

**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

Зав. редакцией *Т.М. Курушина*
E-mail: vopr.virusol@mail.ru
www.medlit.ru

Вёрстка *Е.М. Архипова*

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

Сдано в набор 01.06.2019.
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. *Вопр. вирусологии*. 2019.
Т. 64. № 2. 49-96.

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

Свидетельство о регистрации № 1170
от 11 декабря 1990 г.



**МОСКВА
«ИЗДАТЕЛЬСТВО
"МЕДИЦИНА"»**

ВОПРОСЫ ВИРУСОЛОГИИ

ДВУХМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Основан в 1956 г.

2

Том 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 • 2 • 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

- Агеева М.Р., Яцышина С.Б.* Недооценённая инфекция – к вопросу о факторах патогенности аденовирусов человека 53

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Львов Д.К., Богданова В.С., Кириллов И.М., Щелканов М.Ю., Бурцева Е.И., Бовин Н.В., Федякина И.Т., Прилипов А.Г., Альховский С.В., Самохвалов Е.И., Прошина Е.С., Кириллова Е.С., Сыроешкин А.В.* Эволюция пандемического вируса гриппа А(Н1N1)рdm09 в 2009–2016 гг.: динамика рецепторной специфичности первой субъединицы гемагглютинина (HA1) 63
- Тимофеева Т.А., Руднева И.А., Шилов А.А., Баланова М.А., Артемов Е.К., Куш А.А., Масалова О.В., Климова Р.Р., Гребенникова Т.В., Каверин Н.В.* Изменение фенотипических свойств эскейп-мутантов и реадaptантов вируса гриппа А(Н1N1)рdm09 под воздействием селекционированных мутаций в молекуле гемагглютинина 73
- Котова В.О., Троценко О.Е., Балахонцева Л.А., Базыкина Е.А.* Молекулярно-генетическая характеристика вариантов ВИЧ-1, выделенных в субъектах Дальневосточного федерального округа 79
- Куш А.А., Климова Р.Р., Фёдорова Н.Е., Масалова О.В., Никонова А.А., Леснова Е.И., Момотюк Е.Д., Демидова Н.А., Самарцева Т.Г., Зверев В.В.* Получение и свойства моноклональных антител к F-белку респираторно-синцитиального вируса, нейтрализующих инфекционную активность вируса в клеточной культуре 90

CONTENTS

REVIEWS

- Ageeva M.R., Yatsyshina S.B.* Underestimated infection – on the question of the human adenovirus pathogenicity factors

ORIGINAL RESEARCH

- Lvov D.K., Bogdanova V.S., Kirillov I.M., Shchelkanov M.Yu., Burtseva E.I., Bovin N.V., Fedyakina I.T., Prilipov A.G., Alhovskiy S.V., Samokhvalov E.I., Proshina E.S., Kirillova E.S., Syroeshkin A.V.* Evolution of pandemic influenza virus A(H1N1)pdm09 in 2009–2016: dynamics of receptor specificity of the first hemagglutinin subunit (HA1)
- Timofeeva T.A., Rudneva I.A., Shilov A.A., Balanova M.A., Artemov E.K., Kushch A.A., Masalova O.V., Klimova R.R., Grebennikova T.V., Kaverin N.V.* Change of phenotypic properties of escape mutants and readaptants of influenza virus A (H1N1)pdm09 under the influence of selected mutations in the molecule of hemagglutinin
- Kotova V.O., Trotsenko O.E., Balakhontseva L.A., Bazzykina E.A.* Molecular genetic characteristics of HIV-1 variants isolated in the subjects of the Russian Far East
- Kushch A.A., Klimova R.R., Fedorova N.E., Masalova O.V., Niconova A.A., Lesnova E.I., Momotyuk E.D., Demidova N.A., Samartseva T.G., Zverev V.V.* Development and properties of neutralizing monoclonal antibodies for fusion protein of respiratory syncytial virus

Уважаемые читатели!

На сайте Научной Электронной Библиотеки

www.elibrary.ru

можно подписаться на электронную версию журнала

«Вопросы вирусологии».

ОБЗОРЫ

© АГЕЕВА М.Р., ЯЦЫШИНА С.Б., 2019

Агеева М.Р., Яцышина С.Б.

НЕДООЦЕНЁННАЯ ИНФЕКЦИЯ – К ВОПРОСУ О ФАКТОРАХ ПАТОГЕННОСТИ АДЕНОВИРУСОВ ЧЕЛОВЕКА

ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, 111123, г. Москва, Россия

Аденовирусы человека вызывают регистрируемые повсеместно заболевания различных систем и органов, по тяжести варьирующие от практически бессимптомных до тяжёлых случаев с летальным исходом. Факторы, predisposing к тяжёлому течению инфекции, требуют детального и целенаправленного изучения. В литературе представлены сведения, указывающие на ассоциацию тяжёлых респираторных аденовирусных инфекций с определёнными типами аденовируса, в первую очередь с типом 7. Данный обзор освещает возможные причины повышенной патогенности некоторых типов аденовируса и их ассоциации с тяжёлыми формами инфекции. К факторам патогенности можно отнести способность аденовируса связываться с определёнными клеточными рецепторами, образование субвирусных частиц, взаимодействие с белками крови, в частности с фактором свёртывания X, а также особенности ранних генов *E1A*, *E1B*, *E3*, *E4*. Кроме того, на тяжесть заболевания может влиять наличие или отсутствие анамнестического типоспецифического иммунитета к аденовирусам. Сопутствующие хронические заболевания или иммуносупрессия также увеличивают риск развития тяжёлой аденовирусной инфекции. Сведения, представленные в этом обзоре, помогают пролить свет на патогенез аденовирусной инфекции, и могут быть использованы при разработке средств её профилактики и лечения.

Ключевые слова: аденовирус; тип аденовируса; факторы патогенности; вспышка; тяжёлая респираторная инфекция; обзор.

Для цитирования: Агеева М.Р., Яцышина С.Б. Недооценённая инфекция – к вопросу о факторах патогенности аденовирусов человека. *Вопросы вирусологии*. 2019; 64(2): 53-62.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-2-53-62>

Ageeva M.R., Yatsyshina S.B.

UNDERESTIMATED INFECTION – ON THE QUESTION OF THE HUMAN ADENOVIRUS PATHOGENICITY FACTORS

Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, 111123, Russian Federation

Human adenoviruses cause different organ infections of varying severity, from asymptomatic to severe cases with lethal outcome, that are registered everywhere. Detailed and focused study of factors predisposing to a severe course of infection is required. The literature contains information indicating the association of severe adenoviral respiratory diseases with certain types of adenovirus, primarily type 7. This review highlights the possible causes of increased pathogenicity of some types of adenovirus and their association with severe forms of infection. Pathogenicity factors include the ability of adenovirus to bind the specific cellular receptors, the formation of subviral particles, the interaction with blood proteins, in particular the coagulation factor X, as well as the features of the early genes *E1A*, *E1B*, *E3*, *E4*. In addition, the severity of the disease may be affected by the presence or absence of pre-existing antibodies specific to certain types of adenoviruses. Chronic diseases or immunosuppression also increase the risk of severe adenovirus infection. The information presented in this review may elucidate the pathogenesis of adenovirus infection, and help to develop new features for prevention and treatment.

Keywords: adenovirus; adenovirus type; pathogenicity factor; outbreak; severe respiratory infection; review.

For citation: Ageeva M.R., Yatsyshina S.B. Underestimated infection - on the question of the human adenovirus pathogenicity factors. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2019; 64(2): 53-62. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-2-53-62>

For correspondence: Svetlana B. Yatsyshina, Ph.D., Head of the Scientific Group on the development of new methods of ARI diagnostics of the Department of molecular diagnostics and epidemiology, senior researcher of Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, 111123, Russian Federation. E-mail: svetlana.yatsyshina@pcr.ms

Information about authors:

Yatsyshina S.B., <https://orcid.org/0000-0003-4737-941X>

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

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

Received 19 June 2018
Accepted 31 October 2018

Для корреспонденции: Яцышина Светлана Борисовна, канд. биол. наук, руководитель научной группы разработки новых методов диагностики ОРЗ отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии, старший научный сотрудник ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, 111123, г. Москва. E-mail: svetlana.yatsyshina@pcr.ms

Аденовирусы человека (HAdV) – это содержащие двуцепочечную ДНК, не имеющие оболочки вирусы, относящиеся к роду *Mastadenovirus* семейства *Adenoviridae* и вызывающие различные клинические проявления инфекции. Выделяют более 60 типов и 7 видов (A–G) HAdV [1]. С поражением эпителия респираторного тракта ассоциированы виды В, С, Е, конъюнктивы – виды D, В и С, желудка и кишечника – F, G, урогенитального тракта – В, D [2, 3]. HAdV-инфекция в структуре спорадической заболеваемости острыми респираторными заболеваниями составляет от 2,9 до 6% [4, 5], острыми кишечными инфекциями – от 1,8 до 5,3% [6], конъюнктивитами – 20% [7]. HAdV нередко являются причиной вспышек респираторной инфекции в изолированных коллективах (домах ребёнка и др.) и среди военнослужащих срочной службы [8, 9]. Особую опасность HAdV-инфекция представляет для иммунокомпрометированных пациентов, у которых она протекает в тяжёлых формах, включая генерализованную [10]. Более того, наблюдаются случаи тяжёлой HAdV-инфекции у иммунокомпетентных пациентов, когда главным образом идентифицируют HAdV В7 [11, 12], реже обнаруживают типы В3, В11, В21, В55 и С5 [12–14].

Возможными причинами тяжёлого течения и неблагоприятного исхода инфекций, вызванных некоторыми типами HAdV, могут служить особенности этих аденовирусов, обуславливающие их более высокую вирулентность по сравнению с другими типами, а также отсутствие у больного анamnестических антител к ним вследствие низкой распространённости этих типов HAdV в популяции.

Цель данного обзора – осветить факторы, лежащие в основе патогенеза влияющие на тяжесть течения HAdV-инфекции, а также установить возможные причины ассоциации тяжёлых случаев с определёнными типами аденовируса.

Факторы патогенности аденовирусов

1. Тканевой тропизм и рецепторная специфичность

Первым этапом инфицирования является проникновение вирусных частиц в клетку посредством связи со специфическими рецепторами, что обуславливает тропность вирусов к различным тканям и объясняет разнообразие клинических проявлений HAdV-инфекции. Даже внутри одной системы органов HAdV разных типов проявляют различную тканевую тропность, что само по себе может влиять на тяжесть заболевания. Так, HAdV видов С и Е, как правило, поражают верхние дыхательные пути, тогда как вирусы вида В (прежде всего типы 7 и 3) чаще поражают нижние дыхательные пути, вызывая более тяжёлое заболевание [15].

Итак, первая причина, по которой HAdV проявляют тропизм к разным тканям в зависимости от вида и типа, – это использование различных путей проникновения в клетку.

В экспериментах *in vitro* на клетках яичника китайского хомяка продемонстрирована способность всех видов

HAdV (кроме В) связываться с клеточным рецептором CAR [16], который экспрессируется во многих органах, преимущественно в эпителиальных и эндотелиальных клетках.

Для всех HAdV вида В (кроме типов В3 и В7) в экспериментах *in vitro* на культурах клеток яичника китайского хомяка и клеток карциномы лёгкого человека А549 установлено, что функциональным, хотя и не всегда единственным, рецептором является мембранный белок CD46. Блокирование этого рецептора антителами приводило к полной потере инфекционной активности HAdV В16, В21, В50 (подвид В1), В34, В35 (подвид В2) и к частичной потере HAdV В11 и В14 (подвид В2) [17]. CD46 экспрессируется во всех тканях организма, однако представлен на поверхности клеток разных тканей неоднородно: высокий уровень экспрессии, в частности, характерен для респираторного эпителия носоглотки, железистых клеток желчного пузыря, желудка и кишечника, а также переходного эпителия мочевого пузыря. Это может объяснять, почему большую часть геморрагических циститов аденовирусной этиологии вызывают типы В11, В34 и В35 [3]. В лёгких и бронхах отмечают средний уровень экспрессии CD46 [18], вероятно, поэтому эти типы HAdV редко обнаруживаются при внебольничных пневмониях [5].

Однако CAR и CD46 – единственные компоненты клетки, посредством которых HAdV проникают в клетку. Так, показано, что белок основания пентона (III) HAdV С5 и В11 посредством RGD-мотива взаимодействует с интегринами $\alpha\beta3$ и $\alpha\beta5$, а посредством LDV-мотива – с интегринами $\alpha4\beta1$. Связывание и проникновение HAdV С5 в клетку также опосредуют расположенные в её мембране белки МНС I $\alpha2$ и VCAM-1 и гепарансульфат [19].

Ассоциированные с конъюнктивитами и кератоконъюнктивитами HAdV D8, D19, D37 и HAdV G52, кроме CAR, используют в качестве рецепторов сиаловые кислоты [19, 20], которые широко распространены на поверхности клеток разных тканей организма и нередко используются для проникновения в клетку другими вирусами, например вирусами гриппа [21].

Не связывающиеся ни с CAR, ни с CD46 ассоциированные с инфекциями нижних дыхательных путей HAdV В3 и В7 имеют уникальную особенность фибриллы: в положениях 240 и 296 аминокислотной последовательности её белка находятся гидрофобные остатки. Известно, что эти 2 положения значимы для связывания вируса с рецепторами: 240 соответствует участку связывания с CAR HAdV А12, а 296 – участку связывания с сиаловыми кислотами HAdV D37 [17].

В экспериментах *in vitro* на клетках HeLa установлено, что рецептором для HAdV В3, В7, а также для В11 и В14 является десмоглеин 2 [22]. Этот белок является компонентом десмосом и обнаруживается в мембране клеток, на дистальных концах межклеточных соединений. HAdV В3, В7, В11, В14, В14а эффективно инфицируют эпителиальные клетки, индуцируя при этом процесс, в ходе которого они теряют межклеточные контакты и меняют эпителиальный фенотип на мезенхимальный. Такое нарушение целостности эпителиального слоя может способство-

вать большому повреждению глубоких тканей и капилляров. Высокий уровень экспрессии десмоглеина показан в клетках эпителия бронхов, железистых клеток желудка и кишечника, переходного эпителия мочевого пузыря. Тропизм HAdV B3 и B7 к нижним дыхательным путям можно объяснить широкой представленностью десмоглеина на поверхности эпителиоцитов бронхов.

Важно отметить ещё одну особенность проявляющих более высокую патогенность HAdV B7, B3, B11, B14, B14a, а также E4, D9, D15 – их способность формировать во время репликации субвирусные додекаэдрические частицы, состоящие из фибриллы и основания пентона. Менее агрессивные HAdV C1, C2, C6, A12, B16 и HAdV C5 таких частиц не образуют. Сборка субвирусных частиц возможна только из усечённого по N-концу белка основания пентона, образующегося за счёт спонтанного протеолиза между аминокислотными остатками 37 и 38. Этот сайт консервативен у HAdV B3, B7, B11 и B14 и отсутствует у HAdV C2 и C5 [22, 23]. Субвирусные частицы, как и полноценные вирусы, связываются с десмоглеином 2, нарушая связь между клетками, что может приводить к обширному повреждению тканей и более быстрому распространению вновь образованных вирусных частиц в организме хозяина.

II. Проникновение аденовирусов в клетку в составе комплексов с белками хозяина

Рецепторная специфичность разных HAdV объясняет до определённой степени их тропизм к различным органам и тканям. Однако в экспериментах *in vivo*, было показано, что связывание аденовируса с клеточным рецептором не является строго необходимым для его проникновения в клетку. Так, мутантные векторы на основе HAdV C5, лишённые способности связываться с CAR, успешно трансдуцировали гепатоциты мышей *in vivo*. По-видимому, это происходило за счёт связывания с белками крови: фактором свёртывания IX и фактором комплемента C4BP и «переключения» этих комплексов на гепатоцеллюлярные рецепторы, такие как HSPG и LPR [24]. Также для HAdV C5 продемонстрирована способность факторов свёртывания IX, X, VII и белка C (PC) усиливать трансдукцию клеток гепатомы HepG2 *in vitro*.

Из перечисленных белков наибольшее влияние на трансдукцию оказывает фактор X, что было экспериментально показано при введении мышам антикоагулянта – варфарина. У HAdV C5 установлено высокоаффинное взаимодействие гипервариабельных районов (HVR) 5 и 7 капсидного белка II (белок гексона) HAdV с Gla-доменом фактора X. Оказалось, что связывать фактор X способны только HAdV, имеющие в положении 451 гексона (HVR7) аминокислотный остаток E451, в отличие от вирусов, содержащих Q451 [25].

По силе связи с фактором X выделяют 3 фенотипа HAdV. Так, некоторые типы образуют сильную связь (B50, B16, C2, C5, C6, D49), другие – слабую (B3, B7, B11, D13, A18, B35, D37, D46), а третьи (D17, D20, D25, D26, D28, D29, D44, D48) не связывают этот фактор [26]. Таким образом, HAdV, ассоциированные

с более тяжёлым течением инфекции, обладают выраженным в той или иной степени свойством связывать фактор X.

