность; кросс-протективность.*

*Для цитирования:* Цыбалова Л.М., Степанова Л.А., Шуклина М.А., Петров С.В., Ковалёва А.А., Потапчук М.В., Шалджян А.А., Забродская Я.А., Егоров В.В. Кросс-протективные свойства противогриппозной вакцины на основе рекомбинантного белка НВс4М2е. *Вопросы вирусологии.* 2018; 63(2): 68-76

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-2-68-76>

*Tsybalova L.M., Stepanova L.A., Shuklina M.A., Petrov S.V., Kovaleva A.A., Potapchuk M.V., Shaldzhan A.A., Zabrodskaya Ya.A., Egorov V.V.*

## CROSS-PROTECTIVE PROPERTIES OF AN INFLUENZA VACCINE BASED ON НВс4М2е RECOMBINANT PROTEIN

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

*Для корреспонденции:* Цыбалова Людмила Марковна, д-р мед. наук, зам. директора ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России по научной работе, руководитель отдела вакцинологии. 197376, г. Санкт-Петербург. E-mail: [sovets@influenza.spb.ru](mailto:sovets@influenza.spb.ru)

One of the main problems in the area of influenza prophylaxis and pandemic prevention is the development of cross-reactive vaccines, i.e. vaccines directed against all subtypes of human influenza viruses. Such vaccines are being developed in many countries for more than 10 years. A number of vaccines are presently undergoing clinical trials. We created Uniflu candidate vaccine based on recombinant H<sub>Bc</sub>4M2e protein consisting of 4 tandem-connected copies of the highly conserved ectodomain of M2 protein of the influenza A virus. These 4 copies were genetically fused to the carrier protein, namely hepatitis B core antigen. Commercially available Derinat was used as adjuvant in the candidate vaccine. Preclinical studies on laboratory animals (mice, ferrets) demonstrated that immunization with Uniflu leads to significantly higher level of specific immunoglobulins in the blood and bronchoalveolar lavages. Moreover, it produces immunoglobulins belonging to subtype IgG2a that is the most important mediator of antibody-dependent cytotoxicity. The vaccine under review stimulates the proliferation of T-lymphocytes, as well as the formation of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cells synthesizing  $\gamma$ -IFN. When infected with the lethal doses (5 LD<sub>50</sub>) of influenza A viruses of the subtypes H1N1, H2N2, H3N2, and H1N1pdm09, immunized animals typically developed mild form of illness. This kept them alive in 90-100% of cases, which demonstrated almost complete protection from death. Replication of the virus in the lungs of immunized mice was reduced by 1.8-4.8 log<sub>10</sub>. High immunogenicity of the vaccine, and reduced clinical symptoms following experimental infection, were demonstrated in ferrets as well. The developed recombinant vaccine Uniflu has high specific activity and cross-protection. Uniflu can be proposed as pre-pandemic vaccine, provided that it passes clinical trials.

**Key words:** influenza A; recombinant vaccine; laboratory animals; immunogenicity; cross-protection.

**For citation:** Tsybalova L.M., Stepanova L.A., Shuklina M.A., Petrov S.V., Kovaleva A.A., Potapchuk M.V., Shaldzhan A.A., Zabrodskaya Y.A., Egorov V.V. Cross-protective properties of an influenza vaccine based on H<sub>Bc</sub>4M2e recombinant protein. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2018; 63(2): 68-76. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-2-68-76>

**For correspondence:** Liudmila M. Tsybalova, Dr.Sci.Med., Deputy director, Head of the Department of vaccinology, Research Institute of Influenza, St. Petersburg, 197376, Russian Federation. E-mail: [sovets@influenza.spb.ru](mailto:sovets@influenza.spb.ru)

**Information about authors:**

Tsybalova L.M., <http://orcid.org/0000-0002-1193-5907>; Stepanova L.A., <http://orcid.org/0000-0002-8731-1834>;  
Kovaleva A.A., <http://orcid.org/0000-0001-6905-8946>; Egorov V.V., <http://orcid.org/0000-0002-3670-8962>;  
Zabrodskaya Y.A., <http://orcid.org/0000-0003-2012-9461>;

**Acknowledgments.** This work was conducted within the framework of the State Contract No. 13411.1008799.13.13 with the Ministry of Industry and Trade of the Russian Federation. The studies of the specific activity of the recombinant protein containing M2e in ferrets were supported by the Russian Science Foundation (Agreement No. 15-14-0043; May 19, 2015). We are grateful to our collaborators, members of the staff of the Federal Research Center for Biotechnology, Russian Academy of Sciences, for the gene engineering studies and to members of the staff of the Institute of Preclinical Studies (Leningrad Region, Vsevolozhsky District) for their help in working with ferrets.

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

Received 17 November 2017  
Accepted 12 December 2017

## Введение

Пандемия гриппа 2009 г. ещё раз убедительно продемонстрировала, насколько скорость производства традиционных вакцин отстаёт от скорости распространения пандемического вируса. Первые вакцины против вируса A(H1N1)pdm09 были получены в мире в сентябре–октябре 2009 г., тогда как первые эпидемии гриппа A(H1N1)pdm09 во многих странах прошли уже в июне. Подобная ситуация складывалась и в ходе пандемии 1957 и 1968 гг. [1]. Ликвидировать этот временной разрыв могут вакцины с коротким сроком производства, направленные против любых возможных возбудителей будущих пандемий. Идея создания такой универсальной вакцины возникла как результат осознания уникальной изменчивости вирусных антигенов и вытекающих отсюда неизбежных ежегодных временных и материальных затрат на обновление штаммового состава традиционных вакцин.

В последние 15 лет идут энергичные поиски композиции рекомбинантного вируса/белка, способного индуцировать защиту против всех субтипов вирусов гриппа, циркулирующих в человеческой популяции или представляющих реальную угрозу для человека [2–6]. Оценивая наиболее вероятный срок появления хотя бы одной лицензированной универсальной вакцины против гриппа А, ВОЗ называет 2020 г. [7]. Целевыми антигенами для индукции иммунного ответа на широкий спектр вирусов гриппа являются консер-

вативные вирусные белки и консервативные детерминанты поверхностных белков. Эффективное представление их иммунной системе гарантирует защиту организма от тяжелого гриппа и летальных исходов. Индукция стерильного иммунитета такими вакцинами не предусматривается и, судя по всему, невозможна. Исследования разных вариантов универсальных вакцин на экспериментальных моделях показали, что они снижают тяжесть гриппозной инфекции и исключают гибель животных после заражения летальными дозами вируса. Механизм действия универсальных традиционных вакцин в отличие от антигеноспецифических реализуется не через вируснейтрализующие антитела, а путем антителозависимой цитотоксичности и комплементзависимого цитолиза, а также антителозависимого фагоцитоза [6, 8–11].

В этой статье мы представляем рекомбинантную вакцину, направленную на эпидемические субтипы вируса гриппа АН1, Н3 и вероятный пандемический субтип АН2. Основным компонентом вакцины является рекомбинантный белок Н<sub>Bc</sub>4M2e, представляющий собой вирусоподобные частицы диаметром 34–36 нм, образованные коровым антигеном вируса гепатита В и эктодоменом М2 белка вируса гриппа А – М2е. Особенностью нашей конструкции является инсерция четырех tandemно соединённых копий М2е в каждую иммунодоминантную петлю вирусоподобной частицы белка Н<sub>Bc</sub>, что способствует усилению иммунитета и протективности препарата.

## Материал и методы

**Препараты.** Рекомбинантная гриппозная вакцина Унифлю является лиофилизированным препаратом, содержащим в 1 дозе (0,5 мл) высокоочищенный рекомбинантный белок НВс4М2е ( $40,0 \pm 5,0$  мкг) с консенсусной последовательностью М2е вирусов гриппа А человека (А/Н1N1, А/Н3N2, А/Н2N2), адьювант – Деринат ( $500 \pm 50$  мкг), фосфатно-буферный раствор (ФБР), pH 7,2–7,4. Препарат плацебо содержит те же компоненты, кроме белка НВс4М2е, который замещён белком НВс. Рекомбинантные белки были сконструированы и тестированы совместно со специалистами Федерального исследовательского центра биотехнологии РАН [12, 13]. Белки получены путем культивирования штаммов *E. coli* DLT1270 pQE60НВс/4Ме2h и *E. coli* DLT1270 pQE60НВс соответственно и очищены с помощью гель-фильтрации и ионообменной хроматографии. Деринат (адьювант) представляет собой натриевую соль ДНК (олигодезоксинуклеотид) эукариотического происхождения, деполимеризованную ультразвуком до частиц с молекулярной массой 270–500 кДа, не несущих генетической информации. Регистрационный номер препарата Р N002916/01 (дата регистрации 27.02.2008).

**Электрофорез (ЭФ) в полиакриламидном геле (ПААГ) и иммуоблот.** SDS-ПААГ- электрофорез проводили по методике, описанной Лэммли [14]. Электрофоретическое разделение белков в ПААГ выполняли в денатурирующих условиях в присутствии додецилсульфата натрия и бета-меркаптоэтанола. Параметры ЭФ: 25 мА, 220 В, 50 мин. Гель окрашивали коллоидным раствором Кумасси в течение ночи, отмывали водой.

При постановке иммуоблота рекомбинантные белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану («Bio-Rad», США). Белки определяли окрашиванием мембраны моноклональными антителами к белку М2 вируса гриппа А (14С2, ab5416; «Abcam», Великобритания) в разведении 1:16 000. В качестве вторичных антител использовали козы антимышинные IgG, меченные пероксидазой хрена («Abcam», Великобритания) в разведении 1:1000. Белок выявляли после инкубации мембраны с ТМБ (тетраметилбензидин) Immunoblot Solution («Invitrogen», США) в течение 15 мин.

**Масс-спектрометрия.** Ферментативный гидролиз белков в геле трипсином проводили согласно Н. Malen и соавт. [15]. Полученные триптические пептиды смешивали с матрицей 2,5-DHB («Bruker»), наносили на мишень Ground Steel и анализировали на MALDI-TOF/TOF масс-спектрометре UltrafleXtreme («Bruker») в режиме регистрации положительных ионов. Белки идентифицировали с использованием MASCOT (matrixscience.com) при обращении одновременно к базе данных SwissProt и локальной базе данных, в которую внесли аминокислотную последовательность рекомбинантного белка.

**Электронная микроскопия.** Рекомбинантные белки в объёме 0,2 мл наносили на медную сетку с субстратом коллодия. Медную сетку выдерживали 1 мин для адсорбции частиц, затем дважды отмывали дистиллированной водой. Негативное контрастирование проводили раствором фосфорновольфрамовой кислоты (2%) в течение 1 мин. После контрастирования медную сетку высушивали и исследовали на трансмиссионном электронном микроскопе JEOL JEM-1011. Для получения микрофотографий использовали цифровую камеру Morada («Olympus Inc.»).

**Лабораторные животные.** Специфическую активность лиофилизированных препаратов исследовали на мышах и хорьках. Животных содержали в стандартных условиях в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами СП 2.2.1.3218-14. Линейные мыши (самки) Balb/c массой 18–20 г (возраст 6–8 нед) были получены из питомника «Столбовая» ГУ «научный центр биомедицинских технологий» РАМН. Хорьки (самки, 4–5 мес) были получены из питомника «Твой хорёк» (Краснодар). Животных содержали в контролируемых условиях окружающей среды.

**Иммунизация и взятие материалов для исследования.** Мышей иммунизировали внутримышечно трехкратно в двухнедельным интервалом вакцинным препаратом в дозе 40 мкг/мышь в объёме 50 мкл. Контрольным группам мышей вводили плацебо в дозе 40 мкг или ФБР, pH 7,2, в объёме 50 мкл. Хорьков иммунизировали внутримышечно вакцинным препаратом двукратно с интервалом 3 нед в дозе 40 мкг/хорёк. Контрольной группе хорьков вводили плацебо в дозе 40 мкг.

Образцы крови получали от 5 мышей каждой группы через 2 нед после 3-й иммунизации. У хорьков брали кровь из локтевой вены до иммунизации, после 1-й и 2-й иммунизации, а также для определения длительности циркуляции сывороточных специфических антител через 21, 61 день (2 мес) и 151 день (5 мес) после последней иммунизации. Бронхоальвеолярные лаважи (БАЛ) получали от 5 мышей каждой группы после эвтаназии в CO<sub>2</sub>-камере через 2 нед после 3-й иммунизации. В нижнюю часть трахеи вводили катетер на глубину 3–5 мм и дважды промывали бронхи и лёгкие 1 мл ФБР. БАЛ центрифугировали 15 мин при 400 g, аликвотировали и замораживали при -20°C до исследования.

**Иммуноферментный анализ (ИФА).** ИФА проводили описанным ранее методом [16] с использованием 96-луночных планшет с высокой сорбционной способностью («Greiner», Германия). На планшеты сорбировали синтетический пептид М2е в концентрации 5 мкг/мл или НВс в концентрации 3 мкг/мл. В качестве конъюгата использовали меченные пероксидазой хрена моноклональные овечьи антимышинные IgG («Abcam») в разведении 1:20 000, моноклональные овечьи антимышинные IgG1, IgG2a («Abcam») в разведении 1:20 000, моноклональные козы антихорьковые IgG («Abcam») в разведении 1:20 000. В качестве субстрата применялся ТМБ («BD Biosciences», США). Оптическую плотность (ОП) измеряли с использованием микропланшетного ридера i-Mark («Bio-Rad») при длине волны 450 нм. За титр принимали наибольшее разведение сыворотки, при котором ОП по крайней мере в 2 раза превышала среднее значение бланка.

**Реакция торможения гемагглютинации.** Реакция выполнялась общепринятым методом согласно методическим рекомендациям<sup>1</sup>.

**Специфический Т-клеточный ответ в селезёнке.** Определялась способность рекомбинантных белков индуцировать в селезёнке образование специфических CD3+CD4+ и CD3+CD8+ Т-лимфоцитов, продуцирующих ИФН-γ. Спленоциты мышей выделяли на 14-е сутки после 3-й иммунизации в соответствии с протоколом «BD Pharmingen™» с рестимуляцией синтетическим

<sup>1</sup>Выделение вирусов гриппа в клеточных культурах и куриных эмбрионах и их идентификация: Методические рекомендации. Сомина А.А., Бурцева Е.И., Лобова Т. Г. и др. М.: 2006.

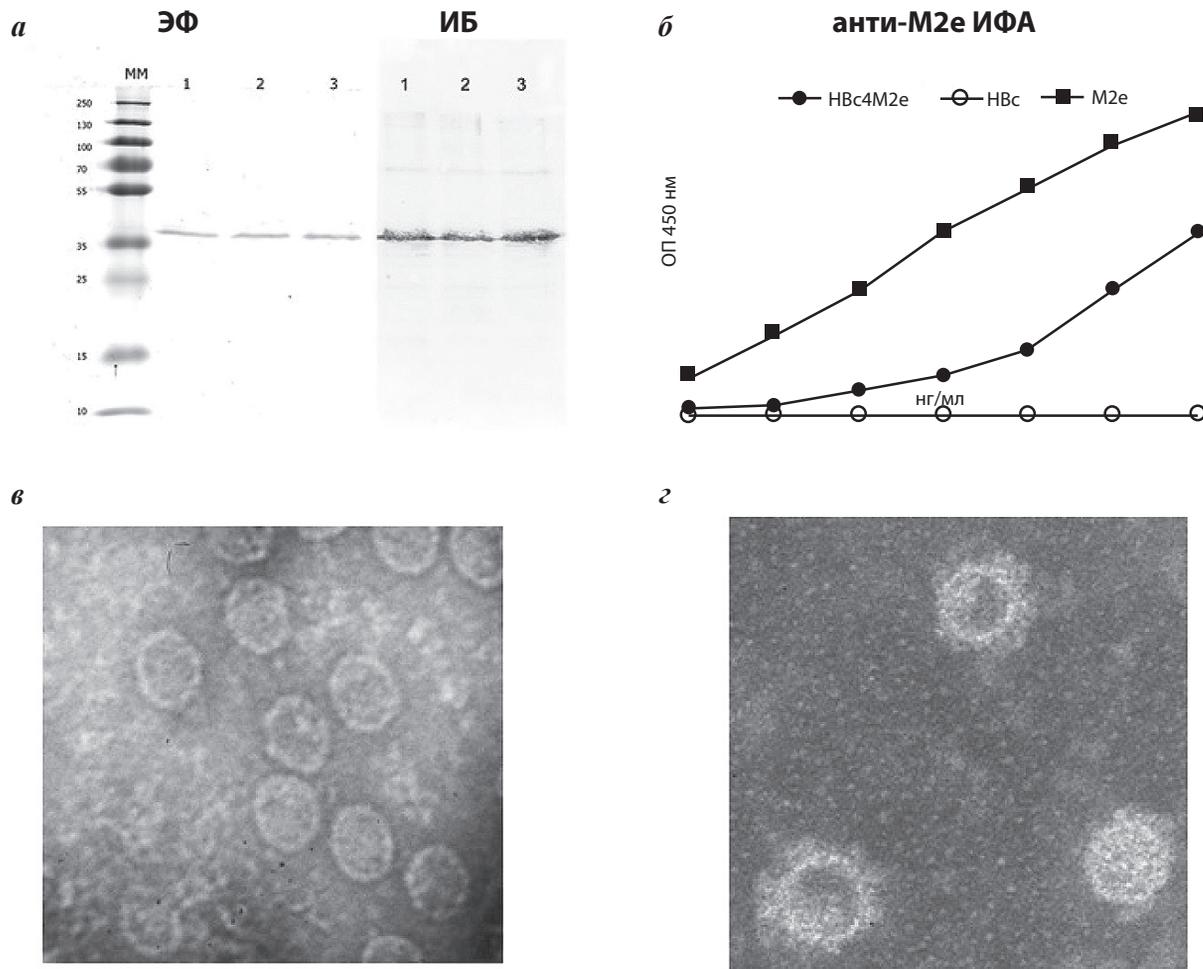


Рис. 1. Анализ рекомбинантного белка Hbc4M2e.

*а* – электрофорез (ЭФ) и иммуноблот (ИБ) трех серий вакцины Унифлю (дорожки 1–3) с моноклональными антителами 14C2, специфичными для M2e; *б* – антигенность рекомбинантного белка Hbc4M2e. Белки Hbc4M2e, Hbc и синтетический пептид M2e сорбировали на планшеты для ИФА с последующей обработкой моноклональными антителами 14C2, специфичными для M2e; *в* – электронная фотография вирусоподобных частиц Hbc; *з* – Hbc4M2e (шкала 50 нм).

пептидом M2e (активированная проба) или без рестимуляции (неактивированная проба) в присутствии брефелдина в течение 6 ч. Клетки отмывали, Fc-рецепторы блокировали антителами CD16/CD32 (Mouse BD Fc Block, «BD Pharmingen™», США) и окрашивали анти-CD3a-FITC, анти-CD4-APC («BD Pharmingen™», США) и анти-CD8-PerCP при 2–8°C в течение 30 мин. Затем клетки пермеабелизировали в соответствии с протоколом тест-системы Cytotfix/Cytoperm Plus («BD Biosciences», США) и окрашивали флуоресцирующими анти-IFN-γ-PE («BD Pharmingen», США). Интенсивность флуоресценции определяли на проточном цитофлуориметре BD FACS Canto II («Becton Dickinson», США). Анализ результатов проводили с использованием программного обеспечения BD FACS Diva версии 6.1.3 («BD Biosciences», США). Специфический ответ спленоцитов мышей (процент клеток, синтезирующих ИФН-γ) к пептиду M2e рассчитывали по формуле:

$$\% \text{ спленоцитов, синтезирующих ИФН-}\gamma, = \frac{\% \text{ положительных событий в активированной пробе} - \% \text{ положительных событий в неактивированной пробе}}{\% \text{ положительных событий в активированной пробе}}$$

Вирусы и заражение экспериментальных животных.

Для заражения мышей были использованы штаммы вирусов гриппа, адаптированные к мышам: A/PR/8/34 (H1N1), A/California/7/2009 (H1N1)pdm09, A/Aichi/2/68 (H3N2), A/Japan/305/57 (H2N2) в дозе 5 LD<sub>50</sub>. Мышей заражали на 14-й день после последней иммунизации (по 10 мышей на одну заражающую дозу). Вирусы вводили интраназально в объеме 50 мкл/мышь после ингаляционной анестезии (2–3% изофлуран, 30% O<sub>2</sub>, 70% N<sub>2</sub>O). После заражения проводили ежедневное наблюдение за животными в течение 14 сут (регистрация гибели и массы тела). Иммунизированных хорьков заражали эпидемическим вирусом гриппа A/Brisbane/53/07 (H1N1) через 3 нед после 2-й иммунизации и A/Texas/2012 (H3N2) через 5 мес после иммунизации в дозах 6,5–7,0 log<sub>10</sub> ТЦИД<sub>50</sub>. В течение 14 дней после иммунизации проводили ежедневный клинический осмотр животных по показателям: клиническим симптомам гриппозной инфекции (активность, выделение из носа), ректальной температуре (утром и вечером), массе тела. Клинические симптомы оценивали в баллах: активное животное – 0 баллов, вялое животное – 1 балл, чихание – 1 балл, выделения из носа – 1 балл. Подсчитывали сумму баллов

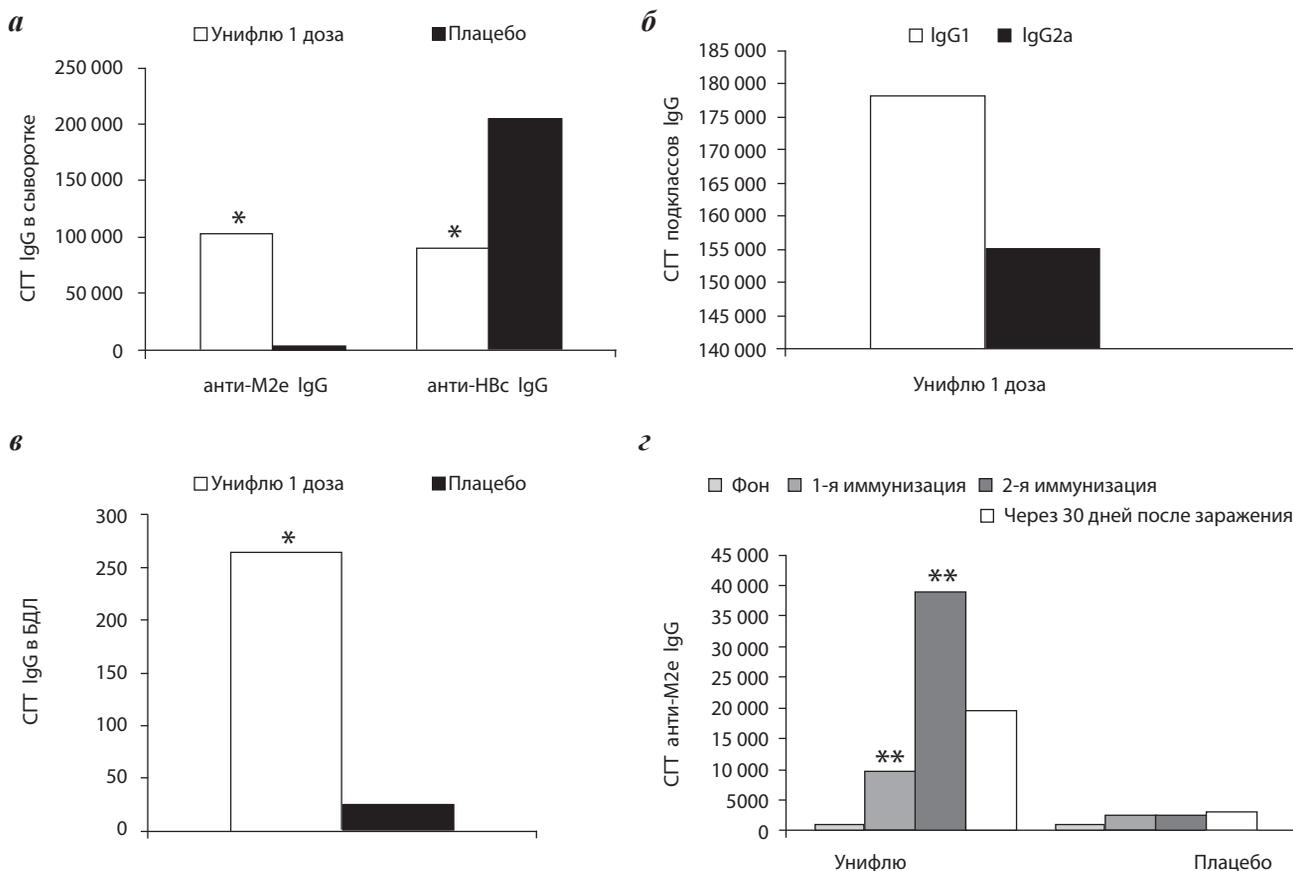


Рис. 2. Доклинические исследования иммуногенности вакцины Унифлю. M2e – специфический гуморальный ответ у мышей (а, б, в) и хорьков (з).

