

**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

ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ

Тел. +7-495-150-07-47 доб. 101
E-mail: info@idm.msk.ru
www.medlit.ru

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

Вёрстка *Е.М. Архипова*

Сдано в набор 13.02.2019.
Подписано в печать 13.03.2019.
Формат 60 × 88%.
Печать офсетная.
Печ. л. 6,00.
Усл. печ. л. 5,88.
Уч.-изд. л. 6,36.

ISSN 0507-4088. Вopr. вирусологии. 2019.
Т. 64. № 1. 1-48.

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.

1

Том 64 · 2019

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.)

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)

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

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

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

Кузин А.А. (д.м.н.; Санкт-Петербург, 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)

Нетесов 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)

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

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

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

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

ИНОСТРАННЫЕ ЧЛЕНЫ РЕДАКЦИОННОГО СОВЕТА

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

Грибкова Н.В. (к.м.н.; Минск, Республика Беларусь)

Титов Л.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)

VOPROSY VIROSOLOGII

PROBLEMS OF VIROLOGY (Russian Journal)

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

Volume 64 • 1 • 2019

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.; **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)



СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРЫ

- Кузнецова Т.А., Персиянова Е.В., Запорожец Т.С., Беседнова Н.Н.** Адъюванты гриппозных вакцин: новые возможности применения сульфатированных полисахаридов из морских бурых водорослей 5
- Галегов Г.А., Андропова В.Л.** АнтиВИЧ/СПИД-препарат 6HP: антивирусная активность, доклиническое изучение. Эффективность у взрослых ВИЧ-инфицированных больных 12

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Хаметова К.М., Алексеев К.П., Южаков А.Г., Костина Л.В., Раев С.А., Мусиенко М.И., Мухин А.Н., Алипер Т.И., Воркунова Г.К., Гребенникова Т.В.** Молекулярно-биологические свойства клонированного штамма Wa ротавируса А человека 16
- Ракитянская И.А., Рябова Т.С., Калашникова А.А.** Влияние ингарона на динамику продукции интерферона- α и - γ и на проявление клинических симптомов у больных хронической вирусной Эпштейна-Барр инфекцией 23
- Ярославец Н.Г., Тихомиров Д.С., Николаева Л.И., Дедова А.В., Овчинникова Е.Н., Мисько О.Н., Романова Т.Ю., Махновский П.И., Гришечкин А.Е., Туполева Т.А.** Низкие концентрации РНК вируса гепатита С при серологически слабовыраженной инфекции 30
- Дзагурова Т.К., Бахтина В.А., Баловнева М.В., Морозов В.Г., Ишмухаметов А.А., Курашова С.С., Клеппа Б., Кругер Д., Ткаченко Е.А.** Анализ групповой вспышки геморрагической лихорадки с почечным синдромом, вызванной вирусом Сочи 36

ДИСКУССИЯ

- Метлин А.Е., Ботвинкин А.Д., Елаков А.Л., Груздев К.Н.** Случаи выздоровления людей от бешенства и прижизненная диагностика лиссавирусных энцефалитов 42

CONTENTS

REVIEWS

- Kuznetsova T.A., Persiyanova E.V., Zaporozhets T.S., Besednova N.N.** Adjuvants of influenza vaccines: new possibilities of using sulphated polysaccharides from marine brown algae 5
- Galegov G.A., Andronova V.L.** AntiHIV/AIDS drug 6HP: antiviral activity, pre-clinical study. Efficiency in adult HIV-infected patients 12

ORIGINAL RESEARCH

- Khametova K.M., Alekseev K.P., Yuzhakov A.G., Kostina L.V., Raev S.A., Musienko M.I., Mukhin A.N., Ali-per T.I., Vorkunova G.K., Grebennikova T.V.** Evaluation of the molecularbiological properties of human rotavirus A strain WA 16
- Rakityanskaya I.A., Ryabova T.S., Kalashnikova A.A.** Influence of ingaron on the dynamics of interferon- α and - γ production and on the manifestation of clinical symptoms in patients with chronic virus Epstein-Barr infection 23
- Yaroslavtseva N.G., Tikhomirov D.S., Nikolaeva L.I., Dedova A.V., Ovchinnikova E.N., Misko O.N., Romanova T. Yu., Makhnovskiy P.I., Grishechkin A.E., Tupoleva T.A.** Low concentrations of hepatitis C virus RNA in serologically mild infection 30
- Dzagurova T.K., Ishmukhametov A.A., Bakhtina V.A., Morozov V.G., Balovneva M.V., Kurashova S.S., Klempa B., Kruger D., Tkachenko E.A.** Hemorrhagic fever with renal syndrome group outbreak caused by Sochi virus 36

DISCUSSION

- Metlin A.E., Botvinkin A.D., Elakov A. L., Gruzdev K.N.** Cases of human convalescence from rabies and lifetime diagnostics of lyssavirus encephalitis 42

Журнал "Вопросы вирусологии" входит в Перечень ведущих научных журналов и изданий ВАК, в которых должны быть опубликованы основные результаты диссертаций на соискание учёной степени доктора и кандидата наук

ОБЗОРЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Кузнецова Т.А.¹, Персиянова Е.В.^{1,2}, Запорожец Т.С.¹, Беседнова Н.Н.¹

АДЬЮВАНТЫ ГРИППОЗНЫХ ВАКЦИН: НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ СУЛЬФАТИРОВАННЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ ИЗ МОРСКИХ БУРЫХ ВОДОРОСЛЕЙ

¹ФГБНУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова», 690087, г. Владивосток, Россия;²ФГБУЗ «Медицинское объединение» Дальневосточного отделения РАН, 690022, г. Владивосток, Россия

В обзоре дана характеристика представителей основных групп адьювантов (минеральные соли алюминия, синтетические адьюванты на основе сквалена – MF59 и AS03, CpG-олигодексинуклеотиды, виросомы, полиоксидоний, совидон), входящих в состав лицензированных гриппозных вакцин, рассмотрены основные механизмы адьювантного действия, отмечены их преимущества и недостатки. Описаны адьюванты вакцин, находящиеся на этапе экспериментальных исследований и клинических испытаний (ISCOMs, Advax™, хитозан). Особое внимание уделено сульфатированным полисахаридам (ПС) (фукоиданам) из морских бурых водорослей в качестве вакцинных адьювантов. Представлены многочисленные примеры их применения в составе экспериментальных вакцин. Оценена перспективность использования сульфатированных ПС при конструировании гриппозных вакцин, обусловленная высокой биосовместимостью, низкой токсичностью и хорошей переносимостью, а также механизмами адьювантной активности. Сульфатированные ПС являются агонистами толл-подобных рецепторов клеток врожденного иммунитета и мощными индукторами клеточного и гуморального иммунного ответа, что важно для разработки вакцин против гриппа. При подготовке обзора использована информация из библиографических и реферативных баз данных научных публикаций, поисковых систем, издательств: RSCI, Web of Science, Scopus, MEDLINE, Google Scholar, PubMed, Springer Nature, Elsevier и др.

Ключевые слова: обзор; адьюванты; вакцины; вирус гриппа; сульфатированные полисахариды; фукоиданы.

Для цитирования: Кузнецова Т.А., Персиянова Е.В., Запорожец Т.С., Беседнова Н.Н. Адьюванты гриппозных вакцин: новые возможности применения сульфатированных полисахаридов из морских бурых водорослей.

Вопросы вирусологии. 2019; 64(1): 5-11.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-1-5-11>Kuznetsova T.A.¹, Persiyanova E.V.^{1,2}, Zaporozhets T.S.¹, Besednova N.N.¹

ADJUVANTS OF INFLUENZA VACCINES: NEW POSSIBILITIES OF USING SULPHATED POLYSACCHARIDES FROM MARINE BROWN ALGAE

¹Research Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, 690087, Russian Federation;²Medical Association of Far East Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690022, Russian Federation

The review article presents the characteristics of the main adjuvant groups (mineral salts of aluminum, synthetic squalene-based adjuvants – MF59 and AS03, CpG-oligodeoxynucleotides, virosomes, polyoxidonium, sovidone) included in the licensed influenza vaccine. The main mechanisms of adjuvant action, advantages and disadvantages of these adjuvants are shown. The vaccines adjuvants in the phase of experimental studies and clinical trials (ISCOMs, Advax™, chitosan) are described too. Particular attention is paid to sulfated polysaccharides (fucoidans) from marine brown algae as vaccine adjuvants. Numerous results of their application in compositions of experimental vaccines are presented. The prospects of sulfated polysaccharides using in the design of influenza vaccines are estimated. These prospects are determined by high biocompatibility, low toxicity and good tolerance of the human body to fucoidans, as well as mechanisms of their adjuvant activity. Sulfated polysaccharides are agonists of toll-like receptors of innate immunity cells and powerful inducers of the cellular and humoral immune response, which is important for the development of influenza vaccines.

The review is based on the information presented in the bibliographic and abstract databases of scientific publications, search engines and publishers: RSCI, Web of Science, Scopus, MEDLINE, Google Scholar, PubMed, Springer Nature, Elsevier and others.

Keywords: review; adjuvants; vaccines; influenza virus; sulfated polysaccharides; fucoidans.

For citation: Kuznetsova T.A., Persiyanova E.V., Zaporozhets T.S., Besednova N.N. Adjuvants of influenza vaccines: new possibilities of using sulphated polysaccharides from marine brown algae. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2019; 64(1): 5-11. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-1-5-11>

For correspondence: Elena V. Persiyanova, Cand. Sci. Biol., senior researcher of the laboratory of Immunology « Research Somov Institute of Epidemiology and Microbiology», Vladivostok, 690087, Russian Federation.

E-mail: helen-pers@yandex.ru**Information about authors:**Kuznetsova T.A., <https://orcid.org/0000-0002-4315-6959>Zaporozhets T.S., <http://orcid.org/0000-0002-8879-8496>Persiyanova E.V., <https://orcid.org/0000-0002-5686-8672>Besednova N.N., <https://orcid.org/0000-0002-2760-9778>

Для корреспонденции: Персиянова Елена Викторовна, канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории иммунологии ФГБНУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова», 690087, г. Владивосток. E-mail: helen-pers@yandex.ru

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

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

Contributions: Kuznetsova T.A. collected information, analyzed the data and wrote the review; Persiyanova E.V. analyzed the data, made out the review; Zaporozhets T.S. analyzed data; Besednova N. N. analyzed data.

Received 16 May 2018

Accepted 31 October 2018

Во всем мире основной экономической ущерб от инфекционных заболеваний приходится на долю гриппа и острых респираторных инфекций. Вакцинация против гриппа является эффективным с эпидемиологической и клинической точки зрения мероприятием.

По мнению Ю.З. Гендона и Ю.М. Васильева, оптимальным методом профилактики гриппа у всего населения является массовая вакцинация детей (до 80%), при которой помимо формируемой защиты может снизиться на 80% заболеваемость гриппом в остальных возрастных группах невакцинированного населения [1]. Не менее важна вакцинация беременных, людей пожилого возраста и имеющих хронические заболевания. В последнем случае особое подхода требует разработка новых противогриппозных вакцин с адьювантами [1, 2]. В работе Ю.М. Васильева [3] отмечена недостаточная иммуногенность инактивированных сезонных вакцин, целесообразность однократной схемы иммунизации, а также возможность использования пониженной дозы антигена. Решение этих задач осуществимо при использовании адьювантов.

Разработка вакцин нового поколения против гриппа требует всестороннего подхода. В первую очередь это касается антигенной основы и определяется антигенными вариантами вируса гриппа, а также вида вакцины. В настоящее время в России и других странах выпускаются следующие виды вакцинных препаратов: живая гриппозная, цельновирионная инактивированная, сплит- и субъединичная вакцины. Главное направление совершенствования противогриппозных вакцин – повышение их безопасности. Именно поэтому от цельновирионных вакцин был совершен переход к сплит-вакцинам, а от сплит-вакцин – к субъединичным. При высокой очистке антигенов возникла проблема снижения иммуногенности [4]. Решение задачи получения высокопротективных вакцин невозможно без выбора соответствующих технологий и функциональных адьювантов [5, 6].

Адьюванты в составе вакцин применяются на протяжении столетия, их основной целью является усиление эффективности и уменьшение рекомендуемой дозы вакцины, а также кратности вакцинации. Настоящий обзор посвящен анализу эффективности адьювантов вакцин против гриппа.

Адьюванты на основе соединений алюминия

В качестве одного из первых адьювантов вакцин, в том числе противогриппозных, был использован гидроксид или фосфат алюминия, относящийся к группе минеральных адьювантов.

Наиболее ранним предложенным механизмом адьювантного эффекта соединений алюминия является ионное взаимодействие с антигеном и создание депо [7]. В последнее время ряд авторов подвергают это положение сомнению, полагая, что депонирование антигена не обеспечивает существенного усиления иммунного ответа. Современные сведения о механизмах действия адьювантов на основе соединений алюминия представлены

в обзоре T.R. Ghimire [8]. Такие адьюванты индуцируют относительно кратковременное образование антител, что требует повторной вакцинации, а также слабо индуцируют клеточный иммунный ответ.

Помимо несовершенства механизмов адьювантной активности, соединения алюминия способны провоцировать ряд побочных эффектов, включая местные и системные реакции. Вследствие токсичности соединения алюминия в составе вакцин способны провоцировать хроническую нейротоксичность и развитие нейродегенеративных заболеваний, в том числе болезни Альцгеймера [9], аутизма [10], рассеянного склероза [11], деменции [12], а также развитие аутоиммунного/воспалительного синдрома [13].

Кроме соединений алюминия, в составе инактивированных гриппозных вакцин используются синтетические адьюванты на основе сквалена (MF59, AS03), CpG-ODN (бактериальная ДНК с высоким содержанием CpG мотивов), виросомы (вирусоподобные частицы), полиоксидоний (N-оксидированное производное полиэтилен пиперозина), совидон (сополимер N-винилпирролидона и 2-метил-5-винилпиридина).

Адьюванты на основе сквалена (MF59, AS03)

Эти адьюванты, представляющие собой микроэмульсии «масло в воде», входят в состав вакцин против гриппа H1N1, H5N1 – «Fluad™», «Grifor®». Водно-масляные эмульсии также создают «депо» антигенов, обеспечивая их более медленное высвобождение. Такие адьюванты способны активировать макрофаги и усиливать их антигенпрезентирующие свойства. Например, MF59 индуцирует развитие воспалительной реакции, активирует макрофаги в месте инъекции, усиливая поглощение антигена дендритными клетками (ДК) и его миграцию в лимфатические узлы. Данный адьювант активирует CD4 Т-клетки и вызывает более сильный иммунный ответ, стимулируя не только гуморальный, но и Т-клеточный иммунитет [14, 15], что имеет принципиальное значение для его включения в состав противовирусных вакцин. Вакцины с MF59 были более эффективными по сравнению с вакцинами, содержащими гидроксид алюминия, фосфат кальция, MF59, полилактид-когликолид PLG, олигонуклеотид CpG при иммунизации мышей инактивированной сезонной гриппозной вакциной [16] и при иммунизации 17 тыс. добровольцев вакциной против вируса свиного гриппа H1N1 (данные метаанализа) [17].

Однако с использованием в качестве адьюванта сквалена и минерального масла связывают развитие аутоиммунного и/или воспалительного синдрома [13], атопического дерматита [18] и других местных и системных реакций [15].

Кроме того, в клиническом исследовании, охватывающем более 9 тыс. добровольцев, при сравнении расщепленных, субъединичных и виросомальных сезонных гриппозных вакцин, а также вакцин с адьювантом MF59 показаны сравнимая иммуногенность и реактогенность вакцин без адьювантов [19].

СрG ODNs

СрG ODNs – короткие одноцепочечные синтетические молекулы, содержащие неметилированные цитозин-фосфат-гуанин олигодеоксинуклеотидные мотивы. Среди многообразия синтетических СрG ODNs отдельные представители, в частности СрG-7909 и СрG-1018, входят в состав допущенных для клинических испытаний экспериментальных вакцин против бактериальных и вирусных инфекций. Например, СРG 7909 (другое название – VaxImmune™) входит в качестве адъюванта в состав вакцины против гриппа «Fluarix™» [20].

Важными преимуществами СрG ODNs как адъювантов являются хорошая переносимость макроорганизмом и отсутствие выраженной токсичности [21, 22].

Неметилированные СрG ODNs являются агонистами толл-подобного рецептора 9 (TLR9), активируют гуморальный и клеточный иммунитет, способствуя индукции врожденных и адаптивных иммунных реакций [22–24]. СрG ODNs являются мощным активирующим сигналом для ДК животных и человека и вызывают высокий уровень продукции цитокинов, ассоциированных с субпопуляцией Т-хелперов 1 типа (IL-12, IL-18). Кроме того, СрG ODNs ускоряют созревание ДК, что способствует активации Т-лимфоцитов [25].

Экспериментальные испытания на цыплятах показали, что при интраназальной иммунизации инактивированным вирусом птичьего гриппа H5N1 с СрG ODN уже на ранних сроках наблюдается значимое увеличение экспрессии мРНК IL-6, IL-12, IFN- γ и TLR21 в тканях респираторного тракта птиц, а также повышение уровня вирусоспецифических секреторных IgA антител в лаважной жидкости респираторного тракта [26].

В рандомизированном двойном слепом исследовании на добровольцах проведены испытания коммерческой инактивированной трехвалентной вакцины против гриппа «Fluarix®» при совместном введении с СрG-7909. Испытуемые 1-й группы получали 1/10 дозы «Fluarix®» и адъювант, 2-й – полную дозу вакцины. Добавление адъюванта повышало иммуногенность вакцины. Кроме того, специфические антитела появлялись значительно раньше у испытуемых 1-й группы. У последних отмечена значительно более высокая продукция IFN- γ , что позволило авторам рекомендовать введение СрG-7909 с вакциной для снижения вакцинирующей дозы [20].

Однако в работе N. Hanagata [27] приведены свидетельства того, что при доклинических и клинических испытаниях СрG-7909, содержащих фосфоротиоат, который обеспечивает устойчивость к деградации ДНКазой, отмечали различные неблагоприятные побочные реакции. В связи с этим продолжают исследования по разработке перспективных адъювантов на основе СрG ODNs.

Виросомы

Виросомы (вирусоподобные частицы) – комплексы, состоящие из липидов и как минимум одного белка вирусной оболочки. По существу, виросомы представляют собой восстановленные вирусные оболочки (пузырьки) без нуклеокапсида, содержащего генетический материал вируса. По механизму действия виросомы относят к эффективным средствам доставки вакцинного антигена к антигенпрезентирующим клеткам (АПК). При этом виросомы оказывают иммуностимулирующее (адью-

вантное) действие, индуцируя не только гуморальный, но и Т-клеточный иммунный ответ [28, 29].

Специфической разновидностью адьювантных гриппозных вакцин являются виросомальные вакцины, основу которых составляют виросомы. Виросомальные вакцины являются вакцинами нового поколения, поскольку имеют ряд преимуществ по сравнению с цельновирионными, субъединичными и сплит-вакцинами.

К таким вакцинам относится «Inflexal® V», инактивированная трехвалентная гриппозная вакцина, представляющая собой систему, содержащую виросомы высокоочищенных поверхностных антигенов вирусов гриппа типа А и В [30, 31].

В 2008 г. в России зарегистрирована виросомальная вакцина «Ультрикс®» – смесь высокоочищенных протективных поверхностных и внутренних антигенов вирусов гриппа типа А (H1N1 и H3N2) и В. Эта вакцина прошла ряд успешных клинических испытаний, которые показали безопасность, хорошую переносимость, низкую реактогенность и высокую иммуногенность при иммунизации населения [32].

Однако в инструкции по применению вакцины «Inflexal® V» в числе побочных эффектов отмечается возможность появления таких общих реакций, как лихорадка, недомогание, озноб, головная боль, повышенная потливость, артралгия и миалгия, а также местных реакций, включая боль, отек, покраснение, появление кровоподтеков и уплотнение кожи в месте инъекции. Также указывается на возможность очень редкого возникновения неврагрии, парестезии, судорог и преходящей тромбоцитопении. Введение вакцины «Ультрикс®» также может сопровождаться местными и общими реакциями.

Полиоксидоний

В Российской Федерации широкое применение получили вакцина «Гриппол» и ее усовершенствованный аналог «Гриппол® плюс», содержащие в качестве адъюванта Полиоксидоний® (производное полиэтиленпиперазин-N-оксида). В основе механизма действия полиоксидония лежит активация фагоцитирующих клеток и естественных киллеров, а также стимуляция антителообразования [33].

Результаты клинического исследования показали высокий профиль безопасности, ареактогенности, иммунологической и клинико-эпидемиологической эффективности вакцины «Гриппол® плюс» при иммунизации населения старше 60 лет. Иммуногенность вакцины соответствовала международным критериям СРМР (Committee for Proprietary Medicinal Products, протокол СРМР/BWP/214/96), предъявляемым к гриппозным вакцинным препаратам для возрастной группы 60 лет и старше. Через 6 мес после вакцинации «Гриппол® плюс» у привитых в норме оставались 3 показателя иммуногенности (сероконверсия, серопротекция и кратность нарастания титра антител) к штамму A/California/7/2009(H1N1), что соответствовало международным стандартам [34].

Однако, как отмечают О.И. Киселев и М.И. Дюков [35], полиоксидоний является слабым иммуноадьювантом.

В эпидемический сезон 2017/18 гг. при иммунизации против гриппа использовали новую субъединичную вакцину «Совигрипп®» с адьювантом Совидон™. Совидон™ оказывает иммуномодулирующее, детоксицирующее, антиоксидантное и мембранопротекторное действия, обусловленные его полимерной природой. Исследования

показали, что у препарата практически отсутствует токсичность и пирогенность. Вакцина «Совигрипп®» демонстрирует высокую иммуногенность и соответствует российским и европейским требованиям, предъявляемым к инактивированным гриппозным сезонным вакцинам, не уступая уже существующей на рынке вакцине того же типа «Гриппол®». Низкая частота местных и общих реакций свидетельствует о хорошей переносимости и слабой реактогенности вакцины. Анализ динамики уровня IgE показал отсутствие аллергизирующего действия вакцин с адьювантом Совидон™ [36].

В составе противогриппозных вакцин, находящихся на этапе клинических испытаний, входят такие адьюванты, как ISCOMATRIX® и Advax™.

ISCOMs

ISCOMs – иммуностимулирующие комплексы, представляющие собой сферические структуры около 40 нм в диаметре, которые самопроизвольно образуются при смешивании в определенном соотношении холестерина, фосфолипидов и сапонинов. Их относят к корпускулярным адьювантам. Поскольку ISCOMs являются наночастицами, они легко поглощаются АПК (макрофагами и ДК). Адьювант ISCOMATRIX® объединил функцию систем доставки, характерную для наночастиц, и иммуностимулирующие свойства сапонинов. Этот адьювант индуцирует не только высокий уровень гуморального иммунного ответа, но и сбалансированный Th1/Th2-ответ [37], что важно для нейтрализации внутриклеточных патогенов. Кроме того, иммуностимулирующие комплексы обеспечивают долговременность протективного иммунитета против разных патогенов [38].

В экспериментах на модели лабораторных мышей изучали иммуногенность и протективную активность образцов инактивированных гриппозных вакцин, содержащих корпускулярные адьюванты, в том числе ISCOMs. Показано, что вакцины с корпускулярными адьювантами вызывают более высокий синтез специфических антител при иммунизации мышей и способствуют их выживанию при заражении адаптированным к мышам вирусом гриппа [39].

В клинических испытаниях I фазы с участием 60 взрослых оценивали переносимость и иммуногенность вирусосамальной вакцины H5N1, содержащей Matrix M™ и не содержащей этого адьюванта. Вакцина с адьювантом индуцировала продукцию H5N1-специфических антител при значительно более низкой дозе антигена. Однако отмечено, что болезненность в области инъекции чаще наблюдалась при вакцинации с адьювантом [40].

Адьюванты на основе соединений полисахаридной природы

На различных стадиях испытаний находится ряд современных адьювантов, способных не только усиливать поглощение антигена АПК или доставлять его в зоны локализации иммунокомпетентных клеток, но и выступать в качестве непосредственных иммуностимуляторов. При выборе адьюванта особое внимание уделяется эффективности формирования иммунологической памяти, способности к комплексной стимуляции Th1- и Th2-иммунного ответа, обеспечению выраженного иммунного ответа при снижении дозы вакцины и кратности вакцинации, отсутствию токсичности для организма [41].

В этом аспекте активно исследуются в качестве адьювантов соединения полисахаридной природы, такие

как хитозаны, α-глюканы (декстраны), β-глюканы (зимозан, лентинан), фруктаны, маннаны, углеводы микобактерий (липоарабиноаманнан, мурамилдипептид, D-мурапалмитин, 6,6-димиколат трегалозы), липополисахариды [42]. В литературе представлены многочисленные экспериментальные данные, подтверждающие адьювантные свойства соединений ПС-природы, однако практического применения эти соединения пока не нашли, за исключением природной ПС-композиции, производного инулина-δ (полимера D-фруктозы) – Advax™.

Адьюванты на основе инулина (Advax™, алгаммулин)

Advax™ – природная ПС-композиция, производное инулина-δ, полимер D-фруктозы; алгаммулин – комбинация инулина-γ с гидроксидом алюминия.

Механизм действия Advax™ заключается в стимуляции гуморальных и Т-клеточных реакций (с увеличением Th1- и Th2-иммунного ответа) без повышения уровня IgE в отличие от соединений алюминия. Действие Advax™ не зависит от связывания антигена и обусловлено праймированием АПК и увеличением их способности презентировать антиген Т- и В-клеткам путем повышения уровня экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости МНС I и 2 класса и/или костимулирующих молекул CD11c, CD40, CD80, CD86 [43, 44]. Advax™ низкоректогенен и не оказывает побочных эффектов в виде значительных местных и системных реакций. Этот адьювант успешно испытан в составе ряда вакцин (против вирусов папилломы человека, герпеса, гемофильной палочки, ВИЧ). Advax™ включен в состав вакцин против гриппа, разрабатываемых в Австралии и Новой Зеландии [45].

Хитозан

Хитозан – деацетилированное производное хитина. Испытание хитозана проводили в ряде доклинических исследований в составе вакцин против различных штаммов вируса гриппа [46, 47].

Так, хитозан, испытанный в экспериментальных условиях в качестве адьюванта к субъединичной пандемической вакцине свиного гриппа, содержащей штамм вируса A/California/7/09 (H1N1), обеспечивал увеличение иммуногенности в 8–16 раз и значительное усиление протективной активности [48]. В работе Н. Chang и соавт. [49] также показано, что адьювированная хитозаном вакцина против вируса гриппа H5N1 индуцировала усиление гуморального иммунного ответа и защищала мышей от летальной инфекции, при этом адьювантный эффект хитозана был сопоставим с таковым у алюминия.

Сульфатированные ПС (фукоиданы)

Фукоиданы представляют собой семейство фукозосодержащих гомо- и гетерополисахаридов (от ПС с высоким содержанием урановых кислот и низкой концентрацией фукозы и сульфатов до практически чистых α-L-фуканов), где основным компонентом молекул ПС является фукоза. Кроме фукозы, эти ПС могут содержать небольшие количества других моносахаридов (галактоза, манноза, ксилоза, глюкоза), а также сульфаты, урановые кислоты, ацетильные группы, белок.

При анализе адьювантных технологий в создании современных вакцин на сегодняшний день предпочтение отдается модификаторам функций рецепторов врожденного иммунитета и их сигнальных путей [41]. Такими свойствами, наряду с высокой биосовместимостью, низ-

кой токсичностью, безопасностью и хорошей переносимостью макроорганизмом, наделены сульфатированные ПС бурых водорослей, что определяет их большие адьювантные потенции [42]. Важно отметить, что сульфатированные ПС обладают широким спектром биологической и фармакологической активности (антивирусной/антибактериальной, иммуномодулирующей, противопухолевой, антиоксидантной, антикоагулянтной и др.), привлекая огромный научный и практический интерес исследователей.

В механизмах действия сульфатированных ПС, важных для оказания адьювантного эффекта, следует выделить способность проявлять свойства агонистов TLRs клеток врожденного иммунитета, предназначенных для распознавания микробных патоген-ассоциированных молекул. TLRs являются одними из основных мишеней для разработки новых адьювантов, и агонисты TLRs наиболее предпочтительны в качестве адьювантов вакцин. При исследовании специфического взаимодействия сульфатированных ПС с TLRs человека установлено, что фукоиданы из водорослей *Saccharina japonica*, *Saccharina cichorioides* и *Fucus evanescens* специфически связываются с TLR-2 и TLR-4, вызывая активацию ядерного фактора NF-κB. Последующие транскрипция и индукция генов провоспалительных цитокинов и интерферон-индуцибельных генов, способствуют активации иммунокомпетентных клеток, развитию адаптивного иммунного ответа на неродственные антигены по Th1-типу [50].

Важнейшим качеством «идеального адьюванта» является способность оказывать стимулирующее влияние на АПК, к которым в первую очередь относятся ДК и макрофаги [51, 52]. Для оптимизации процессов презентации антигенов и индукции полноценного иммунного ответа необходимы зрелые ДК. В работах ряда авторов [53–55] представлены иммунофенотипические, морфологические и функциональные характеристики ДК, свидетельствующие о том, что фукоиданы являются активными индукторами их созревания.

Многочисленные экспериментальные данные демонстрируют адьювантные свойства сульфатированных ПС в отношении различных антигенов и вакцинных штаммов возбудителей инфекционных заболеваний, в том числе вируса гриппа [53–58].

В одной из последних работ [58] показано, что сульфатированные ПС из разных видов бурых водорослей *Grateloupia filicina*, *Ulva pertusa* и *Sargassum qingdaoense*, отличающиеся по ряду структурных характеристик, не только повышали уровень иммунитета к инактивированному штамму вируса птичьего гриппа (AIV) *in vivo*, но значительно ингибировали активность AIV (подтип H9N2) *in vitro*.

Результаты проведенных нами экспериментальных исследований также свидетельствуют об адьювантной активности фукоидана из бурой водоросли *F. evanescens*, проявляющейся в повышении иммуногенности инактивированного вируса гриппа A/California/7/09 H1N1pdm09. При этом эффект фукоидана был выражен в большей степени по сравнению с традиционным лицензированным адьювантом гидроксидом алюминия. Кроме того, при повторной иммунизации животных фукоидан обеспечивал снижение антигенной нагрузки. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования фукоидана в качестве адьюванта в составе противогриппозных вакцин [59].

В последние годы появился ряд работ, посвященных способности фукоиданов функционировать в качестве адьювантов противогриппозных вакцин при пероральном применении. Показано, что фукоидан, выделенный из *Undaria pinnatifida*, при пероральном введении оказывал значительный защитный эффект на мышах, зараженных вирусом гриппа А (H5N3 и H7N2 подтипов), что выражалось в угнетении репликации вируса, повышении сывороточного уровня вируснейтрализующих антител и продукции IgA в слизистой оболочке дыхательных путей [56, 57].

Значительный интерес представляют результаты рандомизированного двойного слепого плацебо-контролируемого исследования с добровольцами пожилого возраста, акцентирующие внимание на способности фукоидана оказывать адьювантный эффект при пероральном способе применения. Испытуемые в течение 4 нед принимали *per os* фукоидан из *U. pinnatifida* в дозе 300 мг/сут. Последующая иммунизация трехвалентной вакциной против гриппа приводила к выявлению более высоких титров антител против всех штаммов вируса, содержащихся в вакцине, по сравнению с титрами антител у лиц, получавших плацебо. В группе добровольцев, принимавших фукоидан, через 9 нед отмечены четкая тенденция к повышению активности натуральных киллеров, отсутствие аллергических и других нежелательных иммунных реакций [60].

Несмотря на положительные результаты тестирования сульфатированных ПС в качестве адьювантов, следует принимать во внимание, что использование фукоиданов в качестве лекарственных препаратов и адьювантов на сегодняшний день ограничено. Это связано с трудностями получения структурно охарактеризованных и однородных образцов или олигомерных фракций фукоиданов. В связи с этим ведется активная работа по получению низкомолекулярных сульфатированных ПС или фукоолигосахаридов (гомо- или гетероолигосахаридов, содержащих от 2 до 10 моносахаридных остатков), родственных природным фукоиданам. Ряд работ свидетельствует о высокой иммуномодулирующей активности низкомолекулярных, структурно охарактеризованных фракций фукоидана или его олигосахаридов, однако исследования их адьювантных свойств единичны [61, 62]. Так, показана адьювантная активность низкомолекулярного сульфатированного ПС, полученного из бурой водоросли *F. evanescens* с применением ферментов фукоиданаз и имеющего стабильную воспроизводимую структуру, в связи с чем авторы считают перспективным его использование в качестве фармацевтической субстанции или адьюванта в составе вакцинных препаратов [62].

Полианионная природа сульфатированных ПС позволяет конструировать на их основе наночастицы – сферические частицы диаметром от 10 до 1000 нм и микрочастицы размером от 1 до 1000 мкм. Такие наночастицы способны стимулировать как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ, что обусловлено особенностями механизма их действия (способность к захвату клеток и последующей доставке антигена в лимфоидные органы). Захваченные АПК наночастицы могут выходить из эндосом в цитоплазму и стимулировать CD8⁺ Т-клеточный ответ, а также способны исполнять роль депо антигена [63]. С учетом этих данных открывается возможность использования наночастиц фукоидана в качестве адьювантов.

Таким образом, представленные в настоящем обзоре данные свидетельствуют о том, что сульфатированные ПС из морских бурых водорослей могут найти применение в качестве безопасных и эффективных адъювантов в составе противогриппозных вакцин нового поколения. Несмотря на трудности, обусловленные сложной структурой и получением стандартных однородных фракций, фукоиданы представляют собой молекулярную основу для создания иммунных адъювантов благодаря высокой биосовместимости, низкой токсичности и хорошей переносимости организмом человека. Перспектива использования сульфатированных ПС в качестве адъювантов в составе широкого спектра профилактических и терапевтических вакцин определяется также механизмами их действия: фукоиданы являются агонистами рецепторов врожденного иммунитета и в силу этого мощными индукторами клеточного и гуморального иммунного ответа.

Финансирование. Исследование финансировалось Дальневосточным отделением Российской академии наук в рамках комплексной программы фундаментальных исследований ДВО РАН «Дальний Восток» № 18-5-084.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов: Кузнецова Т.А. собирала информацию, анализировала данные, писала обзор; Персиянова Е. В. анализировала данные, оформляла обзор; Запорожец Т. С. анализировала данные; Беседнова Н. Н. анализировала данные.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 6-31, 37, 38, 40, 42-47, 49, 51-58, 60, 61, 63 см. REFERENCES)

- Гендон Ю.З., Васильев Ю.М. Проблемы профилактики гриппа с помощью вакцин. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2011; (4): 116-24.
- Гендон Ю.З. Проблемы профилактики гриппа у беременных женщин и новорожденных детей. *Вопросы вирусологии*. 2009; 54(4): 4-10.
- Васильев Ю.М. Направления совершенствования вакцин против гриппа. *Врач*. 2014; (8): 12-4.
- Цыбалова Л.М., Киселев О.И. Универсальные вакцины против гриппа. Разработки, перспективы использования. *Вопросы вирусологии*. 2012; 57(1): 9-14.
- Киселев О.И. Прогресс в создании пандемических противогриппозных вакцин и технология их производства. *Биотехнология*. 2010; (2): 8-24.
- Селькова Е.П., Гренкова Т.А., Алешкин В.А., Гудова Н.В., Лыткина И.Н., Михайлова Е.В. и др. Изучение иммуногенности, эффективности и переносимости отечественной вакцины «Ультрикс®» среди лиц повышенного риска инфицирования и заболеваемости гриппом и острыми респираторными вирусными инфекциями. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2016; (1): 59-66.
- Петров Р.В., Хаитов Р.М. *Иммуногены и вакцины нового поколения*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2011.
- Романенко В.В., Осипова И.В., Ллюзнов Д.А., Марцевич С.Ю., Анкудинова А.В., Чебыкина Т.В. Результаты клинического исследования по оценке безопасности и эффективности полимер-субъединичной адъювантной гриппозной вакцины при сочетании применения иммуномодулятора у лиц 60 лет и старше. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2016; 15(5): 63-71.
- Киселев О.И., Дюков М.И. *Иммунологический адъювант на основе наночастиц для вакцин против высокопатогенных штаммов вируса гриппа*. Патент РФ № 2529959; 2014.
- Никифорова А.Н., Исакова-Сивак И.Н., Ерофеева М.К., Фельдблюм И.В., Руденко Л.Г. Результаты изучения безопасности и иммуногенности отечественной субъединичной адъювантной вакцины Совигрипп у добровольцев 18-60 лет. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2014; (2): 72-8.
- Красильников И.В., Ленева И.А., Михайлова Н.А., Доронин А.Н., Бражкин А.С. Иммунологические свойства экспериментальных инактивированных гриппозных вакцин, содержащих корпускулярные адъюванты. *Медицинский алфавит*. 2016; 2(16): 30-5.
- Семакова А.П., Микшиш Н.И. Адъювантные технологии в создании современных вакцин. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016; (2): 28-35. doi: 10.21055/0370-1069-2016-2-28-35
- Гендон Ю.З., Маркушин С.Г., Васильев Ю.М., Аकोпова И.И., Кривцов Г.Г. Повышение иммуногенности инактивированной вакцины из штамма вируса гриппа А/Калифорния/7/09 (H1N1) при использова-

нии в качестве адъюванта хитозана и анализ антигенной специфичности этого штамма вируса гриппа. *Вопросы вирусологии*. 2012; 57(1): 28-33.