Способность HAdV связываться с белками крови и проникать в клетку в виде комплексов с ними может существенно расширять возможности вируса по распространению в разные ткани и органы, в том числе удаленные от места первичной инфекции. Взаимодействие с белками крови может играть значимую роль в развитии диссеминированной HAdV-инфекции.

Тем не менее клиническая картина заболевания зависит не только от входных ворот инфекции и путей её дальнейшего распространения, патогенез инфекции во многом определяет и взаимодействие патогенного микроорганизма с иммунной системой хозяина.

Иммунный ответ на аденовирусную инфекцию

Установлены различия профиля цитокинов в крови пациентов при HAdV-инфекции различной тяжести. Так, уровни фактора некроза опухоли α (ФНО α), а также интерлейкинов (ИЛ) 6 и 8 в сыворотках крови у детей были выше в тяжёлых и летальных случаях по сравнению с умеренным течением HAdV-инфекции [27]. При тяжёлой респираторной инфекции, вызванной HAdV B55, у взрослых пациентов в крови уровни ИЛ-4, ИЛ-10, ИЛ-17, CD4⁺ Т-лимфоцитов, интерферонов (ИФН) γ и $\alpha 2$ были существенно выше, чем при субклинической форме [28].

Описан летальный случай системного воспалительного ответа и развития в его следствие острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) у пациента, получившего терапию на основе HAdV-вектора [29]. По-видимому, в данном случае происходил избыточный иммунный ответ на HAdV-вектор, характеризующийся активацией системы комплемента, и продукцией провоспалительных цитокинов/хемокинов (ФНО α , ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИФН- γ) и макрофагальных белков воспаления 1 и 2, который привёл к массивному повреждению тканей и смерти, как это наблюдалось у экспериментальных животных [24].

Таким образом, тяжесть течения и неблагоприятный исход HAdV-инфекции могут быть связаны не только с повреждениями клеток, вызванными непосредственно вирусами, но и с избыточным воспалительным ответом организма.

I. Отличия иммунного ответа на аденовирусы разных типов

Имеются свидетельства того, что воспалительный ответ организма различается в зависимости от типа инфицирующего HAdV. Так, в экспериментах на культурах клеток эмбриональных фибробластов лёгких и эпителия лёгких A549 были выявлены типоспецифические отличия в иммунном ответе, а также различная скорость распространения инфекции в зависимости от типа аденовируса. HAdV B7, в отличие от HAdV C5, стимулировал продукцию ИЛ-8 в клетках и демонстрировал более высокую скорость репликации.

Установлено, что синтез ИЛ-8 активизируется в случае экспрессии вирусных генов при участии каскада митоген-активируемых протеинкиназ Ras/Raf/MEK/Erk. Киназа (Erk)1/2 перемещается в ядро, где активирует факторы транскрипции, в частности

NF-κB и AP-1, значимые для индукции транскрипции ИЛ-8 [30]. В свою очередь ИЛ-8 является важным медиатором воспаления, главным хемоаттрактантом и активатором нейтрофилов, стимулирующим провоспалительное действие, включая образование 5-гидроксиизокотетраеновой кислоты и фактора активации тромбоцитов [31]. Повышенный уровень ИЛ-8 в бронхоальвеолярной лаважной жидкости больных положительно коррелирует с тяжестью заболевания, развитием инфекционно-токсического шока и последующим летальным исходом [32].

С другой стороны, HAdV синтезируют множество продуктов, снижающих воспаление и препятствующих уходу клетки в апоптоз, что защищает заражённую клетку и позволяет HAdV ускользнуть от иммунного ответа хозяина. Это продукты ранних генов вируса: *E1A*, *E1B*, *E3*, *E4* (см. рисунок) [33]. Особенности данных генов и их экспрессии, вероятно, играют ключевые роли в воздействии на иммунный ответ хозяина.

II. Роль области *E1A*. Индукция апоптоза

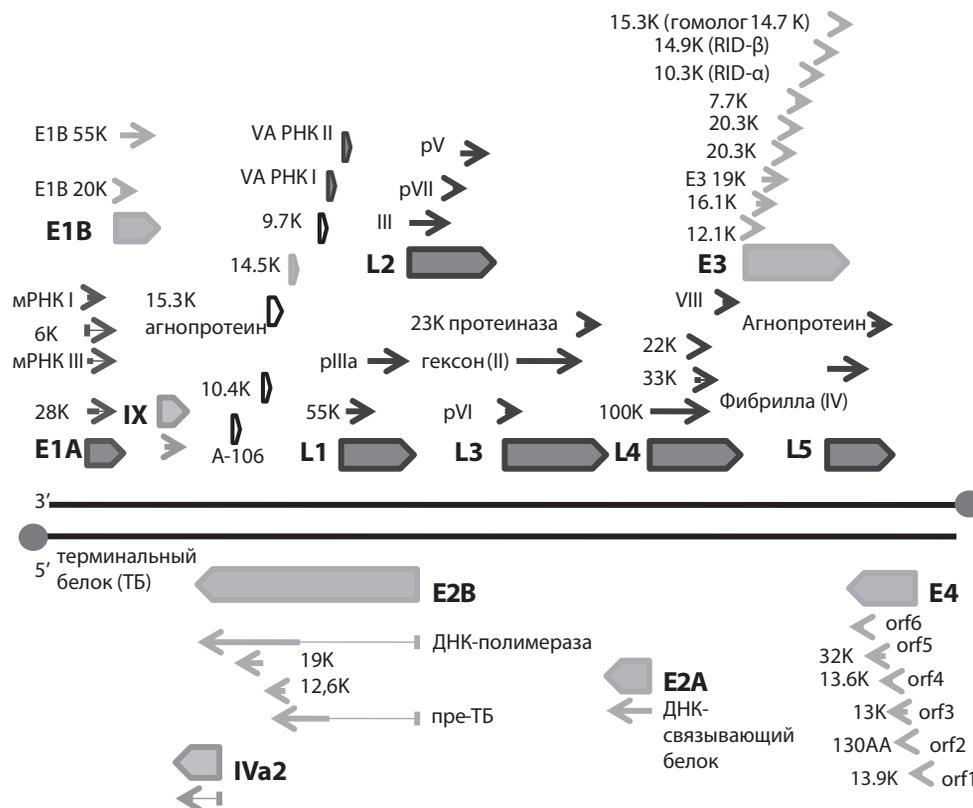
Продукты гена *E1A* способствуют переходу клетки в S-фазу, а также блокируют Jak-STAT-сигнальный путь, запускаяющийся в ответ на связывание с рецепторами ИЛ и ИФН, ухудшают ИФН-зависимую передачу сигнала через трансактиватор IRF-3 и подавляют транскрипцию генов хозяина, опосредованную главным медиатором экспрессии NF-κB.

Известно, что область *E1A* играет определённую роль в индуцировании продукции ИЛ-8. Однако эта роль двойственна: экспрессия отдельно клонированной в вектор области *E1A* HAdV C5, так же, как и области *E1B*, может как повышать, так и понижать продукцию ИЛ-8 в культуре клеток человека NCI-H292, подобной эпителию лёгких. Показано, что экспрессия *E1A* подавляет в этой культуре продукцию ИЛ-6 [34]. По-видимому, повышенная продукция ИЛ-8 при инфекции HAdV B7 связана именно с особенностями этого гена.

Установлено, что среди всех продуктов гена *E1A* у HAdV C5 самую важную роль в подавлении воспалительного ответа хозяина играет белок E1A 243R [35]. E1A 243R взаимодействует с белком Rb и родственными белками p107 и p130, освобождая тем самым регуляторы транскрипции семейства E2F, которые требуются для эффективной транскрипции раннего промотора E2 [36]. Однако избыточная экспрессия E2F ведёт к индукции не только S-фазы, но и апоптоза, поэтому наряду с защитой клетки от иммунного ответа E1A индуцирует апоптоз [37].

III. Роль области *E1B*. Блокировка апоптоза

Продукты гена *E1B* 19K и 55K блокируют E1A-индуцированный апоптоз. *E1B* 55K препятствует запуску апоптоза сигналами, возникающими внутри клетки из-за накопления и активации клеточного супрессора опухолей p53. Так, он вместе с белком



Геном HAdV B7 штамма 19BOVLB/Volgograd/Rus/2014 (GenBank: KU361344.1). Толстыми стрелками обозначены транскрипционные единицы, тонкими – отдельные продукты экспрессии.

E4 Orf6 формируют вирус-специфическую убиквитин-лигазу, субстратом которой, согласно экспериментам *in vitro* на клетках HeLa, является p53 [38]. Кроме того, E1B 55K связывает p53 и изолирует его в перинуклеарных цитоплазматических структурах и, связываясь с N-концевым активационным доменом p53, ингибирует p53-зависимую транскрипцию (*in vitro* на клетках CV-1, NIH-3T3 и COS). Видимо, ингибирование происходит за счёт репрессирующего домена E1B 55K. При этом известны положения (C-концевые сайты фосфорилирования (Ser490, Ser491, Thr495) и Lys104), замены аминокислот в которых уменьшают репрессирующее воздействие белка E1B 55K на транскрипцию и трансформацию и предотвращают ингибирование p53-зависимого апоптоза. Нормальный белок E1B 55K подавляет более 30 генов иммунного и противовирусного ответа, причём он воздействует не только на p53-зависимую транскрипцию [36]. Белок E1B 55K, а также VA РНК и белок E4 orf3 защищают репликацию HAdV C5 от ИФН-индуцированного ингибирования [39]. Мутанты HAdV C5 с делетированной кодирующей последовательностью белка E1B 55K вызывают усиленную выработку провоспалительных цитокинов и более выраженное воспаление лёгких по сравнению с немутантными штаммами [40].

Другой белок E1B 19K может предотвращать апоптоз, так как является гомологом клеточного антиапоптотического белка Bcl-2, связывает и ингибирует проапоптотические белки Bak и Bad [36].

Роль белка E1B 19K в развитии воспаления не до конца ясна. Так, у мышей он уменьшал отёк в месте инокуляции суспензии вирусов (путём инъекции в ухо) при экспрессии обоих белков E1A 243R и E1B 55K, но индуцировал отёк в случае экспрессии только одного из них [35].

E1B 19K у HAdV C2 и C5 подавляет воспалительные ответы, опосредованные макрофагами [41]. В свою очередь альвеолярные макрофаги, модулируя экспрессию ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО α и других провоспалительных цитокинов, играют ключевую роль в инициации воспалительного ответа, ассоциированного с ОРДС. В то же время штамм HAdV с делетированной последовательностью E1B 19K, снижал продукцию ИЛ-8 и CCL2 (фактор хемотаксиса моноцитов) в клетках анапластической тиреоидной карциномы человека как на уровне мРНК, так и на уровне белка [42].

Примечательно, что не только делеция кодирующей последовательности или значимое изменение последовательности белка могут усиливать патогенные свойства вируса, но и снижение уровня экспрессии белка при полном сохранении его функциональности. Так, при сравнении действия 2 штаммов HAdV B14 (прототипного штамма HAdV B14 deWit и мутантного HAdV B14p1) на культуру клеток A549 было установлено, что мутантный HAdV B14p1 более агрессивный, т.е. он формировал бляшки большего размера и вызывал более выраженное цитопатическое действие по сравнению с прототипным штаммом HAdV-B14 deWit. При этом у HAdV B14p1 был значительно снижен синтез белка 20K E1B

(гомолог 19K E1B) на уровне транскрипции, однако последовательности генов 20K E1B у HAdV B14 deWit и HAdV B14p1 отличались лишь на одну точечную «молчащую» мутацию [41]. Повышенный воспалительный ответ на B14p1 наблюдался и в эксперименте *in vivo* на сирийских хомяках [41]. Инфицированные HAdV B14p1 клетки человека при инокуляции животным индуцировали повышенную экспрессию провоспалительных цитокинов альвеолярными макрофагами, тогда как клетки, погибающие от инфекции HAdV B14 deWit, подавляли продукцию этих цитокинов макрофагами.

IV. Роль области E3. Блокировка апоптоза. Ускорение лизиса клеток. Модуляция иммунного ответа

В то время как регионы E1A и E1B консервативны у разных видов HAdV, регионы E3 значительно различаются. Некоторые гены региона E3 присутствуют у всех видов аденовируса: 10.4K (RID- α), 14.4K (RID- β) и 14.7K; другие имеются у большинства (виды В, С, D, E): 12.5K, 19K, третьи видоспецифичны. Так, гены 20.1K, 20.5K специфичны для вида В (20.5 K экспрессируется в виде 2 гликозилированных форм 22K и 36K), а 6.7K – для вида С. Продукты области E3 не являются необходимыми для репликации вируса, их функция, как нам представляется, сводится к защите инфицированной клетки от иммунного ответа хозяина. Так, E3 14.7K ингибирует апоптоз, опосредованный ФНО α и блокирует апоптоз, индуцированный цитокином TRAIL. Образованный белками E3 10.4K и E3 14.5K (14.4K) комплекс интернализации и деградации рецепторов RID индуцирует удаление с поверхности клетки и последующее разрушение рецепторов Fas, TRAIL-R1 и R2, предотвращая лиганд-индуцируемый апоптоз [43]. Этот комплекс также уменьшает количество рецепторов эпидермального фактора роста и противодействует апоптозу и воспалению, за счёт ингибирования индуцированной ФНО α секреции арахидоновой кислоты [44]. Специфический для вида С белок E3 6.7K формирует комплекс вместе с RID [43]. Виды В, D, E аденовирусов имеют родственные белки: E3 16K, 22K, 23K соответственно.

Мембранный интегральный гликопротеин E3 19K HAdV вида С связывается с антигенами главного комплекса гистосовместимости (МНС) I в цитоплазматическом ретикулуме, ингибирует их гликозилирование и препятствует их переносу на поверхность клетки и, как следствие, узнаванию цитотоксическими лимфоцитами [43]. Также он обеспечивает защиту от NK-киллеров, так как уменьшает транспортирование на поверхность клетки лигандов рецептора NK-киллеров NKG2D [45]. Белки, подобные E3 19K, экспрессируются всеми видами HAdV, кроме А и F. Установлено, что HAdV A12 препятствует экспрессии МНС I путём репрессии транскрипции промотора тяжёлой цепи МНС I и промотора, регулирующего экспрессию двух значимых для презентирования антигена белков: TAP1 и LMP2 [46].

Наличие таких механизмов у большинства видов HAdV, указывает на высокое значение удаления с поверхности клетки антигенов МНС I для адаптации аденовируса к хозяину.

По-видимому, именно область *E3 19K* наиболее важна для проявления патогенности вирусов вида *C*. Показано, что *HAAdv C* с делетированным *E3 19K* проявляли повышенную патогенностью по сравнению с диким типом, тогда как мутанты с делетированными *E3 6.7K*, *11.6K* и *12.5K* вызывали одинаковое с диким типом поражение лёгких у экспериментальных животных [47].

С помощью кристаллографических исследований изучены механизмы взаимодействия *E3 19K* с антигенами МНС I. Показано, что *E3 19K* связывает антигены МНС I с разной силой: связь сильнее с HLA-A, чем с HLA-B, в то время как с HLA-C практически не связывается [48]. Исследована кристаллическая структура связи между *E3 19K* и HLA-A2 МНС I и определены значимые для формирования этой связи аминокислотные остатки. Установлено, что белок *E3 19K HAAdv* вида D (D37) формирует более слабую связь и отличается от белков *E3 19K* видов B, C, E сайтами связывания с МНС I [49]. Мы предполагаем, что наличие аминокислотных замен в сайтах связывания *E3 19K* с МНС I у видов B, C и E также может приводить к увеличению патогенности данных видов *HAAdv*.

В экспериментах на хлопковых хомяках было показано, что делеция в *E3* на 3'-конце (в области *E3B*) не приводила к значительному увеличению воспалительной инфильтрации, но повышала количество сегментоядерных лейкоцитов в лёгких. Таким образом, в этот процесс могут быть вовлечены один или несколько генов области *E3 (7.5K, 14.5K и 10.4K)* [33].

Кроме того, для *HAAdv* вида *C* был обнаружен и изучен дополнительный фактор патогенности – *E3 11.6K*, или белок смерти (adenovirus death protein, ADP), который несмотря на расположение кодирующего его гена в ранней области, синтезируется на очень поздних стадиях инфекции и опосредует лизис клетки. Делеция кодирующей последовательности этого белка приводила к формированию бляшек меньшего размера при инфицировании вирусом культуры клеток. ADP – это интегральный N-, O-, пальмитоилированный гликопротеин, локализующийся в ядерной мембране, эндоплазматическом ретикулуме и аппарате Гольджи. ADP прочно связывается с клеточным белком человека MAD2B (MAD2L2, REV7), который замедляет лизис инфицированных аденовирусом клеток [50]. Аналоги белка смерти (9K и 7.7K) обнаружены у наиболее патогенных *HAAdv B3* и *B7* (подвид B1), но отсутствуют у тропных к переходному эпителию *HAAdv B11*, *B35* (подвид B2).