а – СГТ анти-M2e и анти-NPc IgG после 3-й иммунизации мышей одной дозой вакцины и плацебо; б – соотношение IgG1 и IgG2a в сыворотках крови иммунизированных мышей; в – СГТ анти-M2e IgG после 3-й иммунизации мышей в БАЛ; з – СГТ анти-M2e IgG у хорьков; \* - достоверное отличие от плацебо,  $p < 0,01$ ; \*\* – достоверное отличие от плацебо,  $p \leq 0,05$ .

для каждого животного и вычисляли среднее значение.

**Репродукция вирусов гриппа в лёгких мышей.** На 6-е сутки после заражения у 5 мышей из каждой группы после эвтаназии забирали лёгкие. Выделение вируса проводили титрованием лёгочной суспензии мышей на культуре клеток MDCK. Уровень репродукции вируса в культуральной жидкости оценивали в реакции гемагглютинации эритроцитов с 1% взвесью в физиологическом растворе. Инфекционную активность вируса рассчитывали по методу Рида и Менча (1938). За титр вируса принимали величину, противоположную десятичному логарифму наибольшего разведения вируса, способного вызвать положительную реакцию гемагглютинации, и выражали в логарифмах 50% тканевой цитопатической инфекционной дозы вируса ( $\lg \text{ТЦИД}_{50}$ ).

**Статистическая обработка.** Статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prism версии 6.0. Статистическую значимость различий показателей оценивали с использованием непараметрического критерия Манна – Уитни. Сравнение показателей выживаемости выполняли с помощью критерия Мантла – Кокса. Различия считали значимыми при  $p < 0,05$ .

### Результаты

Для подтверждения идентичности рекомбинантного белка NPc4M2e использовали несколько методов. На

рис. 1 представлены результаты, подтверждающие присутствие M2e в очищенном рекомбинантном белке NPc4M2e с помощью методов иммуноблота и ИФА. Белки NPc и NPc4M2e формируют вирусоподобные частицы диаметром 35–36 нм, что продемонстрировано электронной микроскопией. Присутствие целевых компонентов – рекомбинантных белков NPc4M2e и NPc в препаратах (вакцине и плацебо) было подтверждено методом масс-спектрометрии. Для каждого белка величина Score превышала пороговое значение и составляла 119 и 271 при пороговых значениях 70 и 92, что указывает на достоверность идентификации ( $p < 0,05$ ). В препаратах были выявлены и идентифицированы примесные белки *E. coli*, однако их содержание составляло менее 5% (4,78%), что соответствует требованиям Государственной фармакопеи, предъявляемым к генно-инженерным препаратам.

В сыворотках мышей на 39-й день исследования были определены титры анти-M2e IgG, титры подклассов иммуноглобулинов IgG (IgG1, IgG2a), анти-NPc IgG; в БАЛ определяли титры анти-M2e IgG. Установлено, что среднегеометрический титр (СГТ) анти-M2e IgG в группе иммунизированных животных составил 1:102 400,00 и достоверно отличался от СГТ в группе плацебо – 1:200,0 ( $p = 0,0079$ ). Соотношение IgG1/IgG2a составило 1,15 (рис. 2), что свидетельствует об отсутствии

**Средний индекс стимуляции (ИС) пролиферации лимфоцитов и средний процент Т-лимфоцитов селезёнки мышей опытной и контрольной групп, продуцирующих ИФН-γ, после активации пептидом M2e**

№ группы	Препарат	Число мышей в группе	ИС пролиферации после активации спленоцитов пептидом M2e	Средний % спленоцитов, синтезирующих ИФН-γ	
				CD3+CD4+ИФН-γ+	CD3+CD8+ИФН-γ+
1-я	Вакцина Унифлю, 1 доза	5	1,96 ± 0,16*	0,490 ± 0,290**	0,858 ± 0,230**
2-я	Плацебо	5	1,02 ± 0,23	0,00 ± 0,00	0,000 ± 0,000

Примечание. \* – достоверное отличие от 2-й группы,  $p = 0,0079$  по критерию Манна—Уитни; \*\* – достоверное отличие от 2-й группы,  $p < 0,01$  по критерию Манна—Уитни.

превалирования одного из подклассов иммуноглобулинов. Уровень антител к белку-носителю (НВс) у мышей опытных групп был в 2,3 раза ниже, чем у мышей контрольной группы, которых иммунизировали НВс: 1: 89 144,38 против 1: 204 800,0 ( $p = 0,0317$ ).

В БАЛ мышей, иммунизированных вакциной, титры специфических IgG к M2e-пептиду также достоверно отличались от титров в группе получивших плацебо: 1:263,9 против 1:25,0 ( $p = 0,0079$  по критерию Манна—Уитни).

В селезёнках мышей опытной и контрольной групп (42-й день исследования) был определён индекс пролиферации спленоцитов и процент клеток CD3+CD4+ и CD3+CD8+, синтезирующих ИФН-γ после активации пептидом M2e (см. таблицу).

Средний индекс стимуляции (ИС) пролиферации лимфоцитов и средний процент Т-лимфоцитов селезёнки мышей опытной и контрольной групп, продуцирующих ИФН-γ, после активации пептидом M2e.

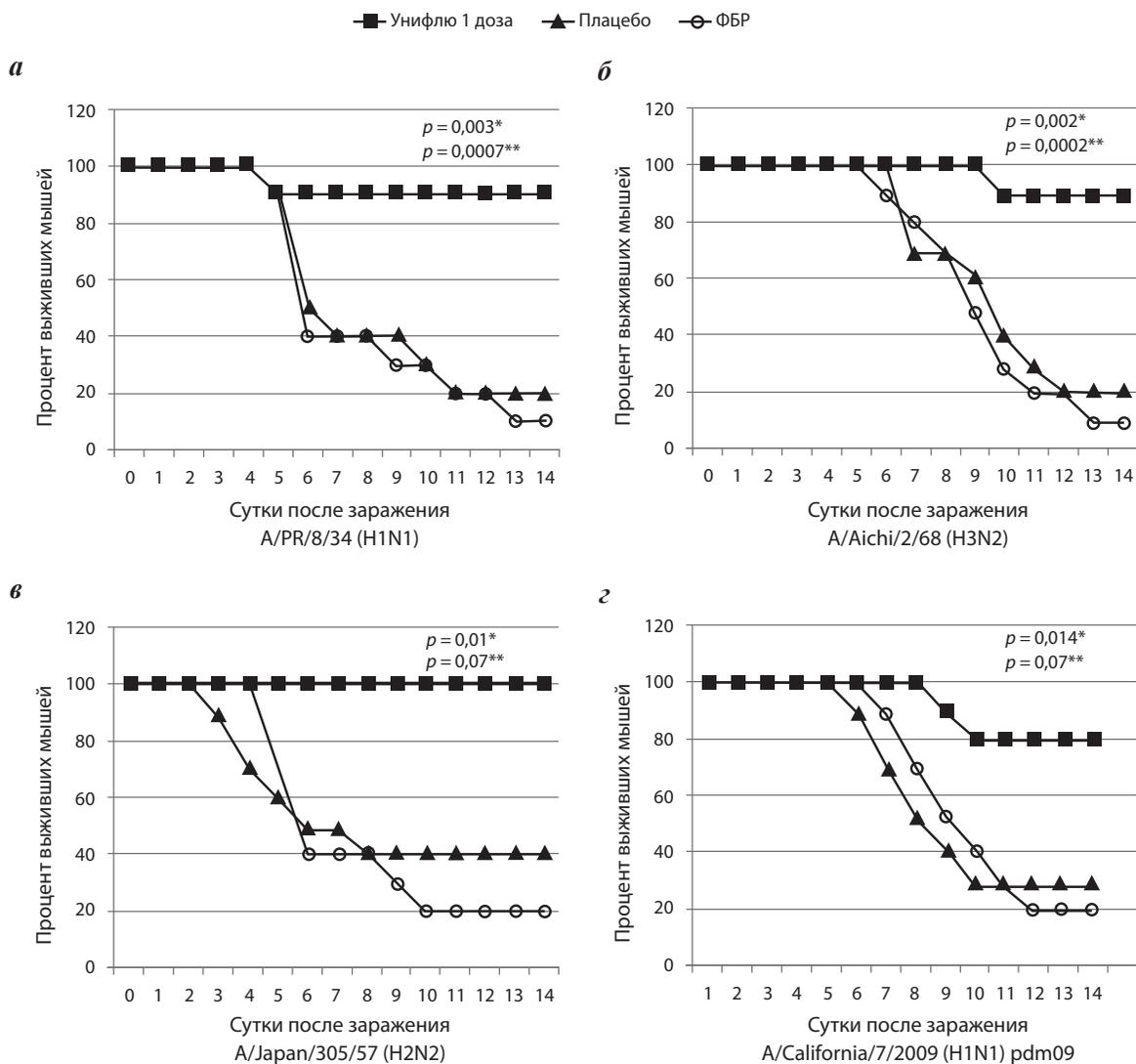


Рис. 3. Доклинические исследования протективности вакцины Унифлю на модели летальной гриппозной инфекции ( $5 LD_{50}$ ) у мышей. а – выживаемость мышей после заражения вирусом A/PR/8/34 (H1N1); б – выживаемость мышей после заражения вирусом A/Aichi/2/68 (H3N2); в – выживаемость после заражения вирусом A/Japan305/57 (H2N2); з – выживаемость после заражения вирусом A/California/7/2009 (H1N1)pdm09; \* – достоверные результаты между вакциной и плацебо; \*\* – достоверные результаты между вакциной и ФБР.

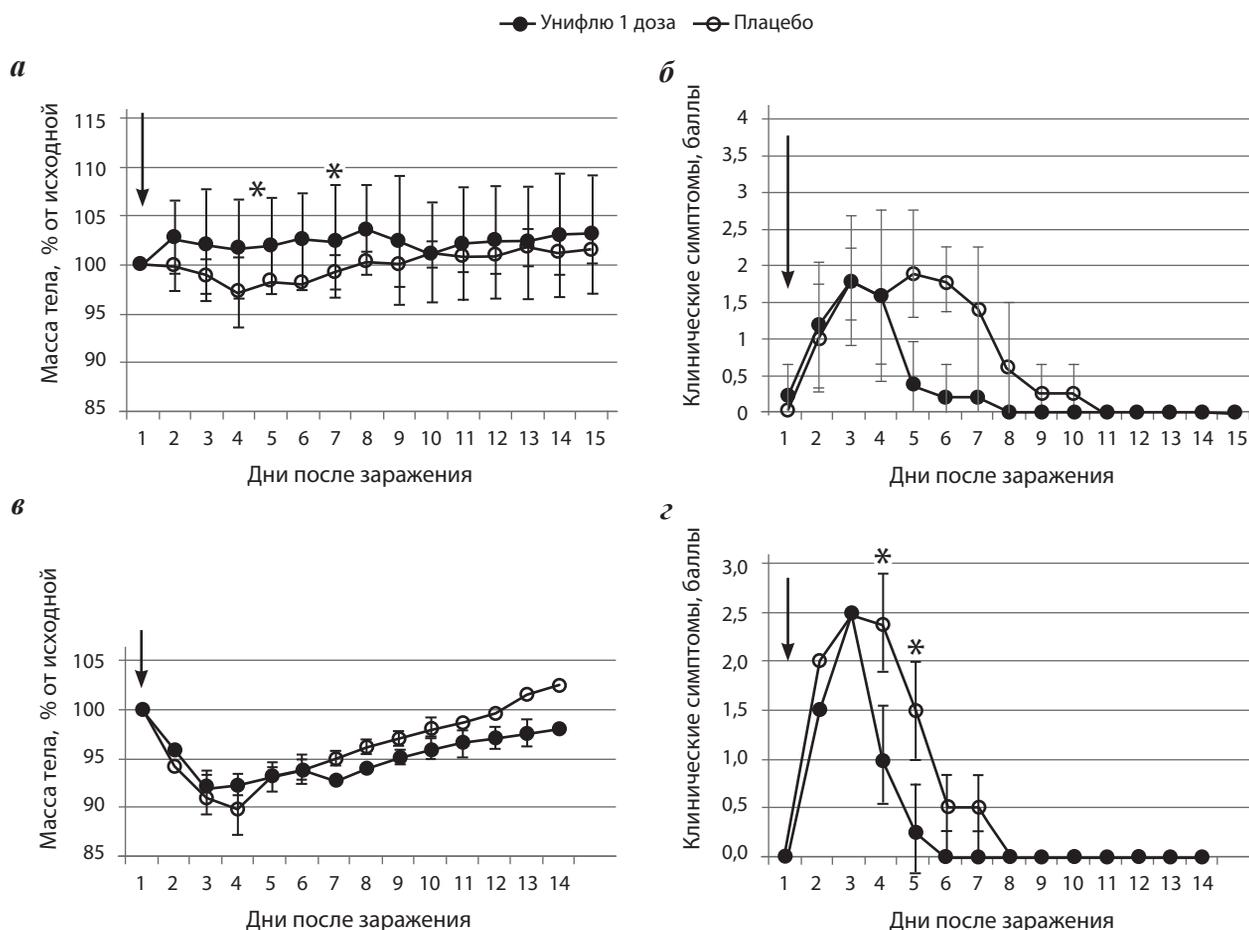


Рис. 4. Доклинические исследования протективности вакцины Унифлю на модели гриппозной инфекции у хорьков.

*а* – динамика массы тела и *б* – клинические симптомы (в баллах) у хорьков опытной и контрольной групп после заражения эпидемическим вирусом A/Brisbane/53/07 (H1N1) в дозе 6,5–7,0 log<sub>10</sub> ТЦИД<sub>50</sub>; *в* – динамика массы тела и *г* – клинические симптомы (в баллах) у хорьков опытной и контрольной групп после заражения эпидемическим вирусом A/Texas/50/2012 (H3N2); \* – достоверные различия между группами на 5–7-й день наблюдения ( $p \leq 0,05$  по критерию Манна–Уитни).

Из результатов, представленных в таблице, следует, что ИС пролиферации лимфоцитов селезенки после активации у мышей, иммунизированных вакциной (1-я группа), был достоверно в 1,9 раз выше, чем в группе мышей, получивших плацебо (2-я группа). Также у мышей опытной группы определялись CD3+CD4+ и CD3+CD8+ Т-клетки, синтезирующие ИФН-γ, тогда как в группе плацебо такие спленоциты отсутствовали.

Исследование протективности вакцины на мышах показало, что вакцинация уменьшает тяжесть инфекции. Так, максимальная потеря массы тела в опытных группах при заражении разными вирусами, идентичными вакцине по M2e-пептиду, составляла 16,3–17,7%, тогда как в группах плацебо – 20,1–35,3%. Вакцина Унифлю обеспечивала 90–100% защиту животных от летального заражения (5 LD<sub>50</sub>) вирусами гриппа А человека различных субтипов: A/PR/8/34, A/Japan/305/57, A/Aichi/2/68 (рис. 3). Выявлен защитный эффект вакцины также при заражении иммунизированных мышей гетерологичным по M2e вирусом гриппа A/California/7/2009 (H1N1)pdm09, у которого эктодомен белка M2 отличается на 4 аминокислоты от последовательности M2e других субтипов вирусов гриппа А человека и от M2e, содержащегося в вакцине. При заражении вирусом A/

California/7/2009 вакцина Унифлю обеспечила 80% выживаемость мышей. Следует отметить, что защитные свойства практически не снижались и после её хранения в течение 15 мес. Вакцинация также достоверно снижала репродукцию вирусов гриппа А разных субтипов в лёгких мышей при последующем заражении: при заражении вирусом A/PR/8/34 – на 2,65 log<sub>10</sub>, A/Japan305/57 – на 4,79 log<sub>10</sub>, A/Aichi/2/68 – на 1,8 log<sub>10</sub>.

Защитные свойства вакцины были продемонстрированы также на хорьках, чувствительность которых к вирусу гриппа и клиника гриппа максимально близки к таковым у человека. На 21-й день после иммунизации СГТ анти-M2e-IgG составил 1:43 000 против 1:200 в группе плацебо, на 61-й день он снизился в 2 раза и составил 1:19 401, что, однако, было достоверно выше, чем у хорьков группы плацебо ( $p = 0,0397$ ) (см. рис. 2). Через 5 мес после иммунизации анти-M2e-IgG еще определялись в крови привитых хорьков и отсутствовали в группе плацебо ( $p < 0,05$ ).

До заражения вирусом гриппа A/Brisbane/53/07 (H1N1) по результатам реакции торможения гемагглютинации (РТГА) все хорьки были серонегативными. Через 1 мес после заражения у животных обеих групп определялся протективный титр анти-НА-антител. У хорьков, имму-

низированных препаратами НВс4М2е и НВс, он составил 1:278,6 и 1:105,6 соответственно. Через 4 мес после заражения у хорьков, получивших вакцину Унифлю, титры антител в РТГА к вирусу гриппа A/Brisbane/53/07 не изменились (СГТ = 1:278,6), а у хорьков, иммунизированных препаратом НВс (плацебо), снизились почти в 2 раза (СГТ = 1:52,8). Это свидетельствует, во-первых, о том, что обе группы хорьков перенесли гриппозную инфекцию, закончившуюся формированием протективного иммунитета, и, во-вторых, указывает на то, что иммунизация хорьков рекомбинантной вакциной на основе белка НВс4М2е не только не мешала формированию нейтрализующих антител после заражения вирусом гриппа, но и способствовала его усилению и более длительному сохранению.

После заражения вирусом A/Brisbane/53/07 (H1N1) у хорьков, иммунизированных как вакциной Унифлю, так и плацебо, было зарегистрировано повышение температуры тела до 39,0–39,7°C, но у животных опытной группы показатели были в целом ниже, и нормализация наступила раньше – к 3–6-м суткам, у контрольных – к 8–9-м суткам. Как следует из рис. 4, выздоровление хорьков опытной группы наблюдали уже на 5-е сутки после заражения, тогда как в группе плацебо – на 9–10-е. Следовательно, двукратная иммунизация животных препаратом Унифлю способствовала уменьшению длительности проявления клинических симптомов заболевания на 4–5 сут.

С целью характеристики кросс-протективности и длительности сохранения защитных свойств препарата иммунизированных животных через 4 мес после первого заражения вирусом гриппа A/Brisbane /53/07 (H1N1) заражали эпидемическим вирусом гриппа A/Texas/50/2012 (H3N2). У животных как опытной, так и контрольной группы на фоне заражения вирусом гриппа A/Texas/50/2012 (H3N2) произошло незначительное снижение массы тела. В обеих группах хорьков наблюдали снижение общей активности, наличие респираторных симптомов, что свидетельствует об активном развитии инфекции. Максимум проявлений инфекции у хорьков контрольной группы наблюдался со 2-х по 6-е сутки. К 7-м суткам клинические симптомы (чихание) наблюдались только у одного животного. У иммунизированных хорьков зафиксировано выздоровление уже на 4-е сутки после заражения ( $p < 0,05$ ).

### Обсуждение

Разработанная противогриппозная вакцина Унифлю представляет собой вирусоподобные частицы, образованные коровым антигеном вируса гепатита В, несущим в иммунодоминантных областях (иммунодоминантные петли) по 4 копии пептида М2е. Многопараметрический анализ препарата, включая электронную микроскопию и масс-спектрометрию, подтвердил структуру и состав целевого белка вакцины. В качестве адьюванта в вакцину был введен Деринат–коммерческий препарат. Действующее вещество препарата Деринат более чем на 2/3 состоит из фрагментов ДНК, оканчивающихся нуклеотидным мотивом неметилированных CpG, которые взаимодействуют с TLR9. Введение Дерината экспериментальным животным усиливает экспрессию гена TLR-9, а также вызывает дозозависимое усиление экспрессии TLR9 макрофагами, что свидетельствует об активации Деринатом врожденного иммунитета через TLR9-рецепторы на антигенпрезентирующих клетках [17, 18].

Продемонстрирована высокая иммуногенность вакцины. Иммунизация двух видов лабораторных животных, мышей и хорьков, индуцировала выраженный иммунный ответ, в первую очередь высокие титры анти-M2e-IgG в сыворотках крови. Специфические к М2е IgG определялись также в БАЛ мышей через 3 нед после вакцинации. М2е-специфические IgG не являются нейтрализующими и осуществляют противовирусную активность, связываясь с эктодоменом белка М2, который экспрессируется в больших количествах на поверхности инфицированных клеток. Механизм их действия обусловлен антителозависимой (АЗКЦ) и комплемент-зависимой клеточной цитотоксичностью [9–11]. Среди иммуноглобулинов класса G подкласса IgG2a является наиболее важными медиатором АЗКЦ у мышей линии Balb/C [19–21]. Нами показано, что после вакцинации IgG2a образовывались в достаточно высокой концентрации, и соотношении IgG1/IgG2 составляло 1,15. Как видно из рис. 2, иммунный ответ на белок НВс в составе рекомбинантного вакцинного белка НВс4М2е был значительно слабее, чем на отдельный белок-носитель НВс (плацебо). Это положительный эффект, так как высокий уровень антител к белку-носителю может снизить формирование анти-M2e-антител (феномен эпитопной супрессии, при котором иммунитет против белкового носителя приводит к редукции антительного ответа против гаптена, конъюгированного с носителем) [22].

В ответ на иммунизацию происходило образование Т-лимфоцитов, экспрессирующих ИФН- $\gamma$ , относящихся к Т-клеткам-хелперам 1-го типа. Именно они вызывают изотипическое переключение синтеза Ig с IgG1 на IgG2a [23], и это согласуется с полученными данными относительно образования IgG2a в сыворотках крови после иммунизации.

Результаты доклинического изучения протективности рекомбинантной вакцины Унифлю свидетельствуют о широком спектре её защитного действия. Оно проявлялось в отношении не только вирусов гриппа А, имеющих идентичную аминокислотную последовательность пептида М2е (субтипы вируса гриппа А/Н3, А/Н2, А/Н1), но и вируса А(Н1N1)pdm09, у которого аминокислотная последовательность М2е пептида отличается по 4 позициям. С большой долей вероятности можно предположить, что такой же защитный эффект (около 80%) вакцина Унифлю будет иметь в отношении вирусов субтипа А/Н5, включая высокопатогенный вирус А/Н5N1, так как пептид М2е вирусов А(Н1N1)pdm09 и А/Н5N1 отличается всего на одну аминокислоту в позиции 12, не критичной для связывания специфических антител. Протективность вакцины по отношению к другим потенциально пандемическим вирусам гриппа птичьего происхождения требует дополнительных исследований.

Защитный эффект вакцины продемонстрирован также на модели хорьков как непосредственно после вакцинации, так и спустя продолжительное время (4 мес). Клинические симптомы после заражения иммунизированных животных были более слабо выражены и исчезали быстрее, чем у хорьков, иммунизированных плацебо. Крайне важным, с нашей точки зрения, является тот факт, что иммунизация вакциной на основе пептида М2е не только не препятствовала формированию высоких титров нейтрализующих антигемагглютининов при последующем заражении животных вирусом гриппа, но и усиливала образование этих антител. При этом не отмечено снижение титров антител в сыворотках через длительное время по-

сле иммунизации (4 мес) в отличие от титров антигемагглютининов у хорьков, получивших плацебо.

Ранее мы высказали предположение [13], что рекомбинантные кросс-протективные вакцины могут быть использованы для праймирования детей. Иммунизация такой вакциной не препятствует развитию естественной инфекции в легкой форме и соответственно формированию полноценного иммунного ответа на все вирусные белки, что совершенно исключается при ежегодной вакцинации детей субъединичными вакцинами.

### Заключение

Таким образом, рекомбинантная вакцина Унифлю, созданная на основе эктодомена белка М2 вируса гриппа, приводит к формированию высокого уровня специфических иммуноглобулинов в крови и БАЛ, включая субтип IgG2a, наиболее важный медиатор АЗКЦ. Вакцина стимулирует пролиферацию Т-лимфоцитов и образование CD4+, CD8+ клеток, синтезирующих ИФН-γ. Вакцинация уменьшает тяжесть инфекции при экспериментальном заражении летальными дозами вирусов и защищает животных от гибели в 80–100% случаев. Она обладает выраженной кросс-протективностью и при успешном завершении клинических исследований может рассматриваться как предпандемическая.

### Благодарность.

Работа выполнена в рамках государственного контракта № 13411.1008799.13.13 с Минпромторгом РФ. Исследования специфической активности рекомбинантного белка, содержащего М2е, на хорьках проведены при поддержке Российского научного фонда (соглашение 15-14-0043 от 19 мая 2015 г.).