- Макаренкова И.Д., Логунов Д.Ю., Тухватулин А.И., Семенова И.Б., Звягинцева Т.Н., Горбач В.И. и др. Сульфатированные полисахариды бурых водорослей – лиганды толл-подобных рецепторов. *Биомедицинская химия*. 2012; 58(3): 318-25. doi: 10.18097/pbmc20125803318
- Кузнецова Т.А., Степанова Л.А., Ермакова С.П. Повышение иммуногенности инактивированного вируса гриппа А/калифорния/7/09 (H1N1) при использовании в качестве адъюванта фукоидана из бурой водоросли *Fucus evanescens*. *Здоровье. Медицинская экология. Наука*. 2017; (3): 57-9.
- Кузнецова Т.А., Иванушко Л.А., Персиянова Е.В., Шутикова А.Л., Ермакова С.П., Хотимченко М.Ю. и др. Оценка адъювантных эффектов фукоидана из бурой водоросли *Fucus evanescens* и его структурных аналогов для усиления эффективности вакцин. *Биомедицинская химия*. 2017; 63(6): 553-8. doi: 10.18097/PBMC20176306553

REFERENCES

- Gendon Yu.Z., Vasil'ev Yu.M. Problem of influenza prophylaxis by vaccines. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2011; (4): 116-24. (in Russian)
- Gendon Yu.Z. Problems in the prevention of influenza in pregnant women and neonatal infants. *Voprosy virusologii*. 2009; 54(4): 4-10. (in Russian)
- Vasil'ev Yu.M. Trends of influenza vaccine development Directions for improving vaccines against influenza. *Vrach*. 2014; (8): 12-4. (in Russian)
- Tsybalova L.M., Kiselev O.I. Universal influenza vaccines: Developments, prospects for use. *Voprosy virusologii*. 2012; 57(1): 9-14. (in Russian)
- Kiselev O.I. Progress in pandemic anti-influenza vaccine development and manufacturing. *Biotechnologiya*. 2010; (2): 8-24. (in Russian)
- Atmar R.L., Keitel W.A. Adjuvants for pandemic influenza vaccines. *Curr. Top. Microbiol. Immunol*. 2009; 333: 323-44. doi: 10.1007/978-3-540-92165-3_16
- Glenny A.T., Buttle G.A.H., Stevens M.F. Rate of disappearance of diphtheria toxoid injected into rabbits and guinea pigs: toxoid precipitated with Alum. *J. Pathol. Bacteriol*. 1931; 34(2): 267-75. doi: 10.1002/path.1700340214
- Ghimire T.R. The mechanisms of action of vaccines containing aluminum adjuvants: an *in vitro* vs *in vivo* paradigm. *SpringerPlus*. 2015; 4: 181. doi: 10.1186/s40064-015-0972-0
- Lukiw W.J., Bazan N.G. Neuroinflammatory signaling upregulation in Alzheimer's disease. *Neurochem. Res*. 2000; 25(9-10): 1173-84.
- Chohly H.H., Panja A. Immunological findings in autism. *Int. Rev. Neurobiol*. 2005; 71: 317-41.
- Exley C., Mamutse G., Korchazhkina O., Pye E., Strekopytov S., Polwart A., et al. Elevated urinary excretion of aluminum and iron in multiple sclerosis. *Mult. Scler*. 2006; 12(5): 533-40. doi: 10.1177/1352458506071323
- Vargas D.L., Nascimbene C., Krishnan C., Zimmerman A.W., Pardo C.A. Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Ann. Neurol*. 2005; 57(1): 67-81. doi: 10.1002/ana.20315
- Vera-Lastra O., Medina G., del Cruz-Dominguez M.P., Jara L.J., Shoenfeld Y. Autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants (Shoenfeld's syndrome): clinical and immunological spectrum. *Expert Rev. Clin. Immunol*. 2013; 9(4): 361-73. doi: 10.1586/eci.13.2
- O'Hagan D.T., Ott G.S., De Gregorio E., Seubert A. The mechanism of action of MF59 – an innately attractive adjuvant formulation. *Vaccine*. 2012; 30(29): 4341-8. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.09.061
- Roman F., Vaman T., Kafeja F., Hanon E., Van Damme P. AS03(A) – adjuvanted influenza A (H1N1) 2009 vaccine for adults up to 85 years of age. *Clin. Infect. Dis*. 2010; 51(6): 668-77. doi: 10.1086/655830
- Wack A., Baudner B., Hilbert A., Manini I., Nuti S., Tavarini S., et al. Combination adjuvants for the induction of potent, long-lasting antibody and T-cell responses to influenza vaccine in mice. *Vaccine*. 2008; 26(4): 552-61. doi: 10.1016/j.vaccine.2007.11.054
- Yin J., Khandaker G., Rashid H., Heron L., Ridha I., Booy R. Immunogenicity and safety of pandemic influenza A(H1N1) 2009 vaccine: systematic review and meta-analysis. *Influenza Other Respir. Viruses*. 2011; 5(5): 299-305. doi: 10.1111/j.1750-2659.2011.00229.x
- Hwang S.M., Kim H.L., Min K.W., Kim M., Lim J.S., Choi J.M., et al. Comparison of the adverse events associated with MF59-adjuvanted and non-adjuvanted H1N1 vaccines in healthy young male Korean soldiers. *Jpn. J. Infect. Dis*. 2012; 65(3): 193-7.
- Beyer W., Nauta J., Palache A., Giezeman K., Osterhaus A. Immunogenicity and safety of inactivated influenza vaccines in primed populations: a systematic literature review and metaanalysis. *Vaccine*. 2011; 29(34): 5785-92. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.05.040
- Cooper C.L., Davis H.L., Morris M.L., Effer S.M., Krieg A.M., Li Y., et al. Safety and immunogenicity of CPG 7909 injection as an adjuvant to Fluarix influenza vaccine. *Vaccine*. 2004; 22(23-24): 3136-43. doi: 10.1016/j.vaccine.2004.01.058

21. Iho S., Maeyama J., Suzuki F. CpG oligodeoxynucleotides as mucosal adjuvants. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2015; 11(3): 755-60. doi: 10.1080/21645515.2014.1004033
22. Gursel M., Gursel I. Development of CpG ODN based vaccine adjuvant formulations. *Methods Mol. Biol.* 2016; 1404: 289-98. doi: 10.1007/978-1-4939-3389-1_20
23. Kawai T., Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on toll-like receptors. *Nat. Immunol.* 2010; 11(5): 373-84. doi:10.1038/ni.1863
24. Tanegashima K., Takahashi R., Nuriya H., Iwase R., Naruse N., Tsuji K., et al. CXCL14 acts as a specific carrier of CpG DNA into dendritic cells and activates Toll-like receptor 9-mediated adaptive immunity. *EBio-Medicine.* 2017; 24: 247-56. doi: 10.1016/j.ebiom.2017.09.012
25. Bauer M., Redecke V., Ellwart J.W., Scherer B., Kremer J.P., Wagner H., et al. Bacterial CpG DNA triggers activation and maturation of human CD11c(-), CD123(+) dendritic cells. *J. Immunol.* 2001; 166(8): 5000-7. doi: 10.4049/jimmunol.166.8.5000
26. Fu J., Liang J., Kang H., Lin J., Yu Q., Yang Q. Effects of different CpG oligodeoxynucleotides with inactivated avian H5N1 influenza virus on mucosal immunity of chickens. *Poult. Sci.* 2013; 92(11): 2866-75. doi:10.3382/ps.2013-03205
27. Hanagata N. CpG oligodeoxynucleotide nanomedicines for the prophylaxis or treatment of cancers, infectious diseases, and allergies. *Int. J. Nanomedicine.* 2017; 12: 515-31. doi: 10.2147/IJN.S114477
28. Schwendener R.A. Liposomes as vaccine delivery systems: a review of the recent advances. *Ther. Adv. Vaccines.* 2014; 2(6): 159-82. doi: 10.1177/2051013614541444
29. Moser C., Muller M., Kaeser M.D., Weydemann U., Amacker M. Influenza virosomes as vaccine adjuvant and carrier system. *Expert Rev. Vaccines.* 2013; 12(7): 779-91. doi: 10.1586/14760584.2013.811195
30. Gasparini R., Amicizia D., Lai P.L., Rossi S., Panatto D. Effectiveness of adjuvanted seasonal influenza vaccines (Inflexal® V and Fludac®) in preventing hospitalization for influenza and pneumonia in the elderly: a matched case-control study. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2013; 9(1): 144-52. doi: 10.4161/hv.22231
31. Herzog C., Hartmann K., Künzi V., Kürsteiner O., Mischler R., Lazar H., et al. Eleven years of Inflexal® V – a virosomal adjuvanted influenza vaccine. *Vaccine.* 2009; 27(33): 4381-7. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.05.029
32. Sel'kova E.P., Grenkova T.A., Aleshkin V.A., Gudova N.V., Lytkina I.N., Mikhaylova E.V., et al. Investigation of the immunogenicity, efficacy and tolerability of the Russian vaccine Ultrix® among people at high risk for the infection and morbidity of influenza and acute respiratory viral infections. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni. Aktual'nye voprosy.* 2016; (1): 59-66. (in Russian)
33. Petrov R.V., Khaitov R.M. *Immunogens and New Generation Vaccines [Immunogeny i vaksiny novogo pokoleniya]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2011. (in Russian)
34. Romanenko V.V., Osipova I.V., Lioznov D.A., Martsevich S.Yu., Anku-dinova A.V., Chebykina T.V. Clinical study of safety and efficacy of a polymer-subunit adjuvant influenza vaccine applied in combination with an immune modulator in people aged 60 and over. *Epidemiologiya i vaksinosprofilaktika.* 2016; 15(5): 63-71. (in Russian)
35. Kiselev O.I., Dyukov M.I. *Immunological adjuvant based on nanoparticles for vaccines against highly pathogenic influenza virus strains*. Patent RF N 2529959; 2014. (in Russian)
36. Nikiforova A.N., Isakova-Sivak I.N., Erofeeva M.K., Fel'dbyum I.V., Rudenko L.G. The results of studying the safety and immunogenicity of domestic subunit adjuvanted vaccine Sovgripp in volunteers from 18 to 60 years old. *Epidemiologiya i vaksinosprofilaktika.* 2014; (2): 72-8. (in Russian)
37. Lövgren-Bengtsson K., Morein B., Osterhaus A.D. ISCOM technology-based Matrix M™ adjuvant: success in future vaccines relies on formulation. *Expert Rev. Vaccines.* 2011; 10(4): 401-3. doi: 10.1586/erv.11.25
38. Sun H.X., Xie Y., Ye Y.P. ISCOMs and ISCOMATRIX. *Vaccine.* 2009; 27(33): 4388-401. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.05.032
39. Krasil'nikov I.V., Leneva I.A., Mikhaylova N.A., Doronin A.N., Brazhkin A.S. Immunobiological properties of experimental inactivated influenza vaccines containing corpuscular adjuvants. *Meditsinskiy alfavit.* 2016; 2(16): 30-5. (in Russian)
40. Cox R.J., Pedersen G., Madhun A.S., Svindland S., Saevik M., Breakwell L., et al. Evaluation of a virosomal H5N1 vaccine formulated with Matrix M™ adjuvant in a phase I clinical trial. *Vaccine.* 2011; 29(45): 8049-59. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.08.042
41. Semakova A.P., Mikshis N.I. Adjuvant technologies in the construction of advanced vaccines. *Problemy osobo opasnykh infektsiy.* 2016; (2): 28-35. doi: 10.21055/0370-1069-2016-2-28-35 (in Russian)
42. Petrovsky N., Cooper P.D. Carbohydrate-based immune adjuvants. *Expert Rev. Vaccines.* 2011; 10(4): 523-37. doi: 10.1586/erv.11.30
43. Petrovsky N., Cooper P. Advax™, a novel microcrystalline polysaccharide particle engineered from delta inulin, provides robust adjuvant potency together with tolerability and safety. *Vaccine.* 2015; 33(44): 5920-6. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.09.030
44. Silva D., Cooper P.D., Petrovsky N. Inulin-derived adjuvants efficiently promote both Th1 and Th2 immuneresponses. *Immunol. Cell Biol.* 2004; 82(6): 611-6. doi: 10.1111/j.1440-1711.2004.01290.x
45. Gordon D., Kelley P., Heinzl S., Cooper P., Petrovsky N. Immunogenicity and safety of Advax™, a novel polysaccharide adjuvant based on delta inulin, when formulated with hepatitis B surface antigen: a randomized controlled Phase I study. *Vaccine.* 2014; 32(48): 6469-77. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.09.034
46. Khalili I., Ghadimipour S., Sadigh Eteghad S., Fathi Najafi M., Ebrahimi M.M., Godsian N., et al. Evaluation of immune response against inactivated avian influenza (H9N2) vaccine, by using chitosan nanoparticles. *Jundishapur J. Microbiol.* 2015; 8(12): e27035. doi: 10.5812/jjm.27035
47. Spinner J., Oberoi H., Yorgensen Y., Poirier D.S., Burkhart D.J., Plante M., et al. Methylglycol chitosan and a synthetic TLR4 agonist enhance immune responses to influenza vaccine administered sublingually. *Vaccine.* 2015; 33(43): 5845-53. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.08.086
48. Gendon Yu.Z., Markushin S.G., Vasil'ev Yu.M., Akopova I.I., Krivtsov G.G. Increasing the immunogenicity of inactivated chitosan adjuvanted vaccine from A/California/7/09 (H1N1) strain and analyzing the antigenic specificity of this influenza virus strain. *Voprosy virusologii.* 2012; 57(1): 28-33. (in Russian)
49. Chang H., Li X., Teng Y., Liang Y., Peng B., Fang F., et al. Comparison of adjuvant efficacy of chitosan and aluminum hydroxide for intraperitoneally administered inactivated influenza H5N1 vaccine. *DNA Cell Biol.* 2010; 29(9): 563-8. doi: 10.1089/dna.2009.0977
50. Makarenkova I.D., Logunov D.Yu., Tikhvatulin A.I., Semenova I.B., Zvyagintseva T.N., Gorbach V.I., et al. Sulfated polysaccharides of brown seaweeds – ligands of toll-like receptors. *Biomeditsinskaya khimiya.* 2012; 58(3): 318-25. doi: 10.18097/pbmc20125803318 (in Russian)
51. Coffman R.L., Sher A., Seder R.A. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity.* 2010; 33(4): 492-503. doi: 10.1016/j.immuni.2010.10.002
52. Reed S.G., Orr M.T., Fox C.B. Key roles of adjuvants in modern vaccines. *Nat. Med.* 2013; 19: 1597-608. doi: 10.1038/nm.3409
53. Lin C.C., Pan I.H., Li Y.R., Pan Y.G., Lin M.K., Lu Y.H., et al. The adjuvant effects of high-molecule-weight polysaccharides purified from *Androdia cinnamomea* on dendritic cell function and DNA vaccines. *PLoS One.* 2015; 10(2): e0116191. doi: 10.1371/journal.pone.0116191
54. Zhang W., Oda T., Yu Q., Jin J.O. Fucoidan from *Macrocystis pyrifera* has powerful immune-modulatory effects compared to three other fucoidans. *Mar. Drugs.* 2015; 13(3): 1084-104. doi: 10.3390/md13031084
55. Jin J.O., Zhang W., Du J.Y., Wong K.W., Oda T., Yu Q. Fucoidan can function as an adjuvant *in vivo* to enhance dendritic cell maturation and function and promote antigen-specific T cell immune responses. *PLoS One.* 2014; 9(6): e99396. doi: 10.1371/journal.pone.0099396
56. Hayashi K., Lee J.B., Nakano T., Hayashi T. Anti-influenza A virus characteristics of a fucoidan from sporophyll of *Undaria pinnatifida* in mice with normal and compromised immunity. *Microbes Infect.* 2013; 15(4): 302-9. doi: 10.1016/j.micinf.2012.12.004
57. Synytsya A., Bleha R., Synytsya A., Pohl R., Hayashi K., Yoshinaga K., et al. Mekabu fucoidan: structural complexity and defensive effects against avian influenza A viruses. *Carbohydr. Polym.* 2014; 111: 633-44. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.05.032
58. Song L., Chen X., Liu X., Zhang F., Hu L., Yue Y., et al. Characterization and comparison of the structural features, immune-modulatory and anti-avian influenza virus activities conferred by three algal sulfated polysaccharides. *Mar. Drugs.* 2016; 14(1): 4. doi: 10.3390/md14010004
59. Kuznetsova T.A., Stepanova L.A., Ermakova S.P. Increasing the immunogenicity of the inactivated influenza virus A/California/7/09 (H1N1) using as adjuvant fucoidan from brown alga *Fucus evaneszens*. *Zdorov'e. Meditsinskaya ekologiya. Nauka.* 2017; (3): 57-9. (in Russian)
60. Negishi H., Mori M., Mori H., Yamori Y. Supplementation of elderly Japanese men and women with fucoidan from seaweed increases immune responses to seasonal influenza vaccination. *J. Nutr.* 2013; 143(11): 1794-8. doi: 10.3945/jn.113.179036
61. Chen L.M., Liu P.Y., Chen Y.A., Tseng H.Y., Shen P.C., Hwang P.A., et al. Oligo-Fucoidan prevents IL-6 and CCL2 production and cooperates with p53 to suppress ATM signaling and tumor progression. *Sci. Rep.* 2017; 7(1): 11864. doi: 10.1038/s41598-017-12111-1
62. Kuznetsova T.A., Ivanushko L.A., Persiyanova E.V., Shutikova A.L., Ermakova S.P., Khotimchenko M.Yu., et al. Evaluation of adjuvant effects of fucoidan from brown seaweed *Fucus evaneszens* and its structural analogues for the strengthening vaccines effectiveness. *Biomeditsinskaya khimiya.* 2017; 63(6): 553-8. doi: 10.18097/PBMC20176306553 (in Russian)
63. Oyewumi M.O., Kumar A., Cui Z. Nano-microparticles as immune adjuvants: correlating particle sizes and the resultant immune responses. *Expert Rev. Vaccines.* 2010; 9(9): 1095-107. doi: 10.1586/erv.10.89

Поступила 16.05.18

Принята в печать 31.10.18

© ГАЛЕГОВ Г.А., АНДРОНОВА В.Л., 2019

Галегов Г.А., Андропова В.Л.

АнтиВИЧ/СПИД-ПРЕПАРАТ 6НР: АНТИВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ, ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ. ЭФФЕКТИВНОСТЬ У ВЗРОСЛЫХ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ БОЛЬНЫХ

ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, Россия

Новый отечественный антиретровирусный препарат 6НР (аммоний-3'-азидо-3'-дезокситимидин-5'-карбомойлфосфонат) проявляет высокий уровень антиВИЧ-активности в культурах лимфобластоидных клеток. В целом организме 6НР превращается в азидотимидин, а фармакокинетические параметры последнего указывают на пролонгированный характер его действия *in vivo*, что является важным показателем, позволяющим сформировать оптимальные лечебные схемы в процессе клинического применения. Комплекс антивирусных свойств 6НР, результаты исчерпывающего доклинического исследования и изучения безопасности и переносимости у взрослых ВИЧ-инфицированных больных, включая важные первые данные его применения в качестве специфического антиВИЧ/СПИД-препарата, несомненно, указывают на перспективность и целесообразность его дальнейшего клинического применения у больных с ВИЧ-инфекцией, в том числе в составе комбинированной антиретровирусной терапии.

Ключевые слова: аналитический обзор; ВИЧ/СПИД-инфекция; химиотерапия; лекарство; предшественник азидотимидина.

Для цитирования: Галегов Г.А., Андропова В.Л. АнтиВИЧ/СПИД-препарат 6НР: антивирусная активность, доклиническое изучение. Эффективность у взрослых ВИЧ-инфицированных больных. *Вопросы вирусологии*. 2019; 64(1): 12-15
DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-1-12-15>

Galegov G.A., Andronova V.L.

AntiHIV/AIDS DRUG 6HP: ANTIVIRAL ACTIVITY, PRE-CLINICAL STUDY. EFFICIENCY IN ADULT HIV-INFECTED PATIENTS

National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russian Federation

The new domestic antiretroviral drug 6HP, which is ammonium-3'-azido-3'-deoxythymidine-5'-carbomoylphosphonate, shows a high level of anti-HIV activity in cultures of lymphoblastoid cells. In a organism, the 6HP is converted to azidothymidine, and the its pharmacokinetic parameters indicate a prolonged nature of action of this compound *in vivo*. It is an important indicator that allows to formulate optimal therapeutic regimens during clinical application of 6HP. The complex of its antiviral properties and the results of its exhaustive preclinical study, as well as the results of studying its safety and tolerability in adult HIV-infected patients, including important first data of its use as a specific therapeutic anti-HIV / AIDS drug, certainly indicate on its prospects and its usefulness in clinical use in patients with HIV infection, including as part of combination antiretroviral therapy.

Keywords: analytical review; HIV/AIDS infection; chemotherapy; drug; azidothymidine prodrug.

For citation: Galegov G.A., Andronova V.L. AntiHIV/AIDS drug 6HP: antiviral activity, pre-clinical study. Efficiency in adult HIV-infected patients. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2019; 64(1): 12-15. (In Russ.).
DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-1-12-15>

For correspondence: Georgij A. Galegov, Prof., Sc.D., Head of the Laboratory of Chemotherapy of Viral Infections, «N.F. Gamaleya NRCM», Moscow, 123098, Russian Federation. E-mail: andronova.vl@yandex.ru

Information about authors:

Galegov G.A., <http://orcid.org/0000-0001-6162-1650>Andronova V.L., <http://orcid.org/0000-0002-2467-0288>

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

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

Received 10 April 2018

Accepted 26 April 2018

По мнению экспертов ВОЗ, одной из основных глобальных проблем общественного здравоохранения во всем мире остается ВИЧ/СПИД-инфекция: в соответствии с официальными данными, только в 2017 г. ВИЧ-инфекцию приобрели 1,8 млн человек, и общее число ВИЧ-инфицированных на сегодняшний день достигло 37 млн.; более 35 млн умерли от причин, связанных с ВИЧ, из них 940 тыс. – в 2017 г. [1].

Антиретровирусная лекарственная терапия ВИЧ-инфекции и СПИДа впервые стала осуществляться в США с середины 1980-х годов, когда был открыт первый лечебный высокоспецифический нуклеозидный препарат азидотимидин (АЗТ, ретровир), относящийся к классу ингибиторов обратной транскриптазы. Вплоть до настоящего времени в лекарственную терапию ВИЧ вводятся новые препараты, относящиеся к классам ин-

Для корреспонденции: Галегов Георгий Артемьевич, доктор биологических наук, профессор, руководитель лаборатории химиотерапии вирусных инфекций ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва. E-mail: andronova.vl@yandex.ru

гибиторов обратной транскриптазы ВИЧ (нуклеозидные и нуклеозидные), ингибиторы протеазы ВИЧ, ингибиторы проникновения ВИЧ в клетку и ингибиторы интегразы ВИЧ [2–4]. Огромный прогресс в лечении ВИЧ-инфекции достигнут благодаря применению комбинаций антиВИЧ-препаратов с различным механизмом действия. Благодаря этому была разработана высокоэффективная антиретровирусная терапия. В таких условиях достигается глубокое подавление ВИЧ у инфицированных, в результате чего болезнь не прогрессирует и пациенты сохраняют свой социальный статус [3–5].

Ранее А.А. Краевский и соавт. создали отечественный антиВИЧ-препарат из группы нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы ВИЧ никавир (фосфазид) – высокоэффективное лекарственное средство, регулярно применяемое как компонент комбинированной терапии ВИЧ во многих клиниках нашей страны и в текущее время [6–11].

В результате дальнейшего поиска эффективных низкотоксичных антиВИЧ-препаратов с пролонгированным действием был создан новый препарат бНР. Этот препарат является представителем группы соединений 5'-аминокарбонилфосфонатов АЗТ, многие из них обладают значительной антиВИЧ-активностью, которая сопровождается более низкой по сравнению с АЗТ токсичностью на клеточном и органном уровнях. Именно бНР обладает такими выраженными антивирусными свойствами, которые сочетаются (и это важно) с его фармакокинетическими параметрами. Установлено, что бНР эффективно превращается в АЗТ, фармакокинетические характеристики которого четко указывают на пролонгацию фармакологического и, следовательно, антивирусного действия на уровне организма, инфицированного ВИЧ [8, 9, 12, 13]. Настоящая обзорная статья посвящена всестороннему рассмотрению антиВИЧ-активности, доклиническим исследованиям и изучению безопасности и переносимости бНР ВИЧ-инфицированными пациентами.

История создания препарата бНР

Молекула бНР была синтезирована в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН (см. А.Л. Хандажинская [8, 9]). По химической структуре это аммоний-3'-азидо-3'-дезокситимидин-5-карбомоилфосфонат. Его способность избирательно подавлять репродукцию ВИЧ в культуре лимфобластоидных клеток была доказана А.Г. Покровским (Новосибирск, Госуниверситет) [14] и Д.Н. Носиком (Москва, Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского) [15]. Были установлены его ингибиторные параметры: препарат бНР подавляет репродукцию ВИЧ в клетках в нецитотоксичных концентрациях. Его 50% цитотоксичная концентрация ($ЦД_{50}$) составляет 5000 мкг/мл; для сравнения: $ЦД_{50}$ АЗТ в 50 раз выше, а фосфазид – в 12,5 раза выше. Его 50% эффективная концентрация ($ЭК_{50}$) в 6 раз выше, чем у АЗТ, и составляет 1,87 мкг/мл. Таким образом, химиотерапевтический индекс (индекс селективности) больше 2700, превышая индекс селективности АЗТ почти в 9 раз, что указывает на высокий уровень избирательности антиВИЧ-действия препарата бНР *in vitro*.

Немаловажно, что при пассивировании ВИЧ в присутствии бНР, как и к АЗТ, постепенно формируется лекарственная устойчивость (резистентность), но более медленно, чем к АЗТ. Это приводит к необходимости для подавления репродукции ВИЧ увеличивать концентра-

цию бНР. После 10-го пассажа величина его $ЭК_{50}$ возрастает с 1,7 до 2,9 мкг/мл.

Высокая антиВИЧ-активность бНР обосновала целесообразность дальнейшего изучения его токсикологических и фармакологических свойств в рамках комплекса доклинических исследований [11–13].

Результаты токсикологического исследования препарата бНР

Величина дозы, вызывающей гибель 50% животных ($ЛД_{50}$) при внутрижелудочном введении крысам линии Вистар (диапазон введения доз: 20 000–50 000 мг/кг), составляет 46 500–48 000 мг/кг, для мышей линии BALB/c – 42 000–43 600 мг/кг. При изучении хронической токсичности бНР установлена хорошая переносимость препарата крысами, он не влияет на функционирование органов и не изменяет гематологические характеристики животных. Эти результаты были получены в процессе ежедневного внутрижелудочного введения крысам в течение 90 дней в дозах 133 и 266 мг на кг массы тела. Доза 133 мг/кг сопоставима с 10-кратной терапевтической дозой для человека. Полученные данные были подтверждены патоморфологическими исследованиями, которые проводили после окончания 90-дневного эксперимента.

В экспериментах на собаках изучали токсичность готовой лекарственной формы препарата бНР. Была установлена его хорошая переносимость при внутрижелудочном способе введения 12,5-кратной терапевтической дозы, рекомендованной для людей – 166 мг/кг.

Результаты изучения мутагенных свойств препарата бНР

Исследователи определяли наличие в стандартных экспериментах (тест Эймса) генных мутаций у индикаторных штаммов *Salmonella typhimurium*, которые могли бы возникать под влиянием бНР, вызывать хромосомные aberrации в клетках костного мозга мышей-гибридов F1 ($CBA_{x}C_{57}Bl_{6}$), а также детектировали количество доминантных леталий в зародышевых клетках мышей. Экспериментально установлено, что бНР в тесте Эймса увеличивает рост ревертантов, однако только в случае высоких концентраций соединения (в 500 раз выше, чем у зидовудина). С другой стороны, бНР не индуцирует количество доминантных летальных мутаций в зародышевых клетках мышей. Препарат в дозе 133 мг/кг, которую ежедневно вводили внутрижелудочно с 1-го по 19-й дни беременности (близкой 10-кратной высшей терапевтической дозе, рекомендованной для человека), не оказывал эмбриотоксического и тератогенного действия. бНР не влиял на репродуктивные функции самцов крыс Вистар при ежедневном внутрижелудочном введении в высокой дозе в течение 10 дней. бНР не оказывает алергизирующего действия, что доказано при его внутрижелудочном введении морским свинкам в дозах 133 и 266 мг/кг, при последующем внутрижелудочном введении разрешающей дозы 266 мг/кг на 14-й и 21-й дни после сенсibilизации препарат не вызывал анафилактического шока. Препарат не проявлял алергизирующего действия в реакции гиперчувствительности третьего типа и не влиял на реакцию подколennого лимфатического узла, что также исключает возможность алергизирующего действия.

На основании всего комплекса токсикологических исследований препарат бНР был рекомендован для клинического изучения (Е.В. Арзамасцев) [16].

Фармакологические исследования препарата 6НР

Е.Т. Гнеушев и Е.В. Арзамасцев установили следующие параметры фармакокинетики 6НР в экспериментах на собаках. При введении внутривенно собакам большая часть 6НР метаболизируется до фармакологически активного АЗТ. Фармакологические параметры: время полувыведения ($T_{1/2} = 7,1 \pm 3,6$ ч), скорость всасывания ($C_{max}/AUC_1 = 0,109 \pm 0,03$ ч⁻¹) и время достижения максимальной концентрации ($T_{max} = 5,2 \pm 1,4$ ч) – указывают на возможную пролонгацию его фармакологического действия. После многократного перорального введения 6НР внутрь в организме собак отмечается кумуляция АЗТ, что выражается в увеличении значений AUC_1 и C_{min} , удлинении T_{max} и возрастании C_{max} . [17]

В процессе изучения тканевой доступности и выведения препарата 6НР в опытах на крысах В.П. Жердевым [18] были получены важные результаты. В организме крыс 6НР интенсивно превращается в АЗТ: после перорального введения 6НР в дозе 100 мг/кг АЗТ определяется в крови животных на протяжении 12 ч. Полупериод элиминации из плазмы крови 3,9 ч. Это немаловажно для контроля всего инфекционного процесса, вызываемого ВИЧ, с помощью 6НР. На основании разработанного авторами количественного метода определения 6НР и АЗТ (определяемость до 10 нг/мл) был установлен высокий уровень тканевой доступности АЗТ при введении 6НР животным. Удалось определить концентрацию АЗТ не только в крови, но и в печени, селезенке, почках, легких, скелетной мускулатуре. В.П. Жердев также установил, что после перорального введения крысам 200 мг/кг 6НР в моче обнаруживается АЗТ в количестве 4,11% от введенного 6НР.

Клинические исследования препарата 6НР

Комплекс клинических исследований 6НР, проведенных З.Н. Лисициной и соавт. [19], позволил разработать метод детекции АЗТ в плазме крови здоровых лиц, перорально получавших препарат 6НР однократно 1,2 г/сут и двукратно 2 г/сут. АЗТ как продукт метаболизации 6НР идентифицировался в плазме крови у людей в концентрациях от 2,5 до 15 нг/мл. Полученные результаты вносят вклад в изучение фармакологических параметров 6НР у людей, способствуя формированию оптимальных лечебных схем.

Безопасность применения препарата 6НР у ВИЧ-инфицированных

Изучению безопасности и переносимости 6НР у взрослых ВИЧ-инфицированных больных, ранее не получавших специфическую антиретровирусную терапию, посвящено обстоятельное логически обоснованное исследование А.В. Кравченко и соавт. [12] и Н.В. Сизовой и соавт. [20, 21]. Ранее с привлечением здоровых добровольцев была показана хорошая переносимость и безопасность 6НР после однократного перорального приема [22]. Следующее исследование включало 75 ВИЧ-инфицированных больных с 3 субклинической стадией ВИЧ-инфекции. Они получали перорально 6НР ежедневно в течение 5 нед. Авторы реализовали 5 исследовательских вариантов терапии ВИЧ-инфекции с помощью 6НР, соответственно, было 5 групп больных, по 15 человек в каждой. Пациенты 1-й группы принимали препарат 6НР по 0,6 г 2 раза в сутки; 2-й группы – по 0,8 г 2 раза в сутки; 3-й группы – 1,2 г однократно; 4-й груп-

пы – 1,6 г однократно; 5-й группы – 2,0 г однократно. После этого срока имело место достоверное снижение количества РНК ВИЧ, выражаемое в lg копий РНК/мл, у пациентов всех 5 групп. Наиболее эффективное снижение количества РНК наблюдалось у пациентов 2-й, 4-й и 5-й групп. По второму базовому показателю у пациентов всех 5 групп обнаружено достоверное увеличение медианы количества CD4-лимфоцитов. Все пациенты хорошо переносили лечение, и отмены препарата не требовалось. Явлений анемии не наблюдалось. Побочное действие 6НР отмечено у 53% пациентов. Однако в 90 % случаев нежелательные явления имели легкую степень выраженности и не были связаны с изучаемым препаратом. Из вышеизложенного однозначно следует, что пероральный препарат 6НР в виде монотерапии оказывает доказанное терапевтическое действие при однократном суточном приеме. Это важное исследование обосновывает целесообразность его дальнейшего изучения у больных с ВИЧ-инфекцией в качестве компонента комбинированной антиретровирусной терапии.

В настоящее время проводится многоцентровое рандомизированное частично слепое клиническое исследование II фазы по эффективности и безопасности препарата 6НР по сравнению с фосфазидом на фоне стандартной терапии, состоящей из 1 нуклеозидного и 1 нуклеозидного ингибиторов обратной транскриптазы, у ВИЧ-инфицированных больных, ранее не получавших антиретровирусной терапии.

Финансирование. Работа выполнена без дополнительной финансовой поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 3, 9 см. REFERENCES)

1. ВИЧ/СПИД. Информационный бюллетень ВОЗ. Available at: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids>
2. ВОЗ. Сводное руководство по использованию антиретровирусных препаратов для лечения и профилактики ВИЧ-инфекции. 2016. Available at: <https://www.who.int/hiv/pub/arv/arv-2016/ru/>
3. Покровский В.В., ред. *ВИЧ-инфекция и СПИД: Национальное руководство*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2013.
4. Покровский В.В., Юрин О.Г., Кравченко А.В., Беляева В.В., Канестри В.Г., Афонина Л.Ю. и др. *Протоколы диспансерного наблюдения и лечения больных ВИЧ-инфекцией*. 2014. Available at: <http://www.komi-aids.ru/upload/iblock/868/86873ba5a885cc44ec48d0fe8dd5581f.pdf>
5. Галегов Г.А. Никавир (Фосфазид) – антиретровирусный препарат: антиВИЧ-активность, токсикология, фармакокинетика и некоторые перспективы клинического применения. *Антибиотики и химиотерапия*. 2004; 49(7): 3-8.
6. Галегов Г.А. Фосфазид в лечении ВИЧ-инфекции на фоне протекающего хронического вирусного гепатита С и туберкулеза. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии*. 2016; 7(3): 61-8.
7. Хандажинская А.Л., Широкова Е.А. 5'-фосфонаты AZT: достижения и перспективы в лечении и профилактике ВИЧ-инфекции. *Acta Naturae*. 2013; 5(3): 57-65.
8. Кравченко А.В., Куимова У.А., Канестри В.Г., Ганкина Н.Ю., Серебрянская Л.В. Применение препарата Фосфазид в схемах АРВТ у больных с ВИЧ-инфекцией и хроническим гепатитом С, получавших лечение. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии*. 2012; 4(2): 64-72.
9. Галегов Г.А. Фосфазид (Никавир) – высокоэффективный лекарственный препарат для лечения ВИЧ/СПИД-инфекции. *Вопросы вирусологии*. 2017; 62(1): 5-11.
10. Кравченко А.В., Сизова Н.В., Минаева С.В., Мошкович Г.Ф., Овсянникова Е.В., Петрова Л.Н. Безопасность и переносимость препарата 6НР у взрослых ВИЧ-инфицированных больных, ранее не получавших АРВТ. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии*. 2015; 7(4): 64-73.