У *HAAdv* вида D также выявлен фактор патогенности, не имеющий аналогов у других видов, – иммуномодулирующий белок *E3 49K (CR1β)*, особенностью которого является воздействие на неинфицированные клетки. Первоначально синтезируемый как трансмембранный белок, *E3 49K* последовательно расщепляется с образованием секретируемого эктодомена *sec49K*. Установлено, что *sec49K* специфически связывается с линиями лимфоидных клеток и всеми первичными лейкоцитами, но не связывается с фибробластами и эпителиальными клетками. Ре-

цептором *sec49K* является локализованная на поверхности клетки тирозинфосфатаза CD45 из семейства белков RPTP, регулирующих проведение сигнала, активность и дифференцирование лимфоцитов. *Sec49K* нарушает функцию NK-клеток: например, в экспериментах он ингибировал обусловленный ими лизис клеток линии лейкемических лимфобластов человека K562, не несущих на своей поверхности белки МНС I. Также *sec49K* препятствует активации лимфоцитов – в его присутствии в NK- и T-клетках снижается экспрессия маркеров активации CD25 и CD69. Кроме того, *sec49K* предотвращает или уменьшает фосфорилирование белка Zap-70, взаимодействующего с T-клеточным рецептором и являющегося одним из ключевых сигнальных белков, вовлечённых в активацию T-клеток. *Sec49K* ингибирует продукцию цитокинов лейкоцитами. Показано, что преинкубация с мононуклеарами периферической крови, серопозитивных к цитомегаловирусу (CMV) лиц, приводила к значительному снижению ИФН-γ и ФНОα в ответ на стимуляцию антигенами CMV [51].

Установлено, что белки *E3 49K* некоторых *HAAdv* вида D модулируют адгезию клеток к внеклеточному матриксу и эндотелию. *E3 49K HAAdv D30* взаимодействует с содержащим тирозиновые ингибиторные мотивы рецептором MPLZ1, участвующим в фибронектин-зависимой миграции клеток и метастазирование опухолей. Так, активация этим белком рецептора MPLZ1 в клетках HeLa сопровождалась значительным ингибированием адгезии клеток к внеклеточным матричным белкам: фибронектину и коллагену. Кроме того, *E3 49K HAAdv D30* препятствовал адгезии T-клеток к эндотелиальным клеткам. А также в эксперименте на клетках эмбриональной почки человека (HEK293T) *E3 49K HAAdv D43* препятствовал проявлению эффектов взаимодействия рецептора EPHA3 с эфрином-A5 и снижению адгезии клеток к фибронектину [52].

Роль белков *E3* в инфекционном цикле *HAAdv* остается не полностью изученной. Так, при аннотации генома *HAAdv D37* выявлена открытая рамка считывания *CR1-γ*, с особенностями которой связана способность *HAAdv* вызывать эпидемический кератоконъюнктивит. Предсказано, что *CR1-γ* кодирует интегральный мембранный белок 31,6 кДа, цитоплазматический домен которого содержит предполагаемый сайт фосфорилирования протеинкиназой C, а также мотивы YXXφ и LL, что указывает на его потенциальную возможность модифицировать белки хозяина [53].

Имеются свидетельства наличия у белков *E3* и других иммуномодулирующих функций. Например, установлено, что большинство видов *HAAdv* кодируют по меньшей мере один белок *E3*, взаимодействующий с широко представленными на поверхности иммунных клеток рецепторами семейства SLAM. В экспериментах на T-клетках человека Jurkat показано уменьшение активации ERK1/2 после преинкубации с белками CR1α *HAAdv A* или CR1β *HAAdv B*. Таким образом, сверхактивация рецепторов SLAM белками *E3 HAAdv* может модулировать проведение сигнала от T-клеточных рецепторов.

Также обнаружено, что белки *E3* связываются с ин-

гибирующими лейкоциты рецепторами из семейства LILR. Белки CR1 β HAdv видов D, E и CR1 α HAdv вида A связывались с LILRB1, тогда как CR1 β HAdv вида F и CR1 α HAdv вида D – с LILRB2.

Рецептор LILRB1 оказывает ингибирующий эффект после взаимодействия с молекулами МНС I и фосфорилирования тирозинового ингибиторного мотива. Показано, что белок CR1 β HAdv E существенно повышал уровень фосфорилирования остатков тирозина в LILRB1 лейкоцитов периферической крови. Кроме того, он снижал скорость уничтожения клеток K562 НК-киллерами, вероятно, за счёт активации LILRB1 на их поверхности [52].

Таким образом, можно сделать вывод, что патогенность HAdv может повышаться за счёт особенностей или мутаций в генах регионов *E1A*, *E1B* и *E3*, а также изменения уровня экспрессии их белков.

Анамнестический иммунитет к разным типам аденовируса

HAdv-инфекция часто регистрируется локально в виде вспышек, не приобретая характера эпидемии, во-первых, благодаря тому, что доза HAdv, необходимая для развития заболевания, достаточно высока. Действительно, для HAdv инфицирующая доза составляет около 150 бляшкообразующих единиц (БОЕ) при интраназальном введении [54], тогда как, например, для вызывающего эпидемии вируса гриппа А минимальная инфицирующая доза (ИД₅₀) составляет 3 БОЕ [55]. В этой связи для передачи HAdv-инфекции от человека к человеку необходим тесный продолжительный контакт.

Тем не менее вспышки у военнослужащих вызывают только определённые типы HAdv: чаще – В7 [5, 8], Е4 [5, 8], В14 [56], В21 [57], реже – В55 [9], В3 [8]. По-видимому, причина в низкой распространённости защитных антител против этих типов HAdv в популяции.

В структуре спорадической аденовирусной респираторной инфекции большинство случаев вызваны типами В3 и С2 [5]. Это подтверждается также сероэпидемиологическими исследованиями, демонстрирующими наличие специфических антител к HAdv С2 и HAdv В3 более, чем у 50% людей [58, 59]. Однако анамнестические антитела к этим типам не обеспечивают иммунной защиты от многих HAdv других типов. Так, в экспериментах по перекрёстной нейтрализации HAdv кроличьими антисыворотками между некоторыми типами (Е4 и В16; D15 и D25; С1, С2, С5, С6 и А12) наблюдались реципрокные кросс-реакции, но для большинства типов был установлен высокий уровень специфичности. В другом исследовании была установлена типоспецифичная нейтрализация HAdv В7, В14, В16 и В21, тогда как тип В3 нейтрализовался также антисывороткой к типу В7, а тип В11 – антисыворотками к типам В3, В7, В14 [60].

Таким образом, для инактивации наиболее патогенного HAdv В7 требуются типоспецифические антитела. Это может объяснить случаи тяжёлых инфекций у иммунокомпетентных взрослых, которые могут быть свя-

заны с отсутствием у них анамнестических антител к агрессивному, но сравнительно редко встречающемуся типу HAdv.

Низкая распространённость антител к некоторым типам HAdv, по-видимому, является одной из причин всплеск острых респираторных заболеваний среди призывников срочной военной службы. Нейтрализующие антитела к типу В7 встречаются не более чем у 1/4 призывников до 20 лет, к типу Е4 – менее чем у 30% [61]. А антитела к типам В14 и В55 обнаруживаются менее чем у 20% людей в возрасте 18–20 лет [59, 62]. В то же время нейтрализующие антитела к типам HAdv, редко вызывающим вспышки, обнаруживаются существенно чаще: к типу В3 – более чем у 80% людей в возрасте 20–29 лет [59], а к типам С2 и С5 – уже у 59,6% взрослых и 43,3% детей [58]. На значимую роль типоспецифического иммунитета в возникновении вспышек также указывают успехи применения вакцины против HAdv Е4, В7 в армии США до 1996 г., а также подъём заболеваемости HAdv-инфекцией в годы после прекращения вакцинации [61].

Заключение

Подводя итоги, можно констатировать, что HAdv обладают множеством факторов патогенности, среди которых: разнообразие путей внедрения инфекционного агента в восприимчивый организм посредством различных типоспецифичных рецепторов, возможность модулирования иммунного ответа организма хозяина и ускользания от защитных факторов, а также способность к генерализации инфекции при взаимодействии с белками крови.

Среди возможных причин тяжёлого течения аденовирусной респираторной инфекции следует выделить следующие свойства HAdv, обуславливающие более высокую патогенность некоторых его типов:

- 1) способность связываться с рецепторами, расположенными в нижних дыхательных путях, а также связывание с десмоглеином 2, широко представленным в бронхиальном эпителии, посредством которого HAdv может проникать в лёгкие;
- 2) образование додекаэдрических субвирусных частиц, способствующих обширному повреждению тканей и дальнейшему распространению инфекции;
- 3) способность связываться с белками крови, в частности с фактором свёртывания X, и тем самым вызывать системную инфекцию;
- 4) особенности генов *E1A*, *E1B*, *E3*, *E4* или изменения уровня их экспрессии, усиливающие воспалительный ответ организма в ответ на инфекцию.

HAdv В7, вызывающий тяжёлые респираторные инфекции с летальным исходом, обладает всеми четырьмя перечисленными свойствами. Рецептором HAdv В7 является десмоглеин 2. Такой рецептор используют ещё 3 HAdv вида В (В3, В11, В14), также ассоциированные с тяжёлыми инфекциями нижних дыхательных путей. Для остальных HAdv вида В рецептором является CD46, а для HAdv других видов – CAR.

HAdv В7 образует додекаэдрические субвирусные частицы. Однако такие частицы образуют и другие

ассоциированные с пневмониями HAdV вида В (В3, В11, В14, В14а), а также некоторые менее патогенные HAdV: D9, D15 и E4. Это свидетельствует о том, что одной способности вируса образовывать такие частицы недостаточно для проявления повышенной патогенности.

HAdV В7 обладает слабой способностью связываться с фактором Х, такой же, как у других возбудителей пневмонии HAdV вида В (В3, В11) и некоторых типов видов А (А18) и D (D37, D46), тогда как у многих HAdV вида D эта способность полностью отсутствует. В то же время существуют HAdV видов С (С2, С5, С6), В (В50, В16) и D (D49), образующие сильную связь с этим фактором. При этом данные типы вида В, как и виды С и D, редко вызывают тяжёлые инфекции, поэтому свойство связывать фактор Х также не является единственным и достаточным условием высокой патогенности.

Тем не менее сочетание этих трёх особенностей встречается только у 4 типов HAdV: В3, В7, В11, В14. Описаны случаи летальных инфекций, вызванных каждым из названных типов, но В11 и В14 редко встречаются в популяции [5], поэтому вызванные ими тяжёлые инфекции наблюдаются гораздо реже.

HAdV В7 вызывает усиленную продукцию ИЛ-8, по-видимому, за счёт особенностей Е1А или других ранних генов. Вероятно, эти особенности обуславливают повышенную патогенность HAdV 7(В) относительно HAdV В3.

Наряду с этим в развитии инфекции очень большое значение имеет анамнестический типоспецифичный иммунитет: низкая распространённость вируса в популяции, и, как следствие, отсутствие анамнестических антител, может приводить к групповым заболеваниям и более тяжёлому осложнённому течению. Поскольку типоспецифические иммуноглобулины к HAdV типа 7 имеются не более чем у 1/4 людей, достигших возраста 20 лет, это создаёт предпосылки для развития вспышек.

Также согласно ряду исследований, к факторам риска развития тяжёлой HAdV-инфекции относятся возраст младше 7 лет, наличие хронических сопутствующих заболеваний (неврологических, хронических заболеваний дыхательных путей, сердечно-сосудистой системы, почек и метаболических нарушений) и иммуносупрессия (например, вследствие недавно перенесённой трансплантации органов и тканей) [10, 63].

Таким образом, можно сделать вывод, что HAdV типа 7 – наиболее патогенный среди других типов HAdV, и инфекция, вызванная им, требует разработки этиотропной и патогенетической терапии, поскольку в сочетании с факторами предрасположенности может привести к неблагоприятному исходу.

В этой связи также требуются разработка вакцин против HAdV типа 7 и иммунизация пациентов групп риска тяжёлого течения и в изолированных коллективах.

Приведенные в данном обзоре факторы, лежащие в основе патогенеза, могут способствовать поиску новых подходов для разработки препаратов этиотропной и патогенетической терапии HAdV-инфекции и в первую очередь инфекции, вызванной HAdV В7.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1-4, 6, 7, 9, 10, 12-63 см. REFERENCES)

5. Яцышина С.Б., Агеева М.Р., Воробьева Н.С., Валдохина А.В., Елькина М.А., Горелов А.В. и др. Аденовирусы в этиологической структуре острых респираторных вирусных инфекций в Москве в 2004 - 2014 гг. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2015; (5): 50-7.
8. Львов Н.И., Соминина А.А., Жданов К.В., Лобзин Ю.В. Особенности клинического течения острых респираторных заболеваний, вызванных аденовирусами эпидемически значимых типов. *Журнал инфектологии*. 2014; 6(2): 5-11.
11. Яцышина С.Б., Самчук В.В., Васильев В.В., Агеева М.Р., Воробьева Н.С., Савочкина Ю.А. и др. Аденовирусная пневмония с летальным исходом у взрослых. *Терапевтический архив*. 2014; 86(11): 55-9.

REFERENCES

1. Ghebremedhin B. Human adenovirus: viral pathogen with increasing importance. *Eur. J. Microbiol. Immunol. (Bp)*. 2014; 4(1): 26-33. Doi: <https://doi.org/10.1556/EuJMI.4.2014.1.2>
2. Bradshaw C.S., Tabrizi S.N., Read T.R., Garland S.M., Hopkins C.A., Moss L.M., et al. Etiologies of nongonococcal urethritis: bacteria, viruses, and the association with orogenital exposure. *J. Infect. Dis*. 2006; 193(3): 336-45. Doi: <https://doi.org/10.1086/499434>
3. Ison M.G., Green M. AST Infectious Diseases Community of Practice. Adenovirus in solid organ transplant recipients. *Am. J. Transplant*. 2009; 9(Suppl. 4): S161-5. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2009.02907.x>
4. Stralioetto S.M., Siqueira M.M., Muller R.L., Fischer G.B., Cunha M.L., Nestor S.M. Viral etiology of acute respiratory infections among children in Porto Alegre, RS, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2002; 35(4): 283-91.
5. Yatsyshina S.B., Ageeva M.R., Vorob'eva N.S., Valdokhina A.V., El'kina M.A., Gorelov A.V., et al. Adenoviruses in the etiological structure of acute respiratory viral infection in Moscow in 2004 — 2014. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2015; (5): 50-7. (in Russian)
6. Podkolzin A.T., Fenske E.B., Abramycheva N.Yu., Shipulin G.A., Sagalova O.I., Mazepa V.N., et al. Hospital-based surveillance of rotavirus and other viral agents of diarrhea in children and adults in Russia, 2005-2007. *J. Infect. Dis*. 2009; 200(Suppl. 1): S228-33. Doi: <https://doi.org/10.1086/605054>
7. Gigliotti F., Williams W.T., Hayden F.G., Hendley J.O., Benjamin J., Dickens M., et al. Etiology of acute conjunctivitis in children. *J. Pediatr*. 1981; 98(4): 531-6.
8. L'vov N.I., Somnina A.A., Zhdanov K.V., Lobzin Yu.V. Features of a clinical course of the acute respiratory diseases caused by adenoviruses of epidemic significant serotypes. *Zhurnal infektologii*. 2014; 6(2): 5-11. (in Russian)
9. Yoo H., Gu S.H., Jung J., Song D.H., Yoon C., Hong D.J., et al. Febrile Respiratory Illness Associated with Human Adenovirus Type 55 in South Korea Military, 2014-2016. *Emerg. Infect. Dis*. 2017; 23(6): 1016-20. Doi: <https://doi.org/10.3201/eid2306.161848>
10. Lion T. Adenovirus infections in immunocompetent and immunocompromised patients. *Clin. Microbiol. Rev*. 2014; 27(3): 441-62. Doi: <https://doi.org/10.1128/CMR.00116-13>
11. Yatsyshina S.B., Samchuk V.V., Vasil'ev V.V., Ageeva M.R., Vorob'eva N.S., Savochkina Yu.A., et al. Adenovirus pneumonia with a fatal outcome in adults. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2014; 86(11): 55-9. (in Russian)
12. Scott M.K., Chommanard C., Lu X., Appelgate D., Grenz L., Schneider E., et al. Human adenovirus associated with severe respiratory infection, Oregon, USA, 2013-2014. *Emerg. Infect. Dis*.