Выражаем благодарность нашим коллегам - сотрудникам Федерального исследовательского центра биотехнологии РАН за выполненные генно-инженерные работы, а также сотрудникам Института доклинических исследований (Ленинградская область, Всеволожский район) за помощь в работе с хорьками.

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

### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1-16, 19-23 см. REFERENCES)

- Филатов О.Ю., Кашаева О.В., Бугримов Д.Ю., Климович А.А. Морфофизиологические принципы иммунологического действия ДНК эукариот. *Российский иммунологический журнал*. 2013; 7(4): 385-90.
- Бугримов Д.Ю., Лядов Д.В., Красноруцкая О.Н., Климович А.А. Оценка уровня экспрессии TLR-9 рецепторов при введении препарата Деринат. *Вестник новых медицинских технологий*. 2012; 19(2): 288-9.

### REFERENCES

- Wood J.M. Developing vaccines against pandemic influenza. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2001; 356(1416): 1953-60.
- Neiryck S., Deroot I., Saelens X., Vanlandschoot P., Jou W., Fiers W. A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein. *Nat. Med.* 1999; 5(10): 1157-63.
- Fiers W., De Filette M., El Bakkouri K., Schepens B., Roose K., Schotsaert M., et al. M2e-based universal influenza A vaccine. *Vaccine*. 2009; 27(45): 6280-3.
- Steel J., Lowen A., Wang T.T., Yondola M., Gao Q., Haye K., et al. Influenza virus vaccine based on the conserved hemagglutinin stalk domain. *MBio*. 2010; 1(1): e00018-10.
- Hessel A., Savidis-Dacho H., Coulibaly S., Portsmouth D., Kreil T.R., Crowe B.A., et al. MVA vectors expressing conserved influenza

- proteins protect mice against lethal challenge with H5N1, H9N2 and H7N1 viruses. *PLoS One*. 2014; 9(2): e88340.
- Dehg L., Ibanes L.I., Van den Bossche V., Roose K., Youssef S.A., de Bruin A. et al. Protection against Influenza A Virus Challenge with M2e-Displaying Filamentous Escherichia coli Phages. *PLoS One*. 2015; 10(5): e0126650.
- WHO. Global Vaccine Action Plan. Available at: [http://www.who.int/immunization/global\\_vaccine\\_action\\_plan/en/](http://www.who.int/immunization/global_vaccine_action_plan/en/)
- Jegerlehner A., Schmitz N., Storni T., Bachmann M.F. Influenza A vaccine based on the extracellular domain of M2: weak protection mediated via antibody-dependent NK cell activity. *J. Immunol.* 2004; 172(9): 5598-605.
- El Bakkouri K., Descamps F., De Filette M., Smet A., Festjens E., Birkett A. et al. Universal vaccine based on ectodomain of matrix protein 2 of influenza A: Fc receptors and alveolar macrophages mediate protection. *J. Immunol.* 2011; 186(2): 1022-31.
- Andersson A.M., Hakansson K.O., Jensen B.A., Christensen D., Andersen P., Thomsen A. R., et al. Increased immunogenicity and protective efficacy of influenza M2e fused to a tetramerizing protein. *PLoS One*. 2012; 7(10): e46395.
- Kim M.C., Lee Y.N., Ko E.J. Supplementation of influenza split vaccines with conserved M2 ectodomains overcomes strain specificity and provides long-term cross protection. *Mol. Ther.* 2014; 22(7): 1364-74.
- Ravin N.V., Blokhina E.A., Kuprianov V.V., Stepanova L.A., Shaldjan A.A., Kovaleva A.A., et al. Development of a candidate influenza vaccine based on virus-like particles displaying influenza M2e peptide into the immunodominant loop region of hepatitis B core antigen: Insertion of multiple copies of M2e increases immunogenicity and protective efficiency. *Vaccine*. 2015; 33(29): 3392-7.
- Tsybalova L.M., Stepanova L.A., Kuprianov V.V., Blokhina E.A., Potapchuk M.V., Korotkov A.V., et al. Development of a candidate influenza vaccine based on virus-like particles displaying influenza M2e peptide into the immunodominant region of hepatitis B core antigen: Broad protective efficacy of particles carrying four copies of M2e. *Vaccine*. 2015; 33(29): 3398-406.
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259): 680-5.
- Malen H., Berven F.S., Fladmark K.E., Wiker H.G. Comprehensive analysis of exported proteins from Mycobacterium tuberculosis H37Rv. *Proteomics*. 2007; 7(10): 1702-18.
- Stepanova L.A., Kotlyarov R.Y., Kovaleva A.A., Potapchuk M.V., Korotkov A.V., Sergeeva M.V., et al. Protection against multiple influenza A virus strains induced by candidate recombinant vaccine based on heterologous M2e peptides linked to flagellin. *PLoS One*. 2015; 10(3): e0119520.
- Filatov O.Yu., Kashaeva O.V., Bugrimov D.Yu., Klimovich A.A. Morphophysiological principles of immunological action of eukaryotic DNA. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal*. 2013; 7(4): 385-90. (in Russian)
- Bugrimov D.Yu., Lyadov D.V., Krasnorutskaya O.N., Klimovich A.A. Evaluation of the expression level of TLR-9 receptors upon administration of Derinat preparation. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy*. 2012; 19(2): 288-9. (in Russian)
- De Filette M., Jou W.M., Birkett A., Lyons K., Schultz B., Tonkyro A., et al. Universal influenza A vaccine: optimization of M2-based constructs. *Virology*. 2005; 337(1): 149-61.
- Mozdzanovska K., Zharikova D., Cudic M., Otvos I., Gerhard W. Roles of adjuvant and route of vaccination in antibody response and protection engendered by a synthetic matrix protein 2-based influenza A virus vaccine in the mouse. *Viol. J.* 2007; 4: 118-29.
- Schmitz N., Beerli R., Bauer M., Jegerlehner A., Dietmeier K., Maudrich M., et al. Universal vaccine against influenza virus: linking TLR signaling to anti-viral protection. *Eur. J. Immunol.* 2012; 42(4): 863-9.
- Herzenberg L.A., Tokuhisa T., Park D.R. Epitope-specific regulation. II. A bistable, Igh-restricted regulatory mechanism central to immunologic memory. *J. Exp. Med.* 1982; 155(6): 1741-53.
- Spellberg B. Type 1/Type 2 Immunity in Infectious Diseases. *Clin. Infect. Dis.* 2000; 32(1): 76-102.

Поступила 17.11.17

Принята в печать 12.12.17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018  
УДК 616.327.2-006.04-022:578.825.13

*Кондратова В.Н., Ломая М.В., Игнатова А.В., Душенькина Т.Е., Смирнова К.В., Мудунов А.М.,  
Лихтенштейн А.В., Гурцевич В.Э., Сенюта Н.Б.*

## ВИРУС ЭПШТЕЙНА–БАРР И РАК НОСОГЛОТКИ: ВИРУСНЫЕ МАРКЁРЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ОЦЕНКИ КЛИНИЧЕСКОГО СТАТУСА БОЛЬНЫХ

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478, г. Москва

Этиологическая роль вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ) в возникновении недифференцированного гистологического варианта рака носоглотки (нРНГ) впервые доказана в регионах с высоким уровнем заболеваемости этой патологией, южных провинциях Китая и странах Юго-Восточной Азии, а позже и в остальных странах мира. Высокие титры антител к ВЭБ, сопровождающие нРНГ, позволили широко использовать серологические маркёры вируса для диагностики этой опухоли. В последние годы в эндемичных по нРНГ регионах для раннего выявления и мониторинга болезни большое распространение получило тестирование плазмы крови больных на содержание ДНК ВЭБ. В неэндемичных регионах такие исследования практически не проводились, не изучена и сравнительная оценка диагностической и прогностической значимости вирусных маркеров нРНГ: гуморального ответа к ВЭБ и нагрузки вирусными копиями кровотока больных. Цель данного исследования, проводимого в России, заключалась в сравнении клинической значимости серологических маркёров ВЭБ и вирусной ДНК в плазме крови больных нРНГ из неэндемичного региона. Полученные результаты свидетельствуют о том, что IgA-антитела к вирусному капсидному антигену (IgA/ВКА) и копии ДНК ВЭБ в плазме могут быть с успехом использованы для диагностики нРНГ у больных из этого региона, в то время как IgG/ВКА-антитела в качестве маркёра не имеют практического значения. Кроме того, было обнаружено, что показатель концентрации ДНК ВЭБ в плазме крови больных является более чувствительным маркёром нРНГ, чем титры IgA/ВКА-антител, поскольку он более точно отражает эффект проведённой терапии и клиническое состояние больных в периоды ремиссии или рецидива. Впервые показано, что в неэндемичном регионе наиболее эффективным для диагностики нРНГ является комбинированная оценка уровней анти-ВЭБ IgA/ВКА-антител и концентрации в плазме больных вирусной ДНК.

**Ключевые слова:** рак носоглотки; вирус Эпштейна–Барр; серологические маркёры.

**Для цитирования:** Кондратова В.Н., Ломая М.В., Игнатова А.В., Душенькина Т.Е., Смирнова К.В., Мудунов А.М., Лихтенштейн А.В., Гурцевич В.Э., Сенюта Н.Б. Вирус Эпштейна–Барр и рак носоглотки: вирусные маркёры для диагностики и оценки клинического статуса больных. *Вопросы вирусологии*. 2018; 63(2): 77-84.

DOI: [http://dx.doi.org/ 10.18821/0507-4088-2018-63-2-77-84](http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-2-77-84)

*Kondratova V.N., Lomaya M.V., Ignatova A.V., Dushenkina T.E., Smirnova K.V., Mudunov A.M.,  
Lichtenstein A.V., Gurtsevitch V.E., Senyuta N.B.*

## EPSTEIN-BARR VIRUS AND NASOPHARYNGEAL CARCINOMA: VIRAL MARKERS FOR DIAGNOSTICS AND ASSESSMENT OF CLINICAL STATUS OF PATIENTS

N.N. Blokhin National Medical Cancer Research Center, Moscow, 115478, Russian Federation

The etiological role of the Epstein-Barr virus (EBV) in the development of an undifferentiated histological variant of nasopharyngeal carcinoma (uNPC) found for the first time in regions with a high incidence of this pathology, the Southern provinces of China and the countries of Southeast Asia, and later in the rest of the world, has served as a basis for the widespread use of EBV serological markers for the diagnosis of this form of tumor. In recent years, the use of a test based on the quantitative determination of the EBV DNA concentration in the blood plasma of uNPC patients for early detection and monitoring of the disease has become widespread in endemic regions. In non-endemic regions, such studies virtually have not been carried out, and moreover, the comparative evaluation of the significance of two viral markers, serological and EBV DNA load in the bloodstream of uNPC patients, for diagnostics and evaluation of the therapeutic effect was not investigated. The aim of this study was to compare the clinical value of two serological markers and plasma EBV DNA load in uNPC patients from non-endemic region (Russia). The obtained results indicate that IgA antibodies to the viral capsid antigen (IgA/VCA) and plasma EBV DNA concentration can be successfully used for the diagnosis of uNPC, while IgG/VCA antibodies have no practical significance as an uNPC marker. In addition, it was found that plasma EBV DNA load is more sensitive marker of uNPC than IgA/VCA titers because DNA copy numbers reflect more accurately the effect of the therapy and the clinical state of patients at the stages of remission or relapse. It was shown for the first time that in the non-endemic region the simultaneous evaluation of IgA/VCA antibody levels and the plasma EBV DNA loads are the most effective markers for the diagnostics of uNPC. However, we believe, that it is more practical to use IgA/VCA antibody levels for uNPC screening, and plasma EBV DNA copies – for monitoring of the disease.

**Key words:** nasopharyngeal carcinoma; Epstein–Barr virus; serological markers.

**For citation:** Kondratova V.N., Lomaya M.V., Ignatova A.V., Dushenkina T.E., Smirnova K.V., Mudunov A.M., Lichtenstein A.V., Gurtsevitch V.E., Senyuta N.B. Epstein-Barr virus and nasopharyngeal carcinoma: viral markers for diagnostics and assessment of clinical status of patients. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2018; 63(2): 77-84. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-2-77-84>

**Для корреспонденции:** Гурцевич Владимир Эдуардович, д-р мед. наук, профессор, вед. научный сотрудник лаборатории вирусного канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н.Блохина» Минздрава России, 115478, г. Москва.  
E-mail: [gurtsevitch-vlad-88@yandex.ru](mailto:gurtsevitch-vlad-88@yandex.ru)

**For correspondence:** Vladimir E. Gurtsevitch, Dr. Med. Sci., leading researcher of the Laboratory of viral carcinogenesis, N.N. Blokhin National Medical Cancer Research Center, Moscow, 115478, Russian Federation.  
E-mail: [gurtsevitch-vlad-88@yandex.ru](mailto:gurtsevitch-vlad-88@yandex.ru)

**Information about authors:**

Gurtsevitch V.E., <http://orcid.org/0000-0003-1840-4364>; Senyuta N.B., <http://orcid.org/0000-0001-8915-8274>;

Mudunov A.M., <http://orcid.org/0000-0002-0918-3857>

**Acknowledgment.** The study had no sponsorship.

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

Received 10 October 2017

Accepted 17 October 2017

## Введение

Вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ), представитель семейства герпесвирусов человека, обладает уникальными биологическими свойствами. Им инфицировано более 90% населения планеты, как правило, без клинических проявлений у вирусоносителей. В то же время вирус признан этиологическим агентом для ряда доброкачественных и злокачественных заболеваний [1]. Среди последних особое место занимает рак носоглотки (РНГ), в возникновении которого ВЭБ играет ключевую роль, стимулируя в носоглотке развитие патологического процесса, прогрессирующего от предраковых поражений до появления злокачественной опухоли [2].

Заболеваемость РНГ в мире характеризуется географической и этнической вариабельностью [3]. Она наиболее высока в южных провинциях Китая и странах Юго-Восточной Азии (25–30 случаев на 100 тыс. населения в год), несколько реже – в арабских странах Северной Африки, среди коренных народов Гренландии и Аляски [4]. В западных странах это новообразование регистрируют редко, менее 0,5 случая на 100 тыс. населения в год [5]. Примерно с такой же частотой РНГ встречается и на территории бывшего СССР, включая Россию, в которой в структуре злокачественных новообразований в 2013 г. опухоли носоглотки у мужчин составляли 0,14%, у женщин – 0,06% [6].

Согласно классификации ВОЗ РНГ морфологически подразделяется на 2 типа: плоскоклеточный ороговевающий рак (keratinizing squamous cell carcinoma) и неороговевающий рак (non-keratinizing squamous cell carcinoma), к которому как подтип относится недифференцированный рак носоглотки, нРНГ (undifferentiated carcinoma) [7]. Для неороговевающего рака обычно характерна обильная лимфоидная инфильтрация, состоящая из лимфоцитов, гистиоцитов, эозинофилов и других реактивных клеточных элементов [8, 9].

Молекулярно-эпидемиологические исследования показали, что у больных РНГ ассоциация с ВЭБ не зависит от географического происхождения и этнической принадлежности больного [10]. Однако для реализации онкогенной потенции вируса и возникновения опухоли необходимо воздействие на организм ряда вредных факторов внешней и/или внутренней среды, обладающих мутагенными свойствами, приводящих к метилированию генов опухолевых супрессоров, активации или супрессии других генов, а также так называемых собственно хозяйских факторов. К их числу относят ослабленный иммунный ответ на вирусную инфекцию, ослабленный локальный иммунный ответ, определённый HLA-генотип хозяина, наследственную предрасположенность и другие [11–14]. Практически все случаи нРНГ являются ВЭБ-позитивными, при этом вирус присутствует во всех опухолевых клетках в отличие от ряда других патологий, ассоциированных с этим виру-

сом. Вирусный геном в очагах трансформации у таких больных можно обнаружить уже в ранних стадиях опухолевого процесса [15].

Для большинства больных нРНГ характерны повышенные титры гуморальных антител к ВЭБ [16, 17], которые поднимаются до высоких уровней задолго до установления диагноза [18]. Это дало основание предположить, что ВЭБ может участвовать в патогенезе нРНГ ещё в доклинической фазе болезни. При этом обнаружение антител IgA к вирусному капсидному антигену (ВКА) широко используется для скрининга нРНГ в эндемичных по этому заболеванию регионах Китая и странах Юго-Восточной Азии [19], но также часто выявляются и высокие титры IgG-антител к ВКА (IgG/ВКА).

В 1999 г. У. Ло и соавт. [20] удалось впервые показать, что концентрация ДНК ВЭБ в плазме крови больных является важным маркером РНГ. Их результаты были позже подтверждены рядом исследований, в которых установлено, что определение количества копий ДНК ВЭБ в плазме особенно полезно для диагностики и выявления остаточных (клинически скрытых) опухолей после химиолучевой терапии [21], а также оценки эффективности лечения [22]. Однако если повышенные уровни ДНК ВЭБ в плазме тесно связаны с размером опухоли, активностью её роста и ответом на химиотерапию [23–25], уровни IgA-антител к ВКА, как правило, ассоциируются с повышенным риском возникновения РНГ и имеют диагностическое значение [26, 27]. Из этого следует, что диагностическое и прогностическое значение обоих маркеров может часто не совпадать [28–32]. В этой связи представляется важным выяснить, окажется ли комбинация гуморального ответа к ВЭБ с уровнями вирусной ДНК в плазме крови больных РНГ оптимальной для их использования в качестве диагностического маркера нРНГ, а также оценки эффективности проведённой терапии и прогноза болезни. Подобные исследования были проведены у больных РНГ из эндемичных регионов [29, 31, 32], однако их значимость у пациентов с этой же патологией из неэндемичных регионов ещё не была должным образом исследована. Как уже упоминалось ранее, кроме ВЭБ, в качестве этиологических факторов РНГ рассматриваются генетическая предрасположенность к этому заболеванию, иммунодефицит и загрязнение окружающей среды. Действительно, у населения географических районов с высоким риском возникновения РНГ выявлены определённые типы распределения HLA-генотипа, отличающиеся от таковых в регионах с низкой заболеваемостью. Кроме того, для разных географических регионов и этнических групп, как правило, характерны кулинарные предпочтения, особенности быта и воздействие различающихся вредных факторов окружающей среды [3, 11, 12]. Таким образом, нельзя исключить, что в неэндемичных странах

ВЭБ-ассоциированный канцерогенез у больных нРНГ имеет свои особенности. В связи с этим целью данного исследования стало проведение в неэндемичном регионе России сравнительной оценки клинической значимости двух серологических маркеров ВЭБ – титров IgG/ВКА- и IgA/ВКА-антител и концентраций ДНК ВЭБ в плазме крови больных РНГ.

### Материал и методы

#### *Больные и клинические образцы*

Материалом для исследования служила плазма крови 45 больных РНГ и 52 пациентов с другими опухолями слизистой оболочки полости рта (ДОПР), не ассоциированными с ВЭБ, которые проходили лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. В качестве контрольных использовали 19 образцов плазмы крови доноров. Соотношение мужчин и женщин, больных РНГ, было 1,6:1, средний возраст составил 45,6 года. У всех больных РНГ согласно классификации ВОЗ был диагностирован неороговевающий вариант рака, нРНГ. В состав больных ДОПР вошли больные раком слизистой оболочки, языка, нёба, щеки, нижней челюсти и некоторыми другими злокачественными поражениями полости рта. Соотношение мужчин и женщин было 2,4:1, средний возраст составил 48,8 года. От больных нРНГ 32 образца плазмы были получены до проведения терапии, 31 образец – в состоянии ремиссии или стабилизации опухолевого процесса и 9 образцов – в состоянии рецидива или метастазирования опухоли. Проведённое исследование, в которое больные нРНГ и ДОПР вошли с их согласия в результате применения метода случайной выборки, было одобрено Комитетом по этике при ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

#### *Экстракция циркулирующей ДНК*

Кровь (5 мл), собранную в пробирки с ЭДТА, центрифугировали при 1500 g, плазму отбирали и хранили при -60°C. Полученные образцы плазмы объемом 0,5–1,0 мл депротеинизировали фенолом и хлороформом, после чего обессоливали путем диализа или центрифугирования через фильтры Amicon. Для выделения нуклеиновых кислот из плазмы крови применили оригинальный метод (изотахофорез в агарозном геле), который обеспечивает полное извлечение всех молекул независимо от размера, что особенно важно при исследовании фрагментированной ДНК [33]. Концентрацию ДНК определяли флуориметрически с красителем SYBR Green I на приборе Plate Reader Chameleon V multilabel counter («Hidex Oy», Финляндия).

#### *Серологический тест на антитела к ВЭБ*

Серологическую активность больных на ВЭБ оценивали с помощью непрямой реакции иммунофлюоресценции. Условия проведения реакции и учёт получаемых результатов были ранее подробно описаны нами и другими исследователями [16, 34], при этом титры ВЭБ-специфических антител в изучаемых группах были представлены в виде их среднегеометрических значений (СГЗ).

#### *Количественное определение копий ДНК ВЭБ*

Количество копий вирусной ДНК в 1 мл плазмы определяли с помощью метода ПЦР в реальном времени. Для построения калибровочных кривых использовали ДНК диплоидных клеток Namalwa, содержащих 2 интегрированных вирусных генома; при этом исходили из соотношения 3,3 пг геномной ДНК на 1 копию вирусной ДНК [35]. Для ПЦР в реальном времени исполь-

зовали следующие праймеры для амплификации фрагмента из 76 пар нуклеотидов (п. н.) в области BamHIW вирусной ДНК (GenBank ID: V01555): сенс-праймер W44F (5'-CCCAACACTCCACCACACC), антисенс-праймер W-119R (5'-TCTTAGGAGCTGTCCGAGGG) и флуоресцентный зонд W-67T (5'-FAM-CACACASTACACACACCCCGTCTC-RTQ1) [20]. Реакцию проводили в 96-луночных планшетах с использованием прибора CFX96 («Bio-Rad Laboratories», США) в 50 мкл реакционной смеси («Syntol», Россия), содержащей 0,3 мкМ каждого праймера, 25 нМ флуоресцентного зонда, 4 мМ MgCl<sub>2</sub>, 200 мкМ каждого dNTP, 1 единицу Taq-полимеразы и 10 мкл раствора ДНК в 10 мМ буфере Tris HCl (pH 8,0) с 1 мМ ЭДТА (что соответствует 50 мкл плазмы). В каждом анализе использовали 2 отрицательных контроля (образцы, которые не содержали ДНК). ПЦР ставили по следующей схеме: денатурация при 95°C в течение 5 мин, 40 циклов при 95°C в течение 15 с и 56,5°C в течение 30 с. Данные ПЦР в реальном времени анализировали с использованием программного обеспечения CFX Manager («Bio-Rad»).

#### *Статистический анализ*

Статистическую достоверность различий в распределении полученных измерений (СГЗ титров антител к ВЭБ и значений концентраций ДНК ВЭБ) в плазме больных нРНГ и ДОПР до лечения, после лечения, в ремиссии и рецидиве, а также при разных параметрах ТНМ проявления РНГ оценивали по критерию Краскела–Уоллиса. Полученные значения считали значимыми при  $p < 0,05$ .

### Результаты

Проведенные исследования показали, что частота обнаружения IgG-антител к ВКА (IgG/ВКА) в плазме больных нРНГ (вне зависимости от клинического статуса), а также у здоровых лиц составляет 100% (табл. 1). Среди больных нРНГ уровень встречаемости IgA-антител к ВКА (IgA/ВКА) был также высоким и наблюдался у 93,8% (30/32) больных до лечения, у 96,8% (30/31) больных после лечения, которые находились в состоянии ремиссии, и у 100% (9/9) больных после лечения с рецидивом заболевания; однако среди здоровых лиц IgA/ВКА-антитела выявлены не были.

У 57 больных ДОПР процент серопозитивных образцов был ниже. В группах больных до лечения или после лечения количество лиц, содержащих IgG/ВКА-антитела, составляло 93,9% (31/33) и 83,3% (20/24) соответственно, а IgA/ВКА-антитела – 15,2% (5/33) и 16,7% (4/24) соответственно.

СГЗ уровней антител к IgG/ВКА у больных нРНГ до лечения равнялось 527,2, это значение снизилось до 286,2 в образцах этих же больных в состоянии ремиссии и значительно увеличилось до 691,3 у больных с рецидивом опухоли. Схожую динамику СГЗ наблюдали и для титров IgA/ВКА-антител: у больных нРНГ до лечения СГЗ было равно 127,1, в состоянии ремиссии оно уменьшилось до 66,4 и резко возросло до 172,8 у больных с рецидивом опухоли. Различия между данными относительно обоих серологических маркеров в изучаемых группах были статистически достоверными ( $p = 0,01$ ).