13. Кравченко А.В., Галегов Г.А., Конестри В.Г. *Фосфазид*. М.: Медпрактика; 2017.
14. Покровский А.Г. *Исследование противовирусной активности комбинированной формы нуклеозидных ингибиторов*. Отчет. Новосибирск; 2011.
15. Носик Д.Н. *Отчет исследования антиретровирусной активности и профиля резистентности штаммов ВИЧ-1 к ингибиторам обратной транскриптазы ВИЧ-1*. М.; 2010.
16. Арзамасцев Е.В., Малиновская К.И., Терехова О.А. *Отчет о токсичности тимазиды (азидотимидин) и 6НР при введении мышам и крысам*. М.; 2011.
17. Гнеушев Е.Т., Арзамасцев Е.В. *Отчет по фармакокинетике и относительной биодоступности антиВИЧ препаратов*. М.; 2012.
18. Жердев В.П. *Изучение тканевой доступности и выведения препарата Фосфамид-3 (6НР) в эксперименте: Отчет*. М.; 2010.
19. Лисицина З.Н., Петрова Л.Н., Беляков Н.А., Прибытковский М.М., Симонян А.Р. Методика определения активного метаболита 3'-азидо-3'-дезокситимидина (азидотимидина) в плазме крови путем высокоэффективной жидкостной хроматографии. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии*. 2015; 7(2): 61-8.
20. Сизова Н.В., Лисицина З.Н., Петрова Л.Н., Фадеев К.А., Беляков Н.А. Высокоэффективная жидкостная хроматография для подбора оптимальных дозировок и курса лечения лекарственным препаратом 6НР группы ингибиторов обратной транскриптазы. *Медицинский академический журнал*. 2015; 15(4): 76-81.
21. Сизова Н.В., Недодаева Т.С., Фадеев К.А., Ефимов Г.А., Логвиненко А.А., Лисицина З.Н. и др. Клиническая эффективность и безопасность препарата 6НР у пациентов с ВИЧ-инфекцией (монотерапия). *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии*. 2016; 8(1): 53-60.
22. Отчет о клиническом исследовании препарата 6НР по Протоколу № 6НР-1-2011. Открытое исследование I фазы по изучению фармакокинетики, безопасности и переносимости препарата 6НР у здоровых добровольцев при однократном введении. Разрешение МЗ № 932. М.; 2013.
23. Achievements and Trends in the Treatment and Prevention of HIV Infection. *Acta Naturae*. 2013; 5(3): 54-61.
24. Khandazhinskaya A.L., Matyugina E.S., Shirokova E.A. Anti-HIV therapy with AZT prodrugs: AZT phosphonate derivatives, current state and prospects. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2010; 6(6): 701-14. doi: 10.1517/17425251003713501
25. Kravchenko A.V., Kuimova U.A., Kanestri V.G., Gankina N.Yu., Serebryannikova L.V. The use of the drug Phosphazide in antiretroviral therapy regimens in patients with HIV infection and chronic hepatitis C who received treatment. *VICH-infektsiya i immunosupressii*. 2012; 4(2): 64-72. (in Russian)
26. Galegov G.A. Phosphazide (Nikavir) is a highly effective drug for the treatment of HIV/AIDS infection. *Voprosy virusologii*. 2017; 62(1): 5-11. (in Russian)
27. Kravchenko A.V., Sizova N.V., Minaeva S.V., Moshkovich G.F., Ovsyannikova E.V., Petrova L.N. Safety and tolerability of 6HP preparation in adult HIV-infected patients who had not previously received antiretroviral therapy. *VICH-infektsiya i immunosupressii*. 2015; 7(4): 64-73. (in Russian)
28. Kravchenko A.V., Galegov G.A., Konestri V.G. *Phosphazid [Fosfazid]*. Moscow: Medpraktika; 2017. (in Russian)
29. Pokrovskiy A.G. *The Study of the Antiviral Activity of the Combined Form of Nucleoside Inhibitors*. Report [Issledovanie protivovirusnoy aktivnosti kombinirovannoy formy nukleozidnykh ingibitorov. Otchet]. Novosibirsk; 2011. (in Russian)
30. Nosik D.N. *Report on the Study of Antiretroviral Activity and the Profile of Resistance of HIV-1 Strains to HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitors [Otchet issledovaniya antiretrovirusnoy aktivnosti i profilya rezistentnosti shtammov VICH-1 k ingibitoram obratnoy transkriptazy VICH-1]*. Moscow; 2010. (in Russian)
31. Arzamastsev E.V., Malinovskaya K.I., Terekhova O.A. *Thymazide (Azidothymidine) and 6HP Toxicity Report when Administered to Mice and Rats [Otchet o toksichnosti timazida (azidotimidin) i 6NR pri vvedenii mysham i kryсам]*. Moscow; 2011. (in Russian)
32. Gneushev E.T., Arzamastsev E.V. *Report on Pharmacokinetics and Relative Bioavailability of Anti-HIV Drugs [Otchet po farmakokinetike i otnositel'noy biodostupnosti antiVICH preparatov]*. Moscow; 2012. (in Russian)
33. Zherdev V.P. *Study of Tissue Availability and Excretion of the Preparation Phosphamide-3 (6HP) in the Experiment: Report [Izuchenie tkanevoy dostupnosti i vyvedeniya preparata Fosfamid-3 (6NR) v eksperimente: Otchet]*. Moscow; 2010. (in Russian)
34. Lisitsina Z.N., Petrova L.N., Belyakov N.A., Pribytkovskiy M.M., Simonyan A.R. Method for determination of the active metabolite of 3'-azido-3'-deoxythymidine (azidothymidine) in blood plasma by high-performance liquid chromatography. *VICH-infektsiya i immunosupressii*. 2015; 7(2): 61-8. (in Russian)
35. Sizova N.V., Lisitsina Z.N., Petrova L.N., Fadeev K.A., Belyakov N.A. High performance liquid chromatography for the selection of the optimal dosages and the course of treatment with the 6HP drug of group of reverse transcriptase inhibitors. *Meditsinskiy akademicheskij zhurnal*. 2015; 15(4): 76-81. (in Russian)
36. Sizova N.V., Nedodaeva T.S., Fadeev K.A., Efimov G.A., Logvinenko A.A., Lisitsina Z.N., et al. Clinical efficacy and safety of the 6HP drug in patients with HIV infection (monotherapy). *VICH-infektsiya i immunosupressii*. 2016; 8(1): 53-60. (in Russian)
37. A report on the clinical study of the 6HP drug according to Protocol No. 6HP-1-2011. Phase I open study to study the pharmacokinetics, safety and tolerability of 6HP in healthy volunteers after a single dose. Resolution of Ministry of Health care № 932. Moscow; 2013. (in Russian)
38. HIV/AIDS. Fact sheet of WHO. Available at: <http://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids>
39. WHO. Consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection: Recommendations for a public health approach – 2nd ed. 2016. Available at: <http://www.who.int/hiv/pub/arv/arv-2016/en/>
40. Bartlett J.G., Gallant J.E., Pham P.A. *Medical Management of HIV Infection 2012*. Baltimore, USA: Knowledge Source Solutions; 2012.
41. Pokrovskiy V.V., ed. *HIV Infection and AIDS: National Guide [VICH-infektsiya i SPID: Natsional'noe rukovodstvo]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2013. (in Russian)
42. Pokrovskiy V.V., Yurin O.G., Kravchenko A.V., Belyaeva V.V., Kanestri V.G., Afonina L.Yu., et al. *Protocols for Dispensary Observation and Treatment of Patients with HIV Infection [Protokoly dispansernogo nablyudeniya i lecheniya bol'nykh VICH-infektsiy]*. 2014. Available at: <http://www.komi-aids.ru/upload/iblock/868/86873ba5a885cc44ec48d0fe8dd5581f.pdf> (in Russian)
43. Galegov G.A. Nicavir (Phosphazide) – an antiretroviral agent: anti-HIV activity, toxicology, pharmacokinetics and some perspectives of clinical use. *Antibiotiki i khimioterapiya*. 2004; 49(7): 3-8. (in Russian)
44. Galegov G.A. Phosphazide in the treatment of HIV infection against the background of chronic viral hepatitis C and tuberculosis. *VICH-infektsiya i immunosupressii*. 2016; 7(3): 61-8. (in Russian)
45. Khandazhinskaya A.L., Shirokova E.A. AZT 5'-Phosphonates:

Поступила 10.04.18

Принята в печать 26.04.18

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Хаметова К.М.¹, Алексеев К.П.¹, Южаков А.Г.¹, Костина Л.В.¹, Раев С.А.¹,
Мусяенко М.И.¹, Мухин А.Н.¹, Алипер Т.И.¹, Воркунова Г.К.¹, Гребенникова Т.В.^{1,2}

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КЛОНИРОВАННОГО ШТАММА WA РОТАВИРУСА А ЧЕЛОВЕКА

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

²ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», 117198, г. Москва, Россия

Введение. Ротавирусы являются одной из главных причин возникновения тяжелых диарей у детей во всем мире. Единственным эффективным методом контроля уровня заболеваемости является вакцинация. В настоящее время для профилактики ротавирусной инфекции применяют вакцины, основанные на живых аттенуированных штаммах ротавируса человеческого или животного происхождения. **Цели и задачи.** Изучение биологических и генетических свойств актуального эпидемического штамма Wa генотипа G1P[8] ротавируса А (РВА) человека. **Материал и методы.** Определение репродуктивной активности РВА в перевиваемых клеточных линиях, концентрирование и очистка антигена РВА, ПААГ-электрофорез и иммуноблот, электрофорез вирусных геномных РНК-сегментов, определение первичной нуклеотидной последовательности (секвенирование). **Результаты.** В статье представлены результаты изучения биологических и молекулярно-генетических свойств штамма Wa генотипа G1P[8] РВА человека для оценки его стабильности. Штамм РВА был адаптирован к репродукции в монослойной перевиваемой культуре клеток MARC145. Инфекционный титр вируса составил 7,5–7,7 lg ТЦИД₅₀/мл. Получен очищенный и концентрированный культуральный антиген РВА. Проведена оценка степени чистоты культурального антигена вируса методом ПААГ-электрофореза и иммуноблота. Для идентификации РВА был проведен электрофорез вирусных геномных РНК-сегментов. Отсутствие накопления изменений в геноме РВА Wa в ходе адаптации к различным клеточным культурам и при пассировании было показано методом секвенирования фрагментов вирусного генома.

Заключение. В ходе проведенных исследований было установлено, что штамм Wa РВА – стабильный, обладает высокой биологической активностью: он хорошо репродуцировался в перевиваемых клеточных линиях, адаптация к клеточной линии MARC145 позволила получить титр 7,5–7,7 lg ТЦИД₅₀/мл. Подтверждена идентичность культивируемого РВА исходному штамму Wa G1P[8].

Ключевые слова: ротавирус А; вакцина против ротавирусной болезни; молекулярно-биологические свойства вируса.

Для цитирования: Хаметова К.М., Алексеев К.П., Южаков А.Г., Костина Л.В., Раев С.А., Мусяенко М.И., Мухин А.Н., Алипер Т.И., Воркунова Г.К., Гребенникова Т.В. Молекулярно-биологические свойства клонированного штамма Wa ротавируса А человека. *Вопросы вирусологии.* 2019; 64(1): 16-22.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-1-16-22>

Khametova K.M.¹, Alekseev K.P.¹, Yuzhakov A.G.¹, Kostina L.V.¹, Raev S.A.¹, Musienko M.I.¹, Mukhin A.N.¹, Aliper T.I.¹, Vorkunova G.K.¹, Grebennikova T.V.^{1,2}

EVALUATION OF THE MOLECULAR-BIOLOGICAL PROPERTIES OF HUMAN ROTAVIRUS A STRAIN WA

¹Ivanovsky Virology Institute, «National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician NF. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation;

²Peoples Friendship University of Russia (RUDN), Moscow, 117198, Russian Federation

Introduction. Rotaviruses are among the leading causes of severe diarrhea in children all over the World. Vaccination is considered to be the most effective way to control the disease. Currently available vaccines for prevention of rotavirus infection are based on live attenuated rotavirus strains human or animal origin. **Objectives and purposes.** The aim of this investigation was to study the biological and genetic properties of an actual epidemic human rotavirus A (RVA) strain Wa G1P[8] genotype. **Material and methods.** RVA Wa reproduction in a monolayer continuous cell lines, purification and concentration of RVA antigen, PAAG electrophoresis and Western-Blot, electrophoresis of viral genomic RNA segments, sequencing. **Results.** Human RVA G1P[8] Wa strain biological and molecular genetic properties were assessed in the process of the adaptation to MARC145 continuous cell line. Cell cultured RVA antigen was purified, concentrated and then characterized by the method of PAAG electrophoresis and immunoblot. To verify RVA Wa genome identity, electrophoresis of viral genomic RNA segments was performed. The lack of accumulation of changes in the RVA Wa genome during adaptation to various cell cultures and during serial passages was demonstrated by sequencing fragments of the viral genome. **Conclusion.** RVA Wa strain is stable, it possesses high biological activity: it has been successfully adapted to the MARC145 cell line and RVA Wa virus titer after the adaptation reached 7,5-7,7 lg TCID₅₀/ml. The identity of the cultivated RVA to the original strain Wa G1P[8] was confirmed.

Keywords: rotavirus A; vaccine against rotavirus disease, molecular biological properties of the virus.

Для корреспонденции: Хаметова Кизхалум Маликовна, научный сотрудник лаборатории средств специфической профилактики вирусных болезней ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. 123098, г. Москва. E-mail: kizkhalum@yandex.ru

For citation: Khametova K.M., Alekseev K.P., Yuzhakov A.G., Kostina L.V., Raev S.A., Musienko M.I., Mukhin A.N., Aliper T.I., Vorkunova G.K., Grebennikova T.V. Evaluation of the molecularbiological properties of human rotavirus A strain WA. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2019; 64(1): 16-22. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-1-16-22>

For correspondence: Kizhalum M. Khametova, Research Fellow, Laboratory for Specific Prevention of Viral Diseases Ivanovsky Virology Institute, «National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after honorary academician N.F.Gamaleya», Moscow. 123098, Russian Federation. E-mail: kizkhalum@yandex.ru

Information about authors:

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

Khametova K.M., <https://orcid.org/0000-0002-8461-600X>

Yuzhakov A.G., <https://orcid.org/0000-0002-0426-9678>

Mukhin A.N., <https://orcid.org/0000-0001-7008-5212>

Aliper T.I., <https://orcid.org/0000-0002-5876-2425>

Alekseev K.P., <https://orcid.org/0000-0001-9536-3127>

Costina L.V., <https://orcid.org/0000-0002-9556-1454>

Acknowledgments. The publication was prepared with the support of the “RUDN University Program 5-100”.

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

Received 15 October 2018

Accepted 31 October 2018

Введение

В настоящее время ротавирусы (РВ) являются одной из основных причин тяжелых форм острых кишечных инфекций (ОКИ) у детей в возрасте от 3 до 5 лет [1–3].

Эпидемиология ротавирусной инфекции (РВИ) имеет региональные особенности. В странах с низким уровнем развития экономики и здравоохранения бремя тяжелых диарейных заболеваний, вызванных РВ, наиболее ощутимо. Так, доля всех ротавирусных госпитализаций у детей в возрасте до 5 лет составляет 43% в Африке и 27% в Европе [4]. Подавляющее большинство летальных случаев регистрируют в странах Африки и Юго-Восточной Азии [5, 6]. Если доля смертельных диарей, связанных с РВ, во всем мире составляет 30–50%, то в этих странах – более 90%.

На территории Российской Федерации доля ротавирусных гастроэнтеритов тоже достигает достаточно внушительных цифр – 44–47% от всех случаев инфекционной кишечной патологии. При этом до 5% всей детской смертности среди больших младше 5 лет связаны с ротавирусным гастроэнтеритом [7,8].

РВ относят к семейству *Reoviridae*. РВ являются безоболочечными вирусами, имеющими сложную архитектуру вириона, который состоит из трех концентрических капсидов, окружающих 11 сегментов двухцепочечной РНК [9]. Сегменты РНК кодируют 6 структурных вирусных белков (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 и VP7) и 6 неструктурных белков (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 и NSP6). Структурные белки определяют процесс адсорбции вируса и его проникновения в эпителиальные клетки, участвуют в последующей транскрипции вирусной РНК, содержат эпитопы, которые индуцируют иммунный ответ. Неструктурные белки участвуют в репликации генома и регуляции врожденного иммунного ответа. Неструктурный пептид NSP4 обладает энтеротоксическими свойствами и принимает непосредственное участие в развитии диареи по секреторному типу [10].

Структурный белок VP6 является основной группоспецифичной антигенной детерминантой РВ [11, 12]. В зависимости от его строения РВ подразделяют на 10 видов, или серологических групп (А–J) [13, 14]. В 98% случаев РВИ у человека вызывают РВА, составляющие весомую долю в этиологии диареи у детей в возрасте до 5 лет [9, 15–17]. РВА далее подразделяют на различные генотипы на основе особенностей структуры гена VP7. Антигенные особенности белков VP4 и структура гена VP7 составляют основу двойной номенклатурной системы, используемой для штаммов РВА: по VP7 РВА

разделяют на G-типы, а по VP4 – на P-типы. На сегодняшний день известно 32 G-генотипа и 47 P-генотипов РВ А [18]. Среди них в мире наиболее распространены 6 G-типов (G1, G2, G3, G4, G9 и G12) и 3 P-типа (P[4], P[6] и P[8]) [19, 20]. На глобальном уровне большинство ротавирусных инфекций у человека связано с генотипами G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8] и G12P[8] [3, 21, 22]. Особенностью эпидемиологической обстановки в Российской Федерации в последние годы было преобладание штаммов G4P[8] [3, 23]. Интересно, что последние данные по распространению типов РВА в Оренбургском регионе за 2013–2016 и 2016–2017 гг. показали появление штаммов G9P[8] и стремительное вытеснение этими штаммами ранее более распространенных типов: в 2016–2017 годы в Оренбургском регионе 54,7% случаев РВИ были ассоциированы со штаммами G9P[8]. Ранее штаммы G9P[8] стали преобладающим типом РВА на территории Китая [24–26].

В настоящее время единственным эффективным методом контроля уровня заболеваемости признается вакцинация [27]. Внедрение ротавирусных вакцин существенно сократило количество случаев госпитализаций от РВИ. Для специфической профилактики ротавирусной инфекции разработаны вакцины, которые показали свою эффективность для предотвращения тяжелых ротавирусных гастроэнтеритов. В настоящее время более чем в 100 странах мира для использования лицензированы две живые аттенуированные вакцины: моновалентная Rotarix (GlaxoSmithKline, Бельгия) на основе аттенуированного РВА человека типа G1P[8] и пентавалентная RotaTeq (Merk & Co, США), которая является реассортантом РВА крупного рогатого скота (КРС) и человека, включая VP7 типов G1, G2, G3, G4 и VP4 типа P[8] [28]. Кроме того, две индийские вакцины проходят III стадию клинических испытаний и включены в последний информационный лист ВОЗ по ротавирусным вакцинам [29]. Rotavac компании Bharat является моновалентной вакциной на основе живого аттенуированного штамма 116E РВА человека типа G9P[11], выделенного от ребенка без клинических симптомов и содержащего VP4 от РВА КРС, полученного, видимо, в результате реассортации [30]. Rotasiil разработан Serum institute of India и является реассортантом РВА КРС и человека, включая VP7 типов G1, G2, G3, G4 и G9.

Несмотря на эффективность применения указанных вакцинных препаратов в развитых странах, их использование остается связано с риском образования спаек в кишечнике. Хотя частота осложнения, связанного с вакциной, не превышает 1:50 000 [31], для развитых стран,

где летальность ротавирусной диареи не превышает 1:100 000 [32], такая частота осложнений по-прежнему остается серьезной проблемой. Второй серьезной проблемой остается образование штаммов-реассортантов на основе вакцинного и полевых РВ, что вызывает вопросы о безопасности применения живых вакцин [33, 34].

РВ поражают как человека, так и основных сельскохозяйственных животных: КРС, свиней [35]. Показано, что РВА человека способны поражать новорожденных поросят [36], а РВА КРС, напротив, были выделены от новорожденных детей [37]. Сегментированный геном РВ, позволяющий легкую реассортацию полевых штаммов ротавируса при коинфекции одного хозяина, дополнительно усиливает антропозоонозный потенциал РВА. Эта особенность РВА дополнительно подчеркивает важность вопроса биобезопасности при применении живых вакцин. Поросята-гнотобиоты или безмолозивные поросята являются уникальной моделью для изучения эффективности новых вакцинных препаратов против ротавирусной инфекции [38]. Плацента свиньи не пропускает антитела, и новорожденные поросята лишены материнских антител [39, 40]. Они сохраняют чувствительность к заражению человеческими штаммами РВ до возраста 8 недель, что достаточно для проведения испытаний вакцины [41], в отличие от грызунов, которые чувствительны к заражению лишь до 14–21-го дня [42, 43].

Целью нашей работы было изучение биологических и генетических свойств штамма Wa G1P[8] РВА человека, который является актуальным эпидемическим штаммом и в дальнейшем может быть использован в качестве вакцинного препарата.

Материал и методы

Вирус. В работе был использован аттенуированный штамм Wa G1P[8] ротавируса А человека, любезно предоставленный профессором Linda J. Saif (OARDC, FAHRP, университет штата Огайо, США). Образец фекалий больного ребенка был использован для орального заражения поросят-гнотобиотов. После 11 пассажей на поросятах-гнотобиотах вирус был адаптирован к культуре клеток MA104 и выделен методом бляшкообразования. Полученный вирус был клонирован методом предельных разведений 6 раз, после чего было сделано 27 пассажей вируса на культуре клеток MA104. 27-й пассаж вируса на MA104 использовали как сток аттенуированного вируса [44, 45].

Клетки и культивирование вируса. Для изучения культуральных свойств вируса были использованы культуры перевиваемых клеточных линий PK-15 (почка свиньи), СПЭВ (почка эмбриона свиньи), MARC145 (почка эмбриона зеленой мартышки), MA104 (почка эмбриона зеленой мартышки). Клетки выращивали в монослой, применяя методы стационарного культивирования. Клетки культивировали в среде ДМЕМ с L-глутамином (Sigma, Германия) в присутствии 10% фетальной бычьей сыворотки (HyClone, США). Двухсуточный монослой (80–90%) используемых клеточных линий дважды промывали солевым раствором Хэнкса, инокулировали 5 мл вирусной суспензии (из расчета 0,1 ТЦИД₅₀/мл) и инкубировали 1 ч при 37 °С для адсорбции вируса. После этого монослой снова промывали раствором Хэнкса и вносили поддерживающую среду ДМЕМ, содержащую 5 мкг/мл трипсина (Sigma, Германия). Клетки наблюдали 4–5 суток до появления признаков цитопатического действия (ЦПД).

Определение инфекционной активности РВА. Для определения инфекционной активности вируса был использован метод титрования в культуре клеток MA104 и MARC145. Значение инфекционного титра вычисляли по методу Рида и Менча и выражали в Ig ТЦИД₅₀/мл.

Концентрирование и очистка антигена РВА. Вирусную суспензию подвергали трехкратному замораживанию и оттаиванию с последующим низкоскоростным центрифугированием (3000 g) в течение 30 минут для освобождения от клеточного детрита. После этого проводили концентрирование с помощью осаждения 7,5% полиэтиленгликоля (ПЭГ) с молекулярной массой 6000 в присутствии 20% NaCl и 0,2% NaN₃ и инкубировали при +4 °С в течение 72 часов.

Далее, осажденную вирусосодержащую жидкость центрифугировали при 8000 g, осадок растворяли в растворе Хэнкса и наслаивали на градиент плотности хлористого цезия (1,44–1,21 г/см³). После центрифугирования при 10000 g в течение 2-х часов, вирусную зону в центре образовавшегося градиента собирали с помощью шприца, диализировали против солевого раствора Хэнкса и хранили при -20 °С.

Иммуноферментный анализ (ИФА). Для подтверждения наличия РВА Wa в вирусосодержащем материале использовали коммерческую тест-систему, позволяющую выявлять РВА в биологическом материале животных и человека (ООО «Ветбиохим», Россия).

Выделение РНК РВА и проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР). РНК РВА выделяли из пробы культурального вируса, с использованием соответствующего набора с неорганическим сорбентом (ООО «Ветбиохим», Россия), по методике производителя. Для проведения ПЦР и последующего секвенирования участков генов VP4, VP6 и VP7 РВА использовали набор специфических олигонуклеотидов, рекомендованных ВОЗ (табл. 1). Олигонуклеотидные праймеры синтезированы в ООО «ДНК Синтез» (Москва).

ПЦР, совмещенную с реакцией обратной транскрипции (ОТ-ПЦР), проводили в конечном объеме 25 мкл. Реакционная смесь содержала 5 мкл РНК, 10 пМ каждого праймера, 10 пМ каждого зонда, 0,25 мМ каждого dNTP, 1,25 ед. Taq-полимеразы, 0,5 ед. ревертазы M-MLV, 20 ед. ингибитора рибонуклеаз RNAsin, 50 мМ Tris-HCl (pH 8,3), 50 мМ KCl, 10 пМ DTT, 1,5 мМ MgCl₂.

Для проведения ПЦР был установлен оптимальный температурно-временной режим: 1 цикл: 50 °С – 30 минут, 94 °С – 5 минут; 30 циклов: 94 °С – 10 секунд, 50 °С – 20 секунд, 72 °С – 30 секунд; 1 цикл: 72 °С – 5 минут.

Горизонтальный электрофорез. Анализ фрагментов ДНК РВА, полученных методом ПЦР, проводили методом электрофореза в 1% агарозном геле. Электрофорез проводили с использованием трис-ацетатного буфера (pH 8,5), содержащего бромистый этидий в концентрации 0,5 мкг/мл, при напряженности электрического поля 10 В/см в течение 30 минут. Гели просматривали в ультрафиолетовом свете с длиной волны 254 нм. Нарботанные фрагменты вырезали из геля и выделяли, с использованием набора для очистки ПЦР-продуктов (Thermo Fisher Scientific, США) по методике производителя.

Определение нуклеотидных последовательностей. Для секвенирования ДНК РВА по двум цепям использовали те же праймеры, что и для проведения ПЦР. Нуклеотидную последовательность определяли по методу Сэнгера при помощи секвенирования ПЦР-продукта с использованием набора Big Dye Terminator Cycle Se-

Таблица 1

Перечень праймеров, использованных в работе, для генотипирования штамма Wa PVA человека [46]

Название праймера	Последовательность праймера	Размер фрагмента, пар нуклеотидов
RotaVP7-F	ATGTATGGTATTGAATATACCAC	881
RotaVP7-R	AACYTGCCACCATTGTTTCC	
RotaVP4 Con3	TGGCTTCGCTCATTTATAGACA	876
RotaVP4 Con2	ATTTCGGACCATTATAACC	
RotaVP6-F	GACGGVGCRACTACATGGT	379
RotaVP6-R	GTCCAATTCATNCCTGGTGG	

quencing Kit (Applied Biosystems, США) согласно инструкции изготовителя. Электрофорез ДНК осуществляли на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

Анализ полученных нуклеотидных последовательностей проводили с помощью пакетов программ BioEdit (version 7.0.0) и программы SeqMap из пакета программ Lasergene (version 7.1.0).

Электрофорез и иммуноблоттинг. Анализ структурных белков антигена PVA проводили методом электрофореза в 12% полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (ПААГ-ДСН) по методу Laemmli (1970). Электрофорез проводили в пластинах ПААГ размером 70 × 100 × 0,75 см на приборе Mini-PROTEAN II (Bio-Rad, США) в восстанавливающих условиях при постоянном напряжении 200 V. Разделяющий гель содержал 12% акриламида, 0,5% N,N-метилен-бис-акриламида, 0,375 M трис-HCl (pH 8,8) и 0,1% ДСН. Фокусирующий гель содержал 4% акриламида, 10% N,N-метилен-бисакриламида в 0,125 M трис-HCl буфере (pH 6,8). Для полимеризации в оба геля вносили по 0,025% персульфата аммония и 0,075% TEMED. Электродный буфер содержал 0,025 M трис-HCl, 0,192 M глицина, pH 8,3 и 0,1% ДСН. Все испытываемые пробы содержали лизирующий буфер с восстановителем (0,125 M трис-HCl, pH 6,8, 5% ДСН, 0,5% β-меркаптоэтанол, 10,8% глицерина, 0,01% бромфенолового синего) и были прогреты в течение 5 минут при 100 °С. Заливку геля и подготовку аппарата для электрофореза к работе проводили согласно рекомендациям изготовителя. Белки в гелях окрашивали в течение 1 часа 0,1% раствором Кумасси ярко-голубого (СВВ R-350) в водном растворе, содержащем 10% уксусной кислоты и 30% метанола. Избыток красителя отмывали 10% раствором уксусной кислоты такое же время с несколькими его сменами. В качестве маркера молекулярной массы использовали коммерческий предокрашенный маркер 26619 (ThermoFisher Scientific, США).

Для определения антигенной активности структурных белков антигена PVA использовали иммуноблоттинг (ИБ). Для постановки ИБ белки после электрофоретического разделения не окрашивали, а переносили на нитроцеллюлозную мембрану Immobilon-NC (Millipore, США) в «полусухой» буферной системе (Kuhse-Andersen J., 1984) на приборе Bio-Rad (США) при постоянной силе тока 200 мА в течение 1 часа при комнатной температуре согласно методике производителя. Буфер для переноса содержал 0,025 M трис-HCl, 0,193 M глицина, 20% метанола (pH 8,35). Эффективность переноса оценивали после окраски одной мембраны-реплики 0,1% раствором амидо-черного, а соответствующего ей геля

– СВВ R-350. Иммунохимическое окрашивание полученных реплик осуществляли с помощью непрямого варианта ИФА с соблюдением всех его стадий. Несвязавшиеся с белками участки нитроцеллюлозы блокировали инкубированием в фосфатно-солевом буферном растворе с твином (ФСБТ), содержащем 3% Tor Block (Yugo, Швейцария) в течение 16 часов при +4 °С. После этого мембраны отмывали 4 раза в ФСБТ и 4 раза в фосфатно-солевом буферном растворе (ФСБ) и инкубировали с козьей антисывороткой к PVA меченой пероксидазой хрена, в разведении 1 : 500 и 1 : 2000 в течение 1 часа при 37 °С. Мембраны отмывали 4 раза в течение 10 мин ФСБТ. Визуализацию комплекса антиген–антитело проводили путем обработки мембраны 3,3'-диаминобензидином (0,05% раствор ФСБ с 0,01% H₂O₂) [47, 48].

Электрофорез итамов ротавируса. Электрофорез штаммов ротавируса включает в себя несколько этапов: выделение РНК из исследуемого материала, электрофорез в ПААГ, визуализацию РНК в геле. Экстракцию РНК осуществляли фенол/хлороформной смесью. Электрофорез проводили в ПААГ в системе буферных растворов с окрашиванием РНК нитратом серебра. На гель наносили 0,75 мкл РНК, предварительно обработанного 2-кратным диссоциирующим буфером и прогретого при 68 °С в течение 5 минут. Разделение материала проводили в 0,1% ПААГ в течение 16 часов при силе тока 12 мА, в присутствии 0,1% SDS, в стандартной триглицериновой системе. После электрофореза пластину трижды по 10 мин промывали от SDS раствором, содержащим 10% этанола и 0,3% уксусной кислоты. Затем помещали на 5 мин в 0,3% азотную кислоту. Окрашивали исследуемую РНК 0,2% раствором нитрата серебра в течение 30 мин. Для проявления полос окрашенной РНК использовали раствор, содержащий 0,2M карбоната натрия и 0,5% формальдегида. Фиксацию окрашенных полос РНК проводили 1% раствором уксусной кислоты.

Результаты

Для адаптации и изучения репродуктивной активности PVA была проведена сокультивация образцов PVA в присутствии трипсина с перевиваемыми клеточными линиями РК-15, СПЭВ, МА104 и MARC145. Наблюдение вели в течение 4–5 суток, отслеживая вирусиндуцированный цитолиз и цитопатическое действие (ЦПД) PVA в клеточном монослое.

На первом пассаже, который длился 5 суток, ЦПД вируса обнаружено не было. На втором пассажном уровне через 72 часа первые признаки ЦПД наблюдали на 20–40% площади монослоя клеточных линий МА104 и MARC145. ЦПД характеризовалось округлением клеток, образованием небольших конгломератов, от которых исходили тяжи. Через 96 часов после внесения вирусного материала, ЦПД вируса охватило уже почти всю площадь клеточного монослоя (80–90%). На 5-е сутки сокультивации наблюдалась дегенерация клеточного монослоя и отторжения клеток от пластика, как в случае с МА104, так и в случае с MARC145. После 5 последовательных пассажей ЦПД PVA в культурах клеток РК-15 и СПЭВ обнаружено не было. Поэтому для дальнейшей работы по изучению репликативной активности и цитопатогенности PVA использовали клеточные линии МА104 и MARC145, в которых впоследствии было проведено 20 последовательных пассажей вируса. Результаты по определению инфекционной активности PVA в пробах 2–20 пассажей приведены в табл. 2.

Таблица 2

Репродукция аттенуированного штамма Wa PBA человека в перевиваемых культурах клеток MA-104 и MARC-145*

№ Пассажа	Культура клеток	
	MA-104	MARC-145
	Инфекционная активность, lg ТЦИД _{50/мл}	
2	4,50	5,50
3	4,66	5,50
4	5,50	6,00
5	5,50	6,23
6	5,66	6,33
7	5,76	6,50
8	5,83	6,50
9	6,00	6,50
10	6,00	6,66
11	6,48	6,76
12	6,50	7,00
13	6,50	7,23
14	6,50	7,23
15	6,66	7,33
16	6,66	7,50
17	6,66	7,50
18	6,66	7,66
19	6,66	7,50
20	6,50	7,50

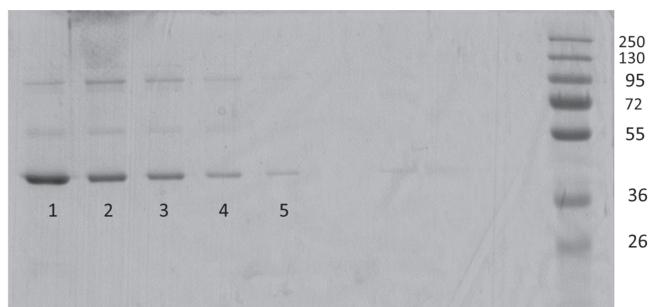
Примечание. * Приведены среднегеометрические значения трех повторностей; ** – максимальное значение инфекционного титра вируса (выделено серым).

Как видно из данных табл. 2 в процессе пассирования PBA в культурах клеток MA104 и MARC145 наблюдалось постепенное увеличение инфекционной активности вируса. Максимальное значение инфекционного титра PBA было зафиксировано в пробах 18 пассажа. При этом в культуре клеток MARC145 он был на один логарифм выше, чем в культуре клеток MA104. Полученные данные свидетельствуют о том, что произошла адаптация исследуемого нами штамма PBA к перевиваемой клеточной линии MARC145. Проба с титром 7,66 lg ТЦИД_{50/мл} была использована для получения очищенного препарата PBA, ПЦР и секвенирования.

Далее, в результате используемой технологии концентрирования и очистки культурального вируса был получен электрофоретически чистый препарат антигена PBA с концентрацией белка 1 мг/мл, (рис. 1). Наличие PBA в пробах исходного и очищенного препаратов было подтверждено методами ИФА и ОТ-ПЦР.

Результаты иммуноблоттинга по определению антигенной активности структурных белков антигена PBA показали, что используемая поликлональная гипериммунная сыворотка давала видимую специфическую полосу окрашивания в области 41 кДа, что соответствует молекулярной массе белка VP6 вируса (рис. 2). Проведенный электрофорез для типирования PBA, основанный на анализе профиля распределения 11 сегментов двунитевой РНК ротавирусного генома показал, что штамм Wa G1P[8] PBA человека имел распределение сегментов, типичное для PBA (рис. 3).

Определение специфической и видовой принадлежности штамма PBA проводили методами ПЦР и секвенирования. При определении идентичности исследуемого



1-5 – двукратные разведения очищенного ротавируса, начиная с исходного.

Рис. 1. Электрофоретический анализ структурного состава белков штамма Wa PBA человека.

1-5 – двукратные разведения очищенного ротавируса начиная с исходного.

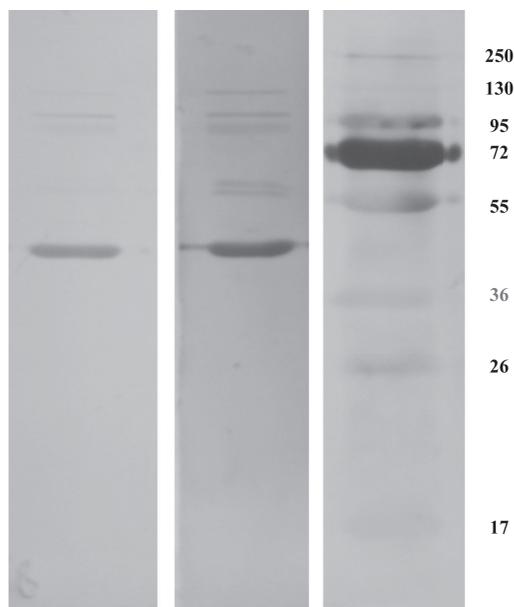


Рис. 2. Определение антигенной активности белков штамма Wa PBA человека в иммуноблоттинге с конъюгированной PBA-специфической антисывороткой козы.

1 – разведение конъюгата 1 : 2000; 2 – разведение конъюгата 1 : 500.

нами штамма PBA человека последовательность, установленную при секвенировании фрагмента, полученного в ПЦР, сравнивали с нуклеотидными последовательностями области генома штамма вируса из биоинформационной системы GenBank. Анализ полученных результатов показал, что адаптированный нами к репликации в клеточной линии MARC145 вирус не отличался от исходного штамма PBA человека группы A Wa G1P[8].

Обсуждение

Характеристика биологических и генетических свойств штаммов PBA человека представляет большой интерес для понимания эпидемиологического процесса и поиска средств борьбы с этой инфекцией, а также для создания и оценки эффективности кандидатных вакцинных препаратов. В настоящее время на мировом рынке доступны 2 вакцины на основе живого аттенуированного штамма PBA. Различия между существующими вакцина-

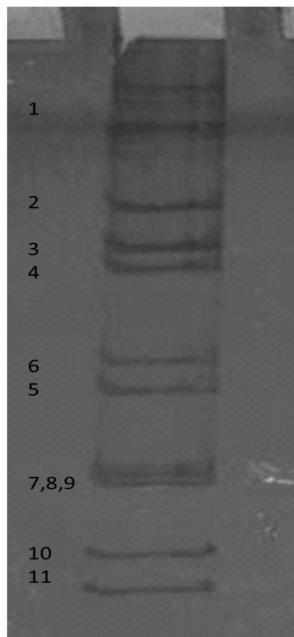


Рис. 3. Распределение сегментов РНК генома штамма Wa РВА человека.

ми заключаются в рекомендуемом режиме вакцинации и антигенном составе. Моновалентная вакцина создана на основе аттенуированного человеческого штамма РВ G1P1A[8]. В состав пентавалентной вакцины входит бычий РВ штамма SW3 генотипа (G6P7[5]), дополненный генами G1, G2, G3, G4 и P1A[8] человека. Анализ результатов применения вакцин показал эффективность моно- и пентавалентных ротавирусных препаратов против тяжелых форм ротавирусного гастроэнтерита, в частности, снижение числа случаев смерти от ротавирусного гастроэнтерита. В зависимости от типа вакцин эффективность значительно не различалась. Так, например, эффективность моновалентной вакцины в странах с низкой, средней и высокой детской смертностью составила 84%, 75% и 57% соответственно. Поливалентная вакцина обеспечила защиту от РВИ на 90% в странах с низким уровнем смертности и на 45% - в странах с высоким уровнем детской смертности. В состав моновалентной вакцины входит всего один серотип РВ, но на иммуногенность и уровень защиты это не влияет [27,31]. В связи с этим, предпосылкой для создания новых кандидатных вакцин, является использование человеческого штамма РВА с высокой инфекционной активностью, циркулирующего на территории их применения.