- 2016; 22(6): 1044-51. Doi: <https://doi.org/10.3201/eid2206.151898>
13. Gu L., Liu Z., Li X., Qu J., Guan W., Liu Y., et al. Severe community-acquired pneumonia caused by adenovirus type 11 in immunocompetent adults in Beijing. *J. Clin. Virol.* 2012; 54(4): 295-301. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2012.04.018>
 14. Tan D., Zhu H., Fu Y., Tong F., Yao D., Walline J., et al. Severe community-acquired pneumonia caused by human adenovirus in immunocompetent adults: a multicenter case series. *PLoS One.* 2016; 11(3): e0151199. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151199>
 15. Alharbi S., Van Caesele P., Consunji-Araneta R., Zoubeidi T., Fanella S., Souid A.K., et al. Epidemiology of severe pediatric adenovirus lower respiratory tract infections in Manitoba, Canada, 1991-2005. *BMC Infect. Dis.* 2012; 12: 55. Doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2334-12-55>
 16. Roelvink P.W., Lizonova A., Lee J.G., Li Y., Bergelson J.M., Finberg R.W., et al. The coxsackievirusadenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F. *J. Virol.* 1998; 72(10): 7909-15.
 17. Marttila M., Persson D., Gustafsson D., Liszewski M.K., Atkinson J.P., Wadell G., et al. CD46 is a cellular receptor for all species B adenoviruses except types 3 and 7. *J. Virol.* 2005; 79(22): 14429-36. Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.79.22.14429-14436.2005>
 18. Human protein atlas. Available at: <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000117335-CD46/tissue>
 19. Sharma A., Li X., Bangari D.S., Mittal S.K. Adenovirus receptors and their implications in gene delivery. *Virus Res.* 2009; 143(2): 184-94. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.02.010>
 20. Lenman A., Liaci A.M., Liu Y., Ardahl C., Rajan A., Nilsson E., et al. Human adenovirus 52 uses sialic acidcontaining glycoproteins and the coxsackie and adenovirus receptor for binding to target cells. *PLoS Pathog.* 2015; 11(2): e1004657. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004657>
 21. Sauer A.K., Liang C.H., Stech J., Peeters B., Quéré P., Schwegmann-Wessels C., et al. Characterization of the sialic acid binding activity of influenza A viruses using soluble variants of the H7 and H9 hemagglutinins. *PLoS One.* 2014; 9(2): e89529. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089529>
 22. Wang H., Li Z.Y., Liu Y., Persson J., Beyer I., Möller T., et al. Desmoglein 2 is a receptor for adenovirus serotypes 3, 7, 11, and 14. *Nat. Med.* 2011; 17(1): 96-104. Doi: <https://doi.org/10.1038/nm.2270>
 23. Lu Z.Z., Wang H., Zhang Y., Cao H., Li Z., Fender P., et al. Penton-dodecahedral particles trigger opening of intercellular junctions and facilitate viral spread during adenovirus serotype 3 infection of epithelial cells. *PLoS Pathog.* 2013; 9(10): e1003718. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003718>
 24. Shayakhmetov D.M., Gaggar A., Ni S., Li Z.Y., Lieber A. Adenovirus binding to blood factors results in liver cell infection and hepatotoxicity. *J. Virol.* 2005; 79(12): 7478-91. Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.79.12.7478-7491.2005>
 25. Alba R., Bradshaw A.C., Parker A.L., Bhella D., Waddington S.N., Nicklin S.A., et al. Identification of coagulation factor (F)X binding sites on the adenovirus serotype 5 hexon: effect of mutagenesis on FX interactions and gene transfer. *Blood.* 2009; 114(5): 965-71. Doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2009-03-208835>
 26. Waddington S.N., McVey J.H., Bhella D., Parker A.L., Barker K., Atoda H., et al. Adenovirus serotype 5 hexon mediates liver gene transfer. *Cell.* 2008; 132(3): 397-409. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.016>
 27. Mistchenko A.S., Diez R.A., Mariani A.L., Robaldo J., Maffey A.F., Bayley-Bustamante G., et al. Cytokines in adenoviral disease in children: association of interleukin-6, interleukin-8, and tumor necrosis factor alpha levels with clinical outcome. *J. Pediatr.* 1994; 124(5 Pt. 1): 714-20.
 28. Chen W.W., Nie W.M., Xu W., Xie Y.X., Tu B., Zhao P., et al. Cross-sectional study of the relationship of peripheral blood cell profiles with severity of infection by adenovirus type 55. *BMC Infect. Dis.* 2014; 14: 147. Doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-147>
 29. Raper S.E., Chirmule N., Lee F.S., Wivel N.A., Bagg A., Gao G.P., et al. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine-transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol. Genet. Metab.* 2003; 80(1-2): 148-58.
 30. Alcorn M.J., Booth J.L., Coggeshall K.M., Metcalf J.P. Adenovirus type 7 induces interleukin-8 production via activation of extracellular regulated kinase 1/2. *J. Virol.* 2001; 75(14): 6450-9. Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.75.14.6450-6459.2001>
 31. Booth J.L., Metcalf J.P. Type-specific induction of interleukin-8 by adenovirus. *Am J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 1999; 21(4): 521-7. Doi: <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.21.4.3677>
 32. Chollet-Martin S., Montravers P., Gibert C., Elbim C., Desmots J.M., Fagon J.Y., et al. High levels of interleukin-8 in the blood and alveolar spaces of patients with pneumonia and adult respiratory distress syndrome. *Infect. Immun.* 1993; 61(11): 4553-9.
 33. Ginsberg H.S., Horswood R.L., Chanock R.M., Prince G.A. Role of early genes in pathogenesis of adenovirus pneumonia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990; 87(16): 6191-5. Doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.87.16.6191>
 34. Van den Berg A., Snoek M., Jansen H.M., Lutter R. E1A expression dysregulates IL-8 production and suppresses IL-6 production by lung epithelial cells. *Respir. Res.* 2005; 6: 111. Doi: <https://doi.org/10.1186/1465-9921-6-111>
 35. Schaack J., Bennett M.L., Colbert J.D., Torres A.V., Clayton G.H., Ornelles D., et al. E1A and E1B proteins inhibit inflammation induced by adenovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004; 101(9): 3124-29. Doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.0303709101>
 36. Miller D.L., Rickards B., Mashiba M., Huang W., Flint S.J. The adenoviral E1B 55-kilodalton protein controls expression of immune response genes but not p53-dependent transcription. *J. Virol.* 2009; 83(8): 3591-603. Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.02269-08>
 37. Ginsberg D. E2F1 pathways to apoptosis. *FEBS Lett.* 2002; 529(1): 122-5.
 38. Harada J.N., Shevchenko A., Shevchenko A., Pallas D.C., Berk A.J. Analysis of the adenovirus E1B-55K-anchored proteome reveals its link to ubiquitination machinery. *J. Virol.* 2002; 76(18): 9194-206. Doi: <https://doi.org/10.1128/jvi.76.18.9194-9206.2002>
 39. Ullman A.J., Reich N.C., Hearing P. Adenovirus E4 ORF3 protein inhibits the interferon-mediated antiviral response. *J. Virol.* 2007; 81(9): 4744-52. Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.02385-06>
 40. Chahal J.S., Qi J., Flint S.J. The human adenovirus type 5 E1B 55 kDa protein obstructs inhibition of viral replication by type I interferon in normal human cells. *PLoS Pathog.* 2012; 8(8): e1002853. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002853>
 41. Cook J., Radke J. Mechanisms of pathogenesis of emerging adenoviruses. *F1000Res.* 2017; 6: 90. Doi: <https://doi.org/10.12688/f1000research.10152.1>
 42. Passaro C., Borriello F., Vastolo V., Di Somma S., Scamardella E., Gigantino V., et al. The oncolytic virus d1922-947 reduces IL-8/CXCL8 and MCP-1/CCL2 expression and impairs angiogenesis and macrophage infiltration in anaplastic thyroid carcinoma. *Oncotarget.* 2016; 7(2): 1500-15. Doi: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6430>
 43. Lichtenstein D.L., Toth K., Doronin K., Tollefson A.E., Wold W.S. Functions and mechanisms of action of the adenovirus E3 proteins. *Int. Rev. Immunol.* 2004; 23(1-2): 75-111.
 44. Horwitz M.S. Function of adenovirus E3 proteins and their interactions with immunoregulatory cell proteins. *J. Gene Med.* 2004; (6 Suppl. 1): S172-83. Doi: <https://doi.org/10.1002/jgm.495>
 45. McSharry B.P., Burgert H.G., Owen D.P., Stanton R.J., Prod'homme V., Sester M., et al. Adenovirus E3/19K promotes evasion of NK cell recognition by intracellular sequestration of the NKG2D ligands major histocompatibility complex class I chain-related proteins A and B. *J. Virol.* 2008; 82(9): 4585-94. Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.02251-07>
 46. Georgopoulos N.T., Proffitt J.L., Blair G.E. Transcriptional regulation of the major histocompatibility complex (MHC) class I heavy chain, TAP1 and LMP2 genes by the human papillomavirus (HPV) type 6b, 16 and 18 E7 oncoproteins. *Oncogene.* 2000; 19(42): 4930-5. Doi: <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203860>
 47. Marinheiro J.C., Dos Santos T.G., Siqueira-Silva J., Lu X., Carvalho D., da Camara A.A. et al. A naturally occurring human adenovirus type 7 variant with a 1743 bp deletion in the E3 cassette. *J. Gen. Virol.* 2011; 92(Pt. 10): 2399-404. Doi: <https://doi.org/10.1099/vir.0.029181-0>
 48. Liu H., Fu J., Bouvier M. Allele- and locus-specific recognition of class II MHC molecules by the immunomodulatory E3-19K protein from adenovirus. *J. Immunol.* 2007; 178(7): 4567-75. Doi: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.7.4567>

49. Li L., Muzahim Y., Bouvier M. Crystal structure of adenovirus E3-19K bound to HLA-A2 reveals mechanism for immunomodulation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2012; 19(11): 1176-81. Doi: <https://doi.org/10.1038/nsmb.2396>
50. Ying B., Wold W.S. Adenovirus ADP protein (E3-11.6K), which is required for efficient cell lysis and virus release, interacts with human MAD2B. *Virology*. 2003; 313(1): 224-34.
51. Arnberg N. Adenovirus E3 protein modulates leukocyte functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013; 110(50): 19976-7. Doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.1319937110>
52. Martinez-Martin N., Ramani S.R., Hackney J.A., Tom I., Wranik B.J., Chan M., et al. The extracellular interactome of the human adenovirus family reveals diverse strategies for immunomodulation. *Nat. Commun.* 2016; 7: 11473. Doi: <https://doi.org/10.1371/10.1038/ncomms11473>
53. Robinson C.M., Rajaiya J., Zhou X., Singh G., Dyer D.W., Chodosh J. The E3 CR1-gamma gene in human adenoviruses associated with epidemic keratoconjunctivitis. *Virus. Res.* 2011; 160(1-2): 120-7. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.05.022>
54. Health Canada (2002). Material data safety sheet – infectious agents. Available at: <http://www.hc-sc.gc.ca/pphb-dgsp/msds-ftss/msds3e.html>
55. Compans W., Oldstone M.B.A., eds. Influenza pathogenesis and control. Volume 1. Cham, Switzerland: Springer; 2014. Doi: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-11155-1>
56. Parcell B.J., McIntyre P.G., Yirrell D.L., Fraser A., Quinn M., Templeton K., et al. Prison and community outbreak of severe respiratory infection due to adenovirus type 14p1 in Tayside, UK. *J. Public Health (Oxf)*. 2015; 37(1): 64-9. Doi: <https://doi.org/10.1093/pubmed/ftu009>
57. Kajon A.E., Hang J., Hawksworth A., Metzgar D., Hage E., Hansen C.J., et al. Molecular epidemiology of adenovirus type 21 respiratory strains isolated from US military trainees (1996–2014). *J. Infect. Dis.* 2015; 212(6): 871-80. Doi: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv141>
58. Yu B., Wang Z., Dong J., Wang C., Gu L., Sun C., et al. A serological survey of human adenovirus serotype 2 and 5 circulating pediatric populations in Changchun, China, 2011. *Viol. J.* 2012; 9: 287. Doi: <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-287>
59. Tian X., Jiang Z., Ma Q., Liu Q., Lu X., Liu W., et al. Prevalence of neutralizing antibodies to common respiratory viruses in intravenous immunoglobulin and in healthy donors in southern China. *J. Thorac. Dis.* 2016; 8(5): 803-12. Doi: <https://doi.org/10.21037/jtd.2016.03.29>
60. Döring N., Nguyen C.X., Wigand R. Neutralization of adenovirus toxins: specificity and antigenic relationships. *Med. Microbiol. Immunol.* 1972; 157(4): 325-3.
61. Ludwig S.L., Brundage J.F., Kelley P.W., Nang R., Towle C., Schnurr D.P., et al. Prevalence of antibodies to adenovirus serotypes 4 and 7 among unimmunized US army trainees: results of a retrospective nationwide seroprevalence survey. *J. Infect. Dis.* 1998; 178(6): 1776-8. Doi: <https://doi.org/10.1086/314498>
62. Zheng X., Rong X., Feng Y., Sun X., Li L., Wang Q., et al. Seroprevalence of neutralizing antibodies against adenovirus type 14 and 55 in healthy adults in Southern China. *Emerg. Microbes Infect.* 2017; 6(6): e43. Doi: <https://doi.org/10.1038/emi.2017.29>
63. Cheng J.L., Peng C.C., Chiu N.C., Weng L.C., Chiu Y.Y., Chang L., et al. Risk factor analysis and molecular epidemiology of respiratory adenovirus infections among children in northern Taiwan. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2017; 50(4): 418-26. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2015.08.006>

Поступила 19.06.18

Принята в печать 31.10.18

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Львов Д.К.¹, Богданова В.С.¹, Кириллов И.М.¹, Щелканов М.Ю.², Бурцева Е.И.¹, Бовин Н.В.³, Федякина И.Т.¹, Прилипов А.Г.¹, Альховский С.В.¹, Самохвалов Е.И.¹, Прошина Е.С.¹, Кириллова Е.С.¹, Сыроешкин А.В.⁴

ЭВОЛЮЦИЯ ПАНДЕМИЧЕСКОГО ВИРУСА ГРИППА А(H1N1)pdm09 В 2009-2016 гг.: ДИНАМИКА РЕЦЕПТОРНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ПЕРВОЙ СУБЪЕДИНИЦЫ ГЕМАГГЛЮТИНИНА (HA1)

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

² Дальневосточный федеральный университет (ДФУ), 690950, Приморский край, г. Владивосток, Россия;

³ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, г. Москва, Россия;

⁴ Российский Университет Дружбы Народов, 117198, г. Москва, Россия

Введение. Возникший в 2009 г. реассортант вируса гриппа свиней А(H1N1)pdm09 преодолел видовой барьер и стал причиной пандемии 2009–2010 гг. Одним из ключевых моментов, необходимых для преодоления вирусом гриппа видовой барьера и адаптации его к человеку, является специфичность его связывания с рецепторами эпителия дыхательных путей человека. **Цели и задачи.** Изучение динамики рецепторной специфичности (РС) первой субъединицы гемагглютинаина (HA1) штаммов вируса гриппа А(H1N1)pdm09, изолированных в 2009–2016 гг. на территории РФ, и анализ возможного влияния этих изменений на показатели заболеваемости населения РФ пандемическим гриппом в отдельные эпидемические сезоны. **Материал и методы.** Использованы стандартные методы сбора клинических материалов, изоляции вирусов гриппа, их типирования и секвенирования генома. Для изучения РС вируса гриппа А(H1N1)pdm09 применяли метод твердофазного сиалозидферментного анализа. **Результаты.** Показано, что изменение параметра $W_{3/6}$, характеризующего степень превышения α 2-3 рецепторной специфичности (α 2-3-РС) вируса гриппа А(H1N1)pdm09 над α 2-6-РС, совпадает с изменением показателя заболеваемости населения РФ пандемическим гриппом в отдельные эпидемические сезоны. Наблюдается тенденция к повышению сродства вируса А(H1N1)pdm09 к α 2-3-сиалогликополимерам (СГП) - аналогам сиалил-гликановых рецепторов эпителия респираторного тракта человека, и снижению к α 2-6-СГП, причём наибольшее сродство вирус проявляет к сульфатированным сиалогликополимерам. **Обсуждение.** Скрининг РС штаммов вируса гриппа А(H1N1)pdm09, изолированных на территории РФ в 2009–2016 гг., выявил снижение сродства вирусов к α 2-6-сиалозидам, особенно к 6'SL-СГП, что, вероятно, связано с наличием аминокислотных замен в 222-й и 223-й позициях РСС HA1 вирусов. Проведённые ранее исследования показали, что наличие таких замен коррелирует с возрастом вирулентности вируса гриппа А(H1N1)pdm09 [16, 23]. Вероятно, произошла эволюция пандемического вируса в направлении селекции более вирулентных пневмотропных вариантов. **Заключение.** Мониторинг РС пандемического вируса гриппа позволяет выявлять штаммы с измененной РС к эпителию респираторного тракта человека и повышенной способностью к передаче от человека к человеку. Изменение в 2009–2016 гг. параметра $W_{3/6}$, характеризующего степень превышения α 2-3-РС вируса гриппа А(H1N1)pdm09 над α 2-6-РС, совпадает с изменением показателей заболеваемости населения РФ пандемическим гриппом в отдельные эпидемические сезоны.