Серологический ответ к ВЭБ у больных ДОПР также различался в группах до и после лечения. СГЗ титров антител к IgG/ВКА у больных до лечения (51,2) было в 2,1 раза выше по сравнению с таковым у больных после лечения (24,3); данное различие было статистически

достоверным ( $p = 0,04$ ). СГЗ титров антител к IgA/ВКА в группе больных ДОПР было низким и незначительно различалось у больных до и после лечения (1,5 и 1,65 соответственно;  $p = 0,86$ ).

Анализ уровней нагрузки ДНК ВЭБ в плазме периферической крови проводили у 32 больных нРНГ до лечения, 40 больных нРНГ после лечения (31 больной в состоянии ремиссии и 9 в состоянии рецидива заболевания), 42 больных ДОПР (28 до лечения и 14 после лечения) и 19 здоровых доноров крови (табл. 2). Высокая концентрация вирусной ДНК в крови больных нРНГ до химиолучевой терапии (медиана 5594 копии/мл; межквартильный интервал (МКИ) 559—32 740 копий/мл) снижалась до фоновых значений у больных, находящихся в состоянии ремиссии или стабилизации опухолевого процесса после лечения (медиана 11 копий/мл; МКИ 0—448,0 копий/мл), и резко возрастала при рецидиве болезни или метастазировании опухоли (медиана 332 177 копий/мл; МКИ 79 492—2 209 558) (см. табл. 2). Различия уровней ДНК ВЭБ в плазме между тремя изучаемыми группами были высокодостоверны ( $p = 0,001$ ). Концентрация ДНК ВЭБ в плазме крови больных ДОПР в группах до и после лечения не превышала фоновых значений (медиана 22,0 копии/мл; МКИ 0—83 и медиана 0 копий/мл; МКИ 0—133 соответственно), при этом различия между изучаемыми группами были статистически недостоверными ( $p = 0,43$ ).

Важно отметить, что гуморальный ответ больных нРНГ на антигены ВЭБ коррелировал с показателями концентрации ДНК ВЭБ в крови этих больных. Высокие СГЗ титров IgG- и IgA-антител к вирусному капсидному (ВКА) и раннему (РА) антигенам, как и высокие уровни ДНК ВЭБ в плазме больных РНГ до лечения, снижались в состоянии ремиссии и резко возрастали при рецидиве опухолевого процесса или метастазировании.

Клиническая значимость изученных биомаркёров, а именно уровней ВЭБ-специфических антител и концентрации ДНК ВЭБ в плазме периферической крови больных нРНГ, становится очевидной при наблюдении за отдельными больными. Изменения этих маркёров у больных нРНГ, отражающие различный эффект терапии, представлены на рис. 1 и 2. В частности, на рис. 1, а показано, что в плазме больного из группы с клинической ремиссией высокое число копий ДНК ВЭБ (33 709 копий/мл) было обнаружено до лечения (случай

1001). Это число уменьшилось до нуля после первого курса химиотерапии и поддерживалось примерно на том же уровне после последующих курсов. Всё это время больной находился в состоянии клинической ремиссии. Уровни обоих IgG/ВКА- и IgA/ВКА- антител у больного соответствовали общей динамике перехода пациента в состояние клинической ремиссии, хотя наблюдалась некоторая задержка появления серологического ответа на вирусные антигены, видимо, вследствие инерции иммунного механизма. Как видно из рис. 1, а, после первого курса терапии титры обоих антител не изменились и соответствовали таковым до лечения – 1:320 и 1:160 соответственно. После второго курса терапии в отличие от сниженной концентрации ДНК ВЭБ в плазме до нуля титры антител к ВЭБ резко возросли (1:1280 и 1:640 соответственно), но после третьего курса они стали снижаться (1:640 и 1:80 соответственно), а после четвертого курса снизились существенно (1:160 и 1:20 соответственно). Аналогичную динамику концентрации вирусной ДНК и титров ВЭБ-специфических антител наблюдали у другого больного нРНГ (случай 1003) с положительным ответом на терапию (рис. 1, б). В двух рассматриваемых случаях позитивного ответа больных на терапию обнаружена важная закономерность: высокая концентрация ДНК ВЭБ до лечения уже после первых курсов химиотерапии снижалась до фоновых значений и продолжала находиться на этом уровне при последующих курсах лечения, а у больных констатировали состояние ремиссии. Динамика же определяемых количеств копий ДНК ВЭБ и серологических ответов на вирусные антигены у каждого больного была весьма индивидуальной.

Анализ вирусных маркеров у больных с рецидивами опухоли представлен на рис. 2. Как показано на этом рисунке, исходная концентрация ДНК ВЭБ в плазме крови этих больных до лечения (случаи 1005 и 1002) была высокой (52 918 и 32 254 копии/мл соответственно) и сопровождалась высокими титрами IgG/ВКА- и IgA/ВКА-антител (1:640 и 1:80 и 1:320 и 1:80 соответственно). После первого курса химиотерапии концентрация ДНК ВЭБ в плазме значительно уменьшилась (2189 и 1182 копии/мл соответственно), что в обоих случаях совпало с уменьшением размера опухоли и шейных лимфатических узлов. На этом этапе у одного больного (случай 1005) титры IgG/ВКА- и IgA/ВКА-антител незначительно уменьшились до 1: 160 и 1:40 соответственно (рис. 2, а), а у другого (случай 1002), напротив, увеличились до 1: 640 и 1:160 соответственно (рис. 2, б). У одного больного (см. рис. 2, а) после двух курсов химиотерапии и одного курса химиотерапии – у второго (см. рис. 2, б) наблюдали резкое увеличение количества копий ДНК ВЭБ в плазме периферической крови (332 177 и 79 492 копии/мл соответственно), что совпало с рецидивом опухоли у первого больного (см. рис. 2, а) и появлением метастазов опухоли в кости у второго больного (см. рис. 2, б). К этому времени уровни титров ВЭБ-специфических антител существенно не изменились (1:640 и 1:160 против 1:320 и 1:160 соответственно). Таким образом, изучение вирусных маркёров у пациентов с рецидивами опухолевого процесса показало, что серологический ответ

Таблица 1

Уровни ВЭБ-специфических антител у больных нРНГ, ДОПР и здоровых лиц							
Клинический статус	Образцы плазмы	IgG-антитела к ВКА			IgA-антитела к ВКА		
		позитивные случаи, n (%)	СГЗ	p	позитивные случаи, n (%)	СГЗ	p
Больные нРНГ							
До лечения	32	32 (100)	527,2		30 (93,8)	127,1	
После лечения (ремиссия)	31	31 (100)	286,2	0,01	30 (96,8)	66,4	0,01
После лечения (рецидив)	9	9 (100)	691,3		9 (100)	172,8	
Больные ДОПР							
До лечения	33	31 (93,9)	51,2		5 (15,2)	1,5	
После лечения (ремиссия)	24	20 (83,3)	24,3	0,04	4 (16,7)	1,65	0,86
Здоровые лица							
Доноры крови	19	19 (100)	50,0	-	0 (0,0)	1,0	-

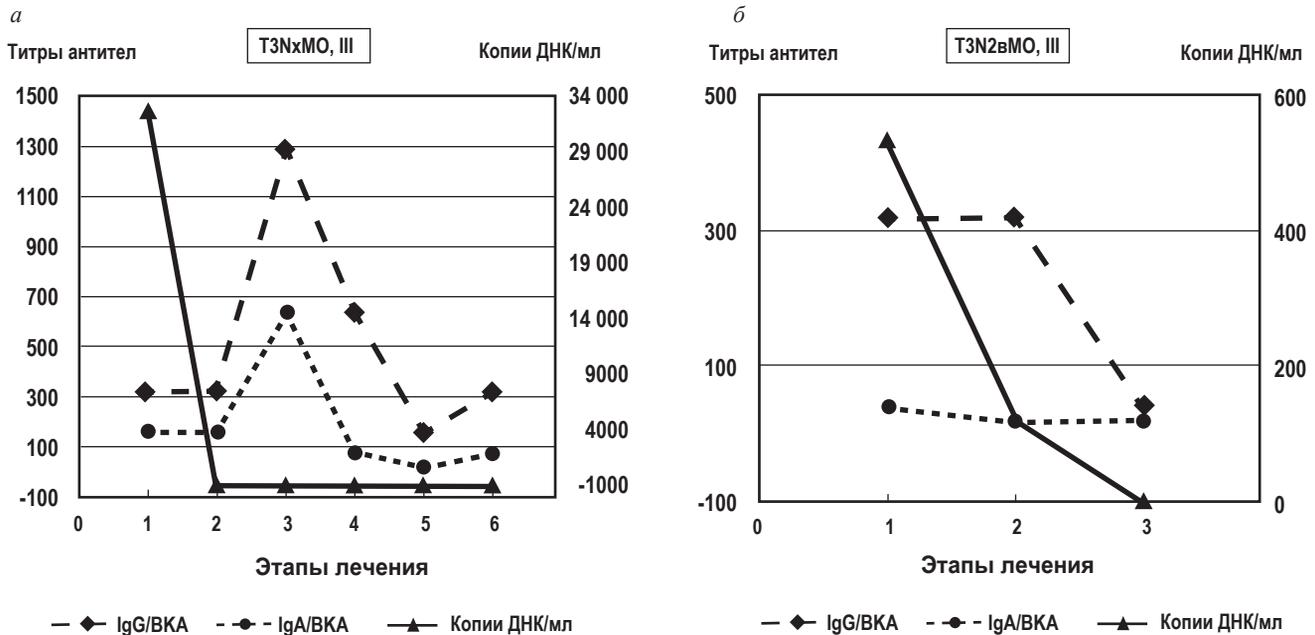


Рис. 1. Маркеры ВЭБ у больных нРНГ, которые положительно реагировали на лечение.

к ВЭБ в отличие от концентрации в плазме вирусной ДНК не отражал эффекта проведенной терапии и соответственно клинических проявлений болезни.

Показатели гуморального ответа к ВЭБ и вирусной нагрузки в плазме больных нРНГ в зависимости от клинических характеристик опухолевого процесса и его распространенности, оцениваемых по классификации TNM, представлены в табл. 3. Из таблицы видно, что оба серологических маркера не отражают тяжести заболевания. Между СГЗ титров IgG/ВКА- и IgA/ВКА-антител у больных нРНГ с различными размерами опухоли (Т1–Т2 и Т3–Т4), размерами патологически изменённых лимфатических узлов (N0–N1 и N2–N3) и степенью прогрессирования заболевания (I–II и III–IV стадии) статистически значимых различий выявлено не было. Однако в отличие от гуморального ответа различие между концентрацией ДНК ВЭБ в плазме (выраженной медианой копий/мл) больных с различной степенью метастазирования в лимфатические узлы было статистически достоверным (1253,5 у больных с N0–N1 против 32 224 у больных с N2–N3;  $p = 0,03$ ). Аналогичная корреляция между размером опухоли и концентрацией ДНК ВЭБ в плазме не выявлена (6459 при Т1–Т2 против 21 095 при Т3–Т4;  $p = 0,53$ ). Не выявлена корреляция и между клиническими стадиями опухолевого процесса и нагрузкой вирусной ДНК в плазме. Примечательно, что СГЗ титров IgG/ВКА- и IgA/ВКА-антител у больных с I–II стадией болезни были выше, чем у больных с III–IV стадией (640,0 против 470,3 и 186,6 против 132,0;  $p > 0,48$  и  $p > 0,58$  соответственно), что можно объяснить иммунодефицитным состоянием больных из последней группы. В то же время медиана концентрации ДНК ВЭБ в плазме больных с III–IV стадией была в 2 раза выше, чем у больных с I–II стадией (9643,5 против 4729). Хотя разница не была статистически достоверной

( $p = 0,81$ ), этот маркер был более точен по сравнению с титрами антител в отражении проявлений болезни.

**Обсуждение**

В последнее время все больший интерес вызывают исследования, связанные с анализом плазмы крови на присутствие ассоциированных с опухолью нуклеиновых кислот, в связи с возможностью применения результатов таких исследований для раннего выявления и мониторинга неопластических процессов. Доказательство присутствия в кровотоке бесклеточной ДНК, высвобождаемой из гибнущих опухолевых клеток, открыло новые возможности для неинвазивной диагностики и мониторинга ряда злокачественных новообразований [36–39].

Предыдущие исследования показали, что ВЭБ тесно ассоциирован с нРНГ [14, 40], и для этих больных характерны высокие титры IgG/ВКА- и IgA/ВКА-антител [16], а также повышенные концентрации ДНК ВЭБ в

Таблица 2

**Копии ДНК ВЭБ в плазме крови больных нРНГ, ДОПР и здоровых доноров крови**

Клинический статус	Образцы плазмы	Концентрация ДНК ВЭБ в плазме			
		позитивные случаи, n (%)	медиана, копии/мл	p	МКИ, копии/мл
Больные нРНГ					
До лечения	32	29 (90,6)	5594	< 0,001	559–32 740
После лечения (ремиссия)	31	16 (51,6)	11		0–299
После лечения (рецидив)	9	9 (100)	332 177		79 492–2209558
Больные ДОПР					
До лечения	28	19 (67,9)	22	0,34	0–83
После лечения (ремиссия)	14	5 (35,7)	0		0–133
Здоровые лица					
Доноры крови	19	0 (0,00)	0	-	0–0

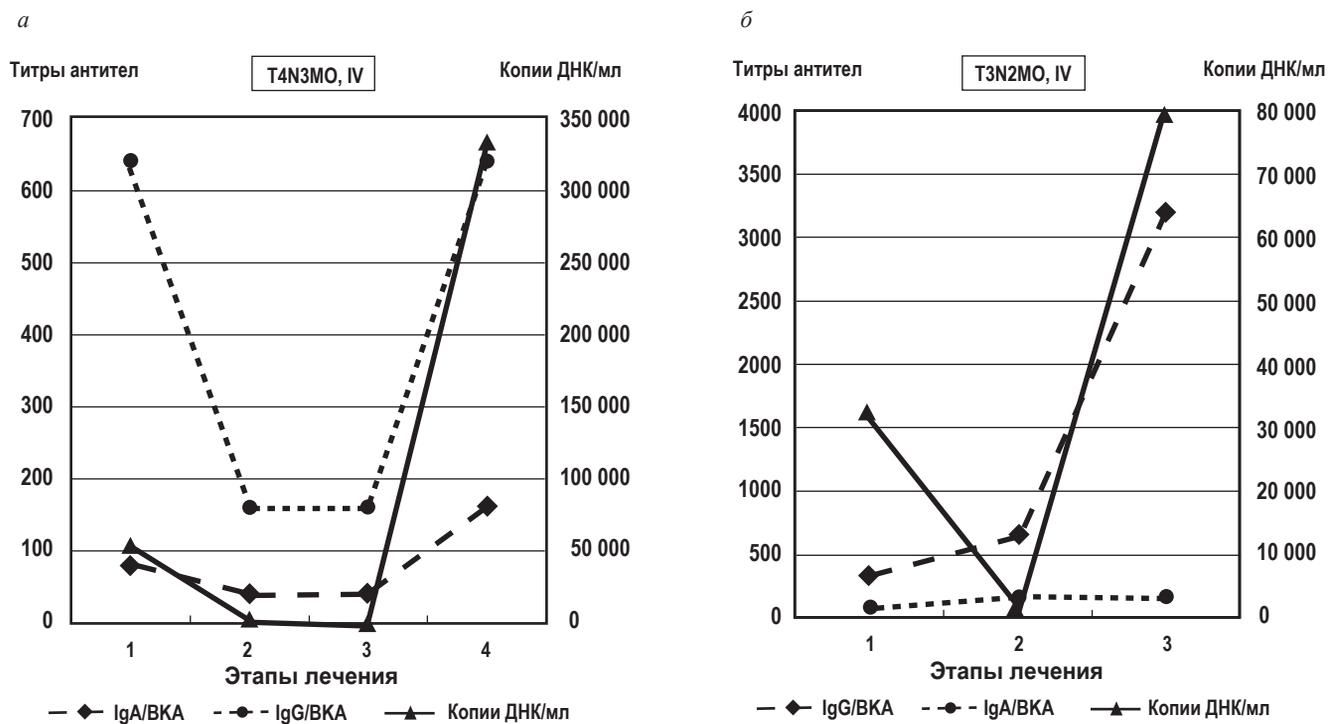


Рис. 2. Маркёры ВЭБ у больных нРНГ, которые не реагировали на лечение.

плазме крови [28, 29, 31]. Показано, что серопозитивные по IgA/VCA больные составляют группу высокого риска развития РНГ, тогда как показатели концентрации ДНК ВЭБ в плазме коррелирует с клиническими проявлениями болезни [29]. Оба маркёра эффективно используются в эндемичных регионах для диагностики нРНГ и мониторинга больных этой формой опухоли, однако их клиническое применение с той же целью в неэндемичных регионах остаётся практически неизученным.

В данном исследовании, которое проводилось в неэндемичном регионе (Россия), мы изучали клиническое значение серологических маркёров ВЭБ, титры IgA/VCA- и IgG/VCA-антител, а также показатели концентрации ДНК ВЭБ в плазме больных нРНГ до и после лечения, в состоянии ремиссии или рецидива. Полученные данные в целом согласуются с результатами исследований, проведённых в эндемичных по нРНГ регионах [41, 42], где тестирование концентраций ДНК ВЭБ и титров IgA/VCA-антител в плазме широко используется в качестве диагностического и прогностического инструмента для определения рецидива и выживаемости больных нРНГ [43–45]. В наших исследованиях мы также показали высокую ценность показателей концентрации ДНК ВЭБ и титров антител IgA/VCA (но не IgG/VCA) в плазме для диагностики нРНГ и оценки клинического состояния болезни (ремиссии или рецидива). Важно отметить, что титры IgA/VCA-антител не столь резко менялись у больных при разных клинических состояниях болезни, как это наблюдалось для концентраций ДНК ВЭБ, поскольку серологический ответ организма

инерционен, а у пациентов с тяжёлым иммунодефицитом может возникнуть и его «паралич» (см. табл. 3). Расхождение между показателями двух биомаркёров можно объяснить последствиями различных событий, происходящих в процессе формирования опухоли. Копии ДНК ВЭБ в плазме крови, вероятно, являются апоптотическими опухолевыми фрагментами, тогда как IgA-антитела к ВКА появляются в плазме лишь в результате иммунного ответа на репликацию ВЭБ [32].

В то время как копии ДНК ВЭБ и IgA/VCA-антитела обладают примерно одинаковой чувствительностью для диагностики нРНГ, концентрация ДНК ВЭБ в плазме больного точнее реагирует на различные проявления болезни (см. рис. 1, 2). Из этого следует, что тестирование на IgA/VCA-антитела как технически несложное может быть рекомендовано для первичной диагностики или скрининга популяции на нРНГ, тогда как определение концентрации ДНК ВЭБ в плазме больного более рационально для мониторинга заболевания. Одновременное тестирование обоих маркёров может быть полезно при установлении клинического статуса нРНГ у больного во время его первичного обследования. В частности, у тако-

Таблица 3

Уровни ВЭБ-специфических антител, концентрации ДНК ВЭБ в плазме и TNM-характеристики больных нРНГ

Параметры	Число больных	СГЗ титров антител к ВЭБ		Медиана, копии/мл	МКИ, копии/мл
		IgG/VCA	IgA/VCA		
T1–T2	9	640,0 $p = 0,41$	217,7 $p = 0,27$	6459 $p = 0,53$	639–17 680
T3–T4	16	484,5	111,6	21 095	1842–36 390
N0–N1	16	452,5 $p = 0,87$	140,5	1253,5 $p = 0,03$	103–11 836
N2–N3	13	491,4	92,3 $p = 0,50$	32 254	1764–44 431
I–II стадия	9	640,0 $p = 0,48$	186,6	4729 $p = 0,82$	572–17 680
III–IV стадия	18	470,3	132,0 $p = 0,58$	9643,5	561–41 428

го больного до лечения, скорее всего, будут обнаружены высокие показатели обоих маркеров. Отсутствие или низкие концентрации ДНК ВЭБ в плазме больного в присутствии высоких титров IgA/ВКА-антител могут подтвердить диагноз нРНГ и свидетельствовать о клинической ремиссии после ранее проведённого лечения. Высокая концентрация ДНК ВЭБ в отсутствие или при низком уровне IgA/ВКА-антител может указывать на тяжёлый иммунодефицит и, возможно, на терминальную стадию опухолевого процесса. Низкие значения обоих маркеров характерны для плоскоклеточного ороговевающего РНГ, который не ассоциирован с ВЭБ, и, кроме того, могут указывать на наличие патологии, исключая нРНГ.

Таким образом, наше исследование, одно из первых, проведённых в эндемичном регионе, наглядно показало, что и концентрация ДНК ВЭБ, и уровни IgA-антител в плазме крови больного являются незаменимыми диагностическими маркерами нРНГ. При этом их сочетание может быть эффективно использовано в эндемичных регионах не только для диагностики нРНГ, но и для оценки эффективности лечения и определения прогноза болезни. Из исследования также следует, что для более точного определения клинического статуса больного следует пользоваться показателем концентрации ДНК ВЭБ, который объективно отражает состояние ремиссии или рецидива. Использование вирусных маркеров для оценки у российских больных нРНГ распространённости опухолевого процесса по классификации TNM позволило выявить корреляцию лишь между показателями концентрации вирусной ДНК и размером патологически изменённых лимфатических узлов (N), но не размером опухоли и клинической стадией болезни. Наблюдаемый феномен, как и особенности гуморального ответа к ВЭБ, может быть объяснён специфическим HLA-генотипом россиян, который у больных в эндемичных и эндемичных регионах, существенно различается [3]. Кроме того, на тип репликации ВЭБ у больных нРНГ могут оказывать влияние различные факторы внешней среды, даже особенности питания, быта и т. д., также различающиеся в эндемичных и эндемичных регионах. Нельзя исключить и персистенцию в этих регионах штаммов ВЭБ со специфической генетической структурой и биологической активностью [11, 16]. Для окончательных выводов, однако, требуется проведение дополнительных исследований.

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

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

#### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1-5, 7-45 см. REFERENCES)

6. Давыдова М.И., Аксель Е.М., ред. *Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2013 году*. М.; 2015.