В результате сравнения различных вариантов заражения ротавирусом клеточных культур РК-15, СПЭВ, МА104 и MARC145, исследования кинетики накопления вируса на различных культурах, а также проведения серии пассажей РВА Wa, было установлено, что оптимальное накопление вируса происходит на клеточной культуре MARC145, которая не является часто используемой для накопления РВА клеточной линией. Для наращивания РВА Wa обычно используют культуру клеток МА104, однако нам удалось получить более высокие титры вируса на культуре клеток MARC145. Таким образом, РВА Wa был адаптирован к культивированию на новой клеточной линии, позволяющей повысить накопление вируса по

сравнению с обычным наращиванием на МА104.

Учитывая высокую степень изменчивости РНК-генома ротавирусов, было крайне важно убедиться, что в процессе пассирования на новой для него культуре клеток, РВА Wa сохранил свои молекулярно-биологические свойства. Для этого нами было проведено определение нуклеотидной последовательности фрагментов генома РВА Wa. Полученные данные свидетельствуют о том, что вирус сохранил свои свойства, не изменившись в процессе пассирования на культуре клеток MARC145.

Идентичность культивируемого нами вируса РВА была так же подтверждена методами электрофореза в ПААГ-ДСН и РНК-электрофореза с окрашиванием сегментов вирусного генома. По структурному составу вирусных белков и сегментов вирусного генома культивируемый нами штамм соответствовал РВА, а белок VP6 вируса специфически взаимодействовал с РВА-положительной антисывороткой в ИБ.

Заключение

Таким образом, резюмируя полученные результаты и имеющиеся данные, можно сделать общее заключение о том, что исследуемый нами штамм вируса демонстрирует все свойства, характерные для РВА, не претерпел изменений по сравнению с исходным штаммом РВА Wa, имеет высокую биологическую активность при культивировании в клеточной линии MARC145. На фоне успешного опыта применения моновалентной вакцины Rotarix в десятках стран и успешных испытаний моновалентной вакцины Rotavac в Индии, можно рассматривать адаптированный нами к культуре клеток MARC145 аттенуированный РВА Wa как потенциальный кандидатный штамм для разработки отечественной моновалентной живой аттенуированной вакцины против РВИ.

Финансирование. Публикация подготовлена при поддержке Программы «5-100».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1, 2, 4-6, 9, 11-14, 16-22, 25, 26, 28-48 см. REFERENCES)

- Алексеев К.П., Кальнов С.Л., Гребенникова Т.В., Алипер Т.И. Ротавирусная инфекция человека. Стратегии вакцинопрофилактики. *Вопросы вирусологии.* 2016; 61(3): 154-9.
- Колпаков С.А., Колпакова Е.П. Адаптация штаммов ротавируса человека группы А и репродукция на перевиваемых культурах клеток. *Вопросы вирусологии.* 2017; 62(3): 138-43.
- Бахтияров Г.Н., Лободанов С.А., Марова А.А., Мескина Е.Р., Зверев В.В., Файзулов Е.Б. Определение генетической структуры ротавирусов группы А, циркулирующих в Московском регионе, методом ПЦР в режиме реального времени. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2012; 67(3): 35-9.
- Лукьянова А.М., Бехтерева М.К., Птичникова Н.Н. Клинико-эпидемиологическая характеристика вирусных диарей у детей. *Журнал инфектологии.* 2014; 6(1): 60-6.
- Кондакова О.А., Никитин Н.А., Трифонова Е.А., Атабеков И.Г., Карпова О.В. Вакцины против ротавируса: новые стратегии и разработки. *Вестник Московского университета. Серия 16. Биология.* 2017; 72(4): 199-208.
- Зайцева Е.В., Ольнева Т.А., Кулешов К.В., Подколзин А.Т., Шипулин Г.А., Кондратьева Л.М. и др. Результаты мониторинга антигенных типов ротавирусов гр. А на территории Российской Федерации в период 2011—2015 гг. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2016; 61(7): 445-8. doi: 10.18821/0869-2084-2016-61-7-445-448
- Денисюк Н.Б. Генетическая характеристика ротавирусов группы А, циркулирующих в Оренбургском регионе в сезон 2016—2017 гг. *Детские инфекции.* 2017; 16(4): 42-5.
- Баранов А.А., Намазова-Баранова Л.С., Таточенко В.К., Вишнёва Е.А., Федосеев М.В., Селимзянова Л.Р. и др. Ротавирусная инфекция у детей — нерешенная проблема. Обзор рекомендаций по вакцинопрофилактике. *Педиатрическая фармакология.* 2017; 14(4): 248-57. doi:10.15690/pf.v14i4.1756

REFERENCES

- Walker C.L.F., Rudan I., Liu L., Nair H., Theodoratou E., Bhutta Z.A., et al. Global burden of childhood pneumonia and diarrhoea. *Lancet*. 2013; 381(9875): 1405-16. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60222-6
- Liu L., Oza S., Hogan D., Perin J., Rudan I., Lawn J.E., et al. Global, regional, and national causes of child mortality in 2000–13, with projections to inform post-2015 priorities: an updated systematic analysis. *Lancet*. 2015; 385(9966): 430-40. doi: 10.1016/S0140-6736(14)61698-6
- Alekseev K.P., Kal'nov S.L., Grebennikova T.V., Aliper T.I. Human rotavirus infection. Strategies for the vaccinal prevention. *Voprosy virusologii*. 2016; 61(3): 154-9. (in Russian)
- Sanderson C., Clark A., Taylor D., Bolanos B. Global review of rotavirus morbidity and mortality data by age and region. WHO; 2011. Available at: https://www.who.int/immunization/sage/meetings/2012/april/Sanderson_et_al_SAGE_April_rotavirus.pdf
- Tate J.E., Burton A.H., Boschi-Pinto C., Parashar U.D. Global, regional, and national estimates of rotavirus mortality in children <5 years of age, 2000–2013. *Clin. Infect. Dis.* 2016; 62(Suppl. 2): S96-S105. doi: 10.1093/cid/civ1013
- Gurwith M., Wenman W., Hinde D., Feltham S., Greenberg H. A prospective study of rotavirus infection in infants and young children. *J. Infect. Dis.* 1981; 144(3): 218-24.
- Kolpakov S.A., Kolpakova E.P. Adaptation of human rotavirus strains of group A to the reproduction in passaged cell cultures. *Voprosy virusologii*. 2017; 62(3): 138-43. (in Russian)
- Bakhtoyarov G.N., Lobodanov S.A., Marova A.A., Meskina E.R., Zverev V.V., Fayzuloev E.B. Determination of the Genetic Structure of Group A Rotaviruses Circulating in the Moscow Region, by PCR in Real Time. *Epidemiologiya i vaksinooprofilaktika*. 2012; 67(3): 35-9. (in Russian)
- Crawford S.E., Ramani S., Tate J.E., Parashar U.D., Svensson L., Hagbom M., et al. Rotavirus infection. *Nat. Rev. Dis. Primers*. 2017; 3: 17083. doi: 10.1038/nrdp.2017.83
- Luk'yanova A.M., Bekhtereva M.K., Ptichnikova N.N. Clinical and epidemiological characteristic viral diarrhea in children. *Zhurnal infektologii*. 2014; 6(1): 60-6. (in Russian)
- Kotloff K.L., Nataro J.P., Blackwelder W.C., Nasrin D., Farag T., Panchalingam S., et al. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the global multicenter study, GEMS): a prospective, case control study. *Lancet*. 2013; 382(9888): 209-22. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60844-2
- Matthijnsens J., Otto P.H., Ciarlet M., Desselberger U., Van Ranst M., Johne R. VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. *Arch. Virol.* 2012; 157(6): 1177-82. doi: 10.1007/s00705-012-1273-3
- Bhat S., Kattoor J., Malik Y., Sircar S., Deol P., Rawat V., et al. Species C Rotaviruses in Children with Diarrhea in India, 2010-2013: A Potentially Neglected Cause of Acute Gastroenteritis. *Pathogens*. 2018; 7(1): 1-14. doi: 10.3390/pathogens7010023
- Estes M.K., Greenberg H.B. Rotaviruses. In: Knipe D.M., Howley P.M., eds. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins; 2013: 1347-401.
- Kondakova O.A., Nikitin N.A., Trifonova E.A., Atabekov I.G., Karpova O.V. Rotavirus vaccines: new strategies and approaches. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 16. Biologiya*. 2017; 72(4): 199-208. (in Russian)
- Parashar U.D., Hummelman E.G., Bresee J.S., Miller M.A., Glass R.I. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg. Infect. Dis.* 2003; 9(5): 565-72.
- Walker C.L., Taneja S., LeFevre A., Black R.E., Mazumder S. Appropriate Management of Acute Diarrhea in Children Among Public and Private Providers in Gujarat, India: A Cross-Sectional Survey. *Glob. Health Sci. Pract.* 2015; 3(2): 230-41. doi: 10.9745/GHSP-D-14-00209
- Rotavirus Classification Working Group: RCWG. KU Leuven Laboratory of Viral Metagenomics. 2017. Available at: <https://rega.kuleuven.be/cev/viralmetagenomics/virus-classification/rcwg>
- Matthijnsens J., Bilcke J., Ciarlet M., Martella V., Banyai K., Rahman M., et al. Rotavirus disease and vaccination: impact on genotype diversity. *Future Microbiol.* 2009; 4(10): 1303-16. doi: 10.2217/fmb.09.96
- Santos N., Hoshino Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev. Med. Virol.* 2005; 15(1): 29-56. doi: 10.1002/rmv.448
- Gentsch J.R., Laird A.R., Bielfelt B., Griffin D.D., Banyai K., Ramachandran M., et al. Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs. *J. Infect. Dis.* 2005; 192(Suppl. 1): S146-59. doi: 10.1086/431499
- Matthijnsens J., Heylen E., Zeller M., Rahman M., Lemey P., Van Ranst M. Phylogenetic analyses of rotavirus genotypes G9 and G12 underscore their potential for swift global spread. *Mol. Biol. Evol.* 2010; 27(10): 2431-6. doi: 10.1093/molbev/msq137
- Zaytseva E.V., Of'neva T.A., Kuleshov K.V., Podkolzin A.T., Shipulin G.A., Kondrat'eva L.M., et al. The results of monitoring of antigen types of rotaviruses of group A on the territory of the Russian Federation in 2011-2015. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2016; 61(7): 445-8. doi: 10.18821/0869-2084-2016-61-7-445-448 (in Russian)
- Denisyuk N.B. Genetic characteristics of Group A rotaviruses circulating in the Orenburg region in season 2016-2017. *Detskije infektsii*. 2017; 16(4): 42-5. (in Russian)
- Zhang J., Liu H., Jia L., Payne D.C., Hall A.J., Xu Z., et al. Active, population-based surveillance for rotavirus gastroenteritis in Chinese children: Beijing Municipality and Gansu Province, China. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2015; 34(1): 40-6. doi: 10.1097/INF.0000000000000505
- Liu N., Xu Z., Li D., Zhang G., Wang H., Duan Z.J. Update on the disease burden and circulating strains of rotavirus in China: a systematic review and meta-analysis. *Vaccine*. 2014; 32(35): 4369-75. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.06.018
- Baranov A.A., Namazova-Baranova L.S., Tatochenko V.K., Vishneva E.A., Fedoseenko M.V., Selimzyanova L.R., et al. Rotavirus Infection in Children is an Unsolved Problem Review of Guidelines for Vaccinal Prevention. *Pediatricheskaya farmakologiya*. 2017; 14(4): 248-57. <https://doi.org/10.15690/pf.v14i4.1756> (in Russian)
- Xue M., Yu L., Che Y., Lin H., Zeng Y., Fang M., et al. Characterization and protective efficacy in animal model of novel truncated rotavirus VP8 subunit parenteral vaccine candidate. *Vaccine*. 2015; 33(22): 2606-13. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.03.068
- World Health Organization. Information sheet. Observed rate of vaccine reactions – Rotavirus Vaccine. 2018. Available at: https://www.who.int/vaccine_safety/initiative/tools/Rotavirus_vaccine_rates_information_sheet_0618.pdf
- Rippinger C.M., Patton J.T., McDonald S.M. Complete genome sequence analysis of candidate human rotavirus vaccine strains RV3 and 116E. *Virology*. 2010; 405(1): 201-13. doi: 10.1016/j.virol.2010.06.005
- Desselberger U. Rotaviruses. *Virus Res.* 2014; 190: 75-96. doi: 10.1016/j.virusres.2014.06.016
- WHO. Rotavirus vaccines: an update. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 2012; 84(51-52): 533-37.
- Bucardo F., Rippinger C.M., Svensson L., Patton J.T. Vaccine-derived NSP2 segment in rotaviruses from vaccinated children with gastroenteritis in Nicaragua. *Infect. Genet. Evol.* 2012; 12(6): 1282-94. doi: 10.1016/j.meegid.2012.03.007
- Hemming M., Vesikari T. Detection of rotateq vaccine-derived, double-reassortant rotavirus in a 7-year-old child with acute gastroenteritis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2014; 33(6): 655-6. doi: 10.1097/INF.0000000000000221
- Soma J., Tsunemitsu H., Miyamoto T., Suzuki G., Sasaki T., Suzuki T. Whole-genome analysis of two bovine rotavirus C strains: Shintoku and Toyama. *J. Gen. Virol.* 2013; 94(Pt. 1): 128-35. doi: 10.1099/vir.0.046763-0
- Ward L.A., Rosen B.I., Yuan L., Saif L.J. Pathogenesis of an attenuated and a virulent strain of group A human rotavirus in neonatal gnotobiotic pigs. *J. Gen. Virol.* 1996; 77(Pt. 7): 1431-41. doi: 10.1099/0022-1317-77-7-1431
- Ghosh S., Alam M.M., Ahmed M.U., Talukdar R.I., Paul S.K., Kobayashi N. Complete genome constellation of a caprine group A rotavirus strain reveals common evolution with ruminant and human rotavirus strains. *J. Gen. Virol.* 2010; 91(Pt. 9): 2367-73. doi: 10.1099/vir.0.022244-0
- Azevedo M.P., Vlasova A.N., Saif L.J. Human rotavirus virus-like particle vaccines evaluated in a neonatal gnotobiotic pig model of human rotavirus disease. *Expert Rev. Vaccines*. 2013; 12(2): 169-81. doi: 10.1586/erv.13.3
- Friess A.E., Sinowatz F., Skolek-Winnisch R., Trütner W. The placenta of the pig. II. The ultrastructure of the areolae. *Anat. Embryol. (Berl.)* 1981; 163(1): 43-53.
- Lala P.K., Chatterjee-Hasrouni S., Kearns M., Montgomery B., Colavincenzo V. Immunobiology of the feto-maternal interface. *Immunol. Rev.* 1983; 75: 87-116.
- Yuan L., Ward L.A., Rosen B.I., To T.L., Saif L.J. Systematic and intestinal antibody-secreting cell responses and correlates of protective immunity to human rotavirus in a gnotobiotic pig model of disease. *J. Virol.* 1996; 70(5): 3075-83.
- Burns J.W., Krishnaney A.A., Vo P.T., Rouse R.V., Anderson L.J., Greenberg H.B. Analyses of homologous rotavirus infection in the mouse model. *Virology*. 1995; 207(1): 143-53. doi: 10.1006/viro.1995.1060
- Ciarlet M., Conner M.E., Finegold M.J., Estes M.K. Group A rotavirus infection and age-dependent diarrheal disease in rats: a new animal model to study the pathophysiology of rotavirus infection. *J. Virol.* 2002; 76(1): 41-57.
- Wyatt R.G., James W.D., Bohl E.H., Theil K.W., Saif L.J., Kalica A.R., et al. 1980. Human rotavirus type 2: cultivation in vitro. *Science*. 1980; 207(4427): 189-91.
- Bohl E.H., Salt L.J., Theil K.W., Agnes A.G., Cross R.F. Porcine parrotrotavirus: detection, differentiation from rotavirus, and pathogenesis in gnotobiotic pigs. *J. Clin. Microbiol.* 1982; 15(2): 312-9.
- WHO. Manual of rotavirus detection and characterization methods. 2009. Available at: https://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/vpd/surveillance_type/sentinel/WHO_IVB_08.17_eng.pdf
- Kyhse-Andersen J. Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods*. 1984; 10(3-4): 203-9.
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259): 680-5.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Ракитянская И.А.¹, Рябова Т.С.^{1,2}, Калашникова А.А.³

ВЛИЯНИЕ ИНГАРОНА НА ДИНАМИКУ ПРОДУКЦИИ ИНТЕРФЕРОНА- α И - γ И НА ПРОЯВЛЕНИЕ КЛИНИЧЕСКИХ СИМПТОМОВ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ ВИРУСНОЙ ЭПШТЕЙНА-БАРР ИНФЕКЦИЕЙ

¹ Амбулаторное отделение аллергологии-иммунологии и клинической трансфузиологии ГБУЗ ГП 112, 195427, г. Санкт-Петербург, Россия;

² ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Минобороны России, 194044, г. Санкт-Петербург, Россия;

³ ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова» МЧС России, 194044, г. Санкт-Петербург, Россия

Введение. У больных с хронической герпесвирусной инфекцией развиваются нарушения продукции интерферона-альфа (TNF- α) и - γ вследствие вторичного иммунодефицита, что приводит к нарушению элиминации внутриклеточного вируса и развитию хронической рецидивирующей инфекции. Показано, что IFN- γ является мощным иммунорегуляторным цитокином, оказывает противовирусный эффект. **Цель исследования** – изучение влияния терапии препаратом ингарон на динамику продукции IFN- α и - γ и клиническую картину у больных хронической вирусной Эпштейна-Барр инфекцией (ХВЭБИ). **Материал и методы.** Обследованы 32 больных ХВЭБИ (22 женщины, 10 мужчин). Средний возраст больных 35,06 \pm 1,60 года. Определяли сывороточную, спонтанную и индуцированную продукцию цитокинов TNF- α и - γ в сыворотке и в культуре лимфоцитов. В качестве индуктора продукции IFN- α использовали вирус болезни Ньюкасла (NDV), полученный в ГИСК им. Л.А. Тарасевича (Санкт-Петербург), с инфекционным титром 8 Ig ЭИД/0,2 мл в объеме 8 мкл на лунку, в качестве индуктора продукции IFN- γ применяли фитогемагглютинин («ПанЭко», Россия) в дозе 10 мкг/мл. Содержание цитокинов определяли в сыворотке и надосадочной жидкости 24-часовой культуры цельной крови с помощью твердофазного иммуноферментного анализа с использованием тест-систем («Вектор Бест», Россия). **Результаты.** Показано, что после терапии ингароном у больных с исходно высоким уровнем индуцированного IFN- γ (4435,64 \pm 1343,50 пг/мл) содержание IFN- γ снизилось ($p = 0,013$), а с исходно низким уровнем индуцированного IFN- γ (234,25 \pm 34,31 пг/мл) – увеличилось ($p = 0,002$). Также ингарон приводит к повышению спонтанной и сывороточной продукции IFN- γ у больных. **Выводы.** Применение ингарона при ХВЭБИ показано независимо от исходной продукции индуцированного TNF- γ в культуре лимфоцитов. Ингарон рекомендован для терапии больных ХВЭБИ в дозе 500 000 МЕ при курсовой дозе 10 инъекций и более.

Ключевые слова: вирус Эпштейна-Барр; T- и B-клетки; иммунитет; интерферон- γ ; терапия.

Для цитирования: Ракитянская И.А., Рябова Т.С., Калашникова А.А. Влияние ингарона на динамику продукции интерферона- α и - γ и на проявление клинических симптомов у больных хронической вирусной Эпштейна-Барр инфекцией. *Вопросы вирусологии*. 2019; 64(1):23-29. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-1-23-29>

Rakityanskaya I.A.¹, Ryabova T.S.^{1,2}, Kalashnikova A.A.³

INFLUENCE OF INGARON ON THE DYNAMICS OF INTERFERON- α AND - γ PRODUCTION AND ON THE MANIFESTATION OF CLINICAL SYMPTOMS IN PATIENTS WITH CHRONIC VIRUS EPSTEIN-BARR INFECTION

¹ Outpatient Department of Allergology-Immunology and Clinical Transfusiology City Ambulant Department №112, St. Petersburg, 195427, Russian Federation;

² Military Medical Academy named after S.M. Kirov, St. Petersburg, 194044, Russian Federation;

³ The Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg, 194044, Russian Federation

Introduction. Patients with chronic herpes virus infection develop impaired IFN- α and IFN- γ products due to secondary immunodeficiency, which leads to impaired elimination of the intracellular virus and the development of chronic recurrent infection. It has been shown that IFN- γ is a potent immunoregulatory cytokine and has an antiviral effect. The **aim** of the study is to study the effect of Ingaron therapy on the dynamics of IFN- α and IFN- γ production and the clinical picture in patients with chronic Epstein-Barr virus infection (ChEBVI). **Material and methods.** 32 patients with ChEBVI were examined. The average age of patients was 35.06 \pm 1.60 years. There were 22 women, 10 men. Serum IFN- α and IFN- γ , spontaneous and induced cytokine production in blood lymphocyte cultures were determined. As an inducer of IFN- α products, the Newcastle disease virus was used (obtained in the LA Tarasevich State Medical Institute, St. Petersburg) with an infectious titer of 8 Ig EID / 0.2 ml in a volume of 8 μ l per well, as an inducer of IFN- γ products, phytohemagglutinin (PanEco, Russia) was used at a dose of 10 μ g / ml. The quantitative content of cytokines was determined in the serum and supernatant of a 24-hour whole blood culture using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using test systems (Vector Best, Russia). **Results.** It was shown that the content of IFN- γ decreased ($P = 0.013$) after Ingaron therapy in patients with initially high levels of induced IFN- γ (4435.64 \pm 1343.50 pg/ml). In patients with initially low levels of induced IFN- γ (234.25 \pm 34, 31 pg / ml) the content of IFN- γ increased ($P = 0.002$). Ingaron leads to an increase in spontaneous and serum IFN- γ production in patients. **Conclusions.** Conducting Ingaron therapy with ChEBVI is shown independently of the initial production of IFN- γ -induced lymphocyte culture. Ingaron is recommended for the treatment of patients with ChEBVI at a dose of 500,000 IU with a course dose of 10 or more injections.

Keywords: Epstein-Barr virus; T and B cells; immunity; interferon-gamma; therapy.

For citation: Rakityanskaya I.A., Ryabova T.S., Kalashnikova A.A. Influence of ingaron on the dynamics of interferon- α and - γ production and on the manifestation of clinical symptoms in patients with chronic virus Epstein-Barr infection. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2019; 64(1): 23-29. (In Russ.).

Для корреспонденции: Ракитянская Ирина Анисимовна, д-р мед. наук, профессор амбулаторного отделения аллергологии-иммунологии и клинической трансфузиологии ГБУЗ ГП 112, 195427, г. Санкт-Петербург. E-mail: tat-akyla@inbox.ru

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-1-23-29>

For correspondence: Irina A. Rakityanskaya, doctor of medical sciences, professor of outpatient department of allergology-immunology and clinical transfusiology of the City Polyclinic 112 of St. Petersburg, 195427, Russian Federation.
E-mail: tat-akyla@inbox.ru

Information about authors:Rakityanskaya I.A., <https://orcid.org/0000-0003-2524-4602>Riabova T.S., <https://orcid.org/0000-0001-9543-9646>**Acknowledgment.** The study had no sponsorship.**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 05 June 2018

Accepted 19 June 2018

Первичная вирусная Эпштейна–Барр (ВЭБ) инфекция обычно протекает бессимптомно, но иногда приводит к развитию инфекционного мононуклеоза, который спонтанно разрешается после формирования специфического ВЭБ-иммунитета. У иммунокомпетентных лиц иногда (возможно, при первичном инфицировании) ВЭБ вызывает рецидивирующие инфекционные мононуклеозоподобные симптомы, которые сопровождаются повышенными титрами вирус-специфических анти-ВЭБ-антител [1]. В анамнезе у этих больных нет предшествующих иммунологических нарушений или каких-либо других недавно перенесенных инфекций, которые могут объяснить их состояние [2]. В 1983 г. D. Hellmann и соавт. впервые предложили аббревиатуру для этого синдрома «хроническая активная ВЭБ-инфекция» (Chronic Active EBV infection – CAEBV) – ХА ВЭБИ [3]. В работе J.H. Jopcas и соавт. [4] описано благоприятное течение и хороший прогноз этого заболевания.

После первичной инфекции развивается латентная стадия и вирус сохраняется в ядре покоящихся В-клеток памяти в скрытой эписомальной форме, экспрессируя только ограниченный набор генов, включая ядерный антиген ВЭБ (EBNA-1). Таким образом, В-клетки памяти представляют собой место долговременной вирусной персистенции, где ВЭБ может сохраняться длительное время не являясь патогенным для человека, так как не экспрессирует гены, которые способствуют пролиферации клеток, а иммунологическая память сохраняется всю жизнь. Эти клетки используют программу транскрипции, которая называется программой латентности и отражает их роль в латентной персистенции [5]. Латентное течение может переходить в стадию реактивации ВЭБ и вхождение в литический активный цикл, который включает репликацию вирусного генома и экспрессию вирусных генов. Биологическое поведение ВЭБ заключается в том, что он инициирует, устанавливает и поддерживает персистирующую инфекцию путем использования различных аспектов нормальной биологии В-клеток и эволюционирует, нарушая нормальное поведение инфицированных В-клеток. У иммунокомпетентных лиц иммунный ответ способен контролировать ВЭБ-инфекцию, при этом центральным медиатором клеточно-опосредованного иммунитета признан интерферон-гамма (TNF- γ) [6]. Показано, что реактивация и генерализация ВЭБ-инфекции предположительно индуцирует экспрессию гомологичного вирусного интерлейкина-10 (IL-10) литического цикла, который подобен человеческому IL-10, ингибирует синтез TNF- γ и подавляет активность цитотоксических клеток, которые могут способствовать нарушению цитокиновой реакции [7].

У больных ВЭБ-инфекцией повышен иммунный ответ за счет взаимодействия между эпителиальными клетками, дендритными клетками, NK-клетками и В-лимфоцитами.

Вирус, находясь в латентной форме, приводит к развитию хронической низкоуровневой активации иммунной системы, что сопровождается продукцией IFN- γ и фактора некроза опухоли альфа (TNF- α) в ответ на частую, но субклиническую реактивацию вируса [8]. По-видимому, активация иммунной системы может быть обусловлена либо хронической презентацией вирусных антигенов, либо трансактивацией суперантигена, кодируемого эндогенным ретровирусом человека HERV-K18, более того, трансактивация зависит от белков латентного цикла ВЭБ [9]. А активность суперантигена зависит от основного транскрибирующего ВЭБ-латентного гена EBNA-2, который активирует большинство других латентных генов ВЭБ. ВЭБ-специфический ответ Т-лимфоцитов формируется через 90–180 дней после начала заболевания (цитотоксичность, ограниченная антигенами лейкоцитов против ВЭБ-инфицированных В-клеток). Таким образом, развитие специфического цитотоксического ответа является постепенным и медленным процессом.

При хронической ВЭБ-инфекции (ХВЭБИ) происходит клональная экспансия ВЭБ-инфицированных Т- или NK-клеток, которые экспрессируют ограниченный спектр вирусных антигенов. ВЭБ-инфицированные В-клетки экспрессируют не менее 9 антигенов, некоторые из них обладают выраженной иммуногенностью и презентированы цитотоксическим Т-лимфоцитам. При анализе экспрессии вирусного генома в ВЭБ-ассоциированных опухолях было выделено 3 типа латентной инфекции. При 1-м типе экспрессируются только кодируемые ВЭБ РНК (EBER-1 и EBER-2), а также BART и EBNA1, экспрессии других латентных белков нет. При 2-м типе, кроме вирусных РНК (EBER, BART) и EBNA1, дополнительно экспрессируются 3 мембранных белка: LMP1, LMP2A, LMP2B. 3-й тип характеризуется экспрессией практически всех белков латентной инфекции, ядерных и мембранных: EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C и LMP1, LMP2. ВЭБ-инфицированные клетки могут уклоняться от иммунного ответа с помощью цитотоксических Т-лимфоцитов, поэтому клетки могут пролиферировать и способствовать развитию хронической инфекции [10].

При снижении вирусной нагрузки параллельно происходит уменьшение содержания субпопуляций CD8⁺, в частности HLA-DR⁺, CD45RO⁺ и ВЭБ-специфических Т-клеток. Показано, что именно 60% субпопуляции CD45RO⁺CD8⁺ Т-клеток способны продуцировать INF- γ [11]. У больных Т- или NK-клеточной ХА ВЭБИ в плазме повышено содержание INF- γ , IL-1 β , IL-10. А у больных с В-клеточной ХА ВЭБИ – повышено содержание INF- γ и TNF- α . Эти данные свидетельствуют о развитии у больных неустойчивого цитокинового профиля [11].

IFN- γ плейотропный цитокин, который участвует в регуляции почти всех фаз иммунновоспалительных реакций, включая активацию и дифференцировку Т-, В- и

НК-клеток, макрофагов и других, организует множественные клеточные программы посредством транскрипционного контроля над большим количеством генов [12, 13]. При активации почти все CD8⁺ Т-клетки, НК-клетки и Th1-лимфоциты продуцируют INF- γ . НК-клетки лизируют ВЭБ-инфицированные клетки и продуцируют INF- γ , в результате активируются макрофаги. INF- γ активирует нейтрофилы и стимулирует цитокиновую активность НК-клеток. Эффекты, индуцированные INF- γ , приводят к усилению иммунного надзора.

Биологическая активность INF- γ начинается со связывания с его рецептором, который состоит из 2 лиганд-связывающих цепей INF- γ R1, экспрессия которых постоянно высокая и 2 сигнально-трансформирующих цепей INF- γ R2, уровень экспрессии которых определяется типом клетки и активационным статусом клетки. Первоначально INF- γ связывается с INF- γ R1, а образованный комплекс INF- γ /INF- γ R1 облегчает его связывание с INF- γ R2, далее инициируются события сигнального нисходящего пути [14]. Формирование лиганд-рецепторного комплекса позволяет Janus активированной киназе 1 (janus activated kinase – JAK1) конститутивно связывать INF- γ R1, а JAK2 связывает INF- γ R2 через N-концевые домены для трансактивации друг друга. Далее JAK1 в каждой цепи INF- γ R1s фосфорилирует остаток тирозина, образуя участок стыковки с преобразователем сигнала и активатором транскрипции 1 (signal transducer and activator of transcription – STAT1), который затем фосфорилирует JAK и формирует димер STAT1 α . Фосфорилированный STAT1 α (pSTAT1 α) диссоциирует из INF- γ R1, транслицируется в ядро клетки через собственную ядерную локализационную последовательность (nuclear localization sequence – NLS), инициирует транскрипцию генов-мишеней, вовлеченных в клеточный ответ на данный стимул [15].

В результате активации генов начинается формирование клеточного иммунного ответа на вирусную инфекцию. Путь JAK/STAT является основным сигнальным путем, инициированным стимуляцией INF- γ . Однако классическая модель JAK/STAT не объясняет основы или механизм движения JAK2 от INF- γ R2 до INF- γ R1 за пределами взаимодействия INF- γ с внеклеточным доменом INF- γ R1. Рецепторная субъединица INF- γ INF- γ R1 и STAT1 α были связаны с элементом INF- γ -активированной последовательности (INF-gamma activated sequence - GAS) в промоторе 2 генов, стимулированных INF- γ . В случае ингибирования функций молекул STAT1 вирусами, INF- γ сам может индуцировать неканонический путь передачи сигналов. Таким образом, INF- γ вместе с одной из его рецепторных субъединиц INF- γ R1 и pSTAT1 транслицируется в цитоплазматический домен в сочетании с эндоцитозом и индуцирует экспрессию гена путем связывания с элементами GAS в промоторной области индуцируемых генов INF [16].

При вирусной инфекции INF- γ включает клеточный антивирусный механизм, индуцируя экспрессию нескольких противовирусных белков. INF- γ может индуцировать апоптоз, регулируя Fas-лиганд для устранения вирусинфицированных клеток. Кроме того, INF- γ усиливает экспрессию INF I типа, которая дополнительно увеличивает антивирусное состояние клеток. INF- γ может индуцировать экспрессию провоспалительных цитокинов и хемокинов эндотелиальными, эпителиальными клетками и фибробластами для привлечения макрофагов, нейтрофилов и Т-клеток в места инфицирования [17]. INF- γ играет критическую роль в передаче противовирусных сигналов от врожденного до адаптивного иммунного от-

вета, с целью активации противовирусного иммунитета хозяина. В результате идентификации вируса Toll-like рецепторами происходит продукция INF- γ , которая индуцирует секрецию IL-12 макрофагами и дендритными клетками. INF- γ регулирует презентацию антигена с помощью HLA (major histocompatibility complex) I и II класса за счет увеличения экспрессии субъединиц, а также путем увеличения экспрессии и активности протеасом. Увеличение экспрессии HLA повышает чувствительность хозяина к патогену и увеличивает способность идентифицировать и реагировать на этот патоген. Кроме этого, INF- γ усиливает экспансию лимфоцитов и приводит к их длительной активации в тканях, индуцирует активацию каскада компонента и острофазовую реакцию, играет роль в переключении синтеза иммуноглобулинов на IgG и оказывает прямые антивирусные эффекты [18]. INF- γ также играет ключевую роль в контроле дифференцировки naive CD4⁺ Т-клеток в Th1 клетки-медиаторы клеточного иммунитета против ВЭБ-инфекции. INF- γ участвует в активации макрофагов с целью продукции TNF- α , который вместе с INF- γ воздействует на усиление фагоцитоза и микробической активности макрофагов, образование активных форм азота и кислорода, включая супероксидные радикалы – оксид азота и перекись водорода [19].

Макрофаги и дендритные клетки также могут секретировать INF- γ . Макрофаги реагируют на внутриклеточный INF- γ посредством механизма, при котором нагруженные INF- γ эндосомы доставляются в фагоцитарные вакуоли или аутофагосомы, несущие INF- γ рецепторы. Позднее было показано, что макрофаги способны потенциально продуцировать и отвечать на INF- γ в аутокринной/паракринной манере [20].

За последние годы проведены многочисленные исследования у больных герпесвирусной инфекцией, которые показали нарушение продукции INF- α и - γ , что является одним из признаков вторичного иммунодефицита, приводит к затруднению элиминации внутриклеточного вируса, что создает благоприятные условия для формирования хронической рецидивирующей инфекции [21]. В 1993 г. были опубликованы положительные результаты лечения тяжелой ВЭБ-инфекции введением рекомбинантного INF- γ [22]. В 1996 г. были опубликованы результаты эффективности терапии рекомбинантным INF- γ в сочетании с введением иммуноглобулинов и ацикловира у больных ВЭБ-инфекцией [23]. В литературе описан положительный эффект терапии рекомбинантным INF- γ у больных с варицелла-зостер герпесвирусной инфекцией [24]. В проведенном ранее двойном слепом плацебо-контролируемом исследовании было показано, что введение рекомбинантного INF- γ 3 раза в неделю подкожно уменьшает частоту тяжелых инфекций у больных с различными генетическими типами хронического гранулематозного заболевания. INF- γ является мощным иммунорегуляторным цитокином и непосредственно ингибирует репликацию вирусов гепатита В, кори и мышинового цитомегаловируса *in vivo* [25]. В 2002 г. опубликованы результаты исследования, показавшие, что рекомбинантный INF- γ способен напрямую ингибировать репликацию вируса простого герпеса 1 типа (HSV-1) с такой же эффективностью, как и INF- β [26]. Авторы работы предположили, что высокий уровень ингибирования, достигаемый введением экзогенного INF- γ , является результатом синергичного взаимодействия с эндогенным INF- α / β , который локально продуцируется в ответ на инфекцию HSV-1.

В Российской Федерации зарегистрирован единствен-

ный препарат IFN- γ под торговым названием «Ингарон», разработанный ООО «НПП «Фармаклон»» путем микробиологического синтеза в рекомбинантном штамме *E. coli* и очищен колоночной хроматографией. Ингарон состоит из 144 аминокислотных остатков, лишен первых 3 из них (Cys-Tyr-Cys), замененных на Met.

В литературе мы не нашли данных о динамике показателей продукции эндогенного IFN- α и - γ у больных ХВЭБИ после окончания терапии ингароном. Поэтому целью проведенного нами исследования было изучение влияния терапии препаратом Ингарон на динамику продукции IFN- α и - γ и клиническую картину у больных, страдающих ХВЭБИ.

Материал и методы

Обследованы 32 больных ХВЭБИ: 22 женщины и 10 мужчин. Средний возраст больных составлял $35,06 \pm 1,60$ года. Длительность ХВЭБИ от появления первых жалоб у больного до лабораторного подтверждения ВЭБ-инфекции и постановки диагноза составила $2,14 \pm 0,26$ года. У 26 (81,25%) больных в детские годы часто обострялся хронический тонзиллит, не поддающийся терапии антибиотиками, а 10 (31,25%) больных перенесли инфекционный мононуклеоз. Всем больным была проведена дифференциальная диагностика ХВЭБИ с другими вирусными инфекциями (ВИЧ, вирусные гепатиты, цитомегаловирусная инфекция, токсоплазмоз), глистными инвазиями, аутоиммунными заболеваниями, ассоциированными с ВЭБ-инфекцией. Клинические методы исследования больных включали сбор анамнеза, данные о ранее проводимой иммуно- или противовирусной терапии, наличии сопутствующих заболеваний. Клиническое состояние пациентов оценивали по общепринятой методике, включающей объективные данные и регистрацию жалоб пациента на момент осмотра. Выраженность жалоб пациента регистрировали с использованием шкалы субъективной оценки по 3-балльной шкале (0 – отсутствие симптомов, 1 – слабая выраженность симптомов, 2 – умеренная выраженность симптомов, 3 – значительная выраженность симптомов).