Ключевые слова: грипп; вирус гриппа А(H1N1)pdm09; эпидемический сезон; гемагглютинин; рецепторная специфичность; сиалил-гликановый рецептор; сиалогликополимер.

Для цитирования: Львов Д.К., Богданова В.С., Кириллов И.М., Щелканов М.Ю., Бурцева Е.И., Бовин Н.В., Федякина И.Т., Прилипов А.Г., Альховский С.В., Самохвалов Е.И., Прошина Е.С., Кириллова Е.С., Сыроешкин А.В. Эволюция пандемического вируса гриппа А(H1N1)pdm09 в 2009-2016 гг.: динамика рецепторной специфичности первой субъединицы гемагглютинаина (HA1). *Вопросы вирусологии.* 2019; 64(2): 63-72.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-2-63-72>

Lvov D.K.¹, Bogdanova V.S.¹, Kirillov I.M.¹, Shchelkanov M.Yu.², Burtseva E.I.¹, Bovin N.V.³, Fedyakina I.T.¹, Prilipov A.G.¹, Alhovskiy S.V.¹, Samokhvalov E.I.¹, Proshina E.S.¹, Kirillova E.S.¹, Syroeshkin A.V.⁴

EVOLUTION OF PANDEMIC INFLUENZA VIRUS A(H1N1)pdm09 IN 2009-2016: DYNAMICS OF RECEPTOR SPECIFICITY OF THE FIRST HEMAGGLUTININ SUBUNIT (HA1)

¹ Ivanovsky Institute of Virology «National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named honorary academician NF Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation;

² Far Eastern Federal University, Vladivostok, 690950, Primorsky Krai, Russian Federation;

³ Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, 117997, Russian Federation;

⁴ Peoples Friendship University of Russia (RUDN), Moscow, 117198, Russian Federation

Для корреспонденции: Львов Дмитрий Константинович, академик РАН, профессор, д-р мед. наук, Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва. E-mail: dk_lvov@mail.ru

Introduction. The new reassortant of the swine flu virus A(H1N1)pdm09, which emerged in 2009, overcame the species barrier and caused the 2009-2010 pandemic. One of the key points required for the influenza virus to overcome the species barrier and adapt it to humans is its specific binding to the receptors on the epithelium of the human respiratory tract. **Targets and goals.** Studying the dynamics of changes in receptor specificity (RS) of the HA1 subunit of the hemagglutinin of the influenza A(H1N1)pdm09 virus strains isolated during the period 2009-2016 on the territory of the Russian Federation, and an analysis of the possible impact of these changes on the incidence rates of the population of the Russian Federation of pandemic influenza in certain epidemic seasons. **Material and Methods.** Standard methods of collecting clinical materials, isolation of influenza viruses, their typing and genome sequencing were used. For the study of RS of influenza A virus (H1N1)pdm09, the method of solid phase sialosidase analysis was used. **Results.** It is shown that the change in the parameter $W_{3/6}$, which characterizes the degree of $\alpha 2-3$ receptor specificity ($\alpha 2-3$ -RS) of the influenza virus A(H1N1)pdm09 over $\alpha 2-6$ -RS, coincides with the change in the incidence rates of the Russian Federation's pandemic flu in separate epidemic seasons. There is a tendency to increase the affinity of the virus A(H1N1)pdm09 to $\alpha 2-3$ analogs of the sialyl-glycan receptors of the human respiratory tract epithelium - $\alpha 2-3$ -sialoglycopolymers ($\alpha 2-3$ -SGP), and falls to $\alpha 2-6$ -SGP, with the virus showing the greatest affinity for sulfated sialoglycopolymers. **Discussion.** Screening for RS strains of influenza A (H1N1)pdm09 virus isolated on the territory of the Russian Federation in 2009–2016 revealed a decrease in the affinity of viruses for $\alpha 2-6$ -sialosides, especially for 6'SL-SGP, which is probably due to the presence of amino acid substitutions in the 222 and 223 positions of RBS HA1 viruses. Previous studies have shown that the presence of such substitutions correlates with an increase in the virulence of the influenza A virus (H1N1)pdm09 [16, 23]. Probably, the pandemic virus has evolved towards the selection of more virulent pneumotropic variants. **Conclusion.** Monitoring of the receptor specificity of a pandemic influenza virus makes it possible to identify strains with altered RS to the epithelium of the human respiratory tract and an increased ability to transfer from person to person. Change in the period 2009-2016 the $W_{3/6}$ parameter characterizing the degree of $\alpha 2-3$ -RS excess of the influenza A(H1N1)pdm09 virus over $\alpha 2-6$ -RS, coincides with the change in the incidence rates of the pandemic influenza population of the Russian Federation in certain epidemic seasons.

Keywords: influenza; influenza virus A(H1N1)pdm09; epidemic season; hemagglutinin (HA); receptor specificity; sialyl-glycan receptor; sialoglycopolymer (SGP).

For citation: Lvov D.K., Bogdanova V.S., Kirillov I.M., Shchelkanov M.Yu., Burtseva E.I., Bovin N.V., Fedyakina I.T., Prilipov A.G., Alhovsky S.V., Samokhvalov E.I., Proshina E.S., Kirillova E.S., Syroeshkin A.V. Evolution of pandemic influenza virus A(H1N1)pdm09 in 2009-2016: dynamics of receptor specificity of the first hemagglutinin subunit (HA1). *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2019; 64(2):63-72. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-2-63-72>

For correspondence: Dmitry K. Lvov, MD, PhD, DSc, prof., academician of RAS; Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russian Federation. E-mail: dk_lvov@mail.ru

Information about authors:

Lvov D.K., <https://orcid.org/0000-0001-8176-6582>

Bogdanova V.S., <https://orcid.org/0000-0003-4353-9826>

Proshina E.S., <https://orcid.org/0000-0003-2348-811X>

Samokhvalov E.I., <https://orcid.org/0000-0001-7444-805X>

Shchelkanov M.Yu., <https://orcid.org/0000-0001-8610-7623>

Acknowledgment. The publication was prepared with the support of the «RUDN University Program 5-100». [Peoples Friendship University of Russia (RUDN), Moscow, 117198, Russian Federation]

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

Received 09 October 2018

Accepted 31 October 2018

Возникший в 2009 г. реассортант вируса гриппа свиней A(H1N1)pdm09, вытеснивший из активной циркуляции в популяции человека эпидемический вирус гриппа A(H1N1), стал причиной пандемии 2009–2010 гг. и доминирующим агентом в этиологии большинства последующих эпидемических сезонов [1–4]. В связи с этим контроль за распространением пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09, обладающего повышенной вирулентностью, является важнейшей задачей по обеспечению биобезопасности.

Вирусы гриппа заметно различаются по эффективности передачи от человека к человеку. Эти различия определяются, в частности, тропизмом вируса к эпителию верхних дыхательных путей человека. Одним из ключевых факторов, влияющих на тропизм вируса гриппа к эпителиальным клеткам хозяина, является процесс узнавания расположенных на поверхности клеток рецепторов. Адаптация вирусов гриппа к хозяину осуществляется главным образом с помощью гемагглютинина, запускающего процессы присоеди-

нения к клетке хозяина и репликации вируса с его дальнейшей трансмиссией. Таким образом, степень аффинности гемагглютинина к клеточным рецепторам тканей хозяина, т.е. рецепторная специфичность (РС) вируса, играет ключевую роль в ограничении межвидового переноса.

Для распознавания вирусом гриппа рецепторов на клеточной поверхности и связывания с ними служит рецепторный карман, который образован 130-й (135–138) и 220-й (221–228) аминокислотными петлями и спиралью 190 (190–198 а.к.) (нумерация по подтипу H3 гемагглютинина) и расположен в глобулярной части гемагглютинина [5].

РС вируса определяется природой формирующего карман аминокислот; они консервативны у разных подтипов вируса гриппа и влияют на аффинитет вируса к клеточным рецепторам эпителия респираторного тракта человека [6, 7]. Минимальной детерминантой последних является сиаловая кислота, или N-ацетилнейраминавая кислота (5-амино-3,5-дидезокси-D-глицеро-D-галакто-2-нонулозоновая

кислота, Neu5Ac), соединённая с углеводным кором α 2-3- или α 2-6-гликозидной связью [8].

Известно, что степень сродства вирусов гриппа разных видов животных к клеточным рецепторам зависит, в частности, от вида связи остатка сиаловой кислоты с субтерминальным остатком галактозы (т.е. Neu5Ac α 2-3Gal- или Neu5Ac α 2-6Gal-связь) [9, 10]. Для вирусов гриппа человека и классических вирусов гриппа свиней характерно взаимодействие с сиаловыми кислотами, связанными с галактозой α 2-6-связью, тогда как для вирусов гриппа птиц и лошадей – α 2-3-связью [11, 12].

Адаптация вируса гриппа к разным хозяевам происходит, в частности, благодаря точечным мутациям в гемагглютинине, способным изменить спектр РС вируса и, соответственно, его тропизм к тканям. Первые данные о находках таких мутантов за рубежом и в России приведены в работах [13–21]. Оценка РС гемагглютинина циркулирующих вирусов гриппа может улучшить прогноз появления штамма с повышенной вирулентностью и способствовать разработке мероприятий по предупреждению пандемии.

В рамках осуществления эпидемиологического надзора за циркуляцией вирусов гриппа в Российской Федерации с начала пандемии свиного гриппа с 2009 г. в Институте вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России проводится скрининг РС штаммов вируса гриппа A(H1N1)pdm09, изолированных на территории РФ, с целью анализа её динамики и выявления возможной связи этого процесса с изменением показателей заболеваемости населения РФ пандемическим гриппом, а также с наличием аминокислотных замен в первой субъединице гемагглютинина вируса. В работе представлены результаты изучения РС HA1 вируса гриппа A(H1N1)pdm09 в 2009–2016 гг.

Материал и методы

Сбор клинических материалов для исследований. В Центр экологии и эпидемиологии гриппа Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России из региональных вирусологических лабораторий в 10 городах РФ, а также из лечебных учреждений (больниц, поликлиник) поступали носоглоточные смывы и секционный материал (ткани бронхов, трахеи, лёгких, селезёнки, плаценты) для выявления или подтверждения инфекции, вызванной пандемическим вирусом гриппа A(H1N1)pdm09.

Изоляцию вирусов гриппа проводили из клинического материала (носоглоточные смывы и секционный материал) на клетках культуры ткани MDCK и развивающихся куриных эмбрионах по общепринятым методикам. Для индикации вируса в реакции гемагглютинации использовали 0,75% взвесь эритроцитов человека 0 (I) группы крови.

Типирование изолятов осуществляли в реакции торможения гемагглютинирующей активности по об-

щепринятой методике с диагностической сывороткой против эталонного вируса гриппа A/California/7/2009 A(H1N1)pdm09.

РНК вируса гриппа A(H1N1)pdm09 выявляли с помощью тест-систем Ампли-Сенс «Influenza viruses A/B», Ампли-Сенс «Influenza viruses A/H1-swine-FL», Ампли-Сенс «Influenza viruses A-тип-FL» (Интерлабсервис, Москва) согласно рекомендациям производителя.

Секвенирование генома. РНК выделяли стандартным методом с применением набора «Viral RNA Kit» согласно инструкции производителя. Амплификацию проводили на приборе «Bio-Rad C1000 Touch» с использованием специфических праймеров. Первичную нуклеотидную последовательность фрагментов ОТ-ПЦР определяли методом Сэнгера на автоматическом секвенаторе «ABI Prism 3130» (Applied Biosystems, США) согласно рекомендациям производителя. Нуклеотидные и соответствующие им аминокислотные последовательности анализировали, используя пакет прикладных программ «Lasergene» (DNASTAR Inc., США).

Для типирования РС вируса гриппа A(H1N1)pdm09 (точнее – HA1 вируса) использован метод твердофазного сиалозидферментного анализа, основанный на определении взаимодействия рецептор-связывающего сайта (PCC) HA1 вируса с аналогами клеточных рецепторов – 9 синтетическими сиалогликополимерами (СПП), углеводная часть которых, связанная с биотинилированным акриламидным полимером (молекулярная масса 30 кДа), содержит как неразветвлённые, так и разветвлённые сиалогликаны (Lectinity Holding Inc., Москва, Россия) (табл. 1) [18]. Анализировали вируссодержащую культуральную или аллантоисную жидкость с титром вируса гриппа A(H1N1)pdm09 16 АЕ/мл.

Для оценки РС использован параметр $W_{3/6}$, который характеризует превышение α 2-3 рецепторной специфичности (α 2-3-РС) над α 2-6-РС и рассчитывается по формуле:

$$W_{3/6} = [d(3'SL) + d(3'SLN)]/[d(6'SL) + d(6'SLN)],$$

где d – сигнал оптической плотности в СФА, соответствующий данному СПП, за вычетом фонового значения [18].

При определении $W_{3/6}$ использованы 4 наиболее информативные неразветвлённые СПП. Реактивность к ним отражает базовые особенности специфичности вируса по отношению к сиалогликану: при $W_{3/6} < 1$ преобладает α 2-6 РС, при $W_{3/6} > 1$ доминирует α 2-3 РС [18].

Наряду с оценкой РС вируса гриппа A(H1N1)pdm09 по параметру $W_{3/6}$ сродство вируса к каждому из 9 СПП выражали в процентах (P) от суммарного сигнала оптической плотности, соответствующего всем 9 СПП:

$$P = (d_i/\sum d_i) \cdot 100,$$

где P – вклад каждого СПП в рецепторную специфичность вируса, d_i – сигнал оптической плотности для соответствующего СПП, $\sum d_i$ – суммарный сигнал оптической плотности, соответствующий 9 СПП.

Результаты

Анализ вирусов гриппа A(H1N1), изолированных в первую волну пандемии в сезон 2009–2010 гг. от

Таблица 1

Аналоги клеточных рецепторов – синтетические сиалогликополимеры, полимер – биотинилированный полиакриламид

Обозначение	Углеводная часть
3'SL	Neu5Acα2-3Galβ1-4Glcβ
3'SLN	Neu5Acα2-3Galβ1-4GlcNAcβ
Su-3'SLN	Neu5Acα2-3Galβ1-4-(6-Su)GlcNAcβ
SLe ^a	Neu5Acα2-3Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAcβ
SLe ^c	Neu5Acα2-3Galβ1-3GlcNAcβ
SLe ^x	Neu5Acα2-3Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ
6'SL	Neu5Acα2-6Galβ1-4Glcβ
6'SLN	Neu5Acα2-6Galβ1-4GlcNAcβ
Su-6'SLN	Neu5Acα2-6Galβ1-4-(6-Su)GlcNAcβ

пациентов с благополучным исходом заболевания (консенсусные штаммы), показал, что они не содержали аминокислотных замен в РСС HA1 и обладали РС, характерной для эпидемических вирусов гриппа A(H1N1) человека (табл. 2).

До октября 2009 г., в основном, приходилось исследовать случаи с благоприятным исходом заболевания, за исключением 1 из 80 проб от пациента с тяжёлой пневмонией, в секционном материале которого была выявлена примерно эквимольная смесь консенсусного (немутантного), содержащего в 222-й позиции аспарагиновую кислоту (D222), и мутантного – с глицином в 222-й позиции (G222) штамма вируса гриппа A(H1N1)pdm09 в пределах РСС гемагглютинаина. Этот вирус – A/IV-Элиста/64/2009 (H1N1)sw1, как и прототипный умеренно вирулентный эталонный штамм ВОЗ A/California/07/2009 ($W_{3/6} = 1,139$; табл. 3), обладал смешанной РС ($W_{3/6} = 1,190$) [17].

Повышенное сродство эталонного вируса гриппа A/California/07/2009 к α2-3-сиалозидам ($W_{3/6} = 1,139$; см. табл. 3) указало на возможность эволюции пан-

демического вируса в направлении селекции более вирулентных пневмотропных вариантов. Так, О.В. Масалова и соавт. [22] обнаружили в эталонном штамме ВОЗ A/California/07/2009 4 аминокислотные замены: Q240R (по номенклатуре зрелого HA1 – Q223R), V338I, T220S и S100P. Повышенное сродство вируса A/California/07/2009 к α2-3-сиалозидам ($W_{3/6} = 1,139$; см. табл. 3), вероятно, связано именно с наличием мутации Q223R, так как наши исследования показали, что возрастание вирулентности вируса гриппа A(H1N1)pdm09 коррелирует с наличием аминокислотных замен в 222-й и 223-й позициях РСС HA1 [16, 23]. Вирусы с такой мутацией чаще выделяют от больных с тяжелой формой гриппа, а также из секционного материала нижних дыхательных путей пациентов с летальным исходом заболевания (как правило, погибших от летальной первичной вирусной пневмонии) [18–21].