#### REFERENCES

- Young L.S., Rickinson A.B. Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat. Rev. Cancer*. 2004; 4(10): 757-68.
- Gu A.D., Zeng M.S., Qian C.N. The criteria to confirm the role of Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma initiation. *Int. J. Mol. Sci.* 2012; 13(10): 13737-47.
- Chang C.M., Yu K.J., Mbulaiteye S.M., Hildesheim A., Bhatia K. The extent of genetic diversity of Epstein-Barr virus and its geographic and disease patterns: a need for reappraisal. *Virus Res.* 2009; 143(2): 209-21.
- Yu M.C., Yuan J.M. Epidemiology of nasopharyngeal carcinoma. *Semin. Cancer Biol.* 2002; 12(6): 421-9.
- Licitra L., Bernier J., Cvitkovic E., Grandi C., Spinazzé S., Bruzzi P., et al. Cancer of the nasopharynx. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2003; 45(2): 199-213.
- Davydova M.I., Aksel' E.M., eds. *Statistics of Malignant Neoplasms in Rus-*

- sia and CIS Countries in 2013 [Statistika zlokachestvennykh novoobrazovaniy v Rossii i stranakh SNG v 2013 godu]*. Moscow; 2015. (in Russian)
- Barnes L., Eweson J.W., Reichart P., Sidransky D. *Pathology and Genetics Head and Neck Tumours*. Lyon: IARC Press; 2005.
- Brennan B. Nasopharyngeal carcinoma. *Orphanet. J. Rare Dis.* 2006; 1: 23.
- Luo S., Zhao L., Wang J., Xu M., Li J., Zhou B., et al. Clinical outcomes for early-stage nasopharyngeal carcinoma with predominantly WHO II histology treated by intensity-modulated radiation therapy with or without chemotherapy in nonendemic region of China. *Head Neck.* 2014; 36(6): 841-7.
- Cho W.C. Nasopharyngeal carcinoma: molecular biomarker discovery and progress. *Mol. Cancer.* 2007; 6: 1.
- Hubert A., De-Thé G. Dietary behavior, way of life, and nasopharyngeal cancer. *Bull. Cancer.* 1982; 69(5): 476-82.
- Li J., Qian C.N., Zeng Y.X. Regulatory T cells and EBV associated malignancies. *Int. Immunopharmacol.* 2009; 9(5): 590-2.
- Li X., Fasano R., Wang E., Yao K.T., Marincola F.M. HLA associations with nasopharyngeal carcinoma. *Curr. Mol. Med.* 2009; 9(6): 751-65.
- Tsao S.W., Tsang C.M., To K.F., Lo K.W. The role of Epstein-Barr virus in epithelial malignancies. *J. Pathol.* 2015; 235(2): 323-33.
- Yeung W.M., Zong Y.S., Chiu C.T., Chan K.H., Sham J.S., Choy D.T., et al. Epstein-Barr virus carriage by nasopharyngeal carcinoma in situ. *Int. J. Cancer.* 1993; 53(5): 746-50.
- Gurtsevitch V., Ruiz R., Stepina V., Plachov I., Le Riverend E., Glazkova T., et al. Epstein-Barr viral serology in nasopharyngeal carcinoma patients in the USSR and Cuba, and its value for differential diagnosis of the disease. *Int. J. Cancer.* 1986; 37(3): 375-81.
- Pearson G.R. Epstein-Barr virus and nasopharyngeal carcinoma. *J. Cell. Biochem. Suppl.* 1993; 17F: 150-4.
- Ho H.C., Ng M.H., Kwan H.C. Factors affecting serum IgA antibody to Epstein-Barr viral capsid antigens in nasopharyngeal carcinoma. *Br. J. Cancer.* 1978; 37(3): 356-62.
- Song C., Yang S. A meta-analysis on the EBV DNA and VCA-IgA in diagnosis of Nasopharyngeal Carcinoma. *Pak. J. Med. Sci.* 2013; 29(3): 885-90.
- Lo Y.M., Chan L.Y., Chan A.T., Leung S.F., Lo K.W., Zhang J., et al. Quantitative and temporal correlation between circulating cell-free Epstein-Barr virus DNA and tumour recurrence in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res.* 1999; 59(21): 5452-5.
- Hou X., Zhao C., Guo Y., Han F., Lu L.X., Wu S.X., et al. Different Clinical Significance of Pre- and Post-treatment Plasma Epstein-Barr Virus DNA Load in Nasopharyngeal Carcinoma Treated with Radiotherapy. *Clin. Oncol. (R. Coll. Radiol.)*. 2011; 23(2): 128-33.
- Wang W.Y., Twu C.W., Chen H.H., Jan J.S., Jiang R.S., Chao J.Y., et al. Plasma EBV DNA clearance rate as a novel prognostic marker for metastatic/recurrent nasopharyngeal carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 2010; 16(3): 1016-24.
- Chan K.C., Chan A.T., Leung S.F., Pang J.C., Wang A.Y., Tong J.H., et al. Investigation into the origin and tumoural mass correlation of plasma Epstein-Barr virus DNA in nasopharyngeal carcinoma. *Clin. Chem.* 2005; 51(11): 2192-5.
- Fan H., Nicholls J., Chua D., Chan K.H., Sham J., Lee S., et al. Laboratory markers of tumour burden in nasopharyngeal carcinoma: a comparison of viral load and serologic tests for Epstein-Barr virus. *Int. J. Cancer.* 2004; 112(6): 1036-41.
- Lo Y.M., Leung S.F., Chan L.Y., Chan A.T., Lo K.W., Johnson P.J., et al. Kinetics of plasma Epstein-Barr virus DNA during radiation therapy for nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res.* 2000; 60(9): 2351-5.
- Cao S.M., Liu Z., Jia W.H., Huang Q.H., Liu Q., Guo X., et al. Fluctuations of Epstein-Barr virus serological antibodies and risk for nasopharyngeal carcinoma: a prospective screening study with a 20-year follow-up. *PLoS One.* 2011; 6(4): e19100.
- Chien Y.C., Chen J.Y., Liu M.Y., Yang H.I., Hsu M.M., Chen C.J., et al. Serologic markers of Epstein-Barr virus infection and nasopharyngeal carcinoma in Taiwanese men. *N. Engl. J. Med.* 2001; 345(26): 1877-82.
- Kondo S., Horikawa T., Takeshita H., Kanegane C., Kasahara Y., Sheen T.S., et al. Diagnostic value of serum EBV-DNA quantification and antibody to viral capsid antigen in nasopharyngeal carcinoma patients. *Cancer Sci.* 2004; 95(6): 508-13.
- Leung S.F., Tam J.S., Chan A.T., Zee B., Chan L.Y., Huang D.P., et al. Improved accuracy of detection of nasopharyngeal carcinoma by combined application of circulating Epstein-Barr virus DNA and anti-Epstein-Barr viral capsid antigen IgA antibody. *Clin. Chem.* 2004; 50(2): 339-45.
- Shao J.Y., Zhang Y., Li Y.H., Gao H.Y., Feng H.X., Wu Q.L., et al. Comparison of Epstein-Barr virus DNA level in plasma, peripheral blood cell and tumour tissue in nasopharyngeal carcinoma. *Anticancer Res.* 2004; 24(6): 4059-66.
- Twu C.W., Wang W.Y., Liang W.M., Jan J.S., Jiang R.S., Chao J., et al. Comparison of the prognostic impact of serum anti-EBV antibody and

- plasma EBV DNA assays in nasopharyngeal carcinoma. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2007; 67(1): 130-7.
32. Zhao F.P., Liu X., Zhong Z.M., Lu J., Yu B.L., Zeng F.Y., et al. Positivity of both plasma Epstein-Barr virus DNA and serum Epstein-Barr virus capsid specific immunoglobulin A is a better prognostic biomarker for nasopharyngeal carcinoma. *BBA Clin.* 2014; 2: 88-93.
  33. Kondratova V.N., Botezatu I.V., Shelepov V.P., Lichtenstein A.V. Tube gel isotachopheresis: a method for quantitative isolation of nucleic acids from diluted solutions. *Anal. Biochem.* 2011; 408(2): 304-8.
  34. Henle G., Henle W. Epstein-Barr virus-specific IgA serum antibodies as an outstanding feature of nasopharyngeal carcinoma. *Int. J. Cancer.* 1976; 17(1): 1-7.
  35. Lawrence J.B., Villnave C.A., Singer R.H. Sensitive, high-resolution chromatin and chromosome mapping in situ: presence and orientation of two closely integrated copies of EBV in a lymphoma line. *Cell.* 1988; 52(1): 51-61.
  36. Chi K.R. The tumour trail left in blood. *Nature.* 2016; 532(7598): 269-71.
  37. Lichtenstein A.V., Melkonyan H.S., Tomei L.D., Umansky S.R. Circulating nucleic acids and apoptosis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2001; 945: 239-49.
  38. Sidransky D. Emerging molecular markers of cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 2002; 2(3): 210-9.
  39. Skvortsova T.E., Rykova E.Y., Tamkovich S.N., Bryzgunova O.E., Starikov A.V., Kuznetsova N.P., et al. Cell-free and cell-bound circulating DNA in breast tumours: DNA quantification and analysis of tumour-related gene methylation. *Br. J. Cancer.* 2006; 94(10): 1492-15.
  40. Gu A.D., Zeng M.S., Qian C.N. The criteria to confirm the role of Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma initiation. *Int. J. Mol. Sci.* 2012; 13(10): 13737-47.
  41. Peng H., Chen L., Zhang Y., Guo R., Li W.F., Mao Y.P., et al. Survival analysis of patients with advanced-stage nasopharyngeal carcinoma according to the Epstein-Barr virus status. *Oncotarget.* 2016; 7(17): 24208-16.
  42. Zhao F.P., Liu X., Chen X.M., Lu J., Yu B.L., Tian W.D., et al. Levels of plasma Epstein-Barr virus DNA prior and subsequent to treatment predicts the prognosis of nasopharyngeal carcinoma. *Oncol. Lett.* 2015; 10(5): 2888-94.
  43. Chen W.H., Tang L.Q., Zhang L., Chen Q.Y., Guo S.S., Liu L.T., et al. Combining plasma Epstein-Barr virus DNA and nodal maximal standard uptake values of 18F-fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography improved prognostic stratification to predict distant metastasis for locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma. *Oncotarget.* 2015; 6(35): 38296-307.
  44. Chen W.H., Tang L.Q., Guo S.S., Chen Q.Y., Zhang L., Liu L.T., et al. Prognostic Value of Plasma Epstein-Barr Virus DNA for Local and Regionally Advanced Nasopharyngeal Carcinoma Treated with Cisplatin-Based Concurrent Chemoradiotherapy in Intensity-Modulated Radiotherapy Era. *Medicine (Baltimore).* 2016; 95(5): e2642.
  45. Zhang Y., Li W.F., Mao Y.P., Guo R., Tang L.L., Peng H., et al. Risk stratification based on change in plasma Epstein-Barr virus DNA load after treatment in nasopharyngeal carcinoma. *Oncotarget.* 2016; 7(8): 9576-85.

Поступила 10.10.17

Принята в печать 17.10.17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.98:578.825.11|06:616.15|=078

**Ярославцева Н.Г.<sup>1</sup>, Тихомиров Д.С.<sup>1</sup>, Романова Т.Ю.<sup>1</sup>, Игнатова Е.Н.<sup>1</sup>, Туполева Т.А.<sup>1</sup>, Филатов Ф.П.<sup>2</sup>, Гапонова Т.В.<sup>1</sup>**

## ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА АКТИВНОЙ И ЛАТЕНТНОЙ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ ВИРУСОМ ГЕРПЕСА ЧЕЛОВЕКА 6-го ТИПА, У ПАЦИЕНТОВ С ЗАБОЛЕВАНИЯМИ СИСТЕМЫ КРОВИ

<sup>1</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России, 125167, г. Москва;

<sup>2</sup> ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва

**Введение.** Вирус герпеса человека 6-го типа (ВГЧ-6) может вызывать серьезные инфекционные осложнения у пациентов со сниженным иммунитетом. Он также обладает способностью к интеграции в геном зараженной клетки. При лабораторной диагностике интеграция может быть принята за активную инфекцию. Вопрос об определении формы инфекции лабораторными методами актуален. При этом крайне скудны данные о взаимодействии ВГЧ-6 с другими герпесвирусами, особенно у пациентов с заболеваниями системы крови. Цель работы – охарактеризовать лабораторные маркеры и тип ВГЧ-6-инфекции у пациентов с заболеваниями системы крови.

**Материал и методы.** В исследование включено 98 пациентов, в крови которых в момент развития инфекционного осложнения обнаружена ДНК ВГЧ-6. Оценивали наличие маркеров герпесвирусных инфекций (вирусные ДНК и противовирусные иммуноглобулины), а также число лейкоцитов периферической крови. **Результаты.** У большинства больных (66 из 98; 67,3%) лабораторно обнаружена латентная ВГЧ-6-инфекция. У 2 больных зафиксирована высокая вирусная нагрузка (1,5·10<sup>5</sup> и 1,7·10<sup>5</sup> копий/10<sup>5</sup> кл.), что позволило заподозрить интегрированную форму инфекции, которая в дальнейшем не подтвердилась. При исследовании маркеров цитомегаловируса (ЦМВ) и вируса Эпштейна-Барр показано, что у большинства больных ВГЧ-6 встречался в виде моноинфекции (20 из 32, 62,5%). В случае смешанной инфекции наиболее частым коинфектом оказался ЦМВ – в 9 из 12 (75%) случаев. При активной ВГЧ-6-инфекции в периферической крови наблюдалась умеренная лейкопения.

**Выводы.** При лабораторной диагностике ВГЧ-6 у пациентов с заболеваниями системы крови чаще встречались лабораторные признаки латентной инфекции. В случаях активной инфекции ВГЧ-6 выявлялся в виде герпесвирусной моноинфекции, а в случаях смешанной инфекции наиболее часто в качестве коинфекта обнаруживали ЦМВ. Не зафиксировано ни одного случая интегрированной формы ВГЧ-6. Концентрация ДНК ВГЧ-6 в лейкоцитах и плазме крови больных почти в 3 раза ниже при смешанной инфекции, чем при моноинфекции. Активная репликация ВГЧ-6, протекающая с высокой вирусной нагрузкой, сопряжена с умеренной лейкопенией.

**Ключевые слова:** вирус герпеса человека 6-го типа; вирусная интеграция; лабораторная диагностика.

**Для корреспонденции:** Ярославцева Наталья Гургеновна, канд. биол. наук, ведущий специалист Научной лаборатории вирусной безопасности трансфузий крови и её компонентов ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, 125167, г. Москва. E-mail: [nygar@yandex.ru](mailto:nygar@yandex.ru)

**Для цитирования:** Ярославцева Н.Г., Тихомиров Д.С., Романова Т.Ю., Игнатова Е.Н., Туполева Т.А., Филатов Ф.П., Гапонова Т.В. Лабораторная диагностика активной и латентной инфекции, вызванной вирусом герпеса человека 6-го типа, у пациентов с заболеваниями системы крови. *Вопросы вирусологии*. 2018; 63(2): 84-90. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-2-84-90>

Yaroslavtseva N.G.<sup>1</sup>, Tikhomirov D.S.<sup>1</sup>, Romanova T.Yu.<sup>1</sup>, Ignatova E.N.<sup>1</sup>, Tupoleva T.A.<sup>1</sup>, Filatov F.P.<sup>2</sup>, Gaponova T.V.<sup>1</sup>

## LABORATORY DIAGNOSTICS OF ACTIVE AND LATENT HHV 6-INFECTION IN PATIENTS WITH HEMATOLOGICAL MALIGNANCIES

<sup>1</sup> National Medical Research Center of Hematology, Moscow, 125167, Russian Federation;

<sup>2</sup> National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russian Federation

**Introduction.** Human herpes virus type 6 (HHV 6) can cause serious infectious complications in immunodeficient patients. It is also capable of integrating into the genome of the infected cell. Due to this, there can be a misdiagnosis between viral integration and active infection during laboratory diagnostics. Thus, determination of HHV 6 infection using proper laboratory tools is relevant. Also the data on viral interference of HHV 6 and other herpes viruses are very poor especially for patients with hematological malignancies.

The aim of the study was to identify laboratory markers of HHV 6 and the form of infection in patients with hematological malignancies.

**Materials and methods.** 98 patients with hematological malignancies positive for HHV 6 DNA during the infectious complication were enrolled in the study. Viral load in leukocytes and plasma of peripheral blood, antiviral M and G immunoglobulins and peripheral blood leukocytes count were evaluated.

**Results.** The majority of patients (66 out of 98, 67.3%) showed laboratory signs of latent HHV 6. Integrated HHV 6 was suspected in 2 patients due to high viral load ( $1.5 \times 10^5$  copies and  $1.7 \times 10^5$  copies), but it was not confirmed subsequently. Additional testing of HCMV and EBV in patients with laboratory signs of active HHV 6 infection revealed the superiority of mono-infection over mixed infection (20 of 32, 62.5%). In cases of mixed infection, the most common co-infectant was HCMV observed in 9 out of 12 (75%) cases. Mild leukopenia accompanied HHV 6 active infection.

**Conclusion.** Laboratory signs of latent HHV 6 tend to be prevalent in patients with hematological malignancies. In patients with laboratory markers of active HHV 6, the mono-infection demonstrated the superiority over mixed one. In cases of mixed infection, HCMV appeared to be the most commonly co-infectant. No cases of an integrated form of HHV 6 have been observed. The viral load of HHV 6 in leukocytes and blood plasma is almost 3 times lower in patients with a mixed infection than with a mono-infection. Active replication of HHV 6 was accompanied with mild leukopenia.

**Key words:** Human herpes virus type 6; viral integration; laboratory diagnostics.

**For citation:** Yaroslavtseva N.G., Tikhomirov D.S., Romanova T.Yu., Ignatova E.N., Tupoleva T.A., Filatov F.P., Gaponova T.V. Laboratory diagnostics of active and latent HHV 6-infection in patients with hematological malignancies. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2018; 63(2): 84-90. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-2-84-90>

**For correspondence:** Natal'ya G. Yaroslavtseva, PhD, senior researcher, Laboratory of virology, National Medical Research Center of Hematology, Moscow, 125167, Russian Federation. E-mail: [ngyar@yandex.ru](mailto:ngyar@yandex.ru)

### Information about authors:

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

Romanova Tamara Yu., <http://orcid.org/0000-0001-7182-2296>;

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

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

Ignatova E.N., <http://orcid.org/0000-0003-3121-037X>;

Gaponova T.V., <http://orcid.org/0000-0002-9684-5045>

**Acknowledgment.** The study had no sponsorship.

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

Received 09 August 2017

Accepted 17 October 2017

## Введение

Вирус герпеса человека 6-го типа (ВГЧ-6) принадлежит к роду розеоовирусов (*Roseolovirus*) подсемейства  $\beta$ -герпесвирусов ( $\beta$ -Herpesvirinae) [1]. Существует 2 варианта вируса – А и В (ВГЧ-6А и ВГЧ-6В), которые считают отдельными видами [2]. Несмотря на то что геномы этих вирусов идентичны на 95%, они различаются фенотипически, тропны к различным клеточным рецепторам и ассоциированы с разными заболеваниями или клиническими проявлениями инфекции.

Размер полностью секвенированных нуклеотидных последовательностей ВГЧ-6В составляет 161–162 тыс. нуклеотидов (kbp), а ВГЧ-6А – 156–159 kbp. Геномы обоих вирусов содержат ограниченный правым и левым концевыми повторами (DR<sup>+</sup> и DR<sup>-</sup>, около 8 kbp каждый) уникальный регион (U-регион, 143 kbp), в который входит 119 открытых рамок считывания. Эта область кодирует основные блоки консервативных генов: белки капсида, ДНК-связывающий белок, ДНК-полимеразу, гликопроте-

иды, протеиназу и другие. Особенностью повторов DR<sup>+</sup> и DR<sup>-</sup> являются участки, содержащие повторяющиеся последовательности TTAGGG, которые полностью совпадают с последовательностями в теломерах человеческого хромосом [3], что в частности делает возможным встраивание вирусного генома в генетический аппарат клетки.

Различают следующие типы ВГЧ-6-инфекции: острую первичную с вирусемией, латентную без вирусемии и активную инфекцию с продукцией вируса (как результат реактивации из латентного состояния, или хроническую). Описано 2 варианта депонирования вирусной ДНК при латентном состоянии ВГЧ-6: эписомальный и интегрированный в геном хозяина. Наиболее часто встречаемым вариантом латентной ВГЧ-6-инфекции является первый вариант. Несколько линейных молекул ДНК ВГЧ-6 в ядре клетки образуют кольцевую ДНК в виде конкатемерной эписомы, способной к репликации [4]. При этом репликация, по-видимому, синхронизирована с делением самой клетки-хозяина. В этом случае не происходит

сборки нового инфекционного вируса, и инфицированная клетка не лизируется. ДНК ВГЧ-6 обнаруживают в ядерных клетках крови в сравнительно невысокой концентрации (до  $10^3$  копий на  $10^5$  ядродержащих клеток, копий/ $10^5$  кл.). Одним из лабораторных признаков латентной ВГЧ-6-инфекции служит выявление в крови анamnестических противовирусных антител класса IgG (анти-ВГЧ-6-IgG), которые нарабатываются в результате первичной инфекции и сохраняются в крови на протяжении всей жизни носителя [5].

Второй вариант латентной инфекции предусматривает встраивание вирусного генома в зону теломер хозийских хромосом посредством гомологичной ДНК-рекомбинации. Такая рекомбинация возможна благодаря наличию в вирусной ДНК теломероподобных повторов [3, 6]. Согласно литературным данным латенция поддерживается экспрессией вирусного неструктурного белка U94, обладающего ДНК-связывающей активностью. По данным некоторых авторов, экспрессия генного продукта U94 ингибирует также репликацию вируса [3, 6].

Передача вируса в случае интеграции может осуществляться как вертикально [7], так и горизонтально, например при пересадке органов и тканей, в том числе стволовых гемопоэтических клеток [8–13]. При реактивации вирус может инфицировать перmissive клетки, наивные в отношении ВГЧ-6, вызывая их лизис [2,7]. По данным исследований, проведенных на материале доноров крови и костного мозга [11, 14], при интеграции вируса характерной особенностью является высокая вирусная нагрузка в цельной крови, достигающая  $1-5$  копий вирусного генома на клетку, или более  $3,3 \cdot 10^6$  копий на миллион ядродержащих клеток периферической крови. У пациентов, находящихся в состоянии иммуносупрессии, в частности у реципиентов аллогенных стволовых гемопоэтических клеток, концентрация вирусной ДНК может достигать  $10^7$  копий на миллион ядродержащих клеток [8–16]. Однако интеграция ВГЧ-6 в хозийский геном – редкое событие. Оно встречается приблизительно в 1–3% случаев: у 0,8% доноров крови и 2,9% пациентов больниц в Великобритании; у 0,21% от общей популяции в Японии; у 0,9% больных после трансплантации костного мозга в Италии [6, 14, 15].

Третий вариант ВГЧ-6-инфекции – это активная инфекция с продукцией нового поколения вирусных частиц вследствие реактивации из латентного состояния. Как правило, данная ситуация наблюдается у лиц со сниженным иммунитетом (после трансплантации органов и тканей, при опухолевых заболеваниях, ВИЧ-инфекции в стадии СПИДа и др.) [8–13, 16–19]. При активной ВГЧ-6-инфекции, по данным литературы, вирусная нагрузка колеблется в пределах  $10^4-10^5$  копий на  $10^6$  клеток, что может быть ошибочно расценено как интегрированная форма инфекции [15]. ДНК ВГЧ-6 при этом может быть обнаружена как в клетках, так и в плазме периферической крови.

При острой инфекции наибольший уровень репликации ВГЧ-6 наблюдается в Т-клетках с фенотипом CD4+, CD3+, CD5+, CD7+, CD8+ [1, 20, 21]. В интегрированном состоянии вирус может находиться в клетках, экспрессирующих рецепторы CD46, которые представлены на поверхности практически всех ядродержащих клеток [4, 21], в моноцитах/макрофагах, стволовых клетках костного мозга, фолликулах волос, ногтевых пластинах [4, 6, 12]. Вирус может реплицироваться во многих первичных и перевиваемых культурах клеток различного

происхождения: лимфоцитах Т-ряда, моноцитарно-макрофагальных, глиальных клетках, клетках тимуса, свежесыведенных лимфоцитах человека [21, 22]. Ростовой цикл составляет 4–5 дней, заканчивается образованием синцитиев, деструкцией и лизисом клеток.

Подтип вируса 6А встречается редко, и его роль в патологии не до конца ясна [6]. Однако показано, что он более нейровирулентен, чем ВГЧ-6В [1, 4, 6, 20]. Предполагают, что ВГЧ-6А ассоциирован с нейровоспалительными заболеваниями (например, рассеянным склерозом). Вирус, вероятно, также играет роль в развитии хронического тиреоидита Хашимото, является кофактором прогрессирования СПИДа [19, 23].

Подтип ВГЧ-6В распространен более широко. Первичное инфицирование ВГЧ-6 у взрослых – редкое событие. До 94% детей первично инфицируются в первые годы жизни (до 3 лет), что приводит к образованию анamnестических IgG-антител к ВГЧ-6, которые затем детектируются в крови у взрослых пожизненно [24, 25]. После первичного инфицирования антитела класса IgM образуются в интервале от 5 дней до 1–2 мес, но не у всех детей [5, 25]. В 94% случаев первичное инфицирование проходит с появлением симптомов внезапной экзантемы или лихорадки без сыпи у новорожденных и детей младшего возраста, к которым могут присоединяться неврологические осложнения в виде фебрильных судорог, менингита и менингоэнцефалита [24–28]. К заболеваниям, ассоциированным с первичной острой ВГЧ-6-инфекцией, относят также мононуклеозоподобный синдром у подростков и взрослых, не связанный с заражением вирусом Эпштейна–Барр (ВЭБ), синдром хронической усталости, гистиоцитарный некротический лимфаденит, длительную лимфаденопатию и гепатит у взрослых [24, 27–29]. Антитела IgG к вирусу выявляются у 80% здоровых доноров [5], 65% ВИЧ-инфицированных и 73% больных онкологическими заболеваниями [19, 29].

С персистенцией ВГЧ-6-инфекцией некоторые авторы ассоциируют лимфопротрофические заболевания (лимфаденопатия, поликлональная лимфопротрофия), злокачественные лимфомы (неходжкинская лимфома, периферическая Т-клеточная лимфома, В-клеточная лимфома, дерматопатическая лимфаденопатия, лимфогранулематоз и другие) [29]. Вирус также рассматривают как кофактор, способный отягачивать течение ряда заболеваний, особенно в случае присоединения других вирусных или бактериальных инфекций. К таким заболеваниям относят рецидивирующий хронический цистит в ассоциации с *E. coli*, фибромиалгию, неврит зрительного нерва, СПИД.

При выявлении высокой концентрации ДНК ВГЧ-6 в цельной крови всегда возникает вопрос о дифференциации между активной репликацией и интеграцией вирусной ДНК в геном хозяина.

Цель работы – охарактеризовать лабораторные маркеры и тип ВГЧ-6-инфекции у пациентов с заболеваниями системы крови.