Диагностика ХВЭБИ основывалась на клинических данных и положительных результатах исследований слюны на наличие ВЭБ. ДНК вируса Эпштейна–Барр в образцах слюны определяли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени. Использовали тест-системы «АмплиСенс EBV/CMV/HHV6-скрин-FL» (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии», Россия). Единицы измерения, используемые для оценки вирусной нагрузки при экстракции ДНК из слюны, рассчитывали по формуле из инструкции к набору:

$$КП_{\text{днк}} = K_{\text{днк}} \cdot 100 \text{ (копий/мл)},$$

где $K_{\text{днк}}$ – количество копий ДНК ВЭБ в пробе ДНК. Аналитическая чувствительность тест-системы составляет 400 копий/мл.

Известно, что ВЭБ распространяется при контакте со слюной и проникает через эпителий, который выстилает носоглотку. Лимфоидная система, которая окружает носоглоточный регион, включает аденоиды и миндалины и называется кольцом Вальдейера. Показано, что уровень инфицированных В-клеток в популяции варьирует от 5 до 3000 для каждых 10^7 В-клеток памяти как в периферической крови (в среднем $110/10^7$), так и в кольце Вальдейера (среднее значение $175/10^7$), т.е. вирус равномерно распределяется по всему кольцу [27]. Таким образом, уровень инфицированных клеток аналогичен между пе-

риферической кровью и кольцом Вальдейера и только 1% этих клеток находится в периферической крови. Вирус постоянно просачивается в полость рта, где он смешивается со слюной в течение примерно 2 мин перед каждым актом глотания. Таким образом, полость рта является резервуаром потока ВЭБ. Около 250 клеток в любой момент начинают реплицировать в кольце Вальдейера.

Также была изучена динамика продукции IFN- α и - γ до начала терапии ингароном и через 1 мес после окончания курса. Определяли содержание IFN- α и - γ в сыворотке, а также спонтанную и индуцированную продукцию этих цитокинов в культуре лимфоцитов крови. В качестве индуктора продукции IFN- α использовали вирус болезни Ньюкасла (получен в ГИСК им. Л.А. Тарасевича, Санкт-Петербург) с инфекционным титром $8 \lg$ ЭИД/0,2 мл в объеме 8 мкл на лунку, в качестве индуктора продукции IFN- γ использовали фитогемагглютинин («ПанЭко», Россия) в дозе 10 мкг/мл. Количественное содержание цитокинов определяли в сыворотке и надосадочной жидкости 24-часовой культуры цельной крови с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием тест-систем альфа-Интерферон-ИФА-БЕСТ и гамма-Интерферон-ИФА-БЕСТ (Вектор Бест, Россия). Референтные значения спонтанной, сывороточной и индуцированной продукции IFN- α и - γ предоставлены производителем тест-систем.

Статистический анализ полученных результатов проводился с помощью статистического пакета программного обеспечения IBM SPSS Statistics, версия 26. Групповые результаты представлены в виде средней \pm стандартная ошибка от средней ($M \pm$ Standard Error). Статистическую обработку результатов проводили с использованием параметрических (метод Пирсона) и непараметрических (тау (τ) Кендалла) критериев. Критический уровень значимости различия показателей принимали равным 0,05.

Результаты

У всех больных наличие ВЭБ-инфекции было подтверждено выявлением ДНК ВЭБ в образцах слюны. Средняя концентрация ДНК ВЭБ составляла $282464,56 \pm 92106,90$ копий/мл. Ингарон вводили в дозе 500 000 МЕ внутримышечно 1 раз в сутки через день на протяжении 20 дней (всего 10 инъекций). До начала терапии ингароном и через 1 мес после ее окончания определяли продукцию IFN- α и - γ (спонтанную, сывороточную и индуцированную). В табл. 1 представлены полученные данные.

Из данных табл. 1 следует, что в общей группе больных после терапии ингароном достоверно увеличилась спонтанная ($p = 0,002$) и сывороточная ($p = 0,024$) продукция IFN- γ . Индуцированная продукция IFN- γ также имела тенденцию к увеличению без достоверной динамики ($p = 0,396$). Однако анализ исходных данных содержания индуцированного IFN- γ в культуре лимфоцитов показал, что эти значения резко отличались у больных, т.е. были ниже или выше показателей здоровых доноров ($281\text{--}4335$ пг/мл, референтные значения предоставлены производителем тест-систем). В связи с этим общая группа больных была разделена на 2 группы в соответствии с исходной индуцированной продукцией IFN- γ до начала терапии: 1-я группа ($n = 13$) – уровень индуцированного IFN- γ $4435,64 \pm 1343,50$ пг/мл и 2-я группа ($n = 19$) – $234,25 \pm 34,31$ пг/мл. В табл. 2 приведены данные по исследованию индуцированной продукции IFN- γ в этих группах больных.

Результаты исследования индуцированной продукции IFN- γ после курса терапии ингароном показали, что

Таблица 1

Динамика продукции IFN- γ до и после терапии ингазоном у больных ХВЭБИ

Показатель	Уровень IFN- γ , пг/мл		p
	до начала терапии	через 1 мес после терапии	
Спонтанный IFN- γ	2,24 \pm 0,16	4,84 \pm 0,72	0,002
Сывороточный IFN- γ	2,15 \pm 0,15	6,45 \pm 1,75	0,024
Индукцированный IFN- γ	2072,40 \pm 716,94	2776,92 \pm 483,39	0,396

Таблица 2

Динамика индуцированной продукции IFN- γ до и после терапии ингазоном у больных ХВЭБИ 1-й и 2-й групп

Группа больных	Уровень IFN- γ , пг/мл		p
	до начала терапии	через 1 мес после терапии	
1-я (n = 13)	4435,64 \pm 1343,50	2934,27 \pm 771,91	0,013
2-я (n = 19)	234,25 \pm 34,31	2431,25 \pm 579,39	0,002

Таблица 3

Динамика спонтанной продукции IFN- γ до и после терапии ингазоном у больных в 1-й и 2-й группах ХВЭБИ

Группа больных	Уровень IFN- γ , пг/мл		p
	до начала терапии	через 1 мес после терапии	
1-я (n = 13)	2,23 \pm 0,231	5,46 \pm 1,08	0,013
2-я (n = 19)	2,18 \pm 0,18	7,24 \pm 2,42	0,054

Таблица 4

Продукция сывороточного IFN- γ до и после терапии ингазоном у больных в 1-й и 2-й группах ХВЭБИ

Группа больных	Уровень IFN- γ , пг/мл		p
	до начала терапии	через 1 мес после терапии	
1-я (n = 13)	2,00 \pm 0,20	5,20 \pm 2,15	0,171
2-я (n = 19)	2,40 \pm 0,27	8,33 \pm 2,17	0,019

Таблица 5

Динамика продукции IFN- α до и после терапии ингазоном в общей группе больных ХВЭБИ

Показатель	Уровень IFN- α , пг/мл		p
	до начала терапии	через 1 мес после терапии	
Спонтанный IFN- α	3,39 \pm 0,63	8,28 \pm 0,471	0,330
Сывороточный IFN- α	6,06 \pm 1,72	4,17 \pm 0,57	0,343
Индукцированный IFN- α	626,11 \pm 145,40	863,31 \pm 171,91	0,285

у больных в 1-й группе содержание индуцированного IFN- γ достоверно снизилось ($p = 0,013$), а во 2-й группе введение ингазома привело к резкому достоверному увеличению продукции индуцированного IFN- γ ($p = 0,002$). При этом уровни IFN- γ в обеих группах достигли референтных значений. Таким образом, введение ингазома показано при любой исходной индуцированной продукции IFN- γ в культуре лимфоцитов, так как способствует его нормализации у больного.

В табл. 3 представлены результаты динамики спонтанной продукции IFN- γ до и после терапии ингазоном.

После терапии ингазоном в 1-й группе больных отмечено достоверное увеличение спонтанной продукции IFN- γ ($p = 0,013$), а во 2-й группе – увеличение продукции IFN- γ было недостоверным ($p = 0,054$). Полученные значения не имели достоверного различия с референтными значениями

(0–6 пг/мл, референтные значения предоставлены производителем тест-системы). В табл. 4 приведены результаты динамики продукции сывороточного IFN- γ до и после терапии ингазоном у больных в обеих группах.

Результаты полученных исследований показали, что в 1-й группе увеличение продукции сывороточного IFN- γ было недостоверным ($p = 0,171$), изменения во 2-й группе носили такой же характер, но были достоверными ($p = 0,019$) через 1 мес после окончания терапии ингазоном. Полученные данные не отличались от референтных значений, предоставленных производителем тест-системы (0–10 пг/мл).

Таким образом, введение препарата ингазон способствует повышению спонтанной и сывороточной продукции IFN- γ у больных, независимо от исходного уровня индуцированного IFN- γ .

Далее были проанализированы изменения продукции IFN- α (спонтанной и индуцированной) до начала терапии ингазоном и через 1 мес после её окончания. Результаты представлены в табл. 5.

Из представленных данных видно, что ингазон не оказывает достоверного влияния на продукцию IFN- α , т.е. терапия ингазоном может быть начата у больных независимо от его исходной продукции.

Для ХВЭБИ характерны длительное течение и частые рецидивы с клиническими и лабораторными признаками вирусной активности [28]. Больных беспокоят длительный субфебрилитет (37,1–37,3 °C), слабость, немотивируемая утомляемость, повышенная потливость (особенно в ночное время), чувство дискомфорта и/или боли в области горла, скудный кашель и отек слизистой носа с обильным стеканием слизи по задней стенке глотки, стоматит, возможны кожные высыпания, артралгии, боли в мышцах туловища и конечностей, лимфаденит. Часто развиваются неврологические расстройства – головные боли, нарушения памяти и сна, раздражительность, плаксивость, склонность к депрессиям. Возможно увеличение внутренних органов (по данным ультразвукового исследования, гепато- или спленомегалия) и чувство тяжести в правом подреберье. Кроме того, больные жалуются на частые простудные заболевания за последние 6–12 мес и присоединение других герпесвирусных инфекций. В клиническом анализе крови у больных наблюдаются относительный и абсолютный лимфо- и моноцитоз, реже могут быть лимфо- и лейкопения. В анамнезе достаточно часто отмечаются длительные стрессовые ситуации, психоэмоциональные и физические перегрузки, на фоне которых ухудшается состояние больных.

Исходя из вышеперечисленного мы проанализировали частоту описанных клинических жалоб у больных отдельно в каждой группе до начала и через 1 мес после терапии ингазоном (табл. 6).

Из представленных в табл. 6 данных следует, что пациенты 1-й группы, с исходно высокой индуцированной продукцией IFN- γ , имели более выраженные клинические проявления. Поскольку обе группы пациентов были сопоставимы по длительности и активности заболевания и по вирусной нагрузке в образцах слюны, то связь выраженности клинических проявлений и высокой индуцированной продукции IFN- γ , возможно, обусловлена системными эффектами IFN- γ как провоспалительного цитокина, гиперэкспрессия которого инициируется при реактивации вируса.

Как следует из данных табл. 6, выраженность клинических жалоб у больных 1-й группы после терапии ингазоном имела незначительную положительную ди-

Таблица 6

Частота клинических жалоб (в %) до начала терапии ингароном и через 1 мес после ее окончания лечения у больных ХВЭБИ

Клинические жалобы	1-я группа (n = 13)		2-я группа (n = 19)		Общая группа (n = 32)	
	до те- рапии	после терапии	до те- рапии	после терапии	до те- рапии	после те- рапии
Субфебрильная температура	84,61	30,76 (<i>p</i> = 0,004)	57,89	31,58 (<i>p</i> = 0,073)	75,0	18,75 (<i>p</i> = 0,05)
Лимфаденит	53,85	30,76 (<i>p</i> = 0,082)	68,42	15,79 (<i>p</i> = 0,002)	53,85	15,62 (<i>p</i> = 0,02)
Боли в горле	92,30	46,15 (<i>p</i> = 0,001)	36,84	31,57 (<i>p</i> = 0,001)	89,61	31,25 (<i>p</i> = 0,001)
Слабость	76,92	70,82 (<i>p</i> = 0,001)	63,16	52,63 (<i>p</i> = 0,073)	96,90	46,88 (<i>p</i> = 0,001)
Озноб	69,23	7,68 (<i>p</i> = 0,008)	47,37	31,58 (<i>p</i> = 0,001)	68,75	46,88 (<i>p</i> = 0,001)
Потливость	92,30	53,85 (<i>p</i> = 0,001)	63,16	52,63 (<i>p</i> = 0,029)	90,63	9,38 (<i>p</i> = 0,001)
Стекание слизи по задней стенке глотки	30,76	7,69 (<i>p</i> = 0,082)	21,05	10,52 (<i>p</i> = 0,029)	84,38	3,13 (<i>p</i> = 0,012)
Стоматит	23,08	15,38 (<i>p</i> = 0,054)	15,78	10,52 (<i>p</i> = 0,004)	43,80	6,26 (<i>p</i> = 0,017)
Боли в суставах	23,08	7,69 (<i>p</i> = 0,054)	15,78	10,52 (<i>p</i> = 0,004)	31,25	28,13 (<i>p</i> = 0,056)
Раздражительность и плаксивость	69,23	58,67 (<i>p</i> = 0,058)	42,11	21,05 (<i>p</i> = 0,054)	81,25	74,87 (<i>p</i> = 0,054)
Высыпания на коже	61,54	54,68 (<i>p</i> = 0,058)	42,11	26,31 (<i>p</i> = 0,056)	34,38	28,13 (<i>p</i> = 0,031)

намику: субфебрильная температура тела сохранялась у 30,76% больных (*p* = 0,004), жалобы на боли в горле – у 46,15% (*p* = 0,001), испытывали слабость 70,82% (*p* = 0,001), жаловались на озноб 7,68% (*p* = 0,008), сохранялась потливость у 53,85% (*p* = 0,001). Остальные жалобы остались без изменения.

Во 2-й группе больных после терапии ингароном наблюдалась более выраженная положительная динамика клинических жалоб и достоверное уменьшение частоты лимфаденита с 68,42 до 15,79% (*p* = 0,002), боли в горле – 31,57% (*p* = 0,001), озноба 31,58% (*p* = 0,001), потливости – 52,63% (*p* = 0,029). На стекание слизи по задней стенке глотки жаловались только у 10,52% больных (*p* = 0,029), на проявления стоматита у 15,38% (*p* = 0,004), на боли в суставах – 7,69% больных (*p* = 0,004). Таким образом, из полученных данных следует, что у больных с исходно сниженной продукцией индуцированного IFN- γ более выраженный ответ на терапию ингароном. Возможно, пациенты 2-й группы, с исходно сниженным уровнем индуцированной продукции IFN- γ , т.е. с истощенными резервными возможностями продукции этого цитокина, до начала терапии не имели возможности осуществлять полноценный противовирусный иммунный ответ. Введение ингарона способствовало элиминации вируса, нормализации синтеза IFN- γ и снижению клинических проявлений ХВЭБИ.

В общей группе больных после курса терапии ингароном была наиболее выражена положительная динамика клинических жалоб. Жалобы на субфебрильную температуру сохранялись у 18,75% больных (*p* = 0,05), лимфаденит – у 15,62% (*p* = 0,02), боли в горле – у 31,25% (*p* = 0,001), слабость и озноб – у 46,88% (*p* = 0,001), потливость – у 9,38% (*p* = 0,001), стекание слизи по задней стенке глотки – только у 3,13% (*p* = 0,012), стоматит – у 6,26% (*p* = 0,017), высыпания на кожных покровах – у 28,13% (*p* = 0,031).

Без достоверной положительной динамики оставались клинические жалобы на боли в суставах, раздражительность и плаксивость.

Следующим этапом работы был корреляционный анализ с целью изучения влияния исходной продукции индуцированного IFN- γ на клиническую картину заболевания. Достоверно было показано, что продукция индуцированного IFN- γ в общей группе ХВЭБИ влияет на развитие у больных только слабости и утомляемости (τ = -0,336, *p* = 0,022; *r* = -0,421, *p* = 0,016). В 1-й группе исходная продукция индуцированного IFN- γ влияет на развитие отека слизистой носа и обильное стекание слизи по задней стенке глотки (τ = 0,613, *p* = 0,007; *r* = 0,762, *p* = 0,002). Других значимых корреляционных связей выявить не удалось.

Обсуждение

В отечественной литературе описаны результаты исследования препарата ингарон и представлены доказательства его высокой эффективности в лечении герпесвирусных инфекций [29, 30]. Авторы работ показали, что препарат оказывает прямое противовирусное воздействие, а клинический эффект проявляется за счет активации клеточного иммунитета. Е.Г. Гайнанова и соавт. в 2010 г. опубликовали положительные результаты лечения больных с варицелла-зостер герпесвирусной инфекцией с использованием схемы терапии ингароном по сравнению с ацикловиром [29]. Авторы пришли к выводу, что ингарон является активным провоспалительным цитокином и обладает противовирусной активностью, уменьшая длительность интоксикации, способствуя разрешению местного процесса и нормализации лабораторных показателей в более короткие сроки терапии, что обосновывает его применение при варицелла-зостер герпесвирусной инфекции. В 2009 г. Ф.И. Ершов и соавт. опубликовали результаты лечения простого герпеса с выраженной положительной динамикой клинической картины, нормализацией продукции интерферонов и содержания CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов в крови [30].

В результате проведенного нами исследования показано, что терапия ингароном может быть начата у больных ХВЭБИ независимо от исходной продукции IFN- α , так как достоверных изменений спонтанного, сывороточного и индуцированного IFN- α после терапии не выявлено.

Были получены результаты выраженной положительной динамики продукции IFN- γ через 1 мес после окончания курса терапии ингароном. Таким образом, ингарон приводит к нормализации индуцированной продукции IFN- γ , независимо от ее исходного уровня у больных. Аналогичная положительная динамика была получена и по уровню спонтанного и сывороточного IFN- γ у больных ХВЭБИ. Таким образом, терапия ингароном при ХВЭБИ показана независимо от исходной индуцированной продукции IFN- γ в культуре лимфоцитов (низкий или высокий). Ранее в работе М. Okano и соавт. показано, что терапия рекомбинантным IFN- γ у больного с острым инфекционным мононуклеозом и X-связанным лимфопролиферативным синдромом с выявленной ВЭБ-инфекцией в тканях приводит к линейному увеличению

продукции эндогенного IFN- γ [31]. Выявленная нами тенденция к увеличению содержания сывороточной и спонтанной продукции IFN- γ может быть следствием увеличения продукции эндогенного IFN- γ .

Необходимо отметить, что через 1 мес после терапии отмечена более выраженная положительная динамика клинических жалоб у больных со сниженной продукцией индуцированного IFN- γ до начала терапии. Но если оценивать динамику жалоб в общей группе больных ХВЭБИ, независимо от исходного значения индуцированного IFN- γ , выявляется выраженная положительная динамика всех клинических жалоб у больных (за исключением артралгий и раздражительности) через 1 мес после курса терапии ингароном. Таким образом, полученные нами результаты подтверждают ранее опубликованные данные других исследователей о наличии выраженного противовирусного эффекта препарата Ингарон в отношении герпесвирусов.

Все больные хорошо переносили терапию ингароном, у 9 из 32 человек было усиление выделения слизи из носа, более обильное стекание слизи по задней стенке глотки и дискомфорт в горле. После окончания терапии ингароном, описанные жалобы проходили через 2–3 дня. Показатели клинических и биохимических анализов крови после курса терапии находились в пределах возрастных норм.

Выводы

Ингарон оказывает положительный эффект на продукцию эндогенного IFN- γ у больных ХВЭБИ.

Терапия ингароном при ХВЭБИ показана независимо от продукции индуцированного IFN- γ в культуре лимфоцитов (низкий или высокий) до начала терапии.

Терапия ингароном приводит к выраженному уменьшению клинических жалоб у больных ХВЭБИ через 1 мес после ее окончания.

Терапию ингароном можно начинать у больных ХВЭБИ независимо от исходного уровня продукции IFN- α .

Ингарон может быть рекомендован для проведения монотерапии у больных ХВЭБИ в дозе 500 000 МЕ через день при курсовой дозе 10 инъекций и более.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1-20, 22-28, 31 см. REFERENCES)

21. Сологуб Т.В., Цветков В.В., Деева Э.Г. Интерферон гамма-цитокин с противовирусной, иммуномодулирующей и противоопухолевой активностью. *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова*. 2014; (3): 56-60.
29. Гайнанова Е.Г., Фазылов В.Х., Скороходкина О.В. Клиническая эффективность цитокинотерапии гамма-интерфероном при варицелла-зостер герпесвирусной инфекции. *Журнал инфектологии*. 2010; 2(4): 56.
30. Ершов Ф.И., Наровлянский А.Н., Чистик О.В., Халдин А.А., Орехов Д.В., Гетия Т.Б. Гамма-Интерферон: новые возможности современной профилактики обострений простого герпеса. *Российский журнал кожных и венерических болезней. Приложение «Герпес»*. 2009; (2): 11-3.

REFERENCES

1. Straus S.E. The chronic mononucleosis syndrome. *J. Infect. Dis.* 1988; 157(3): 405-12.
2. Rickinson A.B. Chronic, symptomatic Epstein-Barr virus infection. *Immunol. Today*. 1986; 7(1): 13-4. doi: 10.1016/0167-5699(86)90183-0
3. Hellmann D., Cowan M.J., Ammann A.J., Wara D.W., Chudwin D., Chang R.S. Chronic active Epstein-Barr virus infections in two immunodeficient patients. *J. Pediatr.* 1983; 103(4): 585-8.
4. Joncas J.H., Ghibu F., Blagdon M., Montplaisir S., Stefanescu I., Menezes J. A familial syndrome of susceptibility to chronic active Epstein-Barr virus infection. *Can. Med. Assoc. J.* 1984; 130(3): 280-4.

5. Hochberg D., Middeldorp J.M., Catalina M., Sullivan J.L., Luzuriaga K., Thorley-Lawson D.A. Demonstration of the Burkitt's Lymphoma Epstein-Barr virus phenotype in dividing latently infected memory cells in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003; 101(1): 239-44.
6. Niller H.H., Wolf H., Minarovits J. Regulation and dysregulation of Epstein-Barr virus latency: implications for the development of autoimmune diseases. *Autoimmunity*. 2008; 41(4): 298-328.
7. Kanegane H., Wakiguchi H., Kanegane C., Kurashige T., Tosato G. Viral interleukin-10 in chronic active Epstein-Barr virus infection. *J. Infect. Dis.* 1997; 176(1): 254-7.
8. Amyes E., Hatton C., Montamat-Sicotte D., Gudgeon N., Rickinson A.B., McMichael A.J., et al. Characterization of the CD4⁺ T Cell Response to Epstein-Barr Virus during Primary and Persistent Infection. *J. Exp. Med.* 2003; 198(6): 903-11.
9. Marrão G., Habib M., Paiva A., Bicout D., Fallecker C., Franco S., et al. Epstein-Barr virus infection and clinical outcome in breast cancer patients correlate with immune cell TNF- α /IFN- γ response. *BMC Cancer*. 2014; 14: 665. doi: 10.1186/1471-2407-14-665
10. Cohen J.I. Epstein-Barr virus infection. *N. Engl. J. Med.* 2000; 343(7): 481-92.
11. Kimura H., Hoshino Y., Kanegane H., Tsuge I., Okamura T., Kawa K., et al. Clinical and virologic characteristics of chronic active Epstein-Barr virus infection. *Blood*. 2001; 98(2): 280-6.
12. Ohga S., Nomura A., Takada H., Ihara K., Kawakami K., Yanai F., et al. Epstein-Barr virus (EBV) load and cytokine gene expression in activated T cells of chronic active EBV infection. *J. Infect. Dis.* 2001; 183(1): 1-7.
13. Gattoni A., Parlato A., Vangieri B., Bresciani M., Derna R. Interferon-gamma: biologic functions and HCV therapy (type I/II) (1 of 2 parts). *Clin. Ter.* 2006; 157(4): 377-86.
14. Schroder K., Hertzog P.J., Ravasi T., Hume D.A. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* 2004; 75(2): 163-89.
15. Saha B., Jyothi Prasanna S., Chandrasekar B., Nandi D. Gene modulation and immunoregulatory roles of interferon gamma. *Cytokine*. 2010; 50(1): 1-14. doi: 10.1016/j.cyt.2009.11.021
16. Johnson H.M., Noon-Song E.N., Dabelic R., Ahmed C.M. IFN signaling: how a non-canonical model led to the development of IFN mimetics. *Front. Immunol.* 2013; 4: 202. doi: 10.3389/fimmu.2013.00202
17. Roff S.R., Noon-Song E.N., Yamamoto J.K. The Significance of Interferon-gamma in HIV-1 Pathogenesis, Therapy, and Prophylaxis. *Front. Immunol.* 2014; 4: 498. doi: 10.3389/fimmu.2013.00498
18. Smith N.L., Denning D.W. Clinical implications of interferon- γ genetic and epigenetic variants. *Immunology*. 2014 Dec; 143(4): 499-511. doi: 10.1111/imm.12362
19. Watford W.T., Moriguchi M., Morinobu A., O'Shea J.J. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003; 14(5): 361-8.
20. Robinson C.M., O'Dee D., Hamilton T., Nau G.J. Cytokines involved in interferon- γ production by human macrophages. *J. Innate Immunol.* 2010; 2(1): 56-65. doi: 10.1159/000247156
21. Sologub T.V., Tsvetkov V.V., Deeva E.G. Interferon gamma - cytokine with antiviral, immunomodulating and antitumor activity. *Rossiyskiy mediko-biologicheskiy vestnik imeni akademika I.P. Pavlova*. 2014; (3): 56-60. (in Russian)
22. Fujisaki T., Nagafuchi S., Okamura T. Gamma-interferon for severe chronic active Epstein-Barr virus. *Ann. Intern. Med.* 1993; 118(6): 474-5.
23. Andersson J. Clinical and immunological considerations in Epstein-Barr virus-associated diseases. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* 1996; 100: 72-82.
24. Balachandra K., Thawaranantha D., Ayuthaya P.I., Bhumisawasdi J., Shiraki K., Yamanishi K. Effects of human alpha, beta and gamma interferons on varicella zoster virus in vitro. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*. 1994; 25(2): 252-7.
25. Patterson C.E., Lawrence D.M., Echols L.A., Rall G.F. Immune-mediated protection from measles virus-induced central nervous system disease is noncytolytic and gamma interferon dependent. *J. Virol.* 2002; 76(9): 4497-506.
26. Schultzn U., Chisari F.V. Recombinant duck interferon gamma inhibits duck hepatitis B virus replication in primary hepatocytes. *J. Virol.* 1999; 73(4): 3162-8.
27. Laichalk L.L., Hochberg D., Babcock G.J., Freeman R.B., Thorley-Lawson D.A. The dispersal of mucosal memory B cells: evidence from persistent EBV infection. *Immunology*. 2002; 16(5): 745-54.
28. Kraggsbjerg P. Chronic active mononucleosis. *Scand. J. Infect. Dis.* 1997; 29(5): 517-8.
29. Gaynanova E.G., Fazylov V.Kh., Skorokhodkina O.V. Clinical efficacy of cytokinotherapy with gamma-interferon in varicella-zoster herpesvirus infection. *Zhurnal infektologii*. 2010; 2(4): 56. (in Russian)
30. Ershov F.I., Narovlyanskiy A.N., Chistik O.V., Khaldin A.A., Orekhov D.V., Getia T.B. Gamma-Interferon: new opportunities for modern prevention of exacerbations of herpes simplex. *Rossiyskiy zhurnal kozhnykh i venericheskikh bolezney. Supplement «Gerpes»*. 2009; (2): 11-3. (in Russian)
31. Okano M., Thiele G.M., Kobayashi R.H., Davis J.R., Synovec M.S., Grierson H.L., et al. Interferon-gamma in a family with X-linked lymphoproliferative syndrome with acute Epstein-Barr virus infection. *J. Clin. Immunol.* 1989; 9(1): 48-54.

Поступила 05.06.18

Принята в печать 19.06.18

Ярославцева Н.Г.¹, Тихомиров Д.С.¹, Николаева Л.И.², Дедова А.В.², Овчинникова Е.Н.¹, Мисько О.Н.¹, Романова Т.Ю.¹, Махновский П.И.², Гришечкин А.Е.², Туполева Т.А.¹

НИЗКИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ РНК ВИРУСА ГЕПАТИТА С ПРИ СЕРОЛОГИЧЕСКИ СЛАБОВЫРАЖЕННОЙ ИНФЕКЦИИ

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

²Институт вирусологии им. Д.И. Иванова при ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалея» Минздрава России, 123098, г. Москва

Скрытая инфекция, вызванная вирусом гепатита С (ВГС), характеризуется низкой вирусемией. Геном вируса в этом случае может быть обнаружен не в плазме, а в клетках крови и/или ткани печени. При нарушениях гуморального иммунитета могут быть получены сомнительные результаты определения противовирусных антител (анти-ВГС). В статье проведен поиск и анализ серологически слабовыраженных форм ВГС-инфекции. Включены результаты скрининга образцов 30 180 потенциальных доноров крови и 4322 пациентов с заболеваниями системы крови. Проведён сравнительный анализ широкого спектра серологических и молекулярных маркеров ВГС у доноров, пришедших на контрольное обследование, и больных с антителами к одному или двум вирусным белкам. Анализ данных, полученных в ходе исследования, показал, что частота обнаружения сомнительных результатов по анти-ВГС у доноров составила 0,18%. Исследование методами иммунохемилюминесценции и иммуноферментного анализа на анти-ВГС крови доноров, пришедших на контрольное обследование, дало противоположные результаты. В 15,2% случаев была выявлена РНК ВГС в концентрации менее 100 МЕ/мл. У больных с неполным спектром антител к ВГС при контрольном исследовании, выполненном через 5–60 дней, в 40,5% случаев обнаружена РНК ВГС как в высокой (21,4%), так и в низкой (19%) концентрации. В образцах с низкой нагрузкой выявлен низкий титр антител к core-белку. В образцах с высоким титром антител выявлена высокая концентрация РНК ВГС. Дискордантные результаты детекции анти-ВГС свидетельствовали о наличии у потенциальных доноров скрытой ВГС-инфекции, что подтверждалось выявлением РНК ВГС в низкой концентрации в плазме/сыворотке либо клетках крови и указывало на необходимость дополнительного углублённого исследования. У пациентов с заболеваниями системы крови низкая вирусная концентрация РНК ВГС обнаруживалась одновременно с низкими титрами анти-ВГС к одному или двум вирусным белкам.

Ключевые слова: скрытый гепатит С; антитела; доноры крови; пациенты с заболеваниями системы крови.

Для цитирования: Ярославцева Н.Г., Тихомиров Д.С., Николаева Л.И., Дедова А.В., Овчинникова Е.Н., Мисько О.Н., Романова Т.Ю., Махновский П.И., Гришечкин А.Е., Туполева Т.А. Низкие концентрации РНК вируса гепатита С при серологически слабо выраженной инфекции. *Вопросы вирусологии*. 2019; 64(1): 30-35.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-1-30-35>

Yaroslavtseva N.G.¹, Tikhomirov D.S.¹, Nikolaeva L.I.², Dedova A.V.², Ovchinnikova E.N.¹, Misko O.N.¹, Romanova T.Yu.¹, Makhnovskiy P.I.², Grishechkin A.E.², Tupoleva T.A.¹

LOW CONCENTRATIONS OF HEPATITIS C VIRUS RNA IN SEROLOGICALLY MILD INFECTION

¹ National Medical Research Center of Hematology, Moscow, 125167, Russian Federation;

² D.I. Ivanovsky Institute of Virology «National Research Center of Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation

Occult HCV infection (OCI) provides significant interest recently. HCV RNA in this case can be detected not in plasma, but in blood cells and/or in liver tissue. In case of antibody genesis impairment anti-HCV detection may lead to negative or “uncertain” result. The aim of the study was to estimate infection type in blood donors and patients with hematological diseases by exploration of samples with uncertain anti-HCV detection results. Blood samples of 30 180 potential blood donors’ and 4322 patients with hematological diseases were tested. Comparative analysis of wide pattern of HCV markers was performed. 33 blood donors and 42 patients were enrolled in follow-up examination. Uncertain results of Anti-HCV detection in donors’ samples were in 0.18% of cases. Follow-up examination of 33 donors provided discordant results using immunochemiluminescence assay and ELISA. 15.2% donors’ samples contained HCV RNA in low concentration. Follow-up observation of 42 patients with incomplete antiviral antibody pattern showed HCV RNA presence in 40.5% cases (21.4% high viremia and 19.0% low viremia). Samples with low RNA concentration contained low titers of anti-core antibodies. Samples with high titers of anti-core antibodies contained high HCV RNA level.

Uncertain results of anti-HCV in 15.2% of potential blood donors’ samples were confirmed by detection of HCV RNA in low concentration. It proved OCI presence in these individuals and called for testing for wide pattern of HCV markers in addition to routine screening. Patients with hematological diseases showed low level of HCV RNA along with low titers of antibodies against one or two viral antigens.

Keywords: hepatitis C virus; occult HCV-infection; blood donors; patients with hematological diseases.

For citation: Yaroslavtseva N.G., Tikhomirov D.S., Nikolaeva L.I., Dedova A.V., Ovchinnikova E.N., Misko O.N., Romanova T. Yu., Makhnovskiy P.I., Grishechkin A.E., Tupoleva T.A. Low concentrations of hepatitis C virus RNA in serologically mild infection. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2019; 64(1): 30-35. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-1-30-35>

Для корреспонденции: Ярославцева Наталья Гургеновна, канд. биол. наук, ведущий специалист научной лаборатории вирусной безопасности трансфузий крови и её компонентов ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России, 125167, г. Москва. E-mail: ngyar@yandex.ru

For correspondence: Natal'ya G. Yaroslavtseva, Ph.D, senior researcher at the virology department, National Research Center for Hematology, Moscow, 125167, Russian Federation.
E-mail: ngyar@yandex.ru

Information about authors:

Yaroslavtseva N.G., <http://orcid.org/0000-0001-8198-7326>
Nikolaeva L.I., <http://orcid.org/0000-0002-1323-5568>
Ovchinnikova E.N., <http://orcid.org/0000-0002-9254-8916>
Romanova T.Yu., <http://orcid.org/0000-0001-7182-2296>
Grishechkin A.E., <http://orcid.org/0000-0002-4489-6756>

Tikhomirov D.S., <http://orcid.org/0000-0002-2553-6579>
Dedova A.V., <http://orcid.org/0000-0002-2491-9324>
Misko O.N., <http://orcid.org/0000-0002-4728-2610>
Makhnovskiy P.I., <http://orcid.org/0000-0002-5859-0360>
Tupoleva T.A., <http://orcid.org/0000-0003-4668-9379>

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

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

Received 28 December 2017

Accepted 06 March 2018

Введение

Вирусом гепатита С (ВГС) инфицировано около 104 млн человек, что составляет 2% всего населения Земли [1]. Доля инфицированных лиц колеблется в широком диапазоне значений в зависимости от страны: в Германии анти-ВГС диагностируются у 0,6% взрослого населения, в Испании – у 1,7%, в Италии – у 2%, в Египте средняя частота выявления этих антител составляет 14,7% [1, 2]. При этом в некоторых отдельных регионах Египта она может достигать 22% [3]. В Российской Федерации более 3% населения инфицировано ВГС и прогнозируется дальнейший рост к 2020 г. [4].

Лабораторная диагностика ВГС-инфекции включает определение анти-ВГС в сыворотке или плазме крови и/или РНК ВГС в периферической крови или ткани печени. Обнаружение любого из этих маркеров однозначно указывает на факт наличия инфекции или контакт с вирусом в прошлом. В совокупности с другими клинико-лабораторными данными в зависимости от комбинации лабораторных маркеров ВГС, времени их появления и места их детекции различают несколько типов ВГС-инфекции: острую, хроническую и скрытую. Первые два типа хорошо изучены как у иммунокомпетентных лиц, так и у лиц с нарушениями иммунитета и другой различной сопутствующей патологией.

В последнее десятилетие скрытой ВГС-инфекции уделяется большое внимание. Выделяют 2 типа скрытой ВГС-инфекции – серонегативную и серопозитивную с низким титром и/или неполным спектром антител к отдельным белкам ВГС [5, 6]. Скрытая ВГС-инфекция может характеризоваться наличием в плазме/сыворотке крови небольших концентраций РНК ВГС (менее 100 МЕ/мл), что приводит к отрицательным результатам в недостаточно чувствительных тестах [7], при этом геном вируса может обнаруживаться в лейкоцитах периферической крови (ЛПК) и/или ткани печени [6]. Скрытая ВГС-инфекция клинически протекает легче, чем хронический вирусный гепатит С, поскольку в патологический процесс вовлечено меньшее количество клеток печени. Тем не менее такая форма инфекции в ряде случаев приводит к фиброзу печени, циррозу и гепатоцеллюлярной карциноме [8]. Согласно многочисленным данным литературы, эта инфекция была обнаружена в различных группах пациентов, в том числе у 10–74% лиц с хроническими заболеваниями печени, криптогенным циррозом и гепатоцеллюлярной карциномой неясной этиологии [6, 7, 9, 10], у больных, получающих регулярную заместительную почечную терапию в 3,7–26,5% случаев [5, 6, 11], у 0,5% реципиентов почечного трансплантата [6], у 10–20% потребителей инъекционных наркотиков [12], у 1,9–20% пациентов

с заболеваниями системы крови [13–16]. Однако данные литературы, посвященной обнаружению скрытой ВГС-инфекции при различных нозологических формах заболеваний системы крови, противоречивы [13–16]. Например, в Египте скрытая ВГС-инфекция была выявлена у 20–27% пациентов, среди которых больные острыми и хроническими лейкозами, ходжкинской и неходжкинской лимфомой, талассемией и другими заболеваниями [14, 15]. В работе исследователей из Ирана, напротив, в аналогичной группе больных доля выявления этой формы инфекции оказалась существенно ниже и составила 1,9% [13]. Таким образом, сравнение этих данных затруднено, а в некоторых случаях некорректно в силу различия дизайна исследования, лабораторной диагностики, изучаемых нозологических форм, критериев включения/исключения пациентов, спектра анализируемого биоматериала.