С ноября 2009 г. стали регулярно поступать секционные материалы от пациентов с летальной пневмонией. В 70% летальных случаев в лёгочной ткани умерших в ноябре-декабре 2009 г. пациентов были выявлены мутанты пандемического гриппа A(H1N1)pdm09 с заменами в РСС гемагглютинаина: D222G (15%), D222N (15%), D222E (2%) и смеси мутантов (38%), причём мутанты с заменами аспарагиновой кислоты (D) на глицин (G) и аспарагин (N) обладали повышенным сродством к α2-3-сиалозидам (см. табл. 2) [17].

С 2009 по 2011 г. была изучена РС более 100 штаммов, выделенных от больных и секционного материала за 2 эпидемических сезона. Замены были выявлены у 88,5% пациентов, скончавшихся от летальной первичной вирусной пневмонии, и у 15,5% пациентов с благоприятным исходом заболевания. Замены D222G составили 16,3%, D222N – 3,9%, D222E – 1,6% и D222V – 1%; 11,6% от проверенных штаммов соста-

Таблица 2

Усреднённые результаты анализа сродства штаммов вируса гриппа A(H1N1)pdm09 к каждому из 9 сиалогликополимеров (СГП) в 2009–2016 гг.

Аминокислотные замены	Вклад СГП в рецепторную специфичность вируса, %									$W_{3/6}$
	3'SL	3'SLN	Su-3'SLN	SLe ^a	SLe ^c	SLe ^x	6'SL	6'SLN	Su-6'SLN	
Замен нет* 222D, 223Q (2009–2010 гг.)	9,03	8,88	11,23	10,72	9,03	6,99	14,39	14,72	14,99	0,639
Замен нет** 222D, 223Q (2009–2016 гг.)	10,98	9,50	13,34	11,09	9,30	8,55	7,25	12,75	16,66	1,149
222G, 223Q	12,46	12,18	14,08	10,98	10,55	7,94	8,41	9,71	13,68	1,417
222N, 223Q	11,18	14,09	15,75	8,64	9,51	7,26	4,81	11,51	15,84	1,807
222G + N; 223Q	12,24	11,49	13,45	11,06	11,65	9,19	7,12	10,73	13,32	1,387
222D, 223R	13,09	13,05	12,71	11,28	9,91	6,02	8,40	12,06	13,59	1,324
222D/G, 223R	12,65	13,51	13,44	11,64	9,80	7,08	7,13	12,50	12,22	1,404
222E, 223Q	9,28	8,37	10,81	11,22	9,3	7,49	15,34	14,23	13,98	0,61
222V, 223Q	10,84	11,93	16,33	13,27	10,39	10,56	6,71	10,11	9,89	1,360

Примечание. * Результаты анализа РС консенсусных штаммов (2009–2010 гг., носоглоточные смывы); ** результаты анализа РС вирусов, не содержащих замен в 222-й и 223-й позициях субъединицы HA1 (2009–2016 гг.).

Таблица 3
Сродство вируса гриппа A/California/07/2009 ($W_{3/6} = 1,139$)
к каждому из 9 сиалогликополимеров (СГП)

СГП	Вклад СГП в рецепторную специфичность вируса, %
3'SL	11,99
3'SLN	12,15
Su-3'SLN	14,35
SLe ^a	9,45
SLe ^c	10,01
SLe ^x	5,97
6'SL	13,38
6'SLN	7,83
Su-6'SLN	14,87

вили вирусы с заменой в 223 позиции HA1 глутамин на аргинин (Q223R) [18].

Со временем существенно возросло число штаммов с аминокислотными заменами в РСС гемагглютинина вируса. Всего с 2009 по 2016 г. была изучена РС более 250 штаммов вируса гриппа A(H1N1)pdm09 (см. табл.2). В подтверждение литературных данных, чаще всего встречается замена в 222-й позиции HA1 вируса аспарагиновой кислоты на глицин (D222G) [13–25]. Такой замене соответствует $W_{3/6} = 1,417$ (см. табл. 2), что говорит о преобладании $\alpha 2$ -3-РС за счёт повышения сродства мутантного вируса к синтетическим аналогам с $\alpha 2$ -3'-связью и снижения сродства к $\alpha 2$ -6'-СГП. Аналогичные результаты получены Yan Liu и соавт. [25]: они наблюдали заметную разницу в РС 222D

и 222G вирусов по отношению к $\alpha 2$ -3-сиалозидным последовательностям. Вирусы с 222D относительно слабо взаимодействовали с $\alpha 2$ -3-сиалозидами и присоединялись в основном к модифицированным фукозой $\alpha 2$ -3-сиалозидам (SLe^a и SLe^x) или содержащим сульфатированный остаток N-ацетилглюкозамина (Su-GlcNAc). Напротив, 222G мутанты, как и в наших исследованиях, более сильно связывались не только с $\alpha 2$ -3-модифицированными последовательностями, но и с несulfатированными и не содержащими фукозу $\alpha 2$ -3-сиалозидами (см. табл. 2). Все исследованные этими авторами пандемические вирусы сильнее связывались с последовательностью 6Su-SLe^x, чем с не содержащей остатка Su. Это свойство характерно для высокопатогенных вирусов гриппа птиц [26].

Замена аспарагиновой кислоты на аспарагин (D222N) приводит к повышению сродства к 3'SL- и 3'SLN-СГП и значительному его снижению к 6'SL- и 6'SLN-СГП ($W_{3/6} = 1,807$, см. табл. 2). В этом случае сродство к сульфатированным СГП превышает таковое для консенсусных штаммов.

Наличие аргинина вместо глутамин в положении 223 (R223Q) РСС сайта HA1 повышает усреднённый параметр $W_{3/6}$ (1,324), что связано с увеличением сродства штаммов к $\alpha 2$ -3-СГП и снижением их сродства к 6'SL- и 6'SLN-сиалозидам при сравнении с консенсусными штаммами вируса гриппа A(H1N1)pdm09 (см. табл. 2). (В отдельных случаях, по результатам анализа РС содержащих такую аминокислотную замену штаммов, получали параметр $W_{3/6}$, значительно превышающий 1,5 единицы.) Похожую картину наблюдают при наличии 222D/G и 223R в РСС субъединицы HA1.

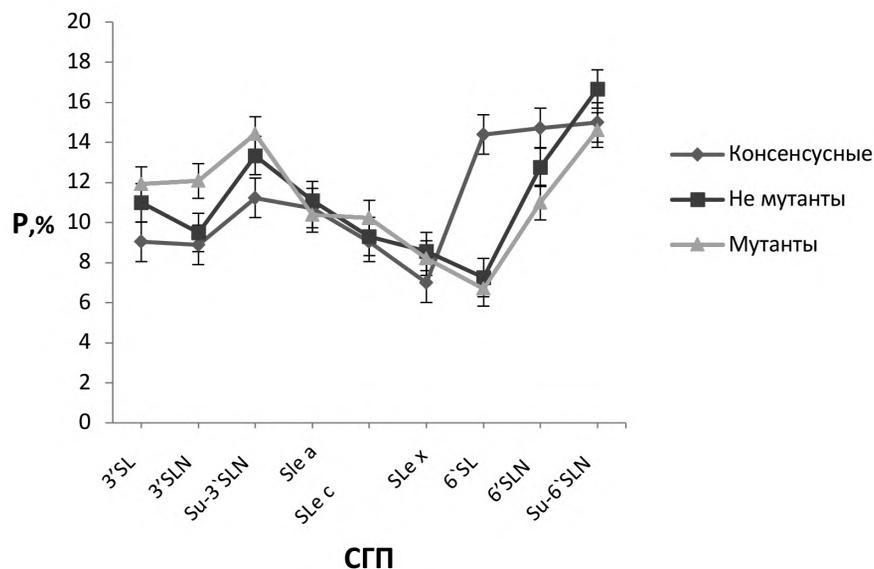


Рис. 1. Динамика рецепторной специфичности консенсусных, немутантных и мутантных штаммов вируса гриппа A(H1N1)pdm09 в 2009–2016 гг.

Консенсусные штаммы – усреднённые результаты анализа РС вирусов от пациентов с благоприятным исходом заболевания в 2009–2010 гг.; не мутанты – усреднённые результаты за 2009–2016 гг., мутанты – усреднённые результаты 2009–2016 гг.

При замене аспарагиновой кислоты на глутаминовую (D222E) в HA1 штаммов вируса гриппа A(H1N1)pdm09 профиль РС аналогичен консенсусным вирусам ($W_{3/6} = 0,610$), что характерно для штаммов гриппа человека [27–29]. Такая замена выявлена нами в материале от больных с благоприятным исходом заболевания. Аналогичное наблюдение о связи замены D222E с нелетальными случаями гриппа A(H1N1)pdm09 приведено в работах [23, 25]. Так, Yan Liu и соавт. выявили замену D222E в изоляте A/Dakar/37/2009, полученном от пациента с лёгким течением болезни [25].

Замене D222V соответствует повышение сродства мутантных штаммов вируса гриппа A(H1N1)pdm09 ко всем $\alpha 2$ -3-СГП, особенно к сульфатированным и разветвлённым, и снижение такового к $\alpha 2$ -6-СГП ($W_{3/6} = 1,360$; см. табл. 2).

В единичных случаях в эпидемических сезонах 2013–2014 и 2015–2016 гг. в РСС HA1 изолятов из секционного материала пациентов, скончавшихся от летальной первичной вирусной пневмонии, методом конвекционного секвенирования была выявлена также замена D222Y, однако по ряду причин РС этих вирусов не изучена.

На рис. 1 представлены усреднённые результаты анализа динамики РС немутантных и мутантных штаммов вируса гриппа A(H1N1)pdm09 на протяжении 2009–2016 гг. по отношению к 9 модельным СГП в сравнении с консенсусными вирусами (за 2009–2010 гг.). Вклад каждого СГП в рецепторную специфичность вируса гриппа A(H1N1)pdm09 выражен в процентах (P) от суммарного сигнала оптической плотности, соответствующего всем 9 СГП.

Обсуждение

В начале циркуляции у штаммов вируса выявлено повышенное по сравнению с $\alpha 2$ -3- сродство ко всем 3 аналогам $\alpha 2$ -6-СГП. С 2009 по 2016 г. резко уменьшилось сродство вируса к 6'SL-СГП. В целом, усреднённый

профиль РС вирусов с аминокислотными заменами в 222-й и 223-й позициях HA1 (2009–2016 гг.) сходен с таковым для немутантных вирусов (2009–2016 гг.). При этом практически не изменилось сродство вируса гриппа A(H1N1)pdm09 к разветвлённым аналогам сиалил-гликановых рецепторов: SLe^a-, SLe^c- и SLe^x-СГП (рис. 1).

Усреднённый профиль динамики сродства вируса гриппа A(H1N1)pdm09 с 2009 по 2016 г. по отношению к 6 $\alpha 2$ -3- и 3 $\alpha 2$ -6-СГП представлен на рис. 2 и 3. Наблюдается тенденция к повышению сродства вируса A(H1N1)pdm09 к $\alpha 2$ -3- и снижению к $\alpha 2$ -6-СГП, причем, как следует из данных рис. 1, наибольшее сродство вирус проявляет к сульфатированным СГП.

Анализ динамики параметра $W_{3/6}$ для штаммов вируса гриппа A(H1N1)pdm09 в 2009–2016 гг. (рис. 4) также подтверждает тенденцию к повышению их сродства к $\alpha 2$ -3-СГП.

В 2009–2016 гг. изменение параметра $W_{3/6}$, характеризующего степень превышения $\alpha 2$ -3-РС вируса гриппа A(H1N1)pdm09 над $\alpha 2$ -6-РС, совпадает с изменением показателей заболеваемости населения РФ пандемическим гриппом в отдельные эпидемические сезоны.

Наиболее интенсивной по заболеваемости была первая волна пандемии 2009–2010 гг. [26, 30]. По мере развития пандемии стали появляться штаммы вируса гриппа A(H1N1)pdm09 с повышенной вирулентностью, что было связано, в частности, с мутациями в 222-й и 223-й позициях HA1 в пределах РСС и увеличением сродства вирусов к $\alpha 2$ -3-сиалозидным рецепторам. Так, в 2009 г. усреднённый параметр $W_{3/6}$ для штаммов, изолированных из носоглоточных смывов от пациентов с благоприятным исходом заболевания, составил 0,639, тогда как для мутантных штаммов – 1,324.

Вторая волна (2010–2011 гг.), вызванная вирусом гриппа подтипа A(H1N1)pdm09, была менее интенсивной: значительно уменьшилась летальность населения РФ в целом. В 2010 и 2011 гг. $W_{3/6}$ имел близ-

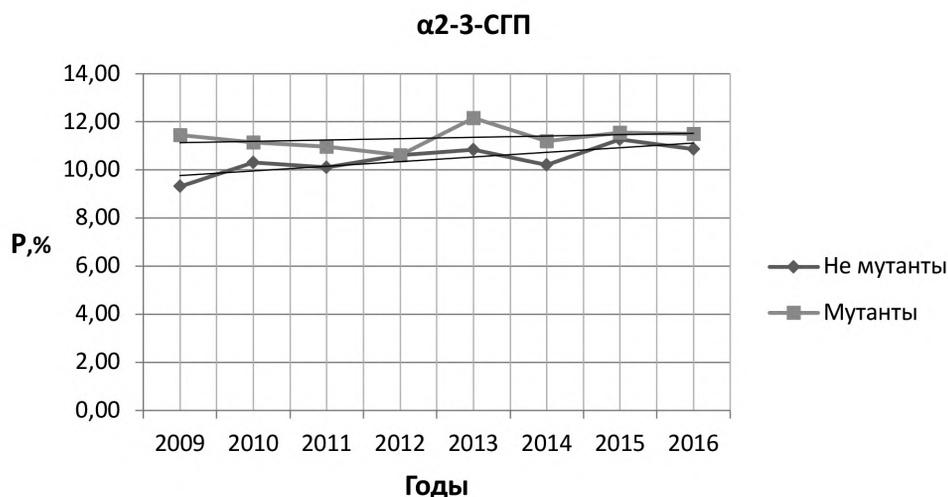


Рис. 2. Динамика сродства вируса гриппа A(H1N1)pdm09 к шести $\alpha 2$ -3-СГП.

кие значения и составил для немутантных штаммов 0,948, для мутантов – 1,247.

Третья эпидемическая волна (2012–2013 гг.) была вызвана вирусами гриппа подтипа A(H1N1)pdm09 и A(H3N2) с преобладанием пандемического вируса. По сравнению с показателями прошлого эпидемического сезона (2010–2011) заболеваемость в 2012–2013 гг. была выше во всех возрастных группах [3, 26]. Из 42 образцов, взятых от умерших от гриппа A(H1N1)pdm09 больных, были обнаружены мутации в составе РСС HA1 – D222(N,G,Y), причем у 6 из них – D222(N,G) и Q223R. Усреднённый параметр для мутантных штаммов $W_{3/6} = 1,858$. При этом у пациентов с благоприятным исходом (142 назальных смыва и 21 штамм) такие мутации отсутствовали, но величина $W_{3/6}$ повысилась до 1,382. Это свидетельствует о значительном смещении РС этих штаммов в сторону птичьих вирусов, т.е. происходит постепенная адаптация вируса к эпителию нижних отделов респираторного тракта человека.

На пике третьей эпидемической волны в 2013 г. заболеваемость гриппом снизилась [31], что, возможно,

было обусловлено пониженной трансмиссивностью вируса A(H1N1)pdm09, обладающего повышенным сродством к $\alpha 2$ -3-рецепторам, тогда как эпителий верхних отделов респираторного тракта содержит в основном $\alpha 2$ -6-сиалозида. В 2013 г. усреднённый параметр $W_{3/6}$ для мутантных штаммов составил 1,791, для немутантных – 1,423.

К 13-й неделе 2014 г. заболеваемость гриппом в Российской Федерации снизилась до пороговых уровней [31]. Уменьшился параметр $W_{3/6}$ для мутантных (1,380) и немутантных (1,414) штаммов. При исследовании РС 11 штаммов вируса гриппа A(H1N1)pdm09, у двух из них выявлены замены D222G и Q223R в РС субъединицы HA1. Усреднённые величины $W_{3/6}$ в конце 2015 г. составляли для немутантных штаммов 1,263, для мутантных – 1,417.