## Материал и методы

В исследование включены материалы от 98 больных в разных стадиях лечения гематологического заболевания, у которых в лейкоцитах периферической крови (ЛПК) была обнаружена ДНК ВГЧ-6. Образцы периферической крови были исследованы во время развития различных инфекционных осложнений: фебрильной и субфебрильной лихорадки, поражения органов дыхания (дыхатель-

ная недостаточность, бронхит, бронхиолит, пневмония), нарушения сознания, менингеальной симптоматики, некротической энтеропатии, поражения кожных покровов или слизистых оболочек, симптомов гепатита, герпетической ангины. Оценивали число лейкоцитов и наличие вирусных маркеров в периферической крови.

Алгоритм исследования на вирусные маркеры включал:

- выделение лейкоцитов периферической крови методом селективного лизиса эритроцитов с помощью реагента «Гемолитик» (ООО «ИнтерЛабСервис») с последующим выделением из них тотальной ДНК с использованием набора реагентов «РИБО-преп» (ООО «ИнтерЛабСервис»);

- определение в образцах наличия и концентрации ДНК ВГЧ-6, ДНК цитомегаловируса (ЦМВ) и ДНК ВЭБ методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с помощью набора реагентов «АмплиСенс EBV/CMV/HHV6-скрин-FL» (ООО «ИнтерЛабСервис»). Амплификацию нуклеиновых кислот проводили на приборе Rotor-Gene Q («Qiagen», Германия) с флюоресцентной регистрацией продуктов амплификации в режиме реального времени;

- при обнаружении ДНК ВГЧ-6 в клетках периферической крови – аналогичное исследование в соответствующих образцах плазмы. Вирусную нагрузку выражали в копиях геном-эквивалента на  $10^5$  ядросодержащих клеток ( $ГЭ/10^5$  кл.) или на 1 мл плазмы ( $ГЭ/мл$ );

- методом твердофазного непрямого иммуноферментного анализа в сыворотке крови больных определение анамнестических иммуноглобулинов класса G к ВГЧ-6 (ВГЧ-6-IgG), а также иммуноглобулинов классов M и G к герпесвирусам человека. Для ЦМВ и вируса простого герпеса 1-го и 2-го типов (ВПГ-1, 2) определяли IgM и титры IgG. Для ВЭБ определяли IgM к вирусному капсидному антигену (IgM-VCA-EBV), IgG к раннему и количеству IgG к ядерному антигену вируса (IgG-EA-EBV и IgG-EBNA-1-EBV).

### Результаты

У большей части больных (66 из 98; 67,3%) ДНК ВГЧ-6 была обнаружена в ЛПК, но не выявлялась при исследовании соответствующих образцов плазмы крови (табл. 1). При этом концентрация вирусной ДНК находилась на пределе чувствительности теста и составляла менее  $500 ГЭ/10^5$  кл. Данное сочетание с высокой степенью вероятности указывало на латентную эписомальную форму ВГЧ-6 в отличие от других образцов, где ДНК ВГЧ-6 также обнаружена в плазме крови.

Из табл. 1 видно, что лабораторные признаки активной ВГЧ-6-инфекции были зафиксированы только у 1/3 больных. Концентрация вирусной ДНК в ЛПК и плазме крови указана в табл. 2.

Табл. 2 показывает, что при латентной инфекции практически у всех пациентов (65 из 66) концентрация вирусной ДНК находится в области низких значений ( $< 500 ГЭ/10^5$  кл.). Только в одном образце эта концентрация составила  $600 ГЭ/10^5$  кл. В образцах крови больных с лабораторными признаками активной ВГЧ-6-инфекции, напротив, у большей части (20 из 32; 62,5%) вирусная нагрузка находилась в области высоких значений ( $1,1 \cdot 10^3$ – $1,3 \cdot 10^5 ГЭ/мл$ ). Только у 3 больных с лабораторными признаками активной инфекции и высокой вирусной нагрузкой в плазме была зафиксирована низкая концентрация вирусной ДНК в ЛПК ( $< 500 ГЭ/10^5$  кл.).

У 2 больных, включённых в исследование, была обнаружена высокая концентрация ДНК ВГЧ-6 в ЛПК ( $1,5 \cdot 10^5$  и  $1,7 \cdot 10^5 ГЭ/10^5$  кл.), что позволило заподозрить у них интегративную форму инфекции. Однако данное предположение не было подтверждено, поскольку у каждого больного через 2 нед после выявления высокой концентрации вирусной ДНК было проведено повторное исследование крови, которое показало, вирусная нагрузка упала до уровня  $< 500$  копий и в ЛПК, и в плазме крови, что, очевидно, не подтверждает интеграцию вирусного генома.

Одной из задач исследования была оценка уровня вирусной нагрузки в случае активной ВГЧ-6-моноинфекции и активной ВГЧ-6-инфекции в сочетании с другими герпесвирусами. Результаты представлены в табл. 3.

В образцах крови (20 из 32; 62,5%), в которых была выявлена только ДНК ВГЧ-6, но отсутствовали противовирусные иммуноглобулины класса M к другим герпесвирусам (или IgG к раннему антигену ВЭБ, которые также считаются антителами острой фазы), зафиксирована моноинфекция ВГЧ-6. В образцах крови остальных больных помимо ДНК ВГЧ-6 были обнаружены маркеры других герпесвирусов, среди которых ДНК ЦМВ и ДНК ВЭБ, а также противовирусные антитела острой фазы. Наиболее часто сочетанная инфекция была представлена ЦМВ.

В качестве суррогатного маркера активной инфекции оценивали число ЛПК. Результаты представлены в табл. 4.

Как видно из табл. 4, в случае активной ВГЧ-6-инфекции, протекающей с высокой концентрацией ДНК ВГЧ-6 в плазме ( $> 500 ГЭ/мл$ ), в периферической крови наблюдается умеренная лейкопения. При низкой вирусной нагрузке в плазме, а также в случае латентной инфекции лейкопения не была выявлена, и число лейкоцитов находилось на нижней границе нормы.

Антитела класса IgG к ВГЧ-6 были выявлены у 84,8% (56 из 66) больных с латентной и у 78,1% (25 из 32) – с активной ВГЧ-6-инфекцией. Это позволило констатировать у некоторых пациентов первичную инфекцию, даже если ДНК ВГЧ-6 была обнаружена только в клетках крови и в низкой концентрации, что соответствовало бы латентной инфекции.

### Обсуждение

Обнаружение высокой концентрации ДНК ВГЧ-6 в клетках периферической крови может служить признаком активной репликации вируса или интеграции вирусной ДНК в ДНК клеток хозяина. В случае отсутствия активного размножения вируса при интегративной форме инфекции вирусная ДНК может быть обнаружена в лейкоцитах крови или других ядросодержащих клетках, но не в плазме. В жидкую часть крови вирусная ДНК попадает на фоне лизиса инфицированных клеток в результате литической инфекции, и в этом случае она принадлежит к новому вирусному поколению. Таким образом, выявление ДНК ВГЧ-6 в плазме крови может указывать на лизис заражённых клеток и свидетельствовать об активной инфекции. Тем не менее не исключена возможность попадания небольшого количества вирусной ДНК в плазму крови за счёт разрушения клеток, содержащих латентный вирус, что может произойти в процессе преаналитической обработки или спонтанного лизиса (например, в результате длительного хранения крови при  $4-8^{\circ}C$ ). Согласно литературным данным при интеграции в геном

Таблица 1

**Частота выявления ДНК ВГЧ-6 в плазме и ЛПК у пациентов с заболеваниями системы крови**

Обнаружение ДНК ВГЧ-6	Число образцов (%)	Уровень концентрации ДНК ВГЧ-6 в:		Тип ВГЧ-6-инфекции
		ЛПК, копий/10 <sup>5</sup> кл.	плазме, копий/мл	
Только в ЛПК	66 (67,3)	< 500*	0	Латентная
В ЛПК и плазме	32 (32,7)	< 500–1,7·10 <sup>5</sup>	< 500–8,2·10 <sup>4</sup>	Активная

Примечание. \* – в одном образце концентрация ДНК ВГЧ-6 в ЛПК составила 600 ГЭ/10<sup>5</sup> кл., но ввиду отсутствия в плазме крови образец расценён как низкоконцентрационный.

клетки концентрация вирусной ДНК в ядросодержащих клетках превышает 10<sup>5</sup>–10<sup>6</sup> ГЭ/10<sup>5</sup> кл., что соответствует 1–5 копиям вирусного генома на одну клетку [11, 15]. У реципиента аллогенного костного мозга от донора с интегрированной формой ВГЧ-6 после восстановления и замещения кроветворения донорским вирусная нагрузка составила 3,1·10<sup>6</sup> ГЭ/мл цельной крови при отсутствии герпесвирусной симптоматики [11]. При этом в плазме крови ДНК ВГЧ-6 у этого больного не была обнаружена.

Выявление вирусной ДНК в плазме крови косвенно указывает на наличие активно реплицирующегося вируса, вызывающего лизис клеток. Вирусная нагрузка при

активной инфекции меньше, чем при интегрированной. В исследованиях разных авторов, посвящённых реактивации ВГЧ-6 у реципиентов пуповинной крови, гемопоэтических стволовых клеток и органов, часто фигурируют противоречивые данные [9, 11, 15, 17]. Это можно объяснить различием методов оценки вирусной нагрузки (число копий вирусной ДНК на 1 мл крови либо на 1 мл плазмы или на число мононуклеаров периферической крови и т. д.) и отсутствием стандартизации этих методов. Пик вирусной нагрузки у реципиентов стволовых клеток крови составлял 10<sup>3</sup>–10<sup>4</sup> ГЭ/10<sup>5</sup> кл. [15], у реципиентов почечного трансплантата – 4·10<sup>2</sup> ГЭ/мл [30], у реципиентов костного мозга – 2,3·10<sup>3</sup> ГЭ/мл сыворотки [16]. После реактивации ВГЧ-6 у 94% (117/125) пациентов с опухолевыми заболеваниями системы крови после трансплантации пуповинной крови среднее значение концентрации вирусной ДНК составило 7,6·10<sup>3</sup> ГЭ/мл цельной крови (при разбросе концентраций от 10<sup>2</sup> до 1,6·10<sup>5</sup> ГЭ/мл крови) [9]. Таким образом, при активной ВГЧ-6-инфекции значения вирусной нагрузки как в плазме, так и в клетках крови могут колебаться в широких пределах: 10<sup>2</sup>– > 10<sup>5</sup> копий/мл крови, 10<sup>2</sup>–10<sup>4</sup> ГЭ/10<sup>5</sup> кл.

Детекция вирусного генома только в клетках крови в низкой концентрации с высокой степенью вероятности может указывать на латентную эписомальную форму ВГЧ-6-инфекции либо на раннюю стадию первичной инфекции, если в крови пациента отсутствуют анamnестические IgG. У больных, включённых в исследование, лабораторные признаки активной формы инфекции выявлены в 32,7%, латентной (вероятно, эписомальной) формы – в 67,3% случаев (см. табл. 1). Признаков (как прямых, так и косвенных) интегрированной формы в рамках данного исследования обнаружить не удалось. Только у 2 больных была зафиксирована концентрация ДНК ВГЧ-6 в ЛПК, превышающая 10<sup>5</sup> ГЭ/10<sup>5</sup> кл. (1,5·10<sup>5</sup>/10<sup>5</sup> кл. и 1,7·10<sup>5</sup>/10<sup>5</sup> кл.). Между тем в плазме этих больных ДНК ВГЧ-6 была выявлена в высокой концентрации (1,2·10<sup>3</sup> и 3,2·10<sup>3</sup> ГЭ/мл), что является косвенным показателем активной вирусной репликации. Однако поскольку последняя может наблюдаться и при интегрированной форме, сам факт выявления вирусной ДНК в плазме крови не является неоспоримым доказательством отсутствия интеграции (которым, строго говоря, может быть только соответствующий результат секвенирования ДНК хозяина – в первую очередь теломерных регионов хромосом). Вместе с тем впоследствии у этих больных наблюдалось снижение виремии, что всё же скорее всего указывает на отсутствие интеграции.

Исследование концентраций ДНК ВГЧ-6 в плазме и ЛПК при активной и латентной инфекции у пациентов с заболеваниями системы крови (см. табл. 2) показывает, что при лабораторной диагностике инфекции для определения типа инфекции – активной или латентной – в некоторых случаях требуется дополнительное тестирование плазмы крови на наличие вирусного генома. Концентрация в лейкоцитах крови в интервале от > 500 до < 10<sup>5</sup> ГЭ/10<sup>5</sup> кл. соответствует активной вирусной инфекции, при которой в плазме крови больных, включённых в исследование, всегда выявлялась вирусная ДНК, кроме одного случая, когда концентрация в ЛПК составляла 600 копий ГЭ/10<sup>5</sup> кл. Таким образом, при определении концентрации ДНК ВГЧ-6 в ЛПК, превышающей 500, в большинстве случаев необходимость исследования в плазме практически отпадает. Если же концентрация вирусной ДНК в лейкоцитах крови составляет < 500 или > 10<sup>5</sup> ГЭ/10<sup>5</sup> кл., для определения

Таблица 2

**Уровни концентраций ДНК ВГЧ-6 в плазме и ЛПК при активной и латентной инфекции у пациентов с заболеваниями системы крови**

Тип ВГЧ-6-инфекции	Уровень вирусной нагрузки	Уровень концентрации ДНК ВГЧ-6 в:		Число проб (%)
		ЛПК, копий/10 <sup>5</sup> кл.	плазме, копий/мл	
Активная	Низкая	< 500	< 500	12 (37,5)
	Высокая	> 500 – 1,7·10 <sup>5</sup>	1,1·10 <sup>3</sup> – 1,3·10 <sup>5</sup>	20 (62,5)
Латентная	Низкая	< 500	0	65 (98,5)
	Высокая	600	0	1 (1,5)

Таблица 3

**Концентрация ДНК ВГЧ-6 при активной (32 больных) моноинфекции и сочетанной с другими герпесвирусами инфекции**

ВГЧ-6-инфекция	Вирусная нагрузка	Концентрация вирусной ДНК в:		Число образцов (%)
		ЛПК, копий ГЭ/10 <sup>5</sup> кл.	плазме, копий ГЭ/мл	
Моноинфекция, 62,5% (20 из 32)	Высокая	1,2·10 <sup>3</sup> –1,7·10 <sup>5</sup>	1,1·10 <sup>3</sup> –1,3·10 <sup>5</sup>	9 (45)
	Средняя*	< 500	> 500 – 2,9·10 <sup>3</sup>	3 (15)
	Низкая	< 500	< 500	8 (40)
Сочетанная инфекция**, 37,5% (12 из 32)	Высокая	6,0·10 <sup>2</sup> –7,4·10 <sup>4</sup>	3,3·10 <sup>3</sup> –7,4·10 <sup>4</sup>	8 (66,7)
	Средняя*	< 500	3,0·10 <sup>3</sup>	1 (8,3)
	Низкая	< 500	< 500	3 (25)

Примечание. \* - вирусная нагрузка расценивалась как средняя, если концентрация вирусной ДНК в ЛПК была в области низких значений (< 500 копий ГЭ/10<sup>5</sup> кл.), а в плазме крови попадала в линейный диапазон измерений тест-системы, т. е. превышала 500 копий ГЭ/мл; \*\* – в большинстве образцов (75%) обнаружена ДНК ЦМВ, в 42% – ДНК ВЭБ, в 25% образцов одновременно была выявлена ДНК трех герпесвирусов.

Таблица 4

## Число ЛПК у больных при различных типах ВГЧ-6-инфекции

Тип ВГЧ-6-инфекции	Концентрация ДНК ВГЧ-6 в плазме крови, копий/мл	Среднее число ЛПК, 10 <sup>9</sup> /л
Активная	>500	1,75 (лейкопения)
	< 500	3,58 (норма)
Латентная	0	3,86 (норма)

типа инфекции требуется дополнительное тестирование этой ДНК в плазме: при концентрации < 500 – для разграничения латентной эпизодической или активной, при концентрации 10<sup>5</sup> ГЭ/10<sup>5</sup> кл. – для разграничения латентной интегрированной и активной.

Исследование ассоциации ВГЧ-6 с другими герпесвирусами у пациентов с лабораторными признаками активной инфекции показало, что более чем в половине случаев (62,5%; 20 из 32 больных; см. табл. 3) вирус представлен моноинфекцией. Показано, что концентрация ДНК ВГЧ-6 в ЛПК больных почти в 3 раза ниже при смешанной инфекции, чем при моноинфекции (5,9·10<sup>4</sup> и 2·10<sup>4</sup> соответственно). У большинства больных (75%; 9 из 12) со смешанной инфекцией была обнаружена ДНК ЦМВ. ВГЧ-6 имеет преимущественный тропизм к Т-клеткам [20, 22, 29], ЦМВ обладает выраженной пантропностью, что позволяет ему реплицироваться в большинстве клеток организма, в том числе в Т-лимфоцитах крови. Таким образом, вирусы конкурируют за перmissive клетки [23]. Геном ЦМВ персистирует в клетках крови; до 2% лейкоцитов доноров содержат предранние белки вируса. ВЭБ поражает В-лимфоциты, вызывая не цитолиз, а их размножение, и способен к длительной персистенции в них [29]. В связи с этим снижение концентрации ДНК ВГЧ-6 в ЛПК при смешанной инфекции по сравнению с моноинфекцией, вероятно, происходит вследствие вирусной интерференции ВГЧ-6 и ЦМВ и возможного подавления ЦМВ репродукции ВГЧ-6. Концентрация ДНК ВГЧ-6 в плазме крови больных также более чем в 2 раза ниже при смешанной инфекции (1,6·10<sup>4</sup> ГЭ/мл) по сравнению с моноинфекцией (3,4·10<sup>4</sup> ГЭ/мл), вероятно, за счет менее интенсивной продукции вируса в ЛПК и уменьшенного лизиса клеток.

Также было показано, что у больных с лабораторными признаками активной ВГЧ-6-инфекции при высокой вирусной нагрузке в плазме понижено содержание ЛПК (см. табл. 4). Лейкопения у пациентов с заболеваниями системы крови может быть вызвана множеством факторов, среди которых течение самой болезни, вызывающей костномозговую аплазию, применение миелотоксических химиопрепаратов, потребление белых клеток крови в результате инфекционных осложнений и пр. Тем не менее у пациентов, включенных в исследование, при низкой вирусной нагрузке в плазме (< 500 ГЭ/мл), а также в случае латентной инфекции число лейкоцитов соответствует норме, что может косвенно указывать на снижение числа лейкоцитов в результате вирусной репликации именно в случае обнаружения лабораторных признаков активной ВГЧ-6-инфекции. Таким образом, активная репликация ВГЧ-6 при высокой вирусной нагрузке в плазме крови сопряжена с умеренной лейкопенией.

## Выводы

Лабораторные признаки активной формы ВГЧ-6-инфекции выявлены в 32,7% (32 из 98), латентной фор-

мы – в 67,3% (66 из 98) случаев. Не обнаружено ни одного случая интегрированной формы ВГЧ-6.

Более чем в половине образцов с лабораторными признаками активной ВГЧ-6-инфекции (62,5%; 20 из 32 больных) вирус представлен моноинфекцией. В случае сочетанной инфекции наиболее часто в качестве коинфекта выступает ЦМВ (75%; 9 из 12). Средние значения концентраций ДНК ВГЧ-6 в ЛПК и плазме крови больных почти в 3 раза ниже при смешанной инфекции, чем при моноинфекции.

Активная репликация ВГЧ-6, протекающая с высокой вирусной нагрузкой, сопряжена с умеренной лейкопенией.

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

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

## ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1-26, 28, 30 см. REFERENCES)

27. Никольский М.А., Радлыш М.В. Роль вирусов герпеса человека 6 и 7-го типов в возникновении фебрильных судорог у детей. *Вопросы диагностики и педиатрии*. 2012; 4(4): 46-8.
29. Львов Н.Д. Герпесвирусы человека – системная, интегративная, лимфопролиферативная иммуноопухоль. *Русский медицинский журнал*. 2012; 20(22): 1133-8.

## REFERENCES

1. Pellett P.E., Roizman B. Herpesviridae. In: Knipe D.M., Howley P.M. *Fields Virology. Chapter 59*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013.
2. Dominguez G., Dambaugh T.R., Stamey F.R., Dewhurst S., Inoue N., Pellett P.E. Human herpesvirus 6B genome sequence: coding content and comparison with human herpesvirus 6A. *J. Virol.* 1999; 73(10): 8040-52.
3. Arbuckle J.H., Pantry S.N., Medveczky M.M., Pritchett J., Loomis K.S., Ablashi D., et al. Mapping the telomere integrated genome of human herpesvirus 6A and 6B. *Virology*. 2013; 442(1): 3-11.
4. Yamanishi K., Yasuko M., Pellett P.E. Human Herpesviruses 6 and 7. In: Knipe D.M., Howley P.M. *Fields Virology. Chapter 64*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013.
5. Asano Y., Yoshikawa T., Suga S., Yazaki T., Hata T., Nagai T., et al. Viremia and neutralizing antibody response in infants with exanthema subitum. *J. Pediatr.* 1989; 114(4 Pt. 1): 535-9.
6. Pellett P.E., Ablashi D.V., Ambros P.F., Agut H., Caserta M.T., Descamps V., et al. Chromosomally integrated human herpesvirus 6: questions and answers. *Rev. Med. Virol.* 2012; 22(3): 144-55.
7. Hall C.B., Caserta M.T., Schnabel K.C., Boettrich C., McDermott M.P., Lofthus G.K., et al. Dewhurst S. Congenital infections with human herpesvirus 6 (HHV6) and human herpesvirus 7 (HHV7). *J. Pediatr.* 2004; 145(4): 472-7.
8. Ward K.N., Leong H.N., Nacheva E.P., Howard J., Atkinson C.E., Davies N., et al. Human herpesvirus 6 chromosomal integration in immunocompetent patients results in high levels of viral DNA in blood, sera, and hair follicles. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44(4): 1571-4.
9. Olson A.L., Dahi P.B., Zheng J., Devlin S.V., Lubin M., Gonzales A.M., et al. Frequent human herpesvirus-6 viremia but low incidence of encephalitis in double-unit cord blood recipients transplanted without antithymocyte globulin. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2014; 20(6): 787-93.
10. Razonable R.R. Human herpesvirus 6, 7 and 8 in solid organ transplant recipients. *Am. J. Transplant.* 2013; 13 (Suppl. 3): 67-78.
11. Jeulin H., Salmon A., Gautheret-Dejean A., Agut H., Dordigoni P., Fortier B., et al. Contribution of human herpesvirus 6 (HHV-6) viral load in whole blood and serum to investigate integrated HHV-6 transmission after haematopoietic stem cell transplantation. *J. Clin. Virol.* 2009; 45(1): 43-6.
12. Hubacek P., Virgili A., Ward K.N., Pohlreich D., Keslova P., Goldova B., et al. HHV-6 DNA throughout the tissues of two stem cell transplant patients with chromosomally integrated HHV-6 and fetal CMV pneumonitis. *Br. J. Haematol.* 2009; 145(3): 394-8.
13. Kamble R.T., Clark D.A., Leong H.N., Heslop H.E., Brenner M.K., Carrum G. Transmission of integrated human herpesvirus-6 in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2007; 40(6): 563-6.
14. Leong H.N., Tuke P.W., Tedder R.S., Khanom A.B., Eglin R.P., Atkinson C.E., et al. The prevalence of chromosomally integrated human

- herpesvirus 6 genomes in the blood of UK blood donors. *J. Med. Virol.* 2007; 79(1): 45-51.
15. Boutolleau D., Agut H., Gautheret-Dejean A. Human herpesvirus 6 genome integration: a possible cause of misdiagnosis of active viral infection? *J. Infect. Dis.* 2006; 194(7): 1019-20.
  16. Ogata M., Kikuchi H., Satou T., Kawano R., Ikewaki J., Kohno K., et al. Human herpesvirus 6 DNA in plasma after allogeneic stem cell transplantation: incidence and clinical significance. *J. Infect. Dis.* 2006; 193(1): 68-79.
  17. De Pagter P.J., Schuurman R., Meijer E., van Baarle D., Sanders E.A., Boelens J.J. Human herpesvirus type 6 reactivation after haematopoietic stem cell transplantation. *J. Clin. Virol.* 2008; 43(4): 361-6.
  18. Boutolleau D., Fernandez C., Andre E., Imbert-Marcille B.M., Milpied N., Agut H., et al. Human herpesvirus (HHV)-6 and (HHV)-7: two closely related viruses with different infection profile in stem cell transplantation recipients. *J. Infect. Dis.* 2003; 187(2): 179-86.
  19. Lusso P., Crowley R.W., Malnati M.S., Di Serio C., Ponzoni M., Biancotto A., et al. Human herpesvirus 6A accelerates AIDS progression in Macaques. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007; 104(12): 5067-72.
  20. De Bolle L., Van Loon J., De Clercq E., Naesens L. Quantitative analysis of human herpesvirus 6 cell tropism. *J. Med. Virol.* 2005; 75(1): 76-85.
  21. McQuaid S., Cosby S.L. An immunohistochemical study of the distribution of the measles virus receptors, CD46 and SLAMF7 in normal human tissues and subacute sclerosing panencephalitis. *Lab. Invest.* 2002; 82(4): 403-9.
  22. Kondo K., Kondo T., Shimada K., Amo K., Miyagawa H., Yamanishi K. Strong interaction between human herpesvirus 6 and peripheral blood monocytes/macrophages during acute infection. *J. Med. Virol.* 2002; 67(3): 364-69.
  23. De Bolle L., Naesens L., De Clercq E. Update on human herpesvirus 6 biology, clinical features and therapy. *Clin. Microbiol. Rev.* 2005; 18(1): 217-45.
  24. Zerr D.M., Meier A.S., Selke S.S., Frenkel L.M., Huang M.L., Wald A., et al. A population-based study of primary human herpesvirus 6 infection. *N. Engl. J. Med.* 2005; 352(8): 768-76.
  25. Okuno T., Takahashi K., Balachandra K., Shiraki K., Yamanishi K., Takahashi M., et al. Seroepidemiology of human herpesvirus 6 infection in normal children and adults. *J. Clin. Microbiol.* 1989; 27(4): 651-3.
  26. Kawabe S., Ito Y., Ohta R., Sofue A., Gotoh K., Morishima T., et al. Comparison of the levels of human herpes virus 6 (HHV6) DNA and cytokines in cerebrospinal fluid and serum of children with HHV6 encephalopathy. *J. Med. Virol.* 2010; 82(8): 1410-5.
  27. Nikol'skiy M.A., Radysh M.V. Human herpesviruses' type 6 and 7 role in the occurrence of febrile seizures in children. *Voprosy diagnostiki i pediatrii.* 2012; 4(4): 46-8. (in Russian)
  28. Yamanishi K., Ocuno T., Shiraki K., Takahashi M., Condo T., Asano Y., et al. Identification of herpesvirus-6 as a causal agent for exanthema subitum. *Lancet.* 1988; 1(8594): 1065-7.
  29. L'vov N.D. Human herpes viruses are systemic, integrative and lymphoproliferative immuno-oncopathology. *Russkiy meditsinskiy zhurnal.* 2012; 20(22): 1133-8. (in Russian)
  30. Kidd I.M., Clark D.A., Sabin C.A., Andrew D., Hassan-Walker A.F., Sweny P., et al. Prospective study of human betaherpesviruses after renal transplantation: association of human herpesvirus 7 and cytomegalovirus disease and increased rejection. *Transplantation.* 2000; 69(11): 2400-4.