Низкие концентрации РНК ВГС могут наблюдаться не только при скрытой ВГС-инфекции. В периферической крови и/или гепатоцитах серопозитивных больных хроническим вирусным гепатитом С после антивирусной терапии с устойчивым вирусологическим ответом и у лиц со спонтанным выздоровлением после первичной инфекции также может наблюдаться кратковременная низкая вирусная нагрузка [17, 18]. При скрытой ВГС-инфекции вирусная РНК была выявлена с помощью ультрачувствительных тестов у доноров крови и её компонентов с нормальными уровнями трансаминаз в некоторых странах Европы [19], у 20% доноров Австралии [7], у 2,2% – в Китае [20] и у здоровых лиц (3,3% в Испании и 4% в Египте) [14, 21, 22]. В России аналогичные исследования только начали проводиться.

В некоторых случаях при нарушениях со стороны гуморального звена иммунитета анти-ВГС могут не выявляться вплоть до поздней фазы инфекции, несмотря на длительное персистентное наличие РНК ВГС (т. е. данная ситуация не может быть определена как первичная инфекция и серонегативное окно). Такой тип инфекции получил название «серонегативная» ВГС-инфекция и часто наблюдается при сочетанном инфицировании вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), у пациентов после проведения процедур гемодиализа и/или трансплантации органов. Также описаны случаи выявления этой инфекции у доноров крови и пациентов других категорий [23, 24]. Период сероконверсии при остром гепатите С, обычно составляющий 6–12 нед, иногда может быть удлинён до нескольких лет, что наблюдается у пациентов с иммуносупрессией [25]. Сероконверсия в этом случае происходит гораздо позже, чем при классическом течении инфекции, а профиль антител к отдель-

ным структурным и неструктурным белкам ВГС может иметь неполный набор, т. е. давать неопределенный результат в иммуноферментном анализе (ИФА) и иммуноблоттинге (ИБ) [21]. Некоторые авторы предполагают, что причиной серонегативности являются особые свойства изолятов ВГС, т. е. наличие вирусных вариантов, антигены которых стимулируют продукцию антител, не выявляемых в стандартных серологических тестах [26]. Известно также, что «серонегативная» ВГС-инфекция может развиться в результате «иммунной толерантности» к антигенам ВГС у новорожденных в случае вертикальной передачи вируса [27].

Существование скрытой и серонегативной форм ВГС-инфекции ставит перед службой крови новые задачи. Отрицательные результаты исследования на анти-ВГС и РНК ВГС у доноров крови не исключают риск трансфузионного инфицирования реципиента при переливании компонентов крови [28]. Интерпретация результатов определения анти-ВГС, находящихся в так называемой «серой зоне», представляет особый интерес не только для вирусологии, но и практической медицины.

Целью нашего исследования было выявление и анализ серологически слабовыраженных форм ВГС-инфекции у доноров крови и пациентов, находящихся на лечении в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России.

Материал и методы

Доноры крови. Исследовано 30 180 образцов крови потенциальных доноров крови и её компонентов, пришедших на донацию с начала 2015 г до апреля 2017 г., на наличие анти-ВГС, HBsAg и антигена/антител к ВИЧ 1-го и 2-го типов (ВИЧ-1/2) методом иммунохемилюминесцентного анализа (ИХЛА) на приборе Architect i2000SR с помощью тест-систем «Anti-HCV» («Abbott», Германия), Architect HBsAg qualitative II («Abbott», Ирландия) и HIV Ag/Ab Combo («Abbott», Германия). Образцы, негативные по серологическим маркерам, исследовали на наличие РНК ВГС, ДНК вируса гепатита В (ВГВ) и РНК ВИЧ-1/2 с помощью мультиплексного набора реагентов «Cobas TagScreen MPX Test, version 2.0» («Roche Diagnostics», Германия) на приборе Cobas S201 («Roche», Швейцария) в пулах из 6 проб с чувствительностью для РНК ВГС 40,8 МЕ/мл.

Для интерпретации результатов определения анти-ВГС использовали общепринятое понятие коэффициента позитивности (КП) – отношения полученного значения оптической плотности исследуемого образца в лунке планшета после проведения исследования к критическому значению оптической плотности, рассчитываемому для каждого планшета. Значения КП от 0,9 до 1,0 расценивали как «серую зону». Термин «сомнительный результат» применяли к образцам в случае попадания результата в «серую зону» или получения противоречивых результатов при исследовании в нескольких скрининговых наборах реагентов.

Образцы с положительным или попадающим в «серую зону» результатом определения анти-ВГС дополнительно исследовали на наличие РНК ВГС с помощью наборов реагентов «АмплиСенс-НСV-FL» («ИнтерЛабСервис», РФ), методом ИФА, используя тест-системы «Бест анти-ВГС» («Вектор-Бест», РФ). Подтверждение положительных или сомнительных результатов проводили с помощью тест-систем «Бест анти-ВГС-спектр» («Вектор-Бест», РФ) и в ИБ «INNO-LIA HCV Score» («Fujirebio Europe», Бельгия). Доноры с неопределен-

ным результатом по анти-ВГС были направлены на контрольное обследование.

Образцы крови 33 потенциальных доноров (17 первичных и 16 повторных), пришедших на контрольное обследование, были проанализированы на широкий спектр серологических и молекулярных маркеров ВГС. Средний возраст этих доноров составил 27,9 года (от 18 до 43 лет), среди них доля мужчин – 75,8%, доля женщин – 24,2%. Временные интервалы контрольных обследований составляли 1–24 мес. Выделение РНК ВГС в образцах этих доноров выполняли из плазмы и ЛПК. ЛПК выделяли из 2–5 мл цельной крови с помощью реагента для предобработки цельной периферической крови «Гемолитик» («ИнтерЛабСервис», Россия). Объем плазмы для выделения РНК составлял 2 мл. Определение РНК осуществляли с помощью наборов реагентов «АмплиСенс-НСV-FL» («ИнтерЛабСервис», Россия) с чувствительностью 100 МЕ/мл и «РеалБест РНК ВГС» («Вектор-Бест», Россия) с чувствительностью 15 МЕ/мл. Наличие core-антигена ВГС выявляли в тесте «ВГС core-антиген-ИФА-Бест» («Вектор-Бест», Россия).

Пациенты, находящиеся на лечении в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России в период с февраля 2016 г. по апрель 2017 г. ($n = 4322$), были обследованы на наличие анти-ВГС с помощью наборов «Бест анти-ВГС». Кровь пациентов, у которых анти-ВГС были выявлены впервые, подтверждали в тесте «Бест анти-ВГС-спектр» («Вектор-Бест», Россия) на наличие антител к отдельным структурным и неструктурным белкам ВГС. У 42 пациентов, в крови которых были выявлены антитела только к одному или двум белкам ВГС, через 5 дней–2 мес проводили повторное исследование крови на широкий спектр серологических и молекулярных маркеров ВГС, как описано выше. Средний возраст больных ($n = 42$), включенных в исследование, составил 34,5 года (от 21 до 70 лет), доля мужчин – 69%, женщин – 31%. Основные диагнозы: тяжёлая форма гемофилии А у 19 больных, тяжёлая форма гемофилии В – у 3, лимфомы – у 6, острые лейкозы – у 3, хроническое миелопролиферативное заболевание – у 2, другие заболевания системы крови – у 9. Для выявления HBsAg использовали наборы реагентов «HBsAg-ИФА-Бест (комплект 1 авто)» и «HBsAg-подтверждающий ИФА Бест» («Вектор-Бест», Россия), для диагностики ДНК-ВГВ – «АмплиСенс-НВV-FL» («ИнтерЛабСервис», Россия). Для выявления ВИЧ-инфекции использовали тест-систему «Architect HIV Ag/Ab Combo Reagent» («Abbott», Германия).

Все образцы крови доноров и пациентов, включенных в исследование, не содержали HBsAg, ДНК ВГВ, антигена/антител к ВИЧ-1, ВИЧ-2 и РНК ВИЧ.

Результаты

При исследовании образцов крови потенциальных доноров на наличие анти-ВГС в 0,18% (54 из 30180) случаев получены сомнительные результаты. Данные по годам представлены в табл. 1. Всем донорам с сомнительными результатами было назначено контрольное обследование.

Контрольное обследование было проведено у 33 доноров. При этом у 25 из 33 доноров были доступны образцы как ЛПК, так и плазмы/сыворотки крови, а у 8 – только плазмы/сыворотки.

При сравнении данных определения анти-ВГС методами ИХЛА и ИФА в 32 образцах крови доноров (обра-

Таблица 1

Частота встречаемости образцов крови доноров с сомнительным результатом по анти-ВГС по годам

Показатель	2015 г.	2016 г.	2017 г. (01.01–04.04)	Всего
Общее число донаций	12 932	13 632	3616	30 180
Число образцов крови доноров, сомнительных по анти-ВГС, абс (%)	27 (0,21)	23 (0,17)	4 (0,11)	54 (0,18)

зец крови 33-го донора не был протестирован методом ИХЛА) отмечено несовпадение полученных результатов (табл. 2).

В 24 образцах, положительных либо сомнительных в тесте «ARCHITECT anti-HCV», был получен отрицательный результат в тесте «Бест анти-ВГС». При исследовании этих образцов в ИБ не было получено ни одного положительного результата. Остальные 8 образцов, отрицательных в тесте «ARCHITECT anti-HCV», дали 4 положительных и 4 сомнительных результата в тест-системе «Бест анти-ВГС». Данные исследования 8 образцов, положительных и сомнительных в тесте «Бест анти-ВГС», с помощью подтверждающего теста «Бест анти-ВГС-спектр», представлены в табл. 3.

В одном образце крови донора, не исследованного в тесте «ARCHITECT anti-HCV», обнаружены антитела к core-антигену в титре 1:10 и к NS3 в титре 1:5, а результат ИБ был отрицательным. Core-антиген ВГС не был обнаружен ни в одном из 33 исследованных образцов.

РНК ВГС определяли в плазме и ЛПК у 25 доноров и только в плазме у 8 доноров. Результат определения в крови всех 33 доноров был отрицательным при исследовании в тесте с чувствительностью 100 МЕ/мл. При этом РНК ВГС была обнаружена в тесте с чувствительностью 15 МЕ/мл в плазме крови и ЛПК 2 доноров и только в плазме ещё 3 доноров (табл. 4). Из 5 РНК-положительных образцов доноров сыворотки 4 были позитивны в тесте «ARCHITECT anti-HCV» с КП от 1,03 до 3,5 и негативны в «Бест анти-ВГС-спектр», а в 5-м образце, несмотря на отрицательный результат в тесте «ARCHITECT anti-HCV», были выявлены антитела только к одному антигену NS4ab в титре 1:5, что по рекомендации производителя расценивается как сомнительный результат. Определение core-антигена дало отрицательный результат в 4 образцах и сомнительный («серая зона») в одном образце при наличии РНК ВГС в плазме и ЛПК.

При исследовании 4322 образцов крови больных, проходивших лечение в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, анти-ВГС были выявлены в 512 (11,8%) образцах. Из них в 216 этот маркер был выявлен впервые. Для подтверждения положительного результата эти образцы были исследованы на наличие антител к различным белкам ВГС в тест-системе «Бест анти-ВГС-спектр». Анти-ВГС к одному и двум вирусным белкам были обнаружены в 74 (34,%) из 216 случаев. Результаты представлены в табл. 5.

Повторно взятые образцы крови от 42 больных через интервалы от 5 дней до 2 мес после первичного выявления антител только к одному (core, NS3, NS4) или двум (core + NS3 и core

+ NS4ab) белкам ВГС исследовали на анти-ВГС, а также на наличие core-антигена и РНК ВГС. У 17 (40,5%) из 42 больных была обнаружена РНК ВГС, при этом у 9 (21,4%) в высокой концентрации от $1,3 \cdot 10^5$ до $1,7 \cdot 10^7$ МЕ/мл, а у 8 (19,0%) в низкой – менее 100 МЕ/мл.

Был проведен анализ спектра серологических и молекулярных маркеров ВГС у 42 больных и 9 доноров, в крови которых выявлены антитела к одному или нескольким вирусным белкам. Результаты представлены в табл. 6. Вирусный геном был выявлен в 18 (35,3%) образцах, из них в 9 (17,6%) образцах концентрация вирусной РНК была низкой (менее 100 МЕ/мл) и в 9 (17,6%) образцах находилась в области высоких значений (более 10^5 МЕ/мл). Низкая концентрация РНК ВГС выявлялась в образцах крови пациентов с антителами к core-белку в титрах 1:5–1:320, а также с антителами только к NS3 в титре 1:5 и только к NS4ab в титре 1:5–1:80. Также низкая вирусная нагрузка зафиксирована в образцах двух анти-ВГС-положительных доноров с антителами ко всем вирусным белкам. Высокая вирусная нагрузка (более 10^5 – 10^6) обнаруживалась в образцах с более высокими титрами (более 1:320) антител только к core-белку либо в комбинации с антителами к NS-белкам.

Обсуждение

Результаты выявления анти-ВГС при скрытой ВГС-инфекции могут быть отрицательными либо сомнительными (в том числе находиться в «серой зоне»), поскольку противовирусные антитела присутствуют в низких титрах [5, 6, 29]. При таком типе инфекции вирусная РНК в плазме/сыворотке крови содержится в небольших концентрациях и может быть не обнаружена при использовании недостаточно чувствительных тест-систем. С более высокой вероятностью она может быть выявлена в ЛПК и/или гепатоцитах [5, 6]. В ходе нашего исследования были получены данные, подтверждающие это. В образцах крови 5 из 33 доноров с сомнительным результатом по анти-ВГС в трех тестах (ИХЛА, ИФА и ИБ) была

Таблица 2

Дискордантные результаты определения анти-ВГС методами ИХЛА и ИФА (n = 32)

Число образцов	«ARCHITECT anti-HCV»			«Бест анти-ВГС»		
	анти-ВГС обнаружены	анти-ВГС-сомнительный результат	анти-ВГС не обнаружены	анти-ВГС обнаружены	анти-ВГС-сомнительный результат	анти-ВГС не обнаружены
18	18 (56,2%)			18 (56,2%)		
6	6 (18,8%)			6 (18,8%)		
8	8 (25,0%)		4 (12,5%)	4 (12,5%)	0	

Таблица 3

Анализ положительных и сомнительных по анти-ВГС образцов в тест-системе «Бест анти-ВГС-спектр» и ИБ

Образцы	Титры* анти-core-IgG	Титр анти-NS3-IgG	Титр анти-NS4ab-IgG	ИБ
Положительные, n = 3	1:5–1:80	Отр.	Отр.	Отр.
Положительный, n = 1	1:10	Отр.	1:10	Неопред. (NS4+)
Сомнительные, n = 3	Отр.	Отр.	1:5 – у двух 1:80	Отр. Неопред. (NS4+)
Сомнительный, n = 1	Отр.	1:5	Отр.	Отр.

Примечание. * – титр начального разведения 1:2,5.

Таблица 4

Выявление РНК ВГС в тесте с чувствительностью 15 МЕ/мл в 33 образцах крови доноров, сомнительных по анти-ВГС

Материал для тестирования РНК ВГС	Количество образцов с РНК ВГС в ЛПК и/или плазме, абс (%)		
	количество образцов с РНК ВГС	плазма «+» клетки «+»	плазма «+» клетки «-»
Плазма и клетки	4	2 (6,1)	2 (6,1)
Только плазма	1	0	1
Всего	5 (15,2)	2 (6,1)	3 (9,1)

Таблица 5

Частота выявления антител к отдельным белкам ВГС и их сочетания в образцах крови пациентов с заболеваниями системы крови

Число больных, с антителами к ВГС	Количество больных с антителами к одному антигену ВГС, абс (%)				Количество больных с антителами к двум антигенам ВГС core + NS3 или core + NS4ab
	core	NS3	NS4ab	NS5a	
216	37 (17,1)	7 (3,2)	12 (5,6)	0	18 (8,3)

выявлена РНК ВГС в концентрации менее 100 МЕ/мл. Доля скрытой ВГС-инфекции среди таких доноров в нашем исследовании составила 15,2%, что коррелирует с данными других исследователей. В небольшом числе работ, посвящённых поиску скрытой ВГС-инфекции у доноров и выполненных на выборках различного размера, доля лиц со скрытой ВГС-инфекцией сильно различается: 2 случая на 5,67 млн [19], 10 (2,2%) из 458 [20], 1 (20,0%) из 5 [30].

Углублённое исследование образцов с дискордантными результатами определения анти-ВГС методами ИХЛА, ИФА и ИБ показало, что такие образцы могут содержать вирусную РНК. Так, в образцах крови 4 доноров, собранных во время контрольного обследования, была обнаружена РНК ВГС, при этом анти-ВГС выявлялись методом ИХЛА (КП от 1,03 до 3,5), но не выявлялись в ИФА и ИБ. Ещё один образец, содержащий вирусную РНК в низкой концентрации, был отрицательным в ИХЛА и ИБ, но по-

ложительным в ИФА в тесте «Бест анти-ВГС». При исследовании этого образца в тест-системе «Бест анти-ВГС-спектр» обнаружены антитела только к NS4 в титре 1:5.

Ранее J.A. Quiroga и соавт. [30] были выявлены различия в обнаружении анти-ВГС в тестах ИХЛА и ИФА при исследовании образцов крови случайных первичных доноров в Испании. При исследовании 2012 образцов крови первичных доноров, негативных при скрининге методом ИХЛА, с помощью ИФА теста, сконструированного на основе пептида из консервативного региона core-антигена, этими же авторами было выявлено 42 (2,1%) позитивных образца. В 3 (7,1%) из них с небольшими титрами антител в сыворотке/плазме крови выявлена РНК ВГС в концентрации менее 100 МЕ/мл, тогда как ни у одного из 100 анти-core-негативных доноров РНК ВГС не обнаружена. Авторы делают вывод, что присутствие у донора антител к core-антигену может указывать на наличие скрытой ВГС-инфекции. В нашей работе у 3 (9,1%) из 33 доноров, образцы которых были отрицательны в ИХЛА, при углублённом исследовании выявлены антитела к core-антигену в титрах от 1:5 до 1:160. Ещё у 2 доноров, кроме антител к core-антигену, были обнаружены антитела к NS3 или NS4ab. Однако ни у одного из этих доноров ни в плазме, ни в ЛПК не удалось обнаружить РНК ВГС.

Анализ спектра серологических и молекулярных маркеров ВГС в образцах крови пациентов с заболеваниями системы крови и доноров показал, что РНК ВГС может быть обнаружена в низкой концентрации (менее 100 МЕ/мл). У 5 (11,9%) из 42 пациентов с заболеваниями системы крови низкая концентрация вирусной РНК была обнаружена одновременно с наличием антител к core-антигену ВГС. При этом у 4 из них титр антител к этому белку находился в области низких значений (1:5–1:320), причем у 2 из них это был единственный серологический маркер ВГС, а у 2 антитела к core-белку обнаружены в комбинации с антителами к NS3 или NS4ab в титрах 1:5 и 1:10 соответственно. В пятом образце антитела к core-белку наблюдались в высоком титре (1:1280), а к белку NS4ab – в титре 1:40. В образцах с более высокими титрами антител к core-белку (более 1:320) в комбинации с антителами к NS-

Таблица 6

Анализ спектра серологических и молекулярных маркёров ВГС у больных и потенциальных доноров

Наличие анти-ВГС к вирусным белкам и их сочетания	Пробы, абс.	Наличие РНК в тестах с чувствительностью, абс (%)			Концентрация РНК ВГС, МЕ/мл
		15 МЕ/мл		100 МЕ/мл	
		РНК ВГС в плазме и ЛПК	РНК ВГС только в плазме	анализировали только плазму	
Core	14	2 (14,3) 2 (14,3)	0 0	2 0	> 10 ⁶ < 100
NS3	4	1 (25)		0	< 100
NS4ab	10	-	3 (30)	0	< 100
Core + NS3	7	-	2 (28,6) 1 (14,3)	2 0	> 10 ⁶ < 100
Core + NS4ab	4	2 (50)	-	0	< 100
Core + NS3 + NS4ab	4	0	0	0	0
Core + NS3 + NS5a	4	2 (40)	-	2	> 10 ⁶
Core + NS4ab + NS5a	1	1 (20)	-	1	> 10 ⁵
Core + NS3 + NS4ab + NS5a	5	2 (40)	2 (40)	2 0	> 10 ⁵ < 100
Всего	53	12 (22,6)	8 (15,1)		

белкам, напротив, вирусный геном выявлен в высокой концентрации (более 10^5 МЕ/мл).

Заклучение

Дискордантные результаты детекции анти-ВГС в 15,2% случаев свидетельствовали о наличии у потенциальных доноров скрытой ВГС-инфекции, что подтверждалось наличием РНК вируса в низкой концентрации в плазме/сыворотке либо в клетках крови. Следовательно, в случаях получения противоречивых результатов при применении разных методов (ИХЛА и ИФА) или попадания результатов в «серую зону» необходимо дополнительное углублённое исследование, включающее определение спектра антител к отдельным антигенам ВГС, а также определение РНК ВГС высокочувствительными тестами не только в плазме/сыворотке, но и в клеточной фракции периферической крови. Это справедливо и при обследовании пациентов с заболеваниями системы крови, поскольку у 19% больных вирусная РНК обнаруживалась в концентрации менее 100 МЕ/мл одновременно с низкими титрами анти-ВГС к одному или двум вирусным белкам.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1-3, 5-28, 30 см. REFERENCES)

4. Трифонова Г.Ф., Левакова И.А., Болсун Д.Д., Мукомолов С.Л. Острый и хронический гепатит С в Российской Федерации в 1994–2013 гг. *Инфекция и иммунитет*. 2014; 4(3): 267–74.
29. Ярославцева Н.Г., Романова Т.Ю., Игнатова Е.Н., Овчинникова Е.Н., Тихомиров Д.С., Николаева Л.И. и др. Низкие концентрации РНК ВГС в образцах крови с неопределённым результатом по анти-ВГС («серая зона»). *Гематология и трансфузиология*. 2016; 61(1; Прил. 1): 82.

REFERENCES

1. Gower E., Estes C., Blach S., Razavi-Shearer K., Razavi H. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. *J. Hepatol.* 2014; 61(1 Suppl.): 45-55. DOI: 10.1016/j.jhep.2014.07.027.
2. Comas L.G., Gavin M.O., Sanz Moreno J.C., Blazques B.R., Rodrigues A.C., Mochales J.A., et al. Prevalence of hepatitis C antibodies in the population aged 16-80 years in the Community of Madrid 2008-2009. *J. Med. Virol.* 2015; 87(10): 1697-701. DOI: 10.1002/jmv.24219.
3. Sievert W., Alraif I., Razavi H.A., Abdo A., Ahmed E.A., Alomair A., et al. A systematic review of hepatitis C virus epidemiology in Asia, Australia and Egypt. *Liver Int.* 2011; 31(Suppl. 2): 61-80. DOI:10.1111/j.1478-3231.2011.02540.x.
4. Trifonova G.F., Levakova I.A., Bolsun D.D., Mukomolov S.L. Acute and chronic hepatitis C in Russia during 1994-2013 yrs. *Infektsiya i immunitet*. 2014; 4(3): 267-74. (in Russian)
5. Carreno V. Seronegative occult hepatitis C virus infection: clinical implications. *J. Clin. Virol.* 2014; 61(3): 315-20. DOI: 10.1016/j.jcv.2014.09.007.
6. Rezaee-Zavareh M.S., Hadi R., Karimi-Sari H., Khosravi M.H., Ajudani R., Dolatimehr F., et al. Occult HCV infection: the current state of knowledge. *Iran Red Crescent Med. J.* 2015; 17(11): e34181. DOI: 10.5812/ircmj.34181.
7. Bartolome J., Lopez-Alcorocho J.M., Castillo I., Rodrigues-Inigo E., Quiroga J.A., Palacios R. Ultracentrifugation of serum samples allows detection of hepatitis C virus RNA in patients with occult hepatitis C. *J. Virol.* 2007; 81(14): 7710-5. DOI: 10.1128/JVI.02750-06.
8. Pardo M., Lopez-Alcorocho J.M., Rodrigues-Inigo E., Castillo I., Carreno V. Comparative study between occult hepatitis C virus infection and chronic hepatitis C. *J. Viral. Hepatitis*. 2007; 14(1): 36-40. DOI: 10.1111/j.1365-2893.2006.00783.x.
9. Bokharaei-Salim F., Keyvani H., Monavari S.H., Alavian S.M., Madjid Z., Toosi M.N., et al. Occult hepatitis C virus infection in Iranian patients with cryptogenic liver disease. *J. Med. Virol.* 2011; 83(6): 989-95. DOI: 10.1002/jmv.22044.
10. Castillo I., Pardo M., Bartolome J., Otiz-Movilla N., Rodriguez-Inigo E., de Lucas S., et al. Occult hepatitis C virus infection in patients in whom the etiology of persistently abnormal results of liver-function test is unknown. *J. Infect. Dis.* 2004; 189(1): 7-14. DOI: doi.org/10.1086/380202.
11. Abdelrahim S.S., Khairy R., Esmail M.A., Ragab M., Abdel-Hamid M., Abdelwahab S.F. Occult hepatitis C virus infection among Egyptian hemodialysis patients. *J. Med. Virol.* 2016; 88(8): 1388-93. DOI: 10.1002/jmv.24467.
12. Sugden P.B., Pham N.N.O., Ratnarajah S., Cameron B., Bull R., White P.A., et al. Rare occurrence of occult hepatitis C virus in apparently uninfected injecting drug user: a two-center, masked, case-control study. *J. Viral. Hepat.* 2013; 20(10): 725-8. DOI: 10.1111/jvh.12098.
13. Farahani M., Bokharaei-Salim F., Ghane M., Basi A., Meysami P., Keyvani H. Prevalence of occult hepatitis C virus infection in Iranian patients with lymphoproliferative. *J. Med. Virol.* 2013; 85(2): 235-240. DOI: 10.1002/jmv.23460.
14. Youssef S.S., Nasr A.S., Zanaty T., Rawi R.S., Mattar M.M. Prevalence of occult hepatitis C virus in Egyptian patients with chronic lymphoproliferative disorders. *Hepat. Res. Treat.* 2012; 2012: 429784. DOI: 10.1155/2012/429784.
15. Helaly G.F., Elsheredy A.G., El Basset Mousa A.A., Ahmed H.K.F., Oluymi A.E.S. Seronegative and occult hepatitis C infections in patients with hematological disorders. *Arch. Virol.* 2017; 162(1): 63-9. DOI: 10.1007/s00705-016-3049-7.
16. Bastani M.N., Bokharaei-Salim F., Keyvani H., Eshaei M., Monavari S.H., Ebrahimi M., et al. Prevalence of occult hepatitis C virus infection in Iranian patients with beta-thalassemia major. *Arch. Virol.* 2016; 161(7): 1899-906. DOI: 10.1007/s00705-016-2862-3.
17. Sugden P.B., Cameron B., Bull R., White P.A., Lloyd R. Occult infection with hepatitis C virus: friend or foe? *Immunol. Cell Biol.* 2012; 90(8): 763-73. DOI: 10.1038/icb.2012.20.
18. Pham T.N.Q., Coffin C.S., Michalak T.I. Occult hepatitis C infection: what does it mean? *Liver Int.* 2010; 30(4): 502-10. DOI: 10.1111/j.1478-3231.2009.02.193.x.
19. Alvarez M., Planelles D., Vila E., Montaro J., Franco E. Prolonged hepatitis C virus seroconversion in a blood donor, detected by HCV Antigen test in parallel with HCV RNA. *Vox. Sanguinis*. 2004; 86(4): 266-7. DOI: 10.1111/j.0042-9007.2004.00513.x.
20. Lin H., Chen X., Zhu S., Mao P., Zhu S., Liu Y., et al. Prevalence of occult hepatitis C virus infection among blood donors in Jiangsu, China. *Intervirology*. 2016; 59(4): 204-10. DOI: 10.1159/000455854.
21. Carreno V., Bartolome J., Castillo I., Quiroga J.A. New perspectives in occult hepatitis C infection. *World J. Gastroenterol.* 2012; 18(23): 2887-94. DOI: 10.3748/wjg.v18.i23.2887.
22. De Marco L., Gillio-Tos A., Fiano V., Ronco G., Krogh V., Palli D., et al. Occult HCV infection: an unexpected finding in a population unselected for hepatic disease. *PLoS One*. 2009; 4(12): e8128. DOI:10.1371/journal.pone.0008128.
23. Brojer E. Serological and molecular markers of HCV infection in Polish blood donors. *Przegl. Epidemiol.* 2005; 59(2): 511-7. (in Polish)
24. Tugwell B.D., Patel P.R., Williams I.T., Hedberg K., Chai F., Nainan O.V., et al. Transmission of hepatitis C virus to several organ and tissue recipients from an antibody-negative donor. *Ann. Intern. Med.* 2005; 143(9): 648-54. DOI: 10.7326/0003-4819-143-9-200511010-00008.
25. Thomson E.C., Nastouli E., Main J., Karayiannis P., Eliahoo J., Muir D., et al. Delayed anti-HCV antibody response in HIV-positive men acutely infected with HCV. *AIDS*. 2009; 23(1): 89-93. DOI: 10.1097/QAD.0b013e32831940a3.
26. Alnaqy A., Al-Harthy S., Kaminsky G., Al-Dhahry S. Detection of serum antibodies to hepatitis C virus in "false-seronegative" blood donors in Oman. *Med. Princ. Pract.* 2006; 15(2): 111-3. DOI: 10.1159/000090914.
27. Larouche A., Gaetan G., El-Bilali N., Quesnel-Vallieres M., Martin S.R., Alvarez F., et al. Seronegative hepatitis C virus infection in a child infected via mother-to-child transmission. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50(7): 2515-9. DOI: 10.1128/JCM.00622-12.
28. Bruhn R., Lelie N., Busch M., Kleinman S. Relative efficacy of nucleic acid amplification testing and serologic screening in preventing hepatitis C virus transmission risk in seven international regions. *Transfusion*. 2015; 55(6): 1195-205. DOI: 10.1111/trf.13024.
29. Yaroslavtseva N.G., Romanova T.Yu., Ignatova E.N., Ovchinnikova E.N., Tikhomirov D.S., Nikolaeva L.I., et al. Blood samples with discordant anti-HCV detection results or "grey zone" results can contain low concentration HCV RNA. *Gematologiya i transfuziologiya*. 2016; 61(1; Suppl. 1): 82. (in Russian)
30. Quiroga J.A., Avellon A., Baltimore J., Andreu M., Flores E., Gonzalez M.I., et al. Detection of hepatitis C virus (HCV) core-specific antibody suggests occult HCV infection among blood donors. *Transfusion*. 2016; 56(7): 1883-90. DOI: 10.1111/trf.13645

Поступила 28.12.17

Принята в печать 06.03.18

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Дзагурова Т.К.¹, Ишмухаметов А.А.^{1,2}, Бахтина В.А.³, Морозов В.Г.⁴,
Баловнева М.В.¹, Курашова С.С.¹, Клемпа Б.⁵, Кругер Д.⁶, Ткаченко Е.А.^{1,2}

АНАЛИЗ ГРУППОВОЙ ВСПЫШКИ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ, ВЫЗВАННОЙ ВИРУСОМ СОЧИ

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

²ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет), 119435, г. Москва, Россия;

³ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России, 350015, г. Краснодар, Россия;

⁴ООО Медицинская компания «Гепатолог», 443063, г. Самара, Россия

⁵Биомедицинский научный центр Словацкой академии наук, 84505, Братислава, Словакия;

⁶Институт вирусологии, Хельмут-Руска-Хаус, D-10098, Берлин, Германия

Введение. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) занимает ведущее место среди природно-очаговых болезней человека в Российской Федерации. С 2000 г. sporadicкая заболеваемость ГЛПС-Сочи ежегодно регистрируется на территории Краснодарского края. Групповая вспышка ГЛПС-Сочи впервые зарегистрирована в Геленджике осенью 2013 г. **Материал и методы.** Использованы серологические методы: непрямая иммунофлуоресценция, иммуноферментный анализ, реакция нейтрализации инфекционных фокусов в культуре Vero, а также методы выявления вирусной РНК: полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией и в реальном времени. **Результаты.** Представлены данные клинико-эпидемиологических, иммунологических и молекулярно-генетических исследований 3 из 4 случаев вспышки ГЛПС-Сочи. Тяжесть заболевания коррелировала с ранними проявлениями желудочно-кишечных расстройств в виде тошноты, рвоты, диареи на фоне других общетоксических симптомов. У больного М.А. желудочно-кишечные расстройства развились на 3-й день лихорадки. По результатам клинических исследований были выявлены признаки поражения почек, печени, поджелудочной железы, двусторонний гидроторакс, двусторонняя полисегментарная пневмония, полинейропатия. В результате длительного лечения больной выздоровел. У больного А.А. желудочно-кишечные расстройства развились на следующий день после начала лихорадки. Несмотря на раннюю госпитализацию больного спасти не удалось. Хантавирусный антиген и РНК выявлены в легочной ткани 2 из 10 кавказских лесных мышей, отловленных на территории проживания заболевших, а также в органах умершего больного. **Обсуждение.** Наиболее тяжелое клиническое течение болезни у близких родственников, сына и отца, с летальным исходом в последнем случае может быть результатом генетической предрасположенности. Тяжесть заболевания и исход болезни не зависели от срока госпитализации и коррелировали с ранними проявлениями желудочно-кишечных расстройств. **Заключение.** Представленные данные подтверждают факт высокой вирулентности и пантропности вируса *Сочи*, а также эпидемиологическую роль кавказской лесной мыши *Apodemus ponticus* как хозяина вируса *Сочи* и источника заражения людей.

Ключевые слова: хантавирусы; вирус *Сочи*; геморрагическая лихорадка с почечным синдромом; кавказская лесная мышь.

Для цитирования: Дзагурова Т.К., Ишмухаметов А.А., Бахтина В.А., Морозов В.Г., Баловнева М.В., Курашова С.С., Клемпа Б., Кругер Д., Ткаченко Е.А. Анализ групповой вспышки геморрагической лихорадки с почечным синдромом, вызванной вирусом *Сочи*. *Вопросы вирусологии*. 2019; 64(1): 36-41.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-1-36-41>.

Dzagurova T.K.¹, Ishmukhametov A.A.^{1,2}, Bakhtina V.A.³, Morozov V.G.⁴,
Balovneva M.V.¹, Kurashova S.S.¹, Klempa B.⁵, Kruger D.⁶, Tkachenko E.A.^{1,2}

HEMORRHAGIC FEVER WITH RENAL SYNDROME GROUP OUTBREAK CAUSED BY SOCHI VIRUS

¹Chumakov federal scientific center for research and development of immune-and-biological products of Russian academy of sciences, Moscow, 108819, Russian Federation;

²1th Moscow State medical university named by I.M. Sechenov, Moscow, 119435, Russian Federation;

³Specialized clinical infectious hospital, Krasnodar, 350015, Russian Federation;

⁴Medical Company «Gepatolog», Samara, 443063, Russian Federation;

⁵Biomedical Research Center Slovak Academy of Sciences, 84505, Bratislava, Slovakia;

⁶Institute of Virology, Helmut-Ruska-Haus, D-10098, Berlin, Germany.

Introduction. Hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) occupies a leading place among natural focal human diseases in the Russian Federation. Sporadic incidence of HFRS-Sochi has been annually recorded in the Krasnodar Territory since 2000. The group outbreak of the HFRS-Sochi was first registered in Gelendzhik in the fall of 2013. **Material and methods.** Serological methods were used: indirect immunofluorescence, enzyme immunoassay, FRNT in Vero cells, and methods for the viral RNA detection: PCR and RT-PCR.

Results. Data of clinical, epidemiological, immunological and molecular studies of 3 out of 4 cases in HFRS-Sochi outbreak are presented. Severity of the disease correlated with early gastrointestinal disorders appearance. Patient MA gastrointestinal disorders were joined on day 3 of a fever. Clinical and laboratory studies revealed signs of kidneys, liver, pancreas damage, bilateral hydrothorax, bilateral polysegmental pneumonia and polyneuropathy. As a result of long-term treatment, the patient recovered. Patient AA had gastrointestinal disturbances the next day after fever onset. The patient

Для корреспонденции: Дзагурова Тамара Казбековна, д-р мед. наук, заведующая лабораторией геморрагических лихорадок ФГБНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН», 108819, г. Москва. E-mail: evgeniytkach@mail.ru

was not saved, despite early hospitalization. Hantavirus antigen and RNA were detected in the lung tissues 2 out of 10 Black-Sea field mice captured in the affected area, as well as in the organs of deceased patient. **Discussion.** The most severe clinical course of the disease in close relatives, son and father, with a fatal outcome in the latter case may be the result of genetic features. The severity and outcome of the disease was not depend on day of hospitalization and correlated with the early manifestations of gastrointestinal disorders. **Conclusion.** Presented data confirm high virulence and pantropism of the Sochi virus, as well as the epidemiological role of Black-Sea field mouse (*Apodemus ponticus*) as the host of the Sochi virus and the source of human infection.