В начале 2016 г. зарегистрирован резкий подъём заболеваемости гриппом A(H1N1)pdm09, его частота составила 94% [4], с большим количеством тяжёлых форм и летального исхода. В отличие от предыдущих эпидемических сезонов доминирующая роль в этиологии эпидемии принадлежала вирусу гриппа

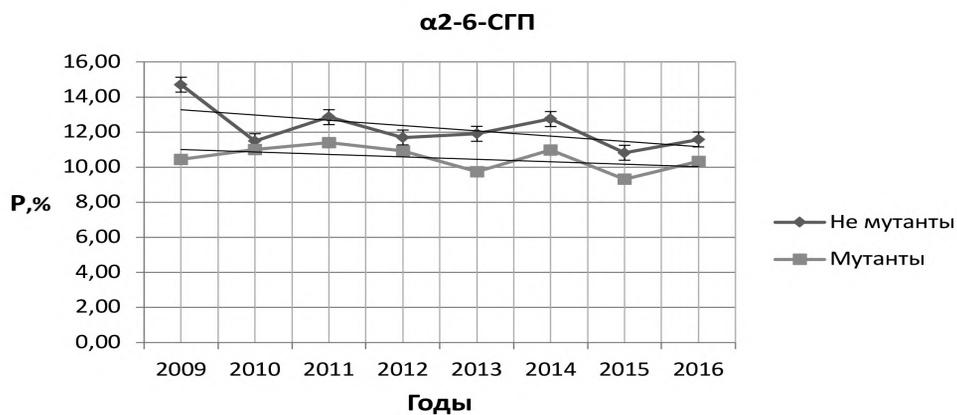


Рис. 3. Динамика сродства вируса гриппа A(H1N1)pdm09 к трём $\alpha 2$ -6-СГП.

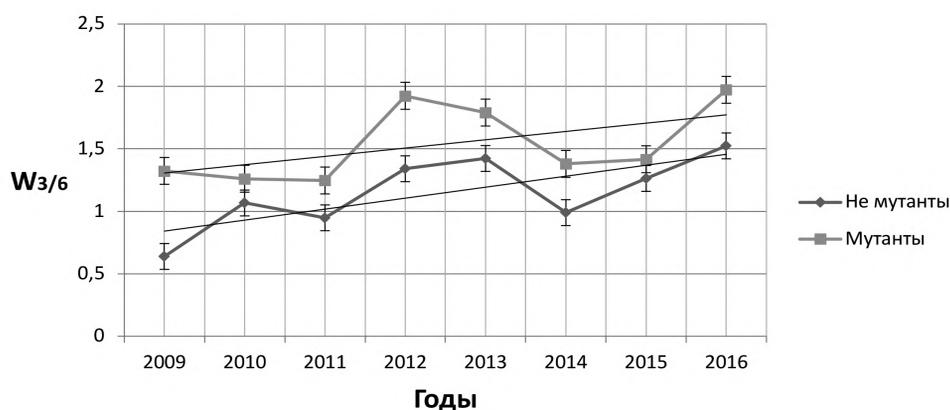


Рис. 4. Динамика параметра $W_{3/6}$ для штаммов вируса гриппа A(H1N1)pdm09 в 2009–2016 гг.

A(H1N1)pdm09. Результаты генетического анализа гемагглютинаина показали, что в 2015 г. в популяции вируса гриппа A(H1N1)pdm09 появилось 2 новых субклайда в кладе 6B (6B1 и 6B2) [32]. В декабре 2015 г. – январе 2016 г. доминирующим стал субклайд 6B1. Для него были замечены характерные замены в антигене Sa сайте HA, расположенном на глобуле белка рядом с PСС (S84N, S162N, K163Q, I121N). С заменой S162N связывают возникновение нового потенциального сайта гликозилирования, который позволяет вирусу «ускользнуть» от специфических антител после вакцинации или ранее перенесенной инфекции [33]. Нельзя исключить влияние появившихся замен на РС гемагглютинаина вируса гриппа A(H1N1)pdm09 и тяжесть клинического течения в сезон 2015–2016 гг.

Результаты изучения штаммов, выделенных в 2016 г. от пациентов с благоприятными исходами (назальные смывы), не выявили аминокислотных замен в PСС, однако они обладали сродством к α 2-3-сиалозидам ($W_{3/6} = 1,246$), превышающим таковое у эталонного вируса гриппа A/California/07/2009 ($W_{3/6} = 1,139$; см. табл. 3). Вероятно, произошла эволюция пандемического вируса в направлении селекции более вирулентных пневмотропных вариантов. На это указывают усреднённая конечная величина $W_{3/6}$ для штаммов, не содержащих аминокислотных замен в позициях 222 и 223 HA1, – 1,524 (рис.4), а также результаты анализа РС 3 образцов секционного материала (bronхи и лёгкие). По результатам секвенирования выделенные штаммы не содержали аминокислотных замен в PСС, но обладали повышенным сродством к α 2-3-сиалозидам ($W_{3/6} = 1,759$). Повышенное сродство к α 2-3-сиалозидам ($W_{3/6} = 1,973$) определено также у 3 штаммов, выделенных из секционных материалов, поступивших из Оренбурга (bronхи, лёгкое) и Москвы. Анализ аминокислотных замен в последовательности HA1 в штаммах, изолированных из этих клинических образцов, выявил наличие мутаций в PСС (D222Y и D222N).

Заключение

Мониторинг РС пандемического вируса гриппа позволяет выявлять штаммы с измененной рецепторсвязывающей аффинностью к эпителию респираторного тракта человека и повышенной способностью к передаче от человека к человеку. Анализ представленных результатов показал, что изменение в 2009–2016 гг. параметра $W_{3/6}$ характеризующего степень превышения α 2-3-РС вируса гриппа A(H1N1)pdm09 над α 2-6-РС, совпадает с изменением показателей заболеваемости населения РФ пандемическим гриппом в отдельные эпидемические сезоны. Наблюдается тенденция к повышению сродства вируса A(H1N1)pdm09 к α 2-3-аналогам сиалил-гликановых рецепторов эпителия респираторного тракта человека – α 2-3-СПП, и снижению к α 2-6-аналогам, причём наибольшее сродство вирус проявляет к сульфатированным сиалогликанам. Таким образом, наш подход к выявлению связи мутаций в 222-й и 223-й позициях PСС HA1 с изменениями РС пандемического вируса гриппа, влияющими на его трансмиссивность и вирулентность, а следовательно и на пандемический потенци-

ал, важен при изучении эволюции циркулирующего в настоящее время A(H1N1)pdm09 вируса гриппа и прогнозе событий в обозримом будущем.

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

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1, 5-15, 19-21, 23-25, 27-29, 33 см. REFERENCES)

2. Львов Д.К., Колобухина Л.В., Бурцева Е.И., Щелканов М.Ю. Пандемический грипп A(H1N1) pdm09. В кн.: Львов Д.К., ред. *Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных*. М.: МИА; 2013: 542-54.
3. Львов Д.К., Бурцева Е.И., Щелканов М.Ю., Колобухина Л.В., Феодоритова Е.Л., Трушакова С.В. и др. Особенности эпидемии гриппа на отдельных территориях России в эпидемическом сезоне 2012-2013гг. Доминирование штаммов вируса гриппа A(H1N1) pdm09 в странах Европы. *Вопросы вирусологии*. 2014; 59(2): 5-10.
4. Львов Д.К., Бурцева Е.И., Колобухина Л.В., Федякина И.Т., Кириллова Е.С., Трушакова С.В. и др. Вирусологические, эпидемиологические, клинические, молекулярно-генетические особенности эпидемии гриппа 2015-2016 гг.: доминирование вируса гриппа A (H1N1)pdm09 в России и странах Северного полушария. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61(4): 159-66.
16. Львов Д.К., Яшкулов К.Б., Прилипов А.Г., Бурцева Е.И., Шляпникова О.В., Поглазов А.Б. и др. Обнаружение аминокислотных замен аспарагиновой кислоты на глицин и аспарагин в рецепторсвязывающем сайте гемагглютинаина в вариантах пандемического вируса гриппа A/H1N1 от больных с летальным исходом и со среднетяжелой формой заболевания. *Вопросы вирусологии*. 2010; 55(3): 15-9.
17. Львов Д.К., Бурцева Е.И., Прилипов А.Г., Богданова В.С., Щелканов М.Ю., Бовин Н.В. и др. Возможная связь летальной пневмонии с мутациями пандемического вируса гриппа A/H1N1/sw1 в рецепторсвязывающем сайте субъединицы HA1 гемагглютинаина. *Вопросы вирусологии*. 2010; 55(4): 4-9.
18. Львов Д.К., Щелканов М.Ю., Бовин Н.В., Малышев Н.А., Чучалин А.Г., Колобухина Л.В. и др. Корреляция между рецепторной специфичностью штаммов пандемического вируса гриппа A(H1N1) pdm09, изолированных в 2009-2011 гг., структурой рецепторсвязывающего сайта и вероятностью развития летальной первичной вирусной пневмонии. *Вопросы вирусологии*. 2012; 57(1): 14-20.
22. Масалова О.В., Чичев Е.В., Федякина И.Т., Мукашева Е.А., Климова Р.Р., Щелканов М.Ю. и др. Выявление консервативных и вариабельных эпитопов гемагглютинаина штаммов пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09 с помощью моноклональных антител. *Вопросы вирусологии*. 2014; 59(3): 34-40.
26. Краснослободцев К.Г., Львов Д.К., Альховский С.В., Бурцева Е.И., Федякина И.Т., Колобухина Л.В. и др. Полиморфизм аминокислот в позиции 222 рецепторсвязывающего сайта гемагглютинаина вируса гриппа A(H1N1) pdm09 у пациентов с летальной вирусной пневмонией в 2012-2014 гг. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61(4): 66-71.

30. Львов Д.К., Бурцева Е.И., Щелканов М.Ю., Бовин Н.В., Мальшев Н.А., Чучалин А.Г. и др. Уроки пандемии гриппа A(H1N1)pdm09 в России (2009-2011). В кн.: *Материалы научно-практической конференции «Грипп: Эпидемиология, профилактика и лечение»*. СПб.: 2011: 4-12.
31. Львов Д.К., Бурцева Е.И., Щелканов М.Ю., Колобухина Л.В., Феодоритова Е.Л., Трушаклова С.В. и др. Развитие эпидемии гриппа на отдельных территориях России и в странах Северного полушария в сезоне 2013-2014гг. *Вопросы вирусологии*. 2015; 60(5): 11-6.
32. Карпова Л.С., Сомнина А.А., Бурцева Е.И., Пелих М.Ю., Феодоритова Е.Л., Поповцева Н.М. и др. Сравнение эпидемий гриппа в России, вызванных пандемическим вирусом гриппа A(H1N1)pdm09 в период с 2009 по 2013 г. *Вопросы вирусологии*. 2015; 60(3): 19-24.

REFERENCES

1. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Outbreak of swine-origin influenza A(H1N1) virus infection – Mexico, March-April 2009. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly Rep.* 2009; 58(17): 467-70.
2. L'vov D.K., Kolobukhina L.V., Burtseva E.I., Shchelkanov M.Yu. Pandemic influenza A(H1N1) pdm09. In: L'vov D.K., ed. *Guide to Virology. Viruses and Viral Infections of Humans and Animals [Rukovodstvo po virusologii. Virusy i virusnye infektsii cheloveka i zhivotnykh]*. Moscow: MIA; 2013: 542-54. (in Russian)
3. L'vov D.K., Burtseva E.I., Shchelkanov M.Yu., Kolobukhina L.V., Feodoritova E.L., Trushakova S.V., et al. The peculiarities of the Influenza epidemics in some areas of Russia during 2012-2013 season. The Influenza A (H1N1) pdm09 virus domination in European countries. *Voprosy virusologii*. 2014; 59(2): 5-10. (in Russian)
4. L'vov D.K., Burtseva E.I., Kolobukhina L.V., Fedyakina I.T., Kirillova E.S., Trushakova S.V., et al. Virological, epidemiological, clinic, and molecular genetic features of the influenza epidemic in 2015-2016: prevailing of the influenza A(H1N1)09 pdm virus in Russia and countries of the Northern hemisphere. *Voprosy virusologii*. 2016; 61(4): 159-66. (in Russian)
5. Gamblin S.J., Haire L.F., Russell R.J., Stevens D.J., Xiao B., Ha Y., et al. (2004) The structure and receptor binding properties of the 1918 influenza hemagglutinin. *Science*. 2004; 303(5665): 1838-42. Doi: <https://doi.org/10.1126/science.1093155>
6. Matrosovich M., Stech J., Klenk H.D. Influenza receptors, polymerase and host range. *Rev. Sci. Tech.* 2009; 28(1): 203-17.
7. Matrosovich M., Tuzikov A., Bovin N., Gambaryan A., Klimov A., Castrucci M.R., et al. Early Alterations of the Receptor-Binding Properties of H1, H2, and H3 Avian Influenza Virus Hemagglutinins after Their Introduction into Mammals. *J. Virol.* 2000; 74(18): 8502-12. Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.74.18.8502-8512.2000>
8. Sriwilaijaroen N., Suzuki Y. Molecular basis of the structure and function of H1 hemagglutinin of influenza virus. *Proc. Jpn Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* 2012; 88(6): 226-49. Doi: <https://doi.org/10.2183/pjab.88.226>
9. Rogers G.N., Paulson J.C. Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: difference in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin. *Virology*. 1983; 127(2): 361-73.
10. Rogers G.N., Pritchett T.J., Lane J.L., Paulson J.C. Differential sensitivity of human, avian, and equine influenza A viruses to a glycoprotein inhibitor of infection: selection of receptor specific variants. *Virology*. 1983; 131(2): 394-408.
11. Suzuki Y., Nagao Y., Kato H., Matsumoto M., Nerome K., Nakajima K., et al. Human influenza A virus hemagglutinin distinguishes sialyloligosaccharides in membrane-associated gangliosides as its receptor which mediates the adsorption and fusion processes of virus infection. Specificity for oligosaccharides and sialic acids and the sequence to which sialic acid is attached. *J. Biol. Chem.* 1986; 261(36): 17057-61.
12. Ito T., Couceiro J.N., Kelm S., Baum L.G., Krauss S., Castrucci M.R., et al. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J. Virol.* 1998; 72(9): 7367-73.
13. Childs R.A., Palma A.S., Wharton S., Matrosovich T., Liu Y., Chai W., et al. Receptor-binding specificity of pandemic influenza A(H1N1) 2009 virus determined by carbohydrate microarray. *Nat. Biotechnol.* 2009; 27(9): 797-9. Doi: <https://doi.org/10.1038/nbt0909-797>
14. Kilander A., Rykkvin R., Dudman S.G., Hungnes O. Observed association between the HA1 mutation D222G in the 2009 pandemic influenza A(H1N1) virus and severe clinical outcome, Norway 2009-2010. *Euro Surveill.* 2010; 15(9): pii 19498. Doi: <https://doi.org/10.2807/ese.15.09.19498-en>
15. Balraj P., Sidek H., Suppiah J., Khoo A.S., Saat Z. Molecular analysis of 2009 pandemic influenza A(H1N1) in Malaysia associated with mild and severe infections. *Malays J. Pathol.* 2011; 33(1): 7-12.
16. L'vov D.K., Yashkulov K.B., Prilipov A.G., Burtseva E.I., Shlyapnikova O.V., Poglavov A.B., et al. Detection of amino acid substitutions of asparagine for glycine and asparagine at the receptor-binding site of hemagglutinin in the variants of pandemic influenza A/H1N1 virus from patients with fatal outcome and moderate form of the disease. *Voprosy virusologii*. 2010; 55(3): 15-9. (in Russian)
17. L'vov D.K., Burtseva E.I., Prilipov A.G., Bogdanova V.S., Shchelkanov M.Yu., Bovin N.V., et al. A possible association of fatal pneumonia with mutations of pandemic influenza A/H1N1 swl virus in the receptor-binding site of the HA1 subunit. *Voprosy virusologii*. 2010; 55(4): 4-9. (in Russian)
18. L'vov D.K., Shchelkanov M.Yu., Bovin N.V., Malyshev N.A., Chuchalin A.G., Kolobukhina L.V., et al. Correlation between the receptor specificity of pandemic influenza A (H1N1)pdm09 virus strains isolated in 2009-2011 and the structure of the receptor-binding site and the probability of fatal primary viral pneumonia. *Voprosy virusologii*. 2012; 57(1): 14-20. (in Russian)
19. L'vov D.K., Bovin N.V., Prilipov A.G., Bogdanova V.S., Kolobukhina L.V., Shchelkanov M.Yu., et al. HA1 receptor-binding site of A(H1N1) V among patients with lethal and not-lethal outcome in Russia (2009-2011). In: *Proceedings of International Congress of International Union of Microbiological Societies (Sapporo, Japan; September, 2-16, 2011)*, VI. Sapporo, Japan: IUMS, 2011: PO55-5.
20. Chutinimitkul S., Herfst S., Steel J., Lowen A.C., Ye J., van Riel D., et al. Virulence-Associated Substitution D222G in the Hemagglutinin of 2009 Pandemic Influenza A(H1N1) Virus Affects Receptor Binding. *J. Virol.* 2010; 84(22): 11802-13. Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.01136-10>
21. Puzelli S., Facchini M., Spagnolo D., De Marco M.A., Calzoletti L., Zanetti A., et al. Transmission of hemagglutinin D222G mutant strain of pandemic (H1N1) 2009 virus. *Emerg. Infect. Dis.* 2010; 16(5): 863-5. Doi: <https://doi.org/10.3201/eid1605.091815>
22. Masalova O.V., Chichev E.V., Fedyakina I.T., Mukasheva E.A., Klimova R.R., Shchelkanov M.Yu., et al. Detection of conservative and variable epitopes of the pandemic influenza virus A(H1N1)pdm09 hemagglutinin using monoclonal antibodies. *Voprosy virusologii*. 2014; 59(3): 34-40. (in Russian)
23. Valli M.B., Selleri M., Meschi S., Zaccaro P., Vincenti D., Lalle E., et al. Hemagglutinin 222 variants in pandemic (H1N1) 2009 virus. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17(4): 749-51. Doi: <https://doi.org/10.3201/eid1706.100784>
24. WHO. Preliminary review of D222G amino acid substitution in the haemagglutinin of pandemic influenza A (H1N1) 2009 viruses. WHO report. Available at: https://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/cp165_2009_2812_review_d222g_amino_acid_substitution_in_ha_h1n1_viruses.pdf
25. Liu Y., Childs R.A., Matrosovich T., Wharton S., Palma A.S., Chai W., et al. Altered Receptor Specificity and Cell Tropism of D222G Hemagglutinin Mutants Isolated from Fatal Cases of Pandemic A(H1N1) 2009 Influenza Virus. *J. Virol.* 2010; 84(22):12069-74. Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.01639-10>
26. Krasnoslobodtsev K.G., L'vov D.K., Al'khovskiy S.V., Burtseva E.I., Fedyakina I.T., Kolobukhina L.V., et al. The Polymorphism of amino acids at position 222 receptor binding site of the hemagglutinin of influenza virus A(H1N1) pdm09 in patients with fatal viral pneumonia in the 2012-2014. *Voprosy virusologii*. 2016; 61(4): 66-71. (in Russian)
27. Gambaryan A.S., Tuzikov A.B., Piskarev V.E., Yamnikova S.S., L'vov D.K., Robertson J.S., et al. Specification of receptor-binding