Поступила 09.08.17

Принята в печать 17.10.17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 615.371:616.916.1=084

**Юнаслова Т.Н.<sup>1</sup>, Бинятова А.С.<sup>1</sup>, Фадейкина О.В.<sup>1</sup>, Саркисян К.А.<sup>1</sup>, Мовсисянц А.А.<sup>1</sup>, Игнатъев Г.М.<sup>2</sup>, Волкова Р.А.<sup>1</sup>, Терешкина Н.В.<sup>1</sup>, Сидоренко Е.С.<sup>3</sup>, Ильяслова Т.Н.<sup>1</sup>, Суханова Л.Л.<sup>3</sup>**

## АНАЛИЗ КАЧЕСТВА ОТЕЧЕСТВЕННОЙ ВАКЦИНЫ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ КРАСНУХИ

<sup>1</sup> ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, 127051, г. Москва;

<sup>2</sup> ФГУП «Санкт-Петербургский НИИ вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов» ФМБА России, 198320, г. Санкт-Петербург;

<sup>3</sup> Московское подразделение по производству бактериальных препаратов ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России, 115088, г. Москва

До недавнего времени краснуха в нашей стране была широко распространённой инфекцией. Благодаря вакцинопрофилактике, участию в глобальной программе элиминации «управляемых инфекций» ВОЗ и выполнению программы «Элиминация кори и краснухи в Российской Федерации» показатели заболеваемости краснухой в России достигли спорадического уровня. Одним из определяющих условий элиминации краснухи является применение вакцины надлежащего качества, соответствующей международным требованиям. В РФ для вакцинации против краснухи в течение ряда лет использовались зарубежные препараты; с 2008 г. начался коммерческий выпуск отечественной вакцины. Известно, что регламентируемое качество медицинских иммунобиологических препаратов обеспечивают условия производства и стандартный технологический процесс. Поэтому при производстве отечественной вакцины против краснухи соблюдаются правила производства, соответствующие требованиям, предусмотренным Правилами надлежащей производственной практики, и международным рекомендациям. В статье представлен ретроспективный анализ качества отечественной вакцины против краснухи по лабораторным показателям за 2012 - 2017 гг., в результате которого показано, что препарат обладает качеством, соответствующим требованиям нормативной документации. Это свидетельствует о стабильности технологии его производства.

Ключевые слова: вакцина против краснухи; заболеваемость; элиминация краснухи; показатели качества; штамм вируса краснухи; эффективность; вакцинопрофилактика; отраслевой стандартный образец; инспекционный контроль; нормативная документация.

**Для цитирования:** Юнаслова Т.Н., Бинятова А.С., Фадейкина О.В., Саркисян К.А., Мовсисянц А.А., Игнатъев Г.М., Волкова Р.А., Терешкина Н.В., Сидоренко Е.С., Ильяслова Т.Н., Суханова Л.Л. Анализ качества отечественной вакцины для профилактики краснухи. *Вопросы вирусологии.* 2018; 63(2):90-96.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-2-90-96>

**Для корреспонденции:** Юнаслова Татьяна Николаевна, канд. биол. наук, гл. эксперт лаборатории вирусных вакцин ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, 127051, г. Москва. E-mail: [Unasova@expmed.ru](mailto:Unasova@expmed.ru)

Unasova T.N.<sup>1</sup>, Binyatova A.S.<sup>1</sup>, Phadeykina O.V.<sup>1</sup>, Sarkisyan K.A.<sup>1</sup>, Movsesyants A.A.<sup>1</sup>, Ignatyev G.M.<sup>2</sup>, Volkova R.A.<sup>1</sup>, Tereshkina N.V.<sup>1</sup>, Sidorenko E.S.<sup>3</sup>, Ilyasova T.N.<sup>1</sup>, Sukhanova L.L.<sup>3</sup>

### ANALYSIS OF THE QUALITY OF NATIONAL VACCINE AGAINST RUBELLA

<sup>1</sup> Scientific Center for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, 127051, Russian Federation;

<sup>2</sup> St. Petersburg Research Institute of Vaccines and Sera and Manufacturer of Bacterial Preparations, St. Petersburg, 198320, Russian Federation;

<sup>3</sup> NPO Microgen, Moscow Subdivision for Manufacture of Bacterial Products, Moscow, 127051, Russian Federation

**Until recently Rubella has been a wide spread infection. Thanks to vaccination against rubella, taking part in the global elimination program of “manageable infections” of WHO and adoption of the program “Elimination of measles and rubella in Russian Federation” the morbidity index of rubella has reached the sporadic level. One of the determining conditions of rubella elimination is application of high-quality vaccines that satisfy international standards. In Russian Federation, foreign rubella vaccines certified in our country were used for several years. In 2008, the commercial production of domestic vaccine began. It is widely known that the required quality of immunobiological medications is achieved using adequate production conditions and standard technological process. That is why during the production of domestic rubella vaccine, all the rules and requirements of Russian regulatory authorities and international recommendations are followed. In this article, a retrospective analysis of domestic vaccine against rubella according to laboratory options of quality in 2012-2017 is given. The results of the analysis show that the medication demonstrates stable high quality that is indicative of secure production technologies.**

**Key words:** rubella vaccine; morbidity; rubella elimination; level of quality; rubella virus strain; effectiveness; vaccination; sectoral standard sample; inspection control; normative documents.

**For citation:** Unasova T.N., Binyatova A.S., Phadeykina O.V., Sarkisyan K.A., Movsesyants A.A., Ignatyev G.M., Volkova R.A., Tereshkina N.V., Sidorenko E.S., Ilyasova T.N., Sukhanova L.L. Analysis of the quality of national vaccine against rubella. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2018; 63(2): 90-96. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-2-90-96>

**For correspondence:** Tatyana N. Unasova, chief expert of viral vaccines laboratory, Scientific Center for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, 127051, Russian Federation. E-mail: [Unasova@expmed.ru](mailto:Unasova@expmed.ru)

**Informaiton about authors:**

Unasova T.N., <http://orcid.org/0000-0002-1606-942X>

**Acknowledgment.** The study had no sponsorship.

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

Received 08 December 2017

Accepted 12 December 2017

## Введение

Основу стратегии борьбы с краснухой в нашей стране составляют мероприятия, проводимые в соответствии с Национальной программой «Элиминация кори и краснухи в Российской Федерации». Заболевание краснухой у детей протекает, как правило, легко, но инфицирование беременных часто приводит к тяжёлым аномалиям развития плода. Поэтому главная задача вакцинопрофилактики краснухи – это предупреждение рождения детей с синдромом врождённой краснухи (СВК). Новый стратегический план ВОЗ по глобальной ликвидации кори, краснухи и предупреждения СВК рассчитан на 2011–2020 гг., а Национальная программа – на 2016–2020 гг.<sup>1,2</sup> [1].

До недавнего времени краснуха в нашей стране была широко распространённой инфекцией. В России вакцинация против краснухи введена в национальный календарь профилактических прививок в 1997 г. Благодаря систематическому совершенствованию тактики вакцинопрофилактики краснухи, планомерным изменениям национального календаря профилактических прививок<sup>3</sup>, включению в планы мероприятий по элиминации кори аналогичных мероприятий по элиминации краснухи заболеваемость краснухой резко снизилась и достигла

уровня элиминации: менее 1 случая на 1 млн населения. Так, если в 2001 г. в России показатель заболеваемости краснухой на 100 тыс. населения был 396,8, в 2007 г. после вакцинации более 11 млн детей и женщин заболеваемость краснухой составила 21,6, в 2009 г. – 1,13, в 2016 г. – 0,03 на 100 тыс. населения [2, 3].

Стабилизация показателей заболеваемости краснухой на спорадическом уровне на большинстве территорий РФ и отсутствие заболеваемости краснухой в целом ряде субъектов страны привели к снижению циркуляции вируса. Однако для сохранения устойчивой спорадической заболеваемости краснухой во всех регионах РФ необходимо поддержание высокого уровня охвата населения вакцинацией и ревакцинацией против краснухи. Особенно следует подчеркнуть, что высокий охват прививками должен сохраняться как при низком уровне заболеваемости, так и при полном отсутствии случаев заболевания краснухой<sup>2</sup>.

В программе «Элиминации кори и краснухи в Российской Федерации» ставится задача повышения охвата прививками до 95% и более не только населения в целом, но также уязвимых и труднодоступных групп населения, к которым относятся культурные и этнические меньшинства, мигранты, географически разобщённые группы населения, люди, которые отказываются от вакцинации из-за религиозных убеждений.

Следует отметить, что на данном этапе выполнения Национальной программы «Элиминации кори и краснухи в Российской Федерации» стоит задача верификации элиминации кори и краснухи на территории Российской Федерации к 2020 г.

Одним из определяющих условий элиминации краснухи является применение вакцины надлежащего качества, соответствующей международным требованиям.

В РФ для вакцинации против краснухи с 1994 г. использовались зарегистрированные в нашей стране моно- и ассоциированные препараты зарубежного производства: французская, бельгийская вакцина, вакцины против краснухи, производившиеся в Индии и Хорватии, а также поливалентные вакцины против кори, паротита и краснухи индийского,

<sup>1</sup>Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации № 17 от 17 апреля 2013 г. «Об утверждении программы «Профилактика кори и краснухи в период верификации их элиминации в Российской Федерации (2013-2015 гг.)» и плана ее реализации», Москва.

<sup>2</sup>Национальный план мероприятий по реализации программы «Элиминация кори и краснухи в Российской Федерации» (2016-2020 гг.), утверждённый Роспотребнадзором и Минздравом России 28-31 декабря 2015 г.

<sup>3</sup>Приказ МЗ РФ от 16 июня 2016 г. № 370н «О внесении изменений к приказу МЗ РФ от 21 марта 2014 г. № 125н «Об утверждении национального календаря профилактических прививок и календаря прививок по эпидемиологическим показаниям».

бельгийского производства и США. Наиболее широко у нас в стране применялась вакцина против краснухи производства «Serum Institute of India, Ltd». В течение 2003 - 2008 гг. в РФ было поставлено более 30 млн доз индийской вакцины.

Все перечисленные вакцины изготовлены на основе аттенуированного штамма вируса краснухи RA 27/3 на диплоидных клетках человека. Этот штамм, полученный и изученный С. Плоткиным в 1969 г., до настоящего времени используется для производства вакцин во всем мире, кроме Японии и Китая. Широкомасштабные полевые и клинические испытания вакцин из этого штамма более чем в 20 странах позволили установить достаточную иммуногенность и низкую реактогенность штамма RA 27/3 [4, 5]. Применение вакцин против краснухи на основе штамма RA 27/3 более 40 лет доказало его безопасность и высокую эффективность, о чем свидетельствует элиминация краснухи и СВК на Кубе и в нескольких странах Европы, которые достигли высокого уровня охвата прививками и поддерживали его, применяя вакцину [6–10].

В нашей стране проводились как регистрационные, так и пострегистрационные клинические испытания применяемых вакцин против краснухи, которые также показали безопасность и эффективность препаратов из этого штамма [11–15].

С 2008 г. в РФ использовалась в основном вакцина против краснухи из субстанции хорватского производства («Institute of Immunology, Inc.», Республика Хорватия), выпуск которой был освоен Московским предприятием по производству бактериальных препаратов ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России. С 2009 по 2012 г. было произведено более 20 млн доз отечественной вакцины из названной субстанции.

В 2006 г. научно-производственное объединение «Микроген» (далее НПО «Микроген») по лицензионному соглашению приобрело вакцинный штамм вируса краснухи Wistar RA 27/3 (далее RA 27/3). Штамм предоставлен Институтом анатомии и биологии Wistar, США. Разработанная в НПО «Микроген» новая отечественная вакцина из этого штамма была изучена в соответствии с существующей в нашей стране системой регистрации<sup>4</sup>. Кроме того, проведена молекулярно-генетическая идентификация производственного штамма, приотловленного из вакцинного штамма RA 27/3. Была исследована нуклеотидная последовательность двух генов вируса краснухи: гена белка NS1 и гена белка E1 в сравнении с теми же генами вакцинного штамма С. Плоткина RA 27/3, сведения о которых имеются в базе данных GenBank. Сравнительный анализ последовательностей генома вируса, представленных в GenBank и в производственном штамме, показал, что производственный штамм вируса краснухи гомологичен оригинальному штамму RA 27/3 [16]. Это указывало на стабильность штамма RA 27/3 в процессе многолетнего хранения и являлось гарантией безопасности и эффективности производимых из него вакцин.

Таким образом, все производственные материалы, производственный штамм, посевной вирус, первые производственные серии препарата были проконтролированы по всем показателям в соответствии с российскими и международными требованиями, после чего новый отечественный препарат был рекомендован к медицинскому применению [17, 18]. Производственный штамм вируса краснухи RA 27/3 был депонирован в государственной коллекции вирусов ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава России под № 2614. К концу 2012 г. предприятие освоило коммерческий выпуск вакцины против краснухи культуральной живой из оригинального авторского штамма С. Плоткина, которая применяется в стране до настоящего времени.

Известно, что регламентируемое качество медицинских

иммунобиологических препаратов обеспечивают условия производства и стандартный технологический процесс. При производстве препарата необходимо неукоснительное соблюдение ряда правил в соответствии с Правилами надлежащей производственной практики и рекомендациями ВОЗ<sup>5</sup> [18].

В течение первых лет производства отечественной вакцины против краснухи проводился предреализационный контроль качества препарата, анализ сводных протоколов производства и контроля и регулярное инспектирование предприятия. В настоящее время испытания вакцины проводятся в рамках сертификационных испытаний.

Цель настоящей работы – ретроспективный анализ качества отечественной вакцины против краснухи по лабораторным показателям за 2012–2017 гг.

## Материал

Использованы следующие материалы:

- вакцина против краснухи культуральная живая аттенуированная из субстанции производства «Institute of Immunology, Inc.», Республика Хорватия; сводные протоколы производства и контроля (155 серий);
- вакцина против краснухи культуральная живая производства ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России; сводные протоколы производства и контроля (634 серии);
- перевиваемая культура клеток почек кролика RK-13 («Institute of Immunology, Inc.», Республика Хорватия);
- ОСО 42-28-426-2013 – отраслевой стандартный образец активности вакцины против краснухи.

## Методы

Ретроспективный анализ качества вакцины против краснухи проводили по данным, представленным в сводных протоколах производства, а также по результатам испытаний качества вакцины в Испытательном центре медицинских иммунобиологических препаратов ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» (ИЦ МИБП ФГБУ «НЦЭСМП») Минздрава России в соответствии с действующими фармакопейными статьями на вакцину против краснухи культуральную живую аттенуированную и вакцину против краснухи культуральную живую [17–21].

Специфическую активность и термостабильность оценивали по цитопатическому действию (ЦПД) вируса на культуре клеток RK-13 при помощи инвертированного микроскопа Olympus IX71 с фотодокументированием.

Испытания препарата по другим показателям качества: потери в массе при высушивании, точности розлива, остаточного содержания бычьего сывороточного альбумина (БСА), pH проводили в соответствии с действующими фармакопейными статьями на вакцину против краснухи культуральную живую [19–21].

Статистическую обработку (расчёт среднеарифметического значения и стандартного (среднеквадратического) отклонения) выполняли по С. Гланцу [22] с помощью программы Microsoft Excel 2007, оценку нормальности распределения – по критерию Колмогорова–Смирнова ( $n = 634$ ) с использованием программы Statistica (version 10).

## Результаты

Выполнен ретроспективный анализ количественных показателей качества 634 коммерческих серий вакцины против краснухи культуральной живой с 2013 г. до настоящего времени, т. е. за 4 года 8 мес.

Для сравнения была проведена оценка тех же показателей

<sup>4</sup>«Государственные испытания и регистрация новых медицинских иммунобиологических препаратов. Санитарные правила. СП 3.3.2.561-96» (утверждено постановлением Госкомсанэпиднадзора РФ от 31.10.1996 № 33). Актуально в 2017 г.

<sup>5</sup>ГОСТ ISO 9001-2011 «Системы менеджмента качества, требования», «Правила надлежащей производственной практики», приказ Минпромторга России от 14.06.2013 № 916

Таблица 1

**Показатели качества вакцины против краснухи за период 2012–2017 гг.**

Год (число выпущенных серий)	ПД (n), ИЦ	Потеря в массе при высушивании, % (X ± S)	Точность розлива**, коэффициент вариации массы, % (X ± S)	Специфическая активность, lg ТЦД <sub>50</sub> /0,5 мл (X ± S)	Термостабильность, lg ТЦД <sub>50</sub> /0,5 мл (X ± S)	pH (X ± S)					
							норма по НД:				
							не более 2	не более 10	не менее 3,0	потеря активности не более 1,0	от 7,0 до 8,0
2012* (155)	ПД (n = 155)	1,23 ± 0,18	0,73 ± 0,29	4,15 ± 0,17	0,20 ± 0,14	7,20 ± 0,05					
	ИЦ	0,94 ± 0,47 (n = 28)	1,2 ± 0,48 (n = 25)	4,04 ± 0,22 (n = 31)	0,22 ± 0,16 (n = 31)	7,23 ± 0,06 (n = 155)					
2013 (136)	ПД (n = 136)	0,98 ± 0,20	0,65 ± 0,29	4,47 ± 0,17	0,22 ± 0,12	7,65 ± 0,06					
	ИЦ	0,92 ± 0,37 (n = 29)	1,01 ± 0,33 (n = 29)	3,97 ± 0,32 (n = 30)	0,19 ± 0,14 (n = 30)	7,68 ± 0,09 (n = 136)					
2014 (141)	ПД (n = 140)	0,88 ± 0,27	0,57 ± 0,23	4,73 ± 0,18	0,20 ± 0,11	7,70 ± 0,05					
	ИЦ	1,00 ± 0,28 (n = 24)	0,98 ± 0,49 (n = 24)	4,59 ± 0,26 (n = 22)	0,12 ± 0,13 (n = 22)	7,69 ± 0,07 (n = 140)					
2015 (119)	ПД (n = 118)	0,91 ± 0,16	0,52 ± 0,20	4,64 ± 0,15	0,18 ± 0,11	7,70 ± 0,05					
	ИЦ	0,92 ± 0,20 (n = 23)	0,99 ± 0,27 (n = 7)	4,33 ± 0,27 (n = 24)	0,17 ± 0,09 (n = 24)	7,72 ± 0,05 (n = 118)					
2016 (150)	ПД (n = 150)	0,74 ± 0,16	-	4,72 ± 0,14	0,20 ± 0,11	7,73 ± 0,06					
	ИЦ	1,10 ± 0,42 (n = 29)	-	4,37 ± 0,31 (n = 27)	0,23 ± 0,14 (n = 27)	7,71 ± 0,06 (n = 139)					
2017 (88)	ПД (n = 87)	0,68 ± 0,13	-	4,68 ± 0,14	0,18 ± 0,10	7,76 ± 0,06					
	ИЦ	1,02 ± 0,37 (n = 14)	-	4,37 ± 0,19 (n = 19)	0,22 ± 0,11 (n = 19)	7,73 ± 0,04 (n = 55)					

Примечание. Здесь и в табл. 2: \* – вакцина из замороженной хорватской субстанции. X ± S – среднееарифметическое значение показателя ± стандартное (среднеквадратическое) отклонение; \*\* – показатель исключен из НД в 2016 г.; ПД (n) – паспортные данные (n – число паспортов) по результатам определения показателя в ФГУП «НПО «Микроген»; ИЦ – данные Испытательного центра (в скобках приведены данные по количеству серий, прошедших испытания в ИЦ МИБП ФГБУ «НЦЭСМП»).

качества в 155 сериях отечественной вакцины против краснухи из субстанции производства «Institute of Immunology, Inc.» (Республика Хорватия) за 2012 г. Полученные результаты представлены в табл. 1.

При сравнении показателей качества вакцины из субстанции хорватского производства с показателями качества вакцины, приготовленной из приобретенного штамма на базе московского предприятия, можно отметить, что значения анализируемых показателей за всё время исследования соответствовали нормативным требованиям.

Анализ специфической активности вакцины с 2012 г. по настоящее время показал, что содержание вируса в прививочной дозе как в сериях, изготовленных из субстанции хорватского производства, так и в сериях, приготовленных полностью по собственной технологии, всегда было выше минимально регламентированного уровня.

Из табл. 2, в которой представлена характеристика выпускаемых серий вакцины по содержанию вируса в прививочной дозе, следует, что около 35% серий содержали вирус с активностью в интервале 4,0 – 4,5 lg ТЦД<sub>50</sub>/доза, 61% серий – в интервале 4,5 – 5,0 lg ТЦД<sub>50</sub>/доза. Как видно из рис. 1, на котором показан мониторинг значений специфической активности вакцины против краснухи в течение 2013–2017 гг. по результатам определения в ИЦ МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, все серии препарата соответствовали требованиям нормативной документации (НД) и содержали вирус в количестве, превышающем минимально допустимое; разброс значений активности практически находился в пределах ± 2 стандартных отклонения (σ), что свидетельствовало о стабильности производства вакцины.

Обязательным требованием при выполнении испытаний специфической активности вакцины против краснухи является использование ОСО активности вакцины как в ИЦ МИБП ФГБУ «НЦЭСМП», так и на предприятии. В течение нескольких лет производства отечественной вакцины из хорватской субстанции в качестве стандартного образца (СО) активности использовали стандартный образец предприятия (СОП). В 2013 г. был всесторонне изучен и аттестован ОСО активности вакцины против краснухи (ОСО 42-28-426-2013), серия № 1 [23]. Использование СО необходимо для подтверждения приемлемости результатов определения специфической ак-

тивности вируса в вакцине. Критерии учёта результатов определения активности вируса в вакцине, представленные ниже, содержатся в фармакопейной статье предприятия (ФСП) и соответствуют Европейской фармакопее (ЕФ):

- диапазон доверительного интервала (p = 0,95) среднего значения титра СО, определённого при трёхкратном титровании 1 ампулы, должен быть в пределах ± 0,3 lg ТЦД<sub>50</sub>;
- титр вируса в СО не должен отличаться более чем на 0,5 lg ТЦД<sub>50</sub> от аттестационного значения.