Keywords: hantaviruses; Sochi virus; hemorrhagic fever with renal syndrome; Black-Sea field mouse.

For citation: Dzagurova T.K., Ishmukhametov A.A., Bakhtina V.A., Morozov V.G., Balovneva M.V., Kurashova S.S., Klempa B., Kruger D., Tkachenko E.A. Hemorrhagic fever with renal syndrome group outbreak caused by Sochi virus. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2019; 64(1): 36-41. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-1-36-41>

For correspondence: Tamara K. Dzagurova, Dr. Sci. Med., Head, Laboratory of Hemorrhagic Fevers, Head, Laboratory of Hemorrhagic Fevers, FSBSI «Chumakov FSC R&D IBP RAS». Moscow, 108819, Russian Federation. E-mail: evgeniytkach@mail.ru

Information about authors:

Dzagurova T.K., <http://orcid.org/0000-0002-6656-1682>
Ishmukhametov A.A., <http://orcid.org/0000-0001-6130-4145>
Bakhtina V.A., <http://orcid.org/0000-0001-6065-2922>
Morozov V.G., <http://orcid.org/0000-0002-4451-7891>

Balovneva M.V., <http://orcid.org/0000-0003-2198-7521>
Kurashova S.S., <http://orcid.org/0000-0001-9934-699X>
Tkachenko E.A., <http://orcid.org/0000-0002-6829-1241>

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

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

Received 02 March 2018

Accepted 06 March 2018

Введение

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) – острое вирусное заболевание зоонозной природы, характеризующееся системным поражением мелких сосудов, гемодинамическими расстройствами и поражением почек (интерстициальный нефрит с развитием острой почечной недостаточности).

Клинически диагностируемые формы ГЛПС у людей регистрируются только в странах Евразии и вызываются вирусами, относящимися к роду *Orthohantavirus* (семейство *Hantaviridae*, отряд *Bunyavirales*). К ним относятся вирусы Хантаан (ХТН), Амур, Сеул (СЕУ), циркулирующие на территории Азии, включая дальневосточные регионы России, а также вирус Пуумала (ПУУ), регистрируемый на Европейской территории, и 4 геноварианта вируса Добrava/Белград, из которых вирусы Сочи и Куркино (КУР) регистрируют в России, вирусы Саарема, КУР, Добrava (ДОБ) – в европейских странах [1]. Клинические проявления ГЛПС у больных варьируют, нередко значительно [2, 3], что связано не только с видовыми, но и с внутривидовыми отличиями возбудителя. Так, известно, что 4 геноварианта вируса Добrava/Белград вызывают ГЛПС в диапазоне клинических проявлений от стертых форм (вирус Саарема), преимущественно легких и среднетяжелых форм (вирус КУР) и с преобладанием тяжелых форм с летальностью до 14% (вирусы ДОБ и Сочи) [4]. Впервые случай ГЛПС, ассоциированный с новым хантавирусом, получившим название Сочи (ГЛПС-Сочи), был выявлен в 2000 г. [5]. С этого времени ГЛПС-Сочи ежегодно регистрируется в виде спорадических случаев на юге Краснодарского края, в ареале обитания кавказской лесной мыши, являющейся природным хозяином вируса. Несмотря на то что регистрируемая заболеваемость людей ГЛПС-Сочи невысока (в среднем 10–12 случаев в год), эта инфекция требует повышенного внимания клиницистов ввиду тяжести течения и высокой летальности, а также эпидемиологов – с целью контроля эпидемиологической ситуации. Ввиду своеобразного клинического течения случаи этой инфекции нередко выявляли ретроспек-

тивно среди остро лихорадящих больных с различными диагнозами (преимущественно абдоминальная патология, включая острую кишечную инфекцию, лептоспироз, острую респираторную вирусную инфекцию) и, как правило, окончательный диагноз ГЛПС ставили лишь после серологического подтверждения этиологической роли хантавируса [6].

На фоне спорадической заболеваемости нами впервые была выявлена групповая вспышка ГЛПС-Сочи.

Цель настоящей работы – анализ результатов клинико-эпидемиологических и лабораторных исследований случаев группового заболевания ГЛПС-Сочи.

Материал и методы

Клинические проявления заболевания описаны на основании данных историй болезни 3 больных, которым был верифицирован окончательный диагноз «ГЛПС-Сочи» с помощью серологических методов: первичный скрининг антител (суммарно IgG и IgM) в сыворотках крови методом иммунофлюоресценции с использованием набора реагентов «Диагностикум ГЛПС» производства ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН»; типирование положительных сывороток с моновалентными антигенами вирусов ПУУ, ХТН, СЕУ, КУР, Сочи и ДОБ [6]; определение IgM, IgG хантавирусных антител методом иммуноферментного анализа (ИФА) [7]; типирование сывороток в реакции нейтрализации, используя метод редукции числа фокособразующих единиц в культуре клеток Vero E6 [6] с вирусами: ПУУ (штамм К-27/Уфа-85), ХТН (штамм Р-88/Хабаровск-89), СЕУ (штамм SR-11), Сочи (штамм Ap1584/Сочи-01), КУР (штамм Aa1854/Липецк-02) и ДОБ (штамм Bel-1).

Хантавирусный антиген в 10% суспензии ткани органов кавказских лесных мышей, а также в секционном материале от больного определяли с помощью прямого метода ИФА с использованием иммуноферментной тест-системы «Хантагност» производства ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН», согласно инструкции производителя.

Количество хантавирусной РНК в секционном материале (легкие, почки, печень, лимфатические узлы,

мозг) определяли методом полимеразной цепной реакции в реальном времени [8].

Результаты

В октябре 2013 г. на территории микрорайона Голубая бухта г. Геленджика Краснодарского края была зарегистрирована вспышка острого лихорадочного заболевания среди рабочих частной строительной компании, проживавших в деревянном строительном вагончике. Все 4 заболевших были сезонными строительными рабочими, приехавшими из Дагестана в начале сентября того же года.

Рабочий, заболевший первым (16.10.2013), несмотря на высокую температуру, на 2-й день после начала лихорадки уехал домой в Дагестан, и дальнейшая его судьба, к сожалению, неизвестна. Спустя 4 дня после начала заболевания 1-го больного, с интервалом в 2–3 дня заболели еще 3 рабочих. У всех больных отмечали резкое повышение температуры тела, головную и мышечную боли, першение и боль в горле, а также желудочно-кишечные расстройства. До обращения в лечебное учреждение больные самостоятельно принимали аспирин.

Пациент М.А. был госпитализирован 26.10.2013 по скорой помощи в МБУЗ «Городская больница» г. Геленджика на 6-й день после начала заболевания с направительным диагнозом: «острый токсический гастроэнтерит, лептоспироз и ГЛПС под вопросом». Начало заболевания, со слов больного, характеризовалось ознобом, общей слабостью, болями в горле и мышцах, особенно нижних конечностей. Температура тела повышалась до 39,5 °С. Больной принимал аспирин по 1 таблетке 3 раза в день. Через 3 дня появились боли в животе, многократная рвота, дважды жидкий стул. В результате лабораторного исследования сыворотки крови больного была установлена этиологическая роль хантавирусов в заболевании, после чего больному был поставлен клинический диагноз ГЛПС. В течение 4 дней пребывания в стационаре состояние больного прогрессивно ухудшалось, и он был переведен в отделение реанимации и интенсивной терапии специализированной клинической инфекционной больницы (СКИБ) Краснодара с диагнозом: ГЛПС (тяжелая форма), синдром почечно-печеночной недостаточности, инфекционно-токсический шок. На основании результатов клинических анализов, ультразвукового и рентгенологического исследования были выявлены: двусторонняя реномегалия, диффузные изменения паренхимы обеих почек по типу острого нефрита; гепатомегалия, спленомегалия, диффузные изменения печени и поджелудочной железы, двусторонний гидроторакс, гидроперитонеум, двусторонняя полисегментарная пневмония, лейкоцитоз, снижение числа эритроцитов и тромбоцитов. В течение 6 дней больной находился на искусственной вентиляции легких, ему была однократно проведена гемофильтрация, 6 переливаний свежемороженой плазмы. На рисунке представлена динамика основных патогномических показателей: сывороточного креатинина и мочевины, тромбоцитов, лейкоцитов, а также показатели суточного диуреза. В результате проведенного лечения, включавшего глюкокортикостероиды, антибактериальную, дезинтоксикационную, метаболическую и гемостатическую терапию, больной был выписан с клиническим выздоровлением на 50-й день болезни.

Пациент А.А. (отец пациента М.А.) заболел 26.10.2013, когда почувствовал слабость, недомогание, першение и боль в горле, боли в мышцах. Температура повышалась

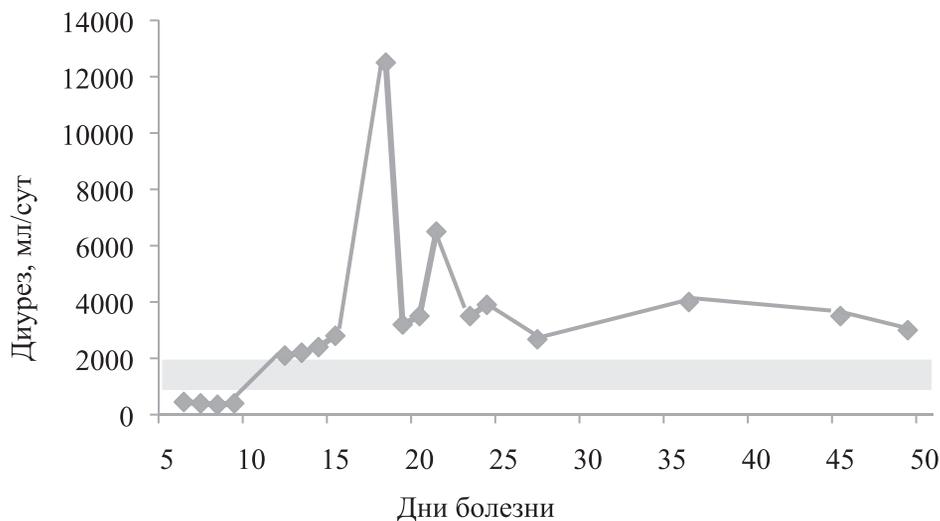
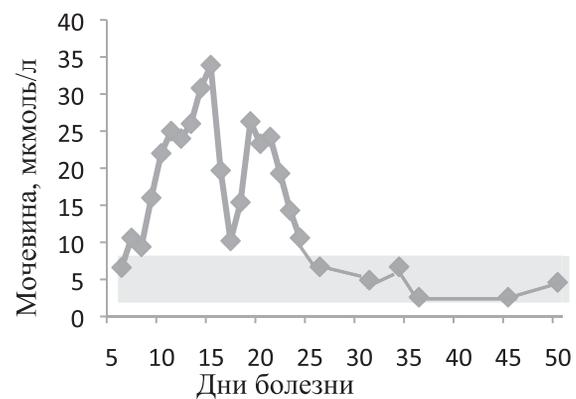
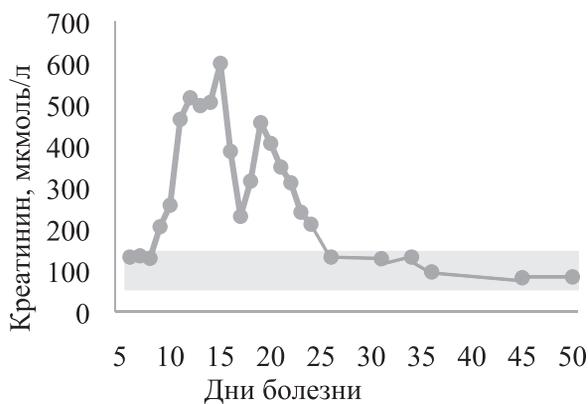
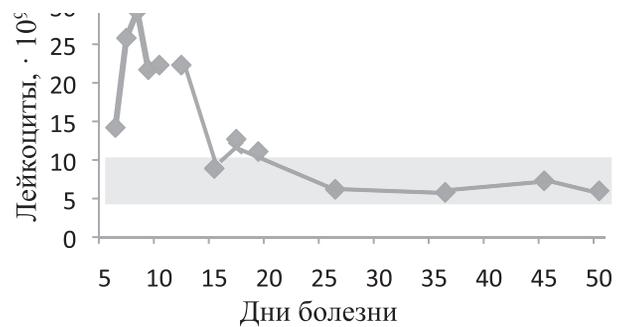
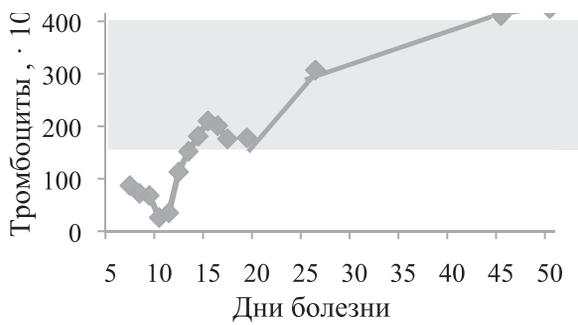
до 39 °С. В ночь с 27 на 28 октября была рвота, появились боли в животе и больной самостоятельно обратился в приемное отделение МБУЗ «Городская больница» г. Геленджика, где уже находился на лечении его сын. Диагноз при поступлении: «острая респираторная инфекция, тяжелое течение; лептоспироз? ГЛПС?» Клинический диагноз: ГЛПС. На фоне уже нормальной температуры тела и проводимого лечения состояние больного прогрессивно ухудшалось, что сопровождалось гемодинамическими нарушениями: снижением артериального давления (АД) до 90/50 мм рт.ст., а также снижением диуреза. Вечером 29 октября на фоне продолжающегося снижения АД, дыхательной и церебральной недостаточности больной был подключен к аппарату искусственной вентиляции легких. Однако в ночь на 30 октября наступила остановка сердечной деятельности и, несмотря на реанимационные мероприятия, была констатирована смерть. При патологоанатомическом вскрытии были обнаружены такие патологические изменения в органах, как отек легких и мозга, кровоизлияние в гипофиз и надпочечники, множественные очаговые кровоизлияния в тканях почечных лоханок и мозговом слое почек, очаговые мелкие геморрагии в легких.

Пациент Т.Р. заболел 22.10.2013, когда почувствовал озноб, потливость, слабость, головную боль, боли в пояснице. Температуру тела впервые измерил 25.10.2013 (39,5 °С). Лечился самостоятельно, принимал жаропонижающие, обильное питье. 28.10.2013 обратился в приемное отделение МБУЗ «Городская больница» г. Геленджика, однако от госпитализации категорически отказался. Тем не менее 30.10.2013 по направлению участкового врача был госпитализирован в ту же больницу с диагнозом ГЛПС, и, учитывая его тяжелое состояние на фоне нормализовавшейся температуры, был переведен в тот же день в отделение реанимации и интенсивной терапии СКИБ Краснодара. К моменту госпитализации у больного началась полиурическая стадия острой почечной недостаточности. По данным ультразвукового исследования определялись признаки двусторонней реномегалии, гепатомегалии, спленомегалии, малого гидроперитонеума, диффузных изменений печени. На фоне проводимого лечения состояние больного стабилизировалось и на 4-й день его перевели из отделения реанимации в отделение общей терапии. На 20-й день пребывания в стационаре больной был выписан с клиническим выздоровлением.

В табл. 1 приведены основные клинико-лабораторные показатели больных. Следует отметить, что сроки поступления в стационар не влияли на тяжесть болезни: летальный исход зафиксирован у больного с наиболее ранней госпитализацией. Наиболее тяжелое течение болезни оказалось у близкородственных пациентов (отца и сына), и, возможно, только молодой возраст позволил справиться с тяжелейшим полиорганым поражением. В обоих случаях заболевание дебютировало желудочно-кишечными расстройствами на фоне высокой температуры тела.

В табл. 2 обращает на себя внимание крайне низкий титр хантавирусных антител в сыворотке крови погибшего больного (1:64), что указывает на угнетение иммунной системы, поскольку, как известно, хантавирусы активно размножаются в В-лимфоцитах [9].

Хантавирусный антиген был выявлен во всех исследованных аутопсийных биоматериалах больного А.А. (сердце, легкое, печень, почка, селезенка, поджелудочная железа, мозг, лимфатический узел), что свидетельствует



Динамика лабораторных показателей больного М.А.
Серым цветом выделен диапазон показателей в норме.

о пантропности вируса. В этих же органах выявили РНК вируса *Сочи*. Наиболее высокая вирусная нагрузка была зафиксирована в почках и лимфатических узлах (11,446 и 3,086 копий/нг РНК соответственно), значительно более низкая – в образцах тканей легких, мозга и печени (50–100 копий/нг РНК).

Обсуждение

Очевидно, заражение больных вирусом *Сочи* произошло по месту их временного проживания в деревянном вагончике. Захламленная и заросшая бурьяном терри-

тория вокруг этого жилища была благоприятной для обитания мышевидных грызунов. Кроме того, больные замечали присутствие мышей внутри самого вагончика, в котором они ночевали, готовили и хранили пищу. У 2 из 10 особей кавказской лесной мыши, отловленных на территории, прилегающей к месту проживания больных, в образцах легочной ткани был обнаружен хантавирусный антиген и выделена вирусная РНК. Это подтверждает тот факт, что кавказские лесные мыши стали источником заражения рабочих.

В опубликованной ранее работе [10] представлены

Таблица 1

Клинико-лабораторные данные больных ГЛПС-Сочи

Показатель	Больной М.А.	Больной А.А.	Больной Т.Р.
Возраст, годы	23	50	31
День госпитализации от начала заболевания	6-й	3-й	8-й
Длительность госпитализации, сут	50	2 (летальный исход)	12
Желудочно-кишечная симптоматика	Боли в животе, рвота, понос, частичный парез кишечника	Боли в животе, рвота, диарея	Боли в животе, тошнота
Гемодинамические нарушения: АД, мм рт.ст. (мин.)	95/55	82/48	111/65
Геморрагический синдром	Кровоизлияние в склеры, макрогематурия, эпистаксис, кровавая мокрота	Кровоизлияние в склеры, микрогематурия	Инъецированные склеры, микрогематурия
Олигурия <500 мл, дни	7 (1 гемодиализ)	1	1
Полиурия (макс.)/длительность, сут	12 500 мл / 26	Не отмечено	4700 мл / 8
Нарушения зрения	«Сетка» перед глазами	Не отмечено	Не отмечено
Осложнения	ОПН, ИТШ, ДВС, ОДН 2-й степени (ИВЛ – 6 сут), двусторонняя полисегментарная пневмония, пост-геморрагическая анемия, реактивный панкреатит, парез кишечника, полинейропатия	ИТШ, ОПН, ОДН (ИВЛ – 1 сут)	ОПН
Креатинин мкмоль/л (макс.) (N = 53–115)	599	297	314
Тромбоциты, ·10 ⁹ /л (мин.) (N = 150–400)	13	30	137*
Лейкоциты, ·10 ⁹ /л (макс.) (N = 5–10)	29,3	21,7	10,3

Примечание. * Ввиду поздней госпитализации более низкие показатели не зафиксированы; ОПН – острая почечная недостаточность; ИТШ – инфекционно-токсический шок; ДВС – диссеминированное внутрисосудистое свертывание; ОДН – острая дыхательная недостаточность; ИВЛ – искусственная вентиляция легких; N – норма; мин. – минимальные показатели; макс. – максимальные показатели.

Таблица 2

Результаты специфической лабораторной диагностики

Больной	День болезни	МФА				ИФА				РН*					
		ПУУ	ДОБ	ХТН	СЕУ	ПУУ		ДОБ		Сочи	КУР	ДОБ	ХТН	СЕУ	ПУУ
						IgM	IgG	IgM	IgG						
М.А.	6-й	32**	2048	1024	1024	< 128	< 128	8192	8192	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.
	36-й	64	4096	1024	1024	< 128	< 128	4096	8192	2560	640	1280	40	<40	<40
А.А.	5-й	<16	128	64	64	< 128	< 128	1024	128	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.
Т.Р.	9-й	32	4096	4096	1024	< 128	< 128	32768	16384	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.
	22-й	64	4096	4096	2048	< 128	< 128	16384	16384	5120	1280	2560	160	80	< 40

Примечание. * В реакции нейтрализации дифференцирующие типоспецифические антитела хантавирусов регистрируются спустя 3–4 нед с начала болезни; ** титр антител в сыворотках крови; МФА – метод иммунофлюоресценции; н.и. – не исследовано.

данные молекулярно-генетических исследований. Частично или полностью были амплифицированы L- и S-сегменты вирусной РНК, изолированной от 2 кавказских лесных мышей и из секционного материала органов пациента А.А., зарегистрированные в GenBank под номерами KP878308, KP878311, KP878309, KP878312, KP878310, KP878313 соответственно. С помощью филогенетического анализа была установлена их генетическая принадлежность к вирусу *Сочи*, выделенному и изученному нами ранее [11, 12].

Вирус *Сочи* – один из наиболее вирулентных возбудителей ГЛПС, при которой частота летальных исходов достигает 14,5% [12]. Для сравнения: летальность от регистрируемой на юге Европы и Балканах ГЛПС, вызываемой близкородственным вирусом ДОБ (резервуарный хозяин – желтогорлая мышь), составляет 10–12% [13, 14], а при ГЛПС, вызываемой вирусом ХТН на Дальнем Востоке РФ, в Корее и Китае, – около 3% [15–17].

Было показано, что у больных ГЛПС-Пуумала возможность развития тяжелой формы инфекции имеет высокую степень корреляции с наличием определенных гаплотипов главного комплекса гистосовместимости (HLA-B8, HLA-C4A*Q0 и HLA-DRB1*0301) [18], тогда как легкие формы ГЛПС ассоциированы с гаплотипом HLA-B27 [19]. Возможно, что тяжесть течения ГЛПС-Сочи также ассоциируется с определенными гаплотипами, о чем свидетельствует наиболее тяжелое клиническое течение болезни у близких родственников, сына и отца, с летальным исходом в последнем случае.

Заключение

Все заболевшие в Геленджике находились в очаге циркуляции вируса *Сочи* и перенесли тяжелую, крайне тяжелую и летальную инфекцию, что характеризует типичность тяжелого клинического течения при ГЛПС-Сочи. Подтверждением этому служит и установленный нами

ранее факт того, что из 67 серологически подтвержденных случаев ГЛПС-Сочи, зарегистрированных на территории Краснодарского края, легкая форма клинического течения установлена лишь у 1 больного [9]. К особенностям наиболее тяжелых форм ГЛПС-Сочи следует отнести желудочно-кишечные расстройства в дебюте заболевания, что усложняет раннюю диагностику заболевания.

Финансирование. Работа выполнена в рамках Госзадания.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 3-5, 7-10, 12-14, 16-19 см. REFERENCES)

1. Ткаченко Е.А., Дзагурова Т.К., Бернштейн А.Д., Коротина Н.А., Окулова Н.М., Мутных Е.С. и др. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (история, проблемы и перспективы изучения). *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2016; 15(3): 23-34.
2. Морозов В.Г., Ишмухаметов А.А., Дзагурова Т.К., Ткаченко Е.А. Клинические особенности геморрагической лихорадки с почечным синдромом в России. *Медицинский совет*. 2017; (5): 156-61.
6. Дзагурова Т.К., Ткаченко Е.А., Юничева Ю.В., Морозов В.Г., Брюханов А.Ф., Башкирцев В.Н. и др. Обнаружение и клинико-этиологическая характеристика ГЛПС в субтропической зоне Краснодарского края. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2008; (1): 12-6.
11. Ткаченко Е.А., Окулова Н.М., Юничева Ю.В., Морзунов С.П., Хайбулина С.Ф., Рябова Т.Е. и др. Эпизоотологические и вирусологические особенности природного очага хантавирусной инфекции в субтропической зоне Краснодарского края. *Вопросы вирусологии*. 2005; 50(3): 14-9.
15. Слонова Р.А., Астахова Т.И., Компанец Г.Г. Результаты изучения геморрагической лихорадки с почечным синдромом на юге Дальнего Востока России. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 1997; (5): 97-101.
- demus sylvaticus. In: *Abstracts of 5th International Conference on HFRS, HPS, and hantaviruses*. Veyrier-du-Lac, France; 2001: 24-7.
6. Dzagurova T.K., Tkachenko E.A., Yunicheva Yu.V., Morozov V.G., Bryukhanov A.F., Bashkirtsev V.N., et al. Detection, clinical and etiological characteristics of HFRS in the subtropical zone of the Krasnodar Territory. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2008; (1): 12-6. (in Russian)
7. Meisel H., Wolbert A., Razanskiene A., Marg A., Kazaks A., Sasnauskas K., et al. Development of novel immunoglobulin G (IgG), IgA, and IgM enzyme immunoassays based on recombinant Puumala and Dobrava hantavirus nucleocapsid proteins. *Clin. Vaccine Immunol.* 2006; 13(12): 1349-57. doi: 10.1128/CVI.00208-06
8. Kramski M., Meisel H., Klempa B., Krüger D.H., Pauli G., Nitsche A. Detection and typing of human pathogenic hantaviruses by real-time reverse transcription-PCR and pyrosequencing. *Clin. Chem.* 2007; 53(11): 1899-905. doi: 10.1373/clinchem.2007.093245
9. Tang Y.M., Yang W.S., Zhang W.B., Bai X.E. Localization and changes of hemorrhagic fever with renal syndrome virus in lymphocyte subpopulation. *Cin. Med. J. (Engl.)* 1991; 104(8): 673-8.
10. Kruger D.H., Tkachenko E.A., Morozov V.G., Yunicheva Y.V., Pilikova O.M., Malkin G., et al. Life-Threatening Sochi Virus Infections, Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 2015; 21(12): 2204-8. doi: 10.3201/eid2112.150891
11. Tkachenko E.A., Okulova N.M., Yunicheva Yu.V., Morzunov S.P., Khaybulina S.F., Ryabova T.E., et al. The epizootological and virological characteristics of a natural hantavirus infection focus in the subtropical zone of the Krasnodar territory. *Voprosy virusologii*. 2005; 50(3): 14-9. (in Russian)
12. Dzagurova T.K., Witkowski P.T., Tkachenko E.A., Klempa B., Morozov V.G., Auste B., et al. Isolation of Sochi virus from a fatal case of hantavirus disease with fulminant clinical course. *Clin. Infect. Dis.* 2012; 54(1): 1-4. doi: 10.1093/cid/cir746
13. Avsic-Zupanc T., Petrovec M., Furlan P., Kaps R., Elgh F., Lundkvist A. Hemorrhagic fever with renal syndrome in the Dolenjska region of Slovenia – a 10-year survey. *Clin. Infect. Dis.* 1999; 28(4): 860-5. doi: 10.1086/515185
14. Papa A., Antoniadis A. Hantavirus infections in Greece – an update. *Eur. J. Epidemiol.* 2001; 17(2): 189-94.
15. Slonova R.A., Astakhova T.I., Kompanets G.G. The results of the study of hemorrhagic fever with renal syndrome in the southern Russian Far East. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 1997; (5): 97-101. (in Russian)
16. Zhang Y.Z., Zou Y., Fu Z.F., Plyusnin A. Hantavirus infections in humans and animals, China. *Emerg. Infect. Dis.* 2010; 16(8): 1195-203. doi: 10.3201/eid1608.090470
17. Noh J.Y., Cheong H.J., Song J.Y., Kim W.J., Song K.J., Klein T.A., et al. Clinical and molecular epidemiological features of hemorrhagic fever with renal syndrome in Korea over a 10-year period. *J. Clin. Virol.* 2013; 58(1): 11-7. doi: 10.1016/j.jcv.2013.06.027
18. Mustonen J., Partanen J., Kanerva M., Pietilä K., Vapalahti O., Pasternack A., et al. Genetic susceptibility to severe course of nephropathia epidemica caused by Puumala hantavirus. *Kidney Int.* 1996; 49(1): 217-21.
19. Mustonen J., Partanen J., Kanerva M., Pietilä K., Vapalahti O., Pasternack A., et al. Association of HLA B27 with benign clinical course of nephropathia epidemica caused by Puumala hantavirus. *Scand. J. Immunol.* 1998; 47(3): 277-9.

REFERENCES

Поступила 02.03.18

Принята в печать 06.03.18

ДИСКУССИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

*Посвящается памяти видных российских рабиологов,
профессоров С.С. Рыбакова, С.В. Грибенчи и Н.А. Хисматуллиной*

Метлин А.Е.¹, Ботвинкин А.Д.², Елаков А.Л.³, Груздев К.Н.¹

СЛУЧАИ ВЫЗДОРОВЛЕНИЯ ЛЮДЕЙ ОТ БЕШЕНСТВА И ПРИЖИЗНЕННАЯ ДИАГНОСТИКА ЛИССАВИРУСНЫХ ЭНЦЕФАЛИТОВ

¹ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», 600901, г. Владимир, Россия;

²Иркутский государственный медицинский университет, 600901, г. Иркутск, Россия;

³Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, Россия

Несмотря на наличие эффективных вакцин в мире ежегодно регистрируется 40–60 тыс. случаев бешенства у людей. Заболевание практически всегда заканчивается летальным исходом, так как терапия лиссавирусных энцефалитов не разработана. После 1970 г. постепенно увеличивается число сообщений о редких случаях выздоровления людей, в том числе с использованием экспериментальных протоколов лечения. Для анализа отобрано 20 случаев полного или «частичного» выздоровления, а также длительного выживания людей (1970–2015 гг.), которые соответствовали лабораторным критериям активной лиссавирусной инфекции. В анализируемой группе больных преобладали дети и подростки (85%). Случаи неравномерно распределены по континентам: Азия – 6, Северная Америка – 6, Южная Америка – 5, Африка – 2, Европа – 1. По числу описанных случаев лидировали Индия и США. Более чем в 60% случаев заражение произошло от собак, в 3 случаях – от летучих мышей, в 2 случаях заболевание, предположительно, было связано с неизвестным лиссавирусом и неустановленным источником инфекции. В 70% случаев больные получали вакцину, в 10% случаев – гаммаглобулин до начала заболевания. Серологические тесты для определения антител к лиссавирусам в ликворе больных наиболее часто использовали для лабораторной верификации диагноза. Положительные результаты реакции иммунофлюоресценции и полимеразной цепной реакции получены менее чем в 30% случаев. Лиссавирусы не выделены. Лечение по экспериментальным протоколам получали только 4 выживших пациентов. В 80% случаев отмечены серьезные неврологические последствия, 4 пациента (возможно, больше) умерли в сроки от 2 мес до 4 лет. Приведены различные точки зрения на перспективы использования протокола Милоуки и других методов терапии.

Ключевые слова: выздоровление от бешенства; прижизненная лабораторная диагностика; экспериментальный протокол лечения.

Для цитирования: Метлин А.Е., Ботвинкин А.Д., Елаков А.Л., Груздев К.Н. Случаи выздоровления людей от бешенства и прижизненная диагностика лиссавирусных энцефалитов. *Вопросы вирусологии*. 2019; 64(1): 42-48

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-1-42-48>.

Metlin A.E.¹, Botvinkin A.D.², Elakov A. L.³, Gruzdev K.N.¹

CASES OF HUMAN CONVALESCENCE FROM RABIES AND LIFETIME DIAGNOSTICS OF LYSSAVIRUS ENCEPHALITIS

¹ Federal Center for Animal Health, Vladimir, 600901, Russian Federation;

² Irkutsky State Medical University, Irkutsk, 600901, Russian Federation;

³ D.I. Ivanovsky Institute of Virology, «National Research Centre of Epidemiology and Microbiology named after honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation

Notwithstanding the availability of effective vaccines, 40 – 60 thousand rabies cases in humans are reported every year. Almost always the disease is fatal because therapeutic treatment of lyssavirus encephalitis has not been developed. Since 1970 the number of reports on rare cases of convalescence including those using experimental treatment protocols has been gradually increasing 20 cases of convalescence, “partial” convalescence or long-term survival of humans (1970-2015) were selected as they were complaint with laboratory criteria of active lyssavirus infection. Children and teenagers were predominant in the analyzed group (85%). The cases were irregularly spread between the continents: Asia – 6 cases, North America – 6 cases, Africa – 2 cases and Europe – 1 case. India and the USA were on the top of the list of countries by the number of described cases. More than 60% humans were infected from dogs, three cases got infection from bats and 2 cases were allegedly associated with an unknown lyssavirus and an unidentified infection source. 70% cases were vaccinated and 10% cases were treated with gamma globulin before the disease onset. Serological tests for detection of antibodies to lyssaviruses in cerebrospinal fluid of infected humans were typically used for diagnostic laboratory verification. Less than 30% IFA and PCR positives were obtained. Lyssaviruses were never detected. Only 4 convalescent patients were treated using experimental protocols. 80% cases demonstrated severe neurological consequences, four (may be more) patients died afterwards within the period from two months to four years. Different perspectives on prospects of *Milwaukee* protocol use and other therapeutic techniques are given.

Для корреспонденции: Елаков Александр Леонидович, канд. биол. наук, старший научный сотрудник Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва. E-mail: alelakov@mail.ru

Keywords: convalescence from rabies; lifetime laboratory diagnostics; experimental protocol; review.

For citation: Metlin A.E., Botvinkin A.D., Elakov A. L., Gruzdev K.N. Cases of human convalescence from rabies and lifetime diagnostics of lyssavirus encephalitis. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2019; 64(1):42-48. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-1-42-48>.

For correspondence: Alexander L. Elakov, Candidate of Biology Science, Senior of research D.I. Ivanovsky Institute of Virology, «National Research Centre of Epidemiology and Microbiology named after honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation. E-mail: alelakov@mail.ru

Information about authors:

Metlin A.E., <http://orcid.org/0000-0002-4283-0171>

Elakov A. L., <http://orcid.org/0000-0001-5798-6518>

Botvinkin A.D., <http://orcid.org/0000-0002-0920-1330>

Gruzdev K.N. <http://orcid.org/0000-0003-3159-1969>

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

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

Received 06 January 2018

Accepted 26 April 2018

Введение

Бешенство (*Rabies*) – широко распространенное инфекционное заболевание теплокровных животных и человека, характеризующееся тяжелым поражением центральной нервной системы и практически неизбежным смертельным исходом. По оценкам ВОЗ, ежегодно в мире погибают от бешенства 40–60 тыс. человек, а экономический ущерб составляет около 8,6 млрд долларов США в год [1].

Заболевание людей после укусов собак со времен К. Цельса (I век н.э.) называют гидрофобией, так как приступы водобоязни являются наиболее характерным признаком болезни. После установления вирусной природы гидрофобии вирус бешенства в течение многих десятилетий считался единственным возбудителем этого смертельного заболевания. Вирус бешенства относится к порядку *Mononegavirales* семейства *Rhabdoviridae*, роду *Lyssavirus*. Кроме вируса бешенства – типового вида этого рода, в состав таксона в настоящее время входит более 15 представителей, 13 из которых также имеют статус вида. Подавляющее большинство случаев заболевания людей гидрофобией связано с вирусом бешенства. Случаи заболевания людей после заражения другими лиссавирусами (Дувенхаге, Мокола, Иркут, европейские лиссавирусы летучих мышей 1-го и 2-го типов, австралийский лиссавирус летучих мышей) регистрируются очень редко. Фатальные энцефалиты, вызываемые вирусом бешенства и другими лиссавирусами у людей и животных, клинически неразличимы и квалифицируются, в соответствии с Международной классификацией болезней 10-го пересмотра, как бешенство. В научной литературе используется также термин «лиссавирусные энцефалиты».

На протяжении многих веков считалось, что заболевший гидрофобией человек практически всегда умирает. До настоящего времени бешенство остается смертельным заболеванием, эффективная терапия которого не разработана. После появления клинических признаков бешенства смерть у 80% больных наступает на 3–7-е сутки [2–5]. Интенсивная поддерживающая терапия в отдельных случаях продляла этот срок до 3 нед и более [6, 7]. Вместе с тем известны исключительно редкие случаи выздоровления. За последние годы число новых сообщений увеличилось.

У животных заболевание также, как правило, заканчивается смертельным исходом. Возможности изучения нелетального бешенства у животных гораздо шире по сравнению с заболеваниями людей. Тем не менее доказанные случаи выздоровления после клинически манифестированного заболевания также немногочисленны [8–15]. Экспериментальной модели для надежного воспроизведения нелетального бешенства не разработано.

Проблема нелетального бешенства неизменно привлекала внимание исследователей, и в большинстве монографий по этой инфекции имеются разделы с описанием abortивных, хронических, бессимптомных и других атипичных форм. Этим вопросам посвящено большое количество научных

статей, в том числе критического характера. Ключевым критерием при верификации таких случаев является надежное прижизненное подтверждение диагноза, что стало возможным после разработки адекватных методов лабораторной диагностики.

Цель данного обзора – проанализировать опубликованные сведения о случаях выздоровления людей от бешенства (лиссавирусного энцефалита) в свете современных возможностей прижизненного подтверждения диагноза, что принципиально важно для организации дальнейших исследований по проблеме нелетального бешенства.

Анализ случаев выздоровления людей

В научных трудах XX века описания случаев выздоровления людей от бешенства крайне редки. В отечественных монографиях, основанных на тысячах наблюдений больных гидрофобией, упоминаются лишь несколько сомнительных случаев. Например, в монографии М.А. Селимова [2] со ссылками на более ранние работы упоминаются 2 случая «возвратного» бешенства: А.И. Савватеев (1927) наблюдал полную ремиссию в течение нескольких дней, но на 14-й день больной умер; Н.М. Кроль (1939) сообщал о больном, который после первого приступа гидрофобии, продолжавшегося 7 дней, поправился, но через 5 мес умер с типичной клинической картиной бешенства. После применения антирабических вакцин, приготовленных из мозга животных, приходилось дифференцировать бешенство от тяжелых поствакцинальных осложнений. Например, в короткой заметке врача Кировоградской больницы (Украина) упоминаются 2 случая выздоровления вакцинированных больных с энцефалитом и случай «легкой формы бешенства», без каких-либо лабораторных доказательств [16]. Энцефалит мог быть ассоциирован с введением мозговой вакцины, а случай нелетального заболевания девочки 8 лет после смерти брата от гидрофобии, скорее всего, был приступом лиссофобии. Однако с современных позиций в этих случаях возможны и другие объяснения. В 1966 г. Н.Т. Fuerst [17] в письме главному редактору журнала Американской медицинской ассоциации (JAMA) сообщал о нескольких подобных публикациях с 1956 по 1964 г. В целом ранние сообщения о выздоровлении людей от бешенства были основаны на клинических наблюдениях и рассматривались как сомнительные. Возможности адекватного лабораторного подтверждения в этот период были ограничены.

Первым надежно документированным и лабораторно подтвержденным выздоровлением человека от бешенства считается случай, зарегистрированный в США в 1970 г. [18]. Постепенно количество подтвержденных случаев увеличивалось, но после публикации R.E. Willoughby и соавт. (2005) [19], в которой была описана схема лечения, получившая название «протокол Милоуки» (Milwaukee protocol), число сообщений резко возросло. Если до 2005 г. за четверть века было зарегистрировано всего 5 случаев, то за последующие

10 лет – не менее 15. По-видимому, в основном это связано с прогрессом в области лабораторной диагностики, интенсивной терапии и выхаживания больных. Распространение информации об успешном применении нового протокола лечения, доступность новых диагностических технологий и некоторые социально-экономические факторы также имели значение [20]. Вслед за ростом числа новых случаев, увеличилось количество публикаций обзорного и критического характера [21–24].

Из 20 отобранных для данного анализа случаев (см. таблицу) [18, 19, 23, 25–43] только 4 больных (1, 6, 8 и 13-й случаи) практически полностью восстановили здоровье и смогли социализироваться. У большей части больных после выписки отмечены выраженные неврологические последствия с инвалидностью в итоге. Двое больных (4-й и 5-й случаи) умерли через 2–4 года после выписки [22]; жизненная траектория реконвалесцентов в других случаях по публикациям не прослеживается. Освобождения от вируса (клиренс) даже в поздние сроки после заболевания в некоторых случаях не наблюдалось. Так, у одного из этих больных (случай 17) РНК вируса бешенства обнаружена через 4,5 года после начала болезни [38]. Двое больных (7-й и 9-й случаи), по мнению авторов [30, 32], выздоровели от бешенства, но погибли от других причин. При этом в головном мозге внезапно умершего на 76-й день больного из Колумбии обнаружены субкомпоненты вируса бешенства (антигены, РНК). Все это послужило основанием для введения понятия «частичное» выздоровление. В некоторые сводки по выздоровлению больных от бешенства такие случаи не включены [21].

В анализируемой группе больных преобладали дети и подростки (85%) в возрасте от 4 до 17 лет. Взрослых было всего 3. Незначительно преобладали лица мужского пола (около 63%). Случаи неравномерно распределены по континентам: Азия – 6, Северная Америка – 6, Южная Америка – 5, Африка – 2, Европа – 1. По числу описанных случаев лидируют Индия и США, несмотря на огромную разницу показателей заболеваемости гидрофобией в этих странах. Это наводит на мысль о зависимости частоты выявляемых случаев в большей степени от активности исследователей, чем от возможностей оказания высокотехнологичной медицинской помощи заболевшим.

У 2 больных источником инфекции были насекомоядные летучие мыши, у одного – летучая мышь-вампир, и еще в 1 случае заражение произошло от кошки, но вирус принадлежал к филогенетической линии, характерной для вампиров. Таким образом, у 20% пациентов анализируемой группы заболевание было вызвано разными вариантами вируса бешенства, ассоциированными с рукокрыльями Нового Света. Основная часть больных (около 60%) заразилась через укусы собак. И хотя генотипирование возбудителя не проводилось (за исключением случая 20) из-за неудачных попыток выделения вируса или амплификации РНК, большинство случаев, связанных с собаками, по-видимому, были вызваны вариантами вируса бешенства, принадлежавшими к космополитной филогенетической ветви. По крайней мере никаких лабораторных доказательств, противоречащих этому заключению, в публикациях не обнаружено. В 1 случае заражение, предположительно, произошло аэрогенно при работе с вакцинным штаммом в лаборатории, однако прямых доказательств этиологической роли именно этого штамма при исследовании биологического материала не представлено. Вирус от больного не выделен, молекулярно-генетические методы в то время еще не применяли. В 2 случаях источник инфекции точно не установлен, и в анамнезе не было укусов животных (11-й и 12-й случаи). Наиболее необычен зарегистрированный в Техасе случай заболевания, который отличался ремиттирующим течением с умеренно выраженными неврологическими симптомами, не требовавшими интенсивной терапии. В ходе опроса не выявлено никаких других факторов риска,

кроме контакта с летучими мышами (без укуса) во время посещения пещеры. У другой больной отмечены контакты с безнадзорными кошками. В обоих случаях результаты лабораторных исследований дали основания для предположений об этиологической роли ранее неизвестных лиссавирусов. В сыворотке крови и ликворе больных обнаружены высокие титры антител в серологических реакциях (иммуноферментный анализ – ИФА, иммуноблот), выявляющих общий пул антител, включая антитела к нуклеопротеину. При этом вируснейтрализующие антитела (ВНА) не обнаружены. Известно, что представители различных филогрупп лиссавирусов характеризуются отсутствием перекрестной нейтрализации (защиты), но имеют общий родоспецифический антиген, входящий в состав нуклеокапсида. Здесь следует подчеркнуть, что на американском континенте неизвестны случаи выделения лиссавирусов других видов, кроме вируса бешенства. На основании этих данных, а также из-за отсутствия клинических проявлений тяжелого энцефалита, случай 11 также включен не во все обзорные работы по выздоровлению от бешенства.

Большинство случаев, кроме упомянутого выше, характеризовались клинической картиной тяжелого энцефаломиелита, подтвержденного неврологической симптоматикой, компьютерной томографией и общеклиническими анализами. Патогномоничные симптомы – гидрофобия, аэро и фотофобия отмечены не во всех случаях. Долю таких атипичных форм точно оценить не удастся, поскольку этот аспект клинических проявлений акцентирован не во всех публикациях.

С самого начала при описании случаев выздоровления от бешенства принципиальное значение придавали постэкспозиционной профилактике. Первые 5 случаев, приведенных в таблице, зарегистрированы у привитых до начала болезни, при этом заболевший сотрудник лаборатории был привит профилактически и имел ВНА в крови до заболевания. Ранний иммунный ответ считается одним из важных защитных факторов [21], поэтому при описании 1-го случая выздоровления без прививок в анамнезе подчеркивалось, что антитела к вирусу бешенства были обнаружены в крови уже при поступлении больной в стационар [19, 21]. Это привлекло дополнительное внимание к новому протоколу лечения. Однако в последующем описано еще несколько случаев выздоровления непривитых пациентов после применения других схем лечения (10, 18, 19 и 20-й случаи). В 7-м, 12-м и 18-м случаях вакцину вводили уже после появления признаков болезни. Обращает на себя внимание тот факт, что в подавляющем большинстве описанных случаев прививки были проведены с нарушением рекомендаций по применению антирабических препаратов: не применяли гаммаглобулин, вакцину вводили с большим опозданием, сокращали число инъекций. Это означает, что по крайней мере в части случаев заболевание можно было предупредить. Таким образом, случаи выздоровления от бешенства были зарегистрированы как среди привитых, так и не привитых антирабическими иммунопрепаратами до начала болезни. Тем не менее использование вакцины способствовало более раннему и выраженному иммунному ответу и могло отразиться на сроках появления и величине титров антител в сыворотке крови.

Прижизненное подтверждение бешенства

Прижизненное подтверждение диагноза у выживших больных служит объективным критерием того, что заболевание было вызвано вирусом бешенства или другим лиссавирусом, а не какой-то другой причиной. Основные критерии для прижизненного лабораторного подтверждения диагноза у человека и животного изложены в работах J.F. Bell и соавт. [12]. К ним отнесены выделение вируса, обнаружение вирусного антигена в любых тканях и жидкостях больного и обнаружение антител к вирусу бешенства в цереброспинальной жидкости (ЦСЖ). Позднее к этому перечню добавлено

обнаружение РНК вируса. Для прижизненной диагностики бешенства можно исследовать биоптаты кожи, отпечатки роговицы глаза, пробы слюны, ЦСЖ, сыворотки крови, слез, мочи [44, 45]. Для повышения эффективности прижизненной диагностики бешенства необходимо исследовать сразу несколько видов патологического материала, по возможности, с применением нескольких лабораторных методов [44]. Отбор проб и оперативное исследование биологического материала используются не только для подтверждения случаев выздоровления. В медицинской практике прижизненная диагностика бешенства имеет важное значение для уточнения плана лечения после постановки предварительного клинического диагноза и определения прогноза болезни, а также для принятия своевременных противоэпидемических и противоэпизоотических мер [46].

Выделение вируса не имеет большого значения для прижизненной диагностики бешенства, так как ни в одном зарегистрированном случае выздоровления вирус от больных людей не выделен, а неудачные попытки предпринимались лишь в нескольких случаях.

Обнаружение вирусных антигенов. Одними из первых возможность применения реакции иммунофлюоресценции (РИФ) для прижизненного обнаружения антигена вируса бешенства описали L.G. Shneider (у животных) [47] и E. Cifuentes и соавт. (у людей) [48]. Для этого предполагалось использовать отпечатки роговицы глаза, фиксированные в ацетоне. С помощью РИФ в криосрезах кожи в нервных окончаниях в области волосяных фолликулов удается выявить специфические для вируса бешенства внутриклеточные включения. В США методику исследования биоптата кожи с затылочной части головы успешно применили для прижизненной диагностики бешенства на практике [49]. Эти методики применяли для прижизненного подтверждения диагноза у выживших больных менее чем в половине случаев. Положительные результаты при исследовании роговицы отмечены лишь в 1 случае (в Турции) и в 4 случаях – при исследовании биоптатов кожи.

Обнаружение фрагментов РНК вируса бешенства является одним из самых перспективных направлений в прижизненной лабораторной диагностике бешенства в связи с возможностью быстрого получения результата и использования любого вида патологического материала. Для этих целей разработаны и применялись на практике как обычные варианты обратнo-транскриптанoй полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР), так и полу-гнездовые ее варианты, а также ПЦР в реальном времени [45, 50]. Следует отметить, что чувствительность разработанной для исследования проб биопсии кожи головы полугнездовой ОТ-ПЦР в реальном времени $\geq 98\%$ [44]. Для повышения результативности исследования проб слюны в ПЦР, необходимо исследовать 3 последовательно отобранные с определенным промежутком времени пробы, так как вирус бешенства в слюне присутствует не постоянно, а выделяется из слюнных желез порциями. Различные варианты ПЦР использовали для подтверждения диагноза у выживших больных более чем в половине всех случаев, но положительные результаты редки. Наличие РНК в пробе кожи подтверждено у 3 больных, единичные находки были в слюне и СМЖ. В случае 20, который закончился смертью на фоне улучшения состояния, материал после аутопсии был тщательно исследован, в том числе с помощью ПЦР. Положительный результат получен при исследовании проб головного мозга, что позволило уточнить происхождение вируса путем секвенирования ПЦР-продукта.

Обнаружение антител в СМЖ и сыворотке крови. Антитела к вирусу бешенства у больных людей обычно удается обнаружить с конца 1-й недели болезни в сыворотке крови и ликворе [51]. Если больной не умер в ранние сроки, то в дальнейшем отмечается интенсивное накопление антител, что удается проследить при исследовании парных проб в ди-

намике. Это хорошо продемонстрировано на примере 20-го случая [43]. Параллельное исследование сыворотки крови и ЦСЖ используют в качестве дифференциального теста, поскольку у вакцинированных пациентов без активного инфекционного процесса ВНА выявляются только в сыворотке. Концентрация антител также имеет значение, так как после лечебно-профилактических прививок титры ВНА обычно не превышают 10^{-3} , но в случае заболевания могут быть на 1-2 порядка выше [51]. В редких случаях положительные серологические реакции в низких титрах выявляются у людей в результате контактов с вирусом бешенства, которые не сопровождались проникновением вируса в нервную систему и появлением симптомов болезни [3].

В анализируемых случаях наиболее часто для доказательства выздоровления от бешенства использовали серологические методы. В 80% случаев антитела в ликворе фигурировали в числе доказательств вирусного поражения ЦНС, в том числе в случаях, когда другие методы не использовались или давали отрицательный результат. Титры антител в сыворотке крови у большинства больных достигали разведения 10^{-4} – 10^{-5} (1:10 000 – 1:100 000), а в ликворе – 10^{-2} – 10^{-5} (1:100 – 1:100 000) в период пиковых значений – примерно через 1 мес после начала болезни. Для определения антител использовались разнообразные серологические тесты, комбинированное применение которых позволяло получить дополнительную информацию. Основное внимание обращали на выработку ВНА, которые необходимы для защиты от вируса бешенства и последующего выздоровления [22]. Для этого рекомендуется использовать быстрый тест подавления фокусов флюоресценции (RFFIT) – вариант реакции микронейтрализации в культуре клеток, описанный в руководстве Всемирной организации по охране здоровья животных (МЭБ), позволяющий получить результат в течение 1 сут. Более оперативные серологические методы: различные варианты иммуноферментного анализа (ИФА), реакции связывания комплемента (РСК) выявляют широкий спектр антител, включая антитела к белкам нуклеокапсида, которые преобладают в общем пуле вирусспецифических иммуноглобулинов. Например, при исследовании в динамике сыворотки крови и ликвора больного из Колумбии было показано, что с помощью ИФА антитела выявлялись раньше и достигали более высоких титров по сравнению с RFFIT. В этом же исследовании в качестве дополнительного доказательства первичного иммунного ответа приводится обнаружение антител класса М к вирусу бешенства [32].

Таким образом, в подавляющем большинстве случаев выздоровление от бешенства было лабораторно подтверждено обнаружением высоких титров антител в ЦСЖ и лишь в редких случаях – обнаружением РНК или антигенов вируса бешенства. Спектр методов, которые могли быть использованы для прижизненного подтверждения диагноза, определялся возможностями лабораторной базы. Наиболее полно обследованы больные, материал от которых был направлен в специализированную лабораторию CDC в США [32, 34, 35]. В Индии материал направляли в лабораторию сотрудничающего с ВОЗ Центра по изучению бешенства на юге страны [20].

В Российской Федерации имеется опыт прижизненной лабораторной диагностики гидрофобии с помощью РИФ в отпечатках роговицы глаза, обнаружения антигена вируса бешенства в слезной жидкости и слюне методом ИФА, а также выявления генома вируса бешенства в ОТ-ПЦР [52–54]. Этот опыт может быть полезен при ведении пациентов с длительным течением болезни в надежде добиться выздоровления.

Лечение

При лечении больных из проанализированного списка использовано 2 основных подхода: поддерживающая терапия и терапия с использованием экспериментальных протоколов.

Сведения о случаях полного или «частичного» выздоровления людей от бешенства и лабораторных методах, которые использовали для прижизненного подтверждения диагноза (1970–2014 гг.)

№	Страна, год	Больной: пол / возраст, годы	Источник инфекции	Введение вакцины и (или) АИГ до начала болезни	Лабораторное подтверждение диагноза					Источник (Ссылка)
					выделение вируса	АГ (РИФ)	РНК (ПЦР)	АТ в СМЖ	АТ в крови	
1	США, 1970	М / 7	Летучая мышь	+	-	н. д.	н. д.	+	+	[18]
2	Аргентина, 1972	Ж / 45	Собака	+	н. д.	н. д.	н. д.	+	+	[25]
3	США, 1977	М / 32	Лабораторное заражение	+	н. д.	-	н. д.	+	+	[26, 27]
4	Мексика, 1992	М / 9	Собака	+	н. д.	н. д.	н. д.	+	+	[28]
5	Индия, 2000	Ж / 6	Собака	+	н. д.	н. д.	н. д.	+	+	[29]
6	США, 2004	Ж / 15	Летучая мышь	-	-	н. д.	н. д.	+	+	[19]
7	Экваториальная Гвинея, 2007	М / 5	Собака	-	-	+	+	+	+	[30]
8	Бразилия, 2008	М / 5	Летучая мышь-вампир	+	н. д.	н. д.	+	н. д.	н. д.	[31]
9	Колумбия, 2008	М / 9	Кошка*	-	-	+	+	+	+	[32]
10	Турция, 2008	М / 17	Собака	+	н. д.	+	-	+	+	[33]
11	США, 2009	Ж / 17	Не установлен (летучая мышь?)	-	-	н. д.	-	+	+	[34]
12	США, 2011	Ж / 8	Не установлен (кошка?)	+	-	-	-	+	+	[35]
13	Индия, 2011	Ж / 13	Собака	-	н. д.	н. д.	н. д.	+	н. д.	[36]
14	Индия, 2011	М / 17	Собака	+	н. д.	н. д.	н. д.	+	+	[37]
15	Индия, 2011	Ребенок**	Собака	+	н. д.	+	+	н. д.	н. д.	[38]
16	ЮАР, 2012	М / 4	Собака	+	н. д.	н. д.	-	+	+	[23]
17	Чили, 2013	М / 25	Собака	+	н. д.	н. д.	-	+	+	[39]
18	Индия, 2014	М / 6	Собака	+	н. д.	н. д.	-	+	+	[40]
19	Индия, 2014	М / 16	Собака	+	н. д.	+	н. д.	+	+	[41, 42]
20	Индия, 2014	М / 13	Собака	+	н. д.	+	н. д.	н. д.	+	[43]
Всего с наличием признака, абс. (%)				15 (75)	0	6 (30)	4 (20)	17 (85)	17 (85)	

Пр и м е ч а н и е. (+) – признак обнаружен; (-) – признак не обнаружен; н. д. – исследование не проводили или в публикации нет данных; АГ (РИФ) – определение антигена с помощью реакции иммунофлюоресценции; РНК (ПЦР) – определение РНК с помощью полимеразной цепной реакции; АТ в СМЖ – определение антител в спинномозговой жидкости; АТ в крови – определение антител в сыворотке крови; * – вариант вирус бешенства, циркулирующий среди летучих мышей-вампиров; ** – сведений о поле и возрасте нет.

Элементы интенсивной терапии (инфузионная терапия, искусственная вентиляция легких, назогастральное и парентеральное питание и др.) в том или ином объеме входят в стандарты лечения и применялись во всех случаях, кроме одного, когда для этого не было показаний [3, 5, 23]. Экспериментальный протокол был впервые применен в 2004 г. и отличался тем, что больного искусственно вводили в кому, а поддерживающую терапию дополняли коктейлем противовирусных и противовоспалительных препаратов [19]. В последующем этот протокол, в оригинальном виде и с модификациями, был использован для лечения больных в нескольких странах Америки, Азии и Европы [5]. Всего описано 4 успешных попытки применения экспериментального протокола Милоуки в США, Бразилии и Экваториальной Гвинее (6, 7, 9 и 19-й случаи). Большая часть больных, включенных в таблицу, получила поддерживающую терапию.

Применять сыворотку крови привитых животных и людей для лечения гидрофобии стали вскоре после того, как появилась первая вакцина. Позднее большие надежды возлагали на очищенные препараты гаммаглобулина. В начале 1960-х годов М.А. Селимов писал: «Специфическое лечение антирабическим гаммаглобулином должно быть начато немедленно при обнаружении первых признаков заболевания гидрофобии...» [2]. Однако надежды не оправдались. В настоящее время целесообразность введения антирабической вакцины или антирабического иммуноглобулина после появления признаков болезни подвергается сомнению, так как

их эффективность при лечении гидрофобии не доказана [3]. Эти препараты не включены в рекомендации по лечению бешенства, изложенные в национальном руководстве по инфекционным болезням [4]. Тем не менее в Российской Федерации антирабический иммуноглобулин в сочетании с поддерживающей терапией в некоторых случаях применяли для лечения гидрофобии до последнего времени [52, 53]. После 1970 г. в России, по нашей приблизительной оценке на основе опубликованных статистических данных, зарегистрировано около 500 заболеваний людей бешенством, но случаев выздоровления не отмечено.

Обсуждение деталей различных схем лечения и патогенетических особенностей нелетального бешенства выходит за рамки данного обзора. Отметим лишь оценку перспектив использования экспериментального протокола Милоуки, который в средствах массовой информации нередко подается как самое выдающееся достижение в области борьбы с бешенством после открытия Луи Пастера. Вскоре после выздоровления 2-го больного с применением экспериментального протокола появилась публикация о том, что выживаемость составила 20%, но речь шла о 2 случаях из 10 [55]. В последующем было опубликовано еще несколько работ авторов протокола как с успешными, так и с неудачными попытками лечения [55, 57, 58]. С другой стороны, в ряде публикаций обосновывается несостоятельность протокола Милоуки, который не рекомендуется для дальнейшего использования в медицинской практике. Патогенетический смысл приме-

нения искусственно индуцированной комы оспаривается. К числу более важных факторов, которые могли способствовать выздоровлению, отнесены молодой возраст, хорошее состояние иммунной системы, раннее начало лечения, возможности для выхаживания больных и др. [21, 22, 24, 59]. В отечественной практике еще в середине XX века были испытаны экспериментальные схемы лечения бешенства с использованием медикаментозного сна, основанные на идее охранительного торможения и закончившиеся неудачными попытками лечения людей [60].

В итоге оживленная научная дискуссия по проблемам лечения гидрофобии, инициированная протоколом Милоуки, послужила толчком для активизации экспериментальных исследований и нацеливает практических врачей на более внимательное отношение к постановке диагноза бешенства и критическое отношение к парадигме: «Если это бешенство, то больной умрет. Если больной не умер, то это не бешенство» [20].

Заключение

Таким образом, несмотря на неоспоримость возможности выздоровления от энцефалита, вызванного вирусом бешенства, такие случаи крайне редки. Из анализа опубликованных данных следует, что полнота описания случаев, качество лабораторного исследования и наблюдения больных после выписки из стационара весьма переменчивы. В связи с этим имеются расхождения в трактовке некоторых случаев и оценке частоты выздоровления при различных подходах к лечению. Выявление вирусспецифических антител в высоких титрах в ликворе больных служит наиболее доступным и результативным лабораторным тестом для верификации диагноза. Для уточнения этиологии нелетальных случаев наиболее перспективно использование ПЦР из-за неудачных попыток выделить вирус. Активизировалась научная дискуссия по оценке различных факторов, включая лечение, которые способствовали увеличению продолжительности болезни и выздоровлению людей. По мнению большинства экспертов, углубление знаний в области патогенеза бешенства в будущем станет наиболее важным компонентом реального прогресса в лечении лиссавирусных энцефалитов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1, 3, 5-7, 12-15, 17-51, 55-59 см. REFERENCES)

- Селимов М.А. Пути ликвидации гидрофобии. М.: 1963.
- Ющук Н.Д., Венгеров Ю.Я., ред. *Инфекционные болезни: Национальное руководство*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2009.
- Грибанова Л.Я., Рудаков В.А., Мальков Г.Б., Грибенча С.В., Селимов М.А. Abortивное бешенство у диких животных в эксперименте. В кн.: *Тезисы конференции «Вопросы природной очаговости болезней»*. Выпуск 10. Алма-Ата; 1979: 183-4.
- Грибенча С.В., Селимов М.А., Первиков Ю.В. Нелетальное бешенство у белых мышей, зараженных различными штаммами вируса. В кн.: *Материалы конференции «Актуальные вопросы вирусных инфекций»*. Алма-Ата; 1973: 143-4.
- Грибенча С.В., Баринский И.Ф. Влияние циклофосфана на воспроизведение в эксперименте abortивной и хронической форм бешенства. *Вопросы вирусологии*. 1982; 27(5): 586-9.
- Сафаров Р.К., Джмухадзе В.А. Нелетальное бешенство собак. *Ветеринария*. 1975; (9): 67.
- Подберезный Г.Г. Редкий случай легкой формы бешенства, закончившейся выздоровлением. В кн.: *Сборник научных работ врачей Кировоградской области*. Выпуск 2. Кировоград; 1958: 137-8.
- Баширова Д.К., Хисматуллина Н.А., Шафеев М.Ш., Шакиров Т.Н., Убасев А.Г., Ходиева И.Ю. и др. Прижизненная клинико-лабораторная диагностика гидрофобии. *Казанский медицинский журнал*. 2007; 88(5): 449-52.
- Фазылов В.Х., Муртазина Г.Х., Урманчиева Ю.Р., Мингажева Р.И.

Диагностика бешенства (клинический случай). *Практическая медицина*. 2014; 83(7): 121-3.

- Хисматуллина Н.А., Гулюкин А.М., Гулюкин М.И., Иванов А.В., Сабирова В.В., Южаков А.Г. и др. Два случая гидрофобии в Республике Татарстан: прижизненная и постмортальная лабораторная диагностика. *Вопросы вирусологии*. 2015; 60(2): 18-24.
- Гайдамович С.Я. К изучению некоторых случаев бешенства у человека. В кн.: Косяков П.Н., Шен Р.М., Горшунова Л.П., ред. *Бешенство (этиология, патогенез, профилактика)*. М.: Медгиз; 1958: 99-102.

REFERENCES

- Hampson K., Coudeville L., Lembo T., Sambo M., Kieffer A., Atatlan M., et al. Estimating the global burden of endemic canine rabies. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2015; 9(4): e0003709.
- Selimov M.A. *Ways to Eliminate Hydrophobia [Puti likvidatsii gidrofobii]*. Moscow; 1963. (in Russian)
- Jackson A.C., Warrell M.J., Rupprecht C.E., Ertl H.C., Dietzschold B., O'Reilly M., et al. Management of rabies in humans. *Clin. Infect. Dis.* 2003; 36(1): 60-3.
- Yushchuk N.D., Vengerov Yu.Ya., eds. *Infectious Diseases: The National Guide [Infektsionnye bolezni: Natsional'noe rukovodstvo]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2009. (in Russian)
- Jackson A.C. Therapy of Human Rabies. In: Jackson AC, ed. *Rabies. Chapter 16*. Boston: Academic Press; 2013: 575-89.
- Emmons R.W., Leonard L.L., DeGenaro F., Protas E.S., Bazeley P.L., Giammona S.T., et al. A case of human rabies with prolonged survival. *Intervirology*. 1973; 1(1): 60-72.
- Gode G.R., Raju A.V., Jayalakshmi T.S., Kaul H.L., Bhide N.K. Intensive care in rabies therapy. Clinical observations. *Lancet*. 1976; 2(7975): 6-8.
- Gribanova L.Ya., Rudakov V.A., Mal'kov G.B., Gribencha S.V., Selimov M.A. Abortive rabies at wild animals in experiment. In: *Abstracts of the Conference «Contributions to the Natural Nidality of Diseases»*. Volume 10 [Tezisy konferentsii «Voprosy prirodnoy ochagovosti bolezney»]. Выпуск 10]. Alma-Ata; 1979: 183-4. (in Russian)
- Gribencha S.V., Selimov M.A., Pervikov Yu.V. Not lethal rabies at the white mice infected with various strains of a virus. In: *Proceedings of the Conference «Actual Issues of Viral Infections» [Materialy konferentsii «Aktual'nye voprosy virusnykh infektsiy»]*. Alma-Ata; 1973: 143-4. (in Russian)
- Gribencha S.V., Barinskiy I.F. Influence of a tsiklofosfan on reproduction in experiment of abortive and chronic forms of rabies. *Voprosy virusologii*. 1982; 27(5): 586-9. (in Russian)
- Safarov R.K., Dzhmukhadze V.A. Not lethal rabies of dogs. *Veterinariya*. 1975; (9): 67. (in Russian)
- Bell J.F., Gonzalez M.A., Diaz A.M., Moore G.J. Nonfatal rabies in dogs: experimental studies and results of a survey. *Am. J. Vet. Res.* 1971; 32(12): 2049-58.
- Fekadu M., Baer G.M. Recovery from clinical rabies of 2 dogs inoculated with a rabies virus strain from Ethiopia. *Am. J. Vet. Res.* 1980; 41(10): 1632-4.
- Hamir A.N., Neizgoda M., Rupprecht C.E. Recovery from and clearance of rabies virus in domestic ferret. *J. Amer. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 2011; 50(2): 248-51.
- Kesdangakonwut S., Sunden Y., Aoshima K., Iwaki Y., Okumura M., Sawa H., et al. Survival of rabid rabbits after intrathecal immunization. *Neuropathology*. 2014; 34(3): 277-83.
- Podberезnyy G.G. An exceptional case of the easy form of rage which ended with recovery. In: *Collection of Scientific Works of Doctors of the Kirovograd Region. Release 2 [Sbornik nauchnykh rabot vrachey Kirovogradskoy oblasti. Vypusk 2]*. Kirovograd; 1958: 137-8. (in Russian)
- Fuerst H.T. Recovery from rabies in man. *JAMA*. 1966; 197(3): 224.
- Hattwick M.A., Weis T.T., Stechschulte C.J., Baer G.M., Gregg M.B. Recovery from rabies. A case report. *Ann. Intern. Med.* 1972; 76(6): 931-42.
- Willoughby R.E., Tieves K.S., Hoffman G.M., Ghanayem N.S., Amlie-Lefond C.M., Schwabe M.J., et al. Survival after treatment of rabies with induction of coma. *N. Engl. J. Med.* 2005; 352(24): 2508-14.
- Subramaniam R. Human Rabies Survivors in India: An Emerging Paradox? *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016; 10(7): e0004774. doi: 10.1371/journal.pntd.0004774
- Jackson A.C. Current and future approaches to the therapy of human rabies. *Antiviral Res.* 2013; 99(1): 61-7.
- Jackson A.C. Recovery from rabies: a call to arms. *J. Neurol. Sci.* 2014; 339(1-2): 5-7.
- Weyer J., Msimang-Dermaux V., Paweska J.T., le Roux K., Govender

DISCUSSION

- P., Coertse J., et al. A case of human survival of rabies, South Africa. *S. Afr. J. Infect. Dis.* 2015; 1(1): 1-3.
24. Wilde H., Hemachudha T. The "Milwaukee protocol" for treatment of human rabies is no longer valid. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2015; 34(6): 678-9.
25. Porras C., Barboza J.J., Fuenzalida E., Adaros H.L., Oviedo A.M., Furst J. Recovery from rabies in man. *Ann. Intern. Med.* 1976; 85(1): 44-8.
26. Tillotson J.R., Axelrod D., Lyman D.O. Epidemiologic notes and reports: Rabies in laboratory worker - New York. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 1977; 26(22): 183-4.
27. Tillotson J.R., Axelrod D., Lyman D.O. Follow-up on rabies — New York. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 1977; 26: 249-50.
28. Alvarez L., Fajardo R., Lopez E., Pedroza R., Hemachudha T., Kamolvarin N., et al. Partial recovery from rabies in a nine-year-old boy. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1994; 13(12): 1154-5.
29. Madhusudana S.N., Nagaraj D., Uday M., Ratnavalli E., Kumar M.V. Partial recovery from rabies in a six-year-old girl. *Int. J. Infect. Dis.* 2002; 6(1): 85-6.
30. Rubin J., David D., Willoughby R.E., Rupprecht C.E., Garcia C., Guarda D.C., et al. Applying the Milwaukee protocol to treat canine rabies in Equatorial Guinea. *Scand. J. Infect. Dis.* 2009; 41(5): 372-5.
31. Ministerio da Saude in Brazil. Rabies, human survival, bat — Brazil: (Pernambuco). Available at: <http://www.promedmail.org>
32. Caicedo Y., Paez A., Kuzmin I., Niezgodna M., Orciari L.A., Yager P.A., et al. Virology, immunology and pathology of human rabies during treatment. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2015; 34(5): 520-8.
33. Karahocagil M.K., Akdeniz H., Aylan O., Sünnetçioğlu M., Ün H., Yapici K., et al. Complete recovery from clinical rabies: case report. *Turkiye Klinikleri J. Med. Sci.* 2013; 33(2): 547-52.
34. Holzmann-Pazgal G., Wanger A., Degaffe G., Rose C., Heresi G., Amaya R., et al. Presumptive abortive human rabies - Texas, 2009. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 2010; 59(7): 185-90.
35. Wiedeman J., Plant J., Glaser C., Messenger S., Wadford D., Sheriff H., et al. Recovery of a patient from clinical rabies - California, 2011. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 2012; 61(4): 61-5.
36. Rawat A.K., Rao S.K. Survival of rabies patient. *Indian Pediatr.* 2011; 48(7): 574.
37. Souza A., Madhusudana S.N. Survival from rabies encephalitis. *J. Neurol. Sci.* 2014; 339(1-2): 8-14.
38. Netravathi M., Udani V., Mani R.S., Gadad V., Ashwini M.A., Bhat M., et al. Unique clinical and imaging findings in a first ever documented PCR positive rabies survival patient: A case report. *J. Clin. Virol.* 2015; 70: 83-8.
39. Galvez S., Basque M., Contreras L., Merino C., Ahumada R., Jamett J., et al. Survivor of rabies encephalitis in Chile. In: *Platform presentation at the XXIVth International Meeting on Research Advances and Rabies Control in the Americas in Toronto, Ontario, Canada on October. Volume 27. Toronto; 2013.*
40. Karande S., Muranjan M., Mani R.S., Anand A.M., Amoghmath R., Sankhe S., et al. Atypical rabies encephalitis in a six-year-old boy: clinical, radiological, and laboratory findings. *Int. J. Infect. Dis.* 2015; 36: 1-3.
41. Hindustan times. Thakur B.S. 2nd rabies survivor in country at P'kula hospital. Available at: Scholar <http://www.hindustantimes.com/chandigarh/2nd-rabies-survivor-in-country-at-p-kula-hospital/story-QblNMMmnXcSynC21JPzE4O.html>
42. Kumar K.H., Ahmad F., Dutta V. Pituitary cachexia after rabies encephalitis. *Neurol. India.* 2015; 63(2): 255-6.
43. Manoj S., Mukherjee A., Johri S., Kumar K.V. Recovery from rabies, a universally fatal disease. *Mil. Med. Res.* 2016; 3: 21. doi: 10.1186/s40779-016-0089-y
44. Dacheux L., Reynes J.M., Buchy P., Sivuth O., Diop B.M., Rousset D., et al. A reliable diagnosis of human rabies based on analysis of skin biopsy specimens. *Clin. Infect. Dis.* 2008; 47(11): 1410-7.
45. Wacharapluesadee S., Hemachudha T. Ante- and post-mortem diagnosis of rabies using nucleic acid-amplification tests. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2010; 10(2): 207-18.
46. Mani R.S., Madhusudana S.N. Laboratory Diagnosis of Human Rabies: Recent Advances. *Sci. World J.* 2013; 2013: 569712.
47. Schneider L.G. The cornea test: A new method for intravitam diagnosis of rabies. *Zentralbl. Veterinarmed. B.* 1969; 16(1): 24-3.
48. Cifuentes E., Calderon E., Diglenga G. Rabies in a child diagnosed by a new intravitam method: The cornea test. *J. Trop. Med. Hyg.* 1971; 74: 23-5.
49. Spector S., Hodinka R., Young S., eds. *Clinical Virology Manual*. 3rd ed. Washington DC: ASM Press; 2000.
50. Nagaraj T., Vasanth J., Desai A., Kamat A., Madhusudana S.N., Ravi V. Ante mortem diagnosis of human rabies using saliva samples: Comparison of real time and conventional RT-PCR techniques. *J. Clin. Virol.* 2006; 36(1): 17-23.
51. Udow S.J., Marrie R.A., Jackson A.C. Clinical features of dog- and bat-acquired rabies in humans. *Clin. Infect. Dis.* 2013; 57: 689-96.
52. Bashirova D.K., Khismatullina N.A., Shafeev M.Sh., Shakirov T.N., Ubasev A.G., Khodierova I.Yu., et al. Intravitam clinical laboratory diagnostics of hydrophobia. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal.* 2007; 88(5): 449-52. (in Russian)
53. Fazylov V.Kh., Murtazina G.Kh., Urmancheeva Yu.R., Mingazheva R.I. Diagnostic of rabies (clinical case). *Prakticheskaya meditsina.* 2014; 83(7): 121-3. (in Russian)
54. Khismatullina N.A., Gulyukin A.M., Gulyukin M.I., Ivanov A.V., Sabirova V.V., Yuzhakov A.G., et al. Two cases of hydrophobia in the Republic of Tatarstan: lifetime and postmortem laboratory diagnostics. *Voprosy virusologii.* 2015; 60(2): 18-24. (in Russian)
55. Willoughby R.E. A cure for a rabies? *Sci. Am.* 2007; 296(4): 88-95.
56. Willoughby R.E. Are we getting closer to the treatment of rabies? *Future Virol.* 2009; 4(6): 563-70.
57. Willoughby R.E. Resistance to Rabies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2012; 87(2): 205.
58. Aramburo A., Willoughby R.E., Bollen A.W., Glaser C.A., Hsieh C.J., Davis S.L., et al. Failure of the Milwaukee protocol in a child with rabies. *Clin. Infect. Dis.* 2011; 53(6): 572-4. doi: 10.1093/cid/cir483
59. Hunter M., Johnson N., Hedderwick S., McCaughey C., Lowry K., McConville J., et al. Immunovirological correlates in human rabies treated with therapeutic coma. *J. Med. Virol.* 2010; 82(7): 1255-65.
60. Gaydamovich S.Ya. To studying of some cases of rabies in humans. In: Kosyakov P.N., Shen R.M., Gorshunova L.P., eds. *Rabies (Etiology, Pathogenesis, Prevention) [Beshenstvo (etiologiya, patogenez, profilaktika)]*. Moscow: Medgiz; 1958: 99-102. (in Russian)

Поступила 06.01.18

Принята в печать 26.04.18