На рис. 2 представлена специфическая активность ОСО 42-28-426-2013 в течение нескольких лет использования его во время испытаний специфической активности коммерческих серий вакцины в ИЦ МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. Из рисунка видно, что значение активности ОСО колебалось в пределах границ аттестованного значения A<sub>оц</sub> = (4,63 ± 0,50) lg ТЦД<sub>50</sub>/0,5 мл, что удовлетворяет критериям приемлемости полученных результатов, свидетельствует о стабильности условий проведения испытаний и надёжности оценки результатов определения специфической активности вакцины.

Особое внимание при контроле вакцины против краснухи было уделено выбору методики определения специфической активности вируса. Некоторые производители осуществляют учёт специфической активности вируса краснухи с помощью вируса везикулярного стоматита (ВВС), которым заражают клетки, инфицированные вирусом краснухи, и учитывают результаты по

Таблица 2

**Характеристика вакцины против краснухи по содержанию вируса в прививочной дозе за 2012–2017 гг.**

Год	Число анализируемых серий (по ПД)	Число серий с активностью вируса в lg ТЦД <sub>50</sub> /0,5 мл			
		3,51 – 4,0	4,01 – 4,5	4,51 – 5,0	≥ 5
2012*	155	34	119	2	0
2013	136	0	87	49	0
2014	140	0	14	121	5
2015	118	0	26	92	0
2016	150	0	13	137	0
2017 (за 8 мес)	87	0	9	78	0

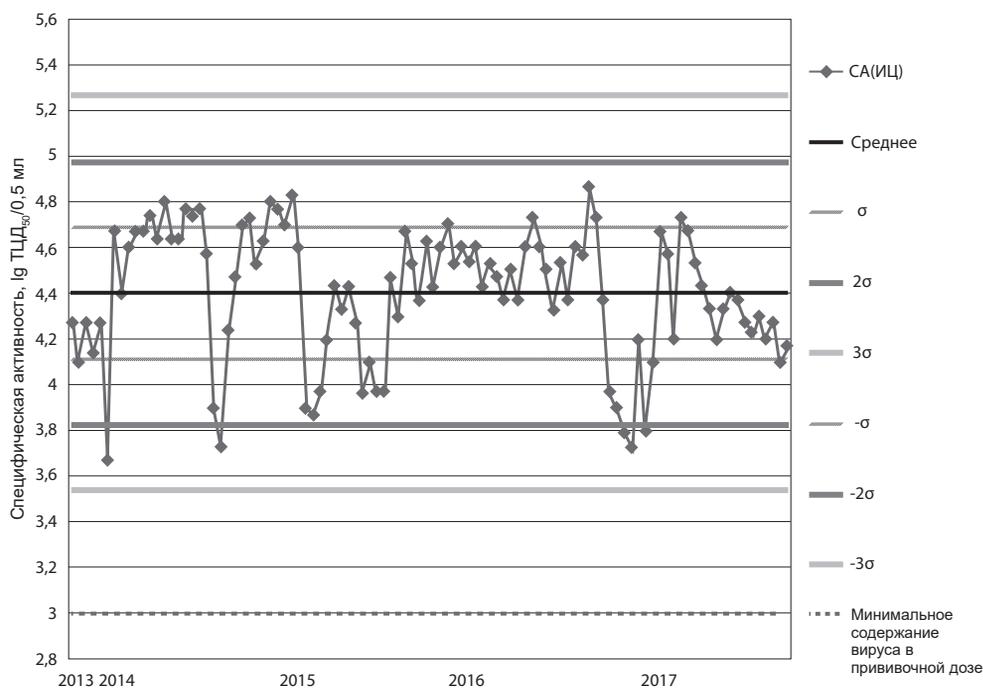


Рис. 1. Мониторинг значения специфической активности вакцины против краснухи за период 2013 – 2017 гг. ( по данным ИЦ МИБП).

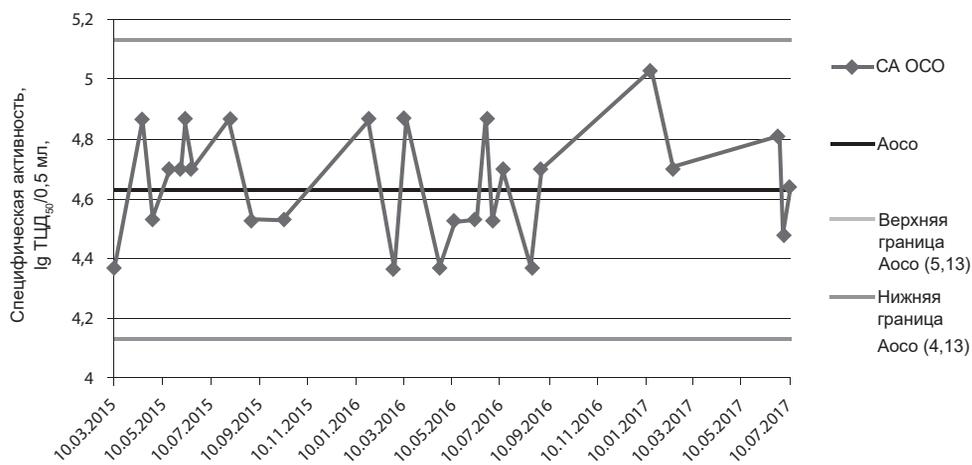


Рис. 2. Специфическая активность ОСО активности вакцины против краснухи за период 2015 – 2017 гг.

отсутствию цитопатического эффекта ВВС. В результате анализа нескольких модификаций титрования был выбран оптимальный вариант, при использовании которого визуально наблюдали ЦПД вируса краснухи на перевиваемой культуре клеток почек кролика RK-13 без интерференции с ВВС. Вирус краснухи в культуре клеток RK-13 вызывает характерное ЦПД в виде гроздевидных скоплений морфологически изменённых клеток (рис. 3). Использование ОСО при каждом титровании для определения активности вируса в вакцине также способствовало достоверной оценке результатов при учёте по ЦПД. Метод учета активности вируса краснухи по ЦПД без интерференции с ВВС является более простым и экономичным.

Результаты оценки термостабильности вакцины за 5,5 года наблюдения, представленные в табл. 1, также свидетельствуют о стабильности качества вакцины. Допустимое снижение

специфической активности препарата после прогревания при 37°C в течение 7 дней в соответствии с национальными и международными требованиями - не более 1,0 lg TCID<sub>50</sub>; фактическое снижение активности вируса в вакцине в тесте термостабильности было в пределах 0,17 – 0,22 lg TCID<sub>50</sub>. Аналогичные данные были получены при испытании вакцины против краснухи индийского производства по показателю качества «Термостабильность». Для сравнения снижение специфической активности индийской вакцины против краснухи в тесте термостабильности, по данным анализа результатов контроля 56 серий препарата, зафиксировано в пределах 0,24 – 0,31 lg TCID<sub>50</sub>.

В 2015 г. в НД на вакцину против краснухи культуральную живую введен показатель «Остаточное количество БСА». Остаточное количество БСА почти в 70% выпущенных серий было менее определяемого уровня, т. е. менее 1,2 нг/доза. Около 30% серий содержали БСА в среднем в количестве 1,68 нг в прививочной дозе, что намного меньше нормативного требования – не более 50 нг в прививочной дозе.

Анализ некоторых показателей, таких как «Точность розлива» и «Потеря в массе при высушивании», выполненный на представительном материале, показывает, насколько стабильно технология производства вакцины обеспечивает надлежащее качество.

По показателю «Точность розлива», по которому можно судить о стандартности вакцины по содержанию вируса в каждой ампуле в пределах

серии препарата, проанализировано качество вакцины за 4 года. Точность розлива оценивается по коэффициенту вариации массы сухого остатка в ампуле. По требованиям НД коэффициент вариации массы сухого остатка составляет 10%. Среднегодовые показатели коэффициента вариации массы сухого остатка по ПД 551 серии вакцины (см. табл. 1) колебались от 0,52 ± 0,20 до 0,73 ± 0,29%, что значительно ниже нормативного требования по этому показателю.

Регламентированный уровень потери в массе при высушивании способствует наряду с другими технологическими приёмами сохранению вируса в ампулах в пределах срока годности. Анализ ПД 634 серий вакцины против краснухи по этому показателю с 2013 г. по настоящее время показал, что все серии имели остаточную влагу менее 1%. Результаты испытаний вакцины по этому показателю в ИЦ МИБП ФГБУ «НЦЭСМП»

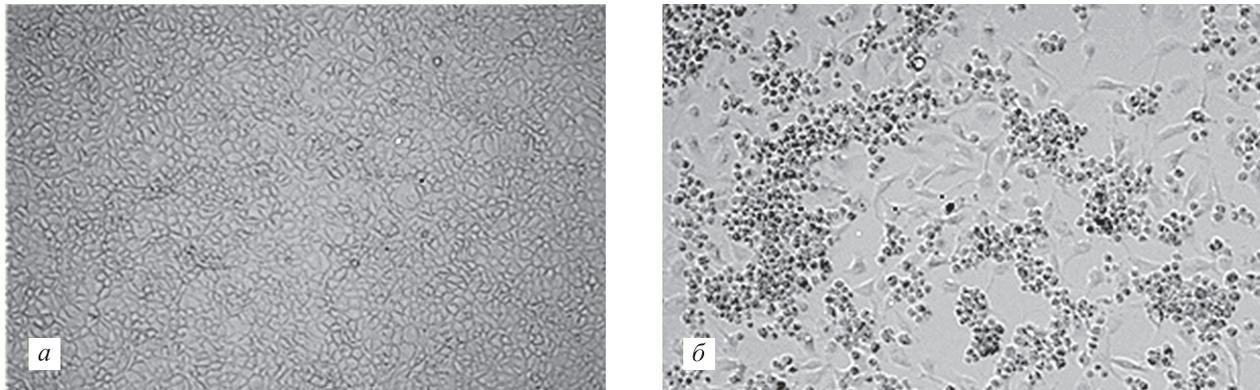


Рис. 3. Перевиваемая культура клеток почек кролика RK-13. Ув. 100.

*a* - контроль: эпителиоподобные клетки без признаков зернистости и дегенерации;  
*б* – ЦПД вируса краснухи (титрование коммерческой серии вакцины против краснухи, разведение  $10^{-1}$ ).

Минздрава России практически совпали с ПД. Средний показатель по этому параметру качества 119 проконтролированных серий варьировал от  $0,91 \pm 0,16$  до  $1,10 \pm 0,42\%$ .

Представленные материалы анализа количественных параметров качества отечественной вакцины против краснухи продемонстрировали стандартность качества вакцины, которая является следствием стандартности и стабильности технологии её производства. Стандартная технология производства отечественной вакцины обеспечивается также благодаря отлаженной системе приготовления посевных вирусов. Анализ пассажной характеристики производственных материалов вируса краснухи с 2013 г. показал, что стандартная пассажная характеристика препарата сохраняется в течение всего времени его выпуска.

### Обсуждение

Ретроспективный анализ качества медицинских иммунобиологических препаратов очень важен для обеспечения возможности управления качеством препарата. В течение анализируемого промежутка времени совершенствовались требования к качеству препарата, что отражалось на изменениях НД.

НД предприятия, в соответствии с требованиями которой выпускается вакцина против краснухи в настоящее время, отличается по набору контролируемых показателей от документации, по которой контролировалась вакцина из субстанции хорватского производства [19, 21].

С 2015 г. в соответствии с требованиями ФС.3.3.1.0024.15. (ГФХП) отечественная вакцина против краснухи контролируется на остаточное содержание БСА, которое не должно превышать 50 нг в прививочной дозе. Это важный показатель качества вакцины, так как БСА является чужеродным белком, и с ним связаны аллергизирующие свойства вакцины. Как показал анализ ПД с 2015 г. по настоящее время (в течение 2 лет 7 мес), почти в 70% выпущенных серий содержание БСА было менее определяемого уровня. Около 30% серий содержали БСА в количестве, намного меньшем допустимого национальными и международными требованиями.

Следует отметить, что субстанция хорватского производства, поступающая на московское предприятие в качестве полуфабриката для изготовления вакцины, содержала антибиотик неомидин сульфат, который использовался при культивировании производственного субстрата и оставался в готовом продукте в следовых количествах. В процессе изготовления вакцины из штамма RA 27/3 в ФГУП «НПО «Микроген» антибиотик не используется.

Благодаря этим двум фактам аллергизирующие свойства отечественной вакцины, изготавливаемой целиком по собственной технологии, минимизированы.

С 2016 г. с учётом стабильности производства и с целью гармонизации национальных требований с требованиями ЕФ из числа контролируемых показателей готового продукта исключён показатель «Точность розлива». В соответствии с требованиями НД коэффициент вариации массы сухого остатка должен быть не более 10%. Дозирующее оборудование предприятия позволяет получить более высокую точность розлива. Анализ сводных протоколов производства и контроля вакцины по этому показателю с 2012 до 2016 г. показал, что средняя величина этого показателя не достигала 1%. Это значительно ниже нормативного требования и обеспечивает стандартное содержание вируса в каждой ампуле.

Ретроспективный анализ качества отечественной вакцины против краснухи по данным, представленным в сводных протоколах производства, позволил также оценить стандартность технологии производства, проследив пассажные уровни производственных материалов. Анализ пассажной характеристики производственных материалов вируса краснухи с 2013 г. показал, что регламентированная пассажная характеристика препарата сохраняется в течение всего времени его выпуска.

Представленные материалы анализа количественных параметров качества отечественной вакцины против краснухи свидетельствуют о стандартности качества вакцины, которая является следствием стандартности и стабильности технологии её производства. Вышеизложенное позволяет сделать вывод о высоком качестве отечественной вакцины для профилактики краснухи.

Результаты анализа качества вакцинного препарата и эффективности вакцинопрофилактики краснухи являются чрезвычайно важными и полезными как для населения, так и для медицинских работников и студентов медицинских образовательных учреждений. Выполнение программы элиминации краснухи и предупреждения СВК требует значительного увеличения охвата населения прививками. Важным фактором для увеличения и поддержания на высоком уровне охвата иммунизацией против краснухи является формирование положительного отношения населения к вакцинопрофилактике и понимание, что вакцинация против краснухи обеспечивает защиту здоровья и предотвращает возникновение такой тяжелой патологии у детей, как СВК. Стратегическим планом элиминации краснухи предусматривалась необходимость совершенствовать доступность для организаторов здравоохранения и населения взвешенной информации о пользе и риске вакцинации против краснухи. В этом аспекте информации о качестве отечественной вакцины, используемой в настоящее время для массовой профилактики краснухи, принадлежит значительная роль<sup>1,2</sup>.

## Выводы

Проведенный нами ретроспективный анализ лабораторных показателей качества отечественной вакцины против краснухи позволяет сделать вывод о стандартности и стабильности качества препарата и стабильности технологии его производства.

Эпидемиологическая эффективность отечественной вакцины против краснухи на основе штамма RA 27/3, применение которой с 2008 г. привело к достижению спорадического уровня заболеваемости краснухой в стране, подтверждает соответствие препарата национальным и международным требованиям.

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

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

## ЛИТЕРАТУРА (п.п. 8-10 см. REFERENCES)

- Итоги международной конференции «Теоретические и практические аспекты элиминации кори». *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2006; (1): 14-7.
- Бичурина М.А., Лаврентьева И.Н., Железнова Н.В., Антипова А.Ю., Тимофеева Е.В. Заболеваемость краснухой на северо-западе России на этапе элиминации инфекции. *Инфекция и иммунитет*. 2014; 4(3): 249-56.
- Управление Роспотребнадзора по городу Москве. <http://77.rosпотребнадзор.ru/>
- Шамсутдинова О.А. Живые аттенуированные вакцины для иммунопрофилактики. *Инфекция и иммунитет*. 2017; 7(2): 107-16.
- Plotkin S.A., Orenstein W.A. Вакцина против краснухи. Опыт применения в мире. *Информационный бюллетень «Вакцинация»*. 1999; (1): 6-7.
- Бектимиров Т.А. Мировой опыт иммунопрофилактики краснухи. *Вакцинация*. 2004; 36(6): 11-2.
- Бектимиров Т.А. Успехи вакцинопрофилактики кори, краснухи и эпидемического паротита за рубежом. *Вакцинация*. 2006; (4): 4-5.
- Гайдерова Л.А., Юнасова Т.Н., Попов В.Ф., Ельшина Г.А., Горбунов М.А., Хржановская И.Н. Пострегистрационная оценка индийской комбинированной вакцины для профилактики кори, паротита и краснухи. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2005; (6): 22-4.
- Гайдерова Л.А., Юнасова Т.Н., Шитикова О.Ю., Попов В.Ф., Игнатьев Г.М., Горбунов М.А. Пострегистрационная оценка отечественных и зарубежных вакцин для профилактики кори, эпидемического паротита и краснухи. *Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2013; (1): 16-22.
- Попов В.Ф., Юнасова Т.Н., Горбунов М.А., Шитикова О.Ю., Павлова Л.И., Гайдерова Л.А. Результаты клинических испытаний по оценке вакцин против краснухи Республики Хорватии при регистрации в РФ. В кн.: *Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Вакцинопрофилактика, иммунотерапия, иммунокоррекция»*. М.; 2004: 70.
- Попов В.Ф., Юнасова Т.Н., Аксенов Л.А., Аверина О.А., Шитикова О.Ю., Иванов А.А. Оценка антигенности и реактогенности индийской вакцины против краснухи. В кн.: *Материалы конференции «Достижения отечественной эпидемиологии в XX веке. Взгляд в будущее»*. СПб.; 2001; 250.
- Попов В.Ф., Юнасова Т.Н., Аксенов Л.А., Аверина О.А., Шитикова О.Ю., Фролова Г.С. и др. Испытания вакцины против кори, паротита и краснухи производства фирмы «Серум Инститьют оф Индия Лтд». В кн.: *Материалы конференции «Достижения отечественной эпидемиологии в XX веке. Взгляд в будущее»*. СПб.; 2001; 250.
- Игнатьев Г.М., Отрашевская Е.В., Неверов А.А., Кулак М.В., Юнасова Т.Н., Суханова Л.Л. и др. Вакцинопрофилактика кори, паротита и краснухи. В кн.: *Сборник научных трудов «Современные проблемы инфекционной патологии человека»*. Выпуск 5. Минск; 2012; 330.
- Фармакопейная статья предприятия ЛП-000463-010311 на Вакцину против краснухи культуральную живую.
- Комитет экспертов ВОЗ по стандартизации биологических препаратов. 43-й доклад. Серия технических докладов ВОЗ № 840. Женева; 1994.
- Фармакопейная статья предприятия 42-0504-7817-06 на Вакцину против краснухи культуральную живую аттенуированную.
- Государственная фармакопея РФ XIII. Фармакопейная статья 3.3.1.0024.15 на Вакцину против краснухи культуральную живую.
- Фармакопейная статья предприятия ЛП-00463-281216. на Вакцину против краснухи культуральную живую.
- Гланц С. *Медико-биологическая статистика*. Пер. с англ. М.: Практика; 1999.
- Юнасова Т.Н., Фадейкина О.В., Сидоренко Е.С., Суханова Л.Л., Шитикова О.Ю., Саркисян К.А. и др. Разработка и изучение отраслевого стандартного образца активности вакцин против краснухи. *Биопрепараты. Профилактика. Диагностика. Лечение*. 2015; (3): 49-53.

## REFERENCES

- Results of the international conference «Theoretical and practical aspects of measles elimination». *Epidemiologiya i vaksino profilaktika*. 2006; (1): 14-7. (in Russian)
- Bichurina M.A., Lavrent'eva I.N., Zheleznova N.V., Antipova A.Yu., Timofeeva E.V. Incidence of rubella in North West Russia on the stage of elimination of rubella. *Infektsiya i immunitet*. 2014; 4(3): 249-56. (in Russian)
- Office of Rosпотребnadzor in the city of Moscow. <http://77.rosпотребнадзор.ru/> (in Russian)
- Shamsutdinova O.A. Live attenuated vaccines for the immunoprophylaxis. *Infektsiya i immunitet*. 2017; 7(2): 107-16. (in Russian)
- Plotkin S.A., Orenstein W.A. The history of rubella and rubella vaccination leading to elimination. *Informatsionnyy byulleten' «Vaksinatziya»*. 1999; (1): 6-7. (in Russian)
- Bektimirov T.A. World experience of rubella immune prophylaxis. *Vaksinatziya*. 2004; 36(6): 11-2. (in Russian)
- Bektimirov T.A. Progress in vaccine prevention of measles, rubella and mumps abroad. *Vaksinatziya*. 2006; (4): 4-5. (in Russian)
- BBC. «Rubella (German measles) eradicated from Americas». Available at: <http://www.bbc.com/news/world-us-canada-32523300>
- PAHO. «Americas region is declared the world's first to eliminate rubella». Available at: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=10798&Itemid=1926&lang=en](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10798&Itemid=1926&lang=en)
- Kretsinger K., Strebel P., Kezaala R., Goodson J.L. Transitioning Lessons Learned and Assets of the Global Polio Eradication Initiative to Global and Regional Measles and Rubella Elimination. *J. Infect. Dis.* 2017; 216(Suppl. 1): S308-15.
- Gayderova L.A., Yunasova T.N., Popov V.F., El'shina G.A., Gorbunov M.A., Khrzhanovskaya I.N. Post-registration evaluation of the Indian Combined Vaccine against measles, epidemical parotitis and rubella. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika*. 2005; (6): 22-4. (in Russian)
- Gayderova L.A., Yunasova T.N., Shitikova O.Yu., Popov V.F., Ignat'ev G.M., Gorbunov M.A. Post-approval evaluation of domestic and foreign vaccines for prophylaxis of measles, mumps and rubella. *Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie*. 2013; (1): 16-22. (in Russian)
- Popov V.F., Yunasova T.N., Gorbunov M.A., Shitikova O.Yu., Pavlova L.I., Gayderova L.A. Results of clinical trials evaluating the rubella vaccine of the Republic of Croatia when registered in the Russian Federation. In: *Materials of the All-Russian Scientific and Practical Conference «Vaccine Prophylaxis, Immunotherapy, Immunocorrection» [Materialy Vserossiyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii «Vaksino profilaktika, immunoterapiya, immunokorreksiya»]*. Moscow; 2004. (in Russian)
- Popov V.F., Yunasova T.N., Aksekov L.A., Averina O.A., Shitikova O.Yu., Ivanov A.A. Study and Evaluation of the Antigenic Activity and Reactogenicity of the Rubella Vaccine. In: *Proceedings of the Conference «Achievements of Domestic Epidemiology in the 20th Century. A Look into the Future» [Materialy konferentsii «Dostizheniya otechestvennoy epidemiologii v XX veke. Vzglyad v budushchee»]*. St. Petersburg; 2001, 250 (in Russian)
- Popov V.F., Yunasova T.N., Aksekov L.A., Averina O.A., Shitikova O.Yu., Frolova G.S., et al. Evaluating of the vaccine against measles, mumps and rubella production of the firm «Serum Institute of India Ltd». In: *Proceedings of the Conference «Achievements of Domestic Epidemiology in the 20th Century. A Look into the Future» [Materialy konferentsii «Dostizheniya otechestvennoy epidemiologii v XX veke. Vzglyad v budushchee»]*. St. Petersburg; 2001, 250 (in Russian)
- Ignat'ev G.M., Otrasheskaya E.V., Neverov A.A., Kulak M.V. Yunasova T.N. Sukhanova L.L., et al. Vaccine prophylaxis of measles, mumps and rubella. In: *Collection of scientific papers «Modern problems of human infectious pathology»*. Issue 5 [Sbornik nauchnykh trudov «Sovremennye problemy infektsionnoy patologii cheloveka»]. Выпуск 5]. Minsk; 2012; 330 (in Russian)
- Pharmacopoeial article of the enterprise LP-000463- 010311 Rubella Vaccine live cultural. (in Russian)
- WHO Expert Committee on Biological Standardization. 43rd report. WHO Technical Report Series No. 840. Geneva; 1994.
- Pharmacopoeial article of the enterprise 42-0504-7817-06 Rubella Vaccine live cultural attenuated. (in Russian)
- State Pharmacopoeia XIII FS 3.3.1.0024.15 Rubella Vaccine live cultural. (in Russian)
- Pharmacopoeial article of the enterprise LP- 00463-281216 Rubella Vaccine live cultural. (in Russian)
- Glantz S.A. *Primer of Biostatistics*. New-York: McGraw-Hill; 1994.
- Yunasova T.N., Fadeykina O.V., Sidorenko E.S., Sukhanova L.L., Shitikova O.Yu., Sarkisyan K.A., et al. Development and study of the industry standard pattern of rubella vaccine activity. *Biopreparaty. Profilaktika. Diagnostika. Lechenie*. 2015; (3): 49-53. (in Russian)

Поступила 08.12.17

Принята в печать 12.12.17