- phenotypes of influenza virus isolates from different hosts using synthetic sialylglycopolymers: non-egg-adapted human HI and H3 influenza A and influenza B viruses share a common high binding affinity for 6'-sialyl(N-acetyl)lactosamine). *Virology*. 1997; 232(2): 345-50. Doi: <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8572>
28. Rogers G.N., Paulson J.C., Daniels R.S., Skehel J.J., Wilson I.A., Wiley D.C. Single amino acid substitutions in influenza hemagglutinin change receptor binding specificity. *Nature*. 1983; 304(5921): 76-8.
 29. Matrosovich M., Tuzikov A., Bovin N., Gambaryan A., Klimov A., Castrucci M.R., et al. Early alterations of the receptor-binding properties of HI, H2, and H3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction into mammals. *J. Virol.* 2000; 74(18): 8502-12. Doi: <https://doi.org/10.1128/jvi.74.18.8502-8512.2000>
 30. L'vov D.K., Burtseva E.I., Shchelkanov M.Yu., Bovin N.V., Malyshev N.A., Chuchalin A.G., et al. The Lessons of the pandemic influenza A(H1N1)pdm09 in Russia (2009-2011). In: *Collection of Materials of Scientific-Practical Conference «Influenza: Epidemiology, Prevention and Treatment» [Materialy nauchno-prakticheskoy konferentsii «Gripp: Epidemiologiya, profilaktika i lechenie»]*. St. Petersburg; 2011: 4-12. (in Russian)
 31. L'vov D.K., Burtseva E.I., Shchelkanov M.Yu., Kolobukhina L.V., Feodoritova E.L., Trushakova S.V., et al. Influenza epidemic development in some regions of Russia and in countries of the North hemisphere during 2013-2014. *Voprosy virusologii*. 2015; 60(5): 11-6. (in Russian)
 32. Karpova L.S., Sominina A.A., Burtseva E.I., Pelikh M.Yu., Feodoritova E.L., Popovtseva N.M., et al. Comparison of the influenza epidemics in Russia caused by the pandemic virus A(H1N1)pdm09 within the period from 2009 to 2013. *Voprosy virusologii*. 2015; 60(3): 19-24. (in Russian)
 33. Komissarov A., Fadeev A., Petrov S., Sergeeva M., Sintsova K., Egorova A., et al. Rapid spread of influenza A (H1N1)pdm09 viruses with a new set of specific mutations in the internal genes in the beginning of 2015/2016 epidemic season in Moscow and Saint-Petersburg (Russian Federation). *Influenza Other Respir. Viruses*. 2016; 10(4): 247-53. Doi: <https://doi.org/10.1111/irv.12389>

Поступила 09.10.18

Принята в печать 31.10.18

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Тимофеева Т.А.¹, Руднева И.А.¹, Шилов А.А.¹, Баланова М.А.¹, Артемов Е.К.¹, Куц А.А.¹, Масалова О.В.¹, Климова Р.Р.¹, Гребенникова Т.В.^{1,2}, Каверин Н.В.¹

ИЗМЕНЕНИЕ ФЕНОТИПИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЭСКЕЙП-МУТАНТОВ И РЕАДАПТАНТОВ ВИРУСА ГРИППА А(H1N1)pdm09 ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ СЕЛЕКЦИОНИРОВАННЫХ МУТАЦИЙ В МОЛЕКУЛЕ ГЕМАГГЛЮТИНИНА

¹Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, 123098, г. Москва, Россия; ²Российский университет дружбы народов, 117198, г. Москва, Россия

Введение. После появления и распространения пандемического вируса H1N1 2009 г. путём селекции эскейп-мутантов было проведено исследование антигенных эпитопов, распознаваемых вируснейтрализующими антителами против гемагглютинаина (HA) вируса гриппа A/Moscow/01/09(H1N1)pdm09. **Цели и задачи.** Получение реадaptированных вариантов вируса из низковирулентного эскейп-мутанта, обладающего повышенной аффинностью к клеточным рецепторам «птичьего» и «человечьего» типа по сравнению с диким типом, и сравнительное изучение их антигенной и рецепторной специфичности. **Материал и методы.** Вирусы накапливали в 10-дневных куриных эмбрионах. Панель моноклональных антител (МКАТ) против HA вируса гриппа штамма A/IIV-Moscow/01/09(H1N1)sw1 использовали в виде асцитных жидкостей мышей. Иммунизацию мышей, реакцию торможения гемагглютинации, элюцию вируса с куриных эритроцитов, полимеразную цепную реакцию и секвенирование реадaptированных вариантов проводили стандартными способами. **Результаты.** Приобретённая в процессе реадaptации мутация A198E приводит к изменениям антигенной специфичности. Выявлена корреляция между снижением вирулентности у низковирулентного эскейп-мутанта, ассоциированным с заменой D190N в молекуле гемагглютинаина, и увеличением гемагглютинирующего титра к ингибиторам в нормальной мышинной сыворотке, взятой от неиммунных мышей. Вирусы с низкой аффинностью к аналогам клеточных рецепторов и несущие аминокислотные замены, которые приводят к снижению электростатического заряда поверхности молекулы HA, обладают повышенной способностью элюировать с куриных эритроцитов. **Обсуждение.** Продемонстрировано влияние мутаций в молекуле HA вируса гриппа A(H1N1)pdm09 на такие важные функциональные свойства вируса, как изменение антигенной специфичности; вирулентности для мышей, адсорбции-элюции на клеточных рецепторах. **Заключение.** Проведённое сравнительное изучение антигенной специфичности и рецепторсвязывающей активности эскейп-мутантов, полученных к HA вируса гриппа A/Moscow/01/2009 (H1N1)sw1, и реадaptированных вариантов, полученных к одному из эскейп-мутантов, обладающему сниженной вирулентностью для мышей. Мониторинг плейотропного эффекта мутаций в молекуле H1 необходим для прогнозирования вариантов вируса, обладающих пандемическим потенциалом.

Ключевые слова: вирус гриппа A(H1N1)pdm09; гемагглютинин H1; аминокислотные замены; антигенная специфичность; рецепторсвязывающая активность; вирулентность для мышей.

Для цитирования: Тимофеева Т.А., Руднева И.А., Шилов А.А., Баланова М.А., Артемов Е.К., Куц А.А., Масалова О.В., Климова Р.Р., Гребенникова Т.В., Каверин Н.В. Изменение фенотипических свойств эскейп-мутантов и реадaptантов вируса гриппа A(H1N1)pdm09 под воздействием селекционированных мутаций в молекуле гемагглютинаина. *Вопросы вирусологии.* 2019; 64(2):73-78.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-2-73-78>

Timofeeva T.A.¹, Rudneva I.A.¹, Shilov A.A.¹, Balanova M.A.¹, Artemov E.K.¹, Kushch A.A.¹, Masalova O.V.¹, Klimova R.R.¹, Grebennikova T.V.^{1,2}, Kaverin N.V.¹

CHANGE OF PHENOTYPIC PROPERTIES OF ESCAPE MUTANTS AND READAPTANTS OF INFLUENZA VIRUS A (H1N1) pdm09 UNDER THE INFLUENCE OF SELECTED MUTATIONS IN THE MOLECULE OF HEMAGGLUTININ

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

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

Introduction. After the emergence and spread of pandemic H1N1 viruses in 2009, antigenic epitopes recognized by neutralizing antibodies against the hemagglutinin of influenza A/Moscow/01/09(H1N1)pdm09 viruses were studied. **Targets and goals.** The purpose of the study was to obtain readapted variants of the virus from a low-virulent escape-mutant that has an increased affinity of the avian and the human types cellular receptors compared to the wild type and the comparative study of their antigenic and receptor specificity. **Material and methods.** Viruses were accumulated in 10-day-old chicken embryos. The MAB panel against HA of influenza virus strain A/IIV-Moscow/01/09(H1N1)sw1 was used in the form of ascites fluids from mice. Immunization of mice, HI testing, elution of viruses from chicken erythrocytes, PCR and sequencing of readapted variants were performed by standard methods. **Results.** The amino acid substitution A198E acquired in the process of readaptation leads to changes in the antigenic specificity. A correlation was found between a decrease in virulence of a low-virulent escape mutant associated with the substitution D190N in the hemagglutinin molecule and an increase in the hemagglutinating titer to inhibitors in normal mouse serum. Viruses

Для корреспонденции: Тимофеева Татьяна Анатольевна, канд. биол. наук, руководитель лаборатории физиологии вирусов, Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва. E-mail: timofeeva.tatyana@inbox.ru

with low affinity of cellular receptor analogs and carrying amino acid substitutions have an increased ability to elute from chicken erythrocytes. **Discussion.** The results discuss the effect of mutations in the HA molecule of the influenza A(H1N1) pdm09 virus to the change in antigen specificity; virulence for mice, adsorption-elution at cellular receptors. **Conclusion.** A comparative study of the antigenic specificity and receptor-binding activity of the escape mutants was conducted for the hemagglutinin of the influenza virus A/Moscow/01/2009 (H1N1)sw1, and the readapted variants obtained for one of the escape mutants with reduced virulence for mouse. Monitoring the pleiotropic effect of mutations in the hemagglutinin H1 molecule is necessary to predict variants of the virus with pandemic potential.

Keywords: influenza virus A (H1N1) pdm09; hemagglutinin H1; amino acid substitutions; antigen specificity; receptor-binding activity; virulence for mice.

For citation: Timofeeva T.A., Rudneva I.A., Shilov A.A., Balanova M.A., Artemov E.K., Kushch A.A., Masalova O.V., Klimova R.R., Grebennikova T.V., [Kaverin N.V.] Change of phenotypic properties of escape mutants and readaptants of influenza virus A (H1N1)pdm09 under the influence of selected mutations in the molecule of hemagglutinin. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2019; 64(2): 73-78. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-2-73-78>

For correspondence: Tatiana A. Timofeeva: P.D., head of laboratory, Ivanovsky Institute of Virology «Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named honorary academician NF Gamaleya». E-mail: timofeeva.tatyana@inbox.ru

Information about authors:

Timofeeva T.A., <http://orcid.org/0000-0002-8991-8525>

Kushch A.A., <http://orcid.org/0000-0002-3396-5533>

Masalova O.V., <https://orcid.org/0000-0001-5571-5669>

Klimova R.R., <http://orcid.org/0000-0002-4147-8444>

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

Acknowledgment. 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 01 October 2018

Accepted 31 October 2018

Вирус гриппа А, вызывающий локальные вспышки, эпизоотии, сезонные эпидемии, а также глобальные пандемии с высокой смертностью по всему миру, является одним из наиболее распространённых патогенных возбудителей заболеваний человека и животных [1]. Эпидемия гриппа, охватившая в 2009 г. почти все страны и получившая, по решению ВОЗ, статус пандемии, была вызвана новым вариантом вируса гриппа А подтипа H1N1, возникшим в результате реассортации двух вирусов свиней – классического североамериканского и европейского [2]. В 2009 г. был выделен первый штамм пандемии в Российской Федерации, названный A/PIV-Moscow/01/2009(H1N1)sw1 [3]. Пандемический вирус гриппа появился на фоне сезонной активности эпидемических штаммов и вытеснил их из циркуляции, став доминирующим. Новый вирус резко отличался по антигенным свойствам от циркулировавшего в предшествующие годы вируса гриппа А подтипа H1N1. После появления и распространения пандемического вируса H1N1 2009 г. нами было проведено исследование антигенных эпитопов [4], распознаваемых вируснейтрализующими антителами против гемагглютинаина (НА) вируса гриппа A/Moscow/01/09(H1N1) pdm09. При этом дополнительно были выявлены фенотипические эффекты аминокислотных замен в НА, обеспечивающих резистентность к моноклональным антителам, такие, как изменения аффинности к аналогам клеточных рецепторов. Сопоставление аминокислотных замен у эскейп-мутантов, полученных к НА штамма A/PIV-Moscow/01/2009(H1N1)sw1 с заменами в гемагглютинине подтипа H1 природных изолятов указывало на роль ослабления сродства к клеточным рецепторам как на фактор, ограничивающий антигенный дрейф [5].

Цель работы – получение реадaptированных вариантов вируса из низковирулентного эскейп-мутанта,

обладающего повышенной аффинностью к клеточным рецепторам как «птичьего» (Neu5Ac2-3Gal), так и «человечьего» (Neu5Ac2-3Gal) типа по сравнению с диким типом [4], и сравнительное изучение их антигенной и рецепторной специфичности.

Материал и методы

Вирусы. Высокопродуктивный штамм-реассортант ReM8, содержащий гены НА и нейраминидазы (NA) пандемического вируса 2009 г. A/PIV-Moscow/01/09(H1N1)sw1 и 6 генов вируса A/Puerto Rico/8/34(H1N1), был ранее использован нами для селекции эскейп-мутантов [4, 6, 7], так как обладал большей продуктивностью, чем вирус-родитель A/PIV-Moscow/01/09(H1N1)sw1. Селекция 14 эскейп-мутантов (7 эскейп-мутантов первого поколения и 7 второго поколения), использованных в настоящем исследовании, описана в нашей предыдущей работе [4]. Два реадaptанта RAm 10G2(6)1 и RAm 10G2(6)3 были получены в настоящем исследовании от низко вирулентного эскейп-мутанта m10G2(6) путем 7-кратного серийного пассирования в легких мышей с последующим 5-кратным клонированием методом предельных разведений в куриных эмбрионах. Вирусы накапливали в 10-дневных куриных эмбрионах заражением в аллантоисную полость с множественностью 1000 ЭИД₅₀ на эмбрион. Зараженные куриные эмбрионы инкубировали в течение 48 ч при 37 °С, после чего охлаждали в течение ночи при 4 °С. Вирусосодержащую аллантоисную жидкость собирали, титровали в реакции гемагглютинации (РГА) и хранили при -80 °С.

Моноклональные антитела (МКАТ). Панель МКАТ против НА вируса гриппа подтипа H1 штамма A/PIV-Moscow/01/09(H1N1)sw1, включающая 6 МКАТ (1E7, 3D9, 5F7, 6A3, 3A3 и 10G2), ранее описана в работе [8].

МКАТ использовали в виде асцитных жидкостей мышей.

Иммунизация мышей вирусом гриппа ReM8 (H1N1). Мышам (белым, беспородным) массой тела 9–10 г вводили интраназально по 75 мкл вирусосодержащего материала в дозе 1000 ЭИД₅₀/мышь под лёгким эфирным наркозом. На 21-й день после заражения у животных забирали кровь и приготавливали сыворотку.

Реакцию торможения гемагглютинации (РТГА) с панелью МКАТ, поликлональной и нормальной мышинной сывороткой проводили по стандартной методике, используя 0,75% суспензию куриных эритроцитов [9].

Элюция вируса с куриных эритроцитов. Способность вирусов элюировать с куриных эритроцитов была исследована, как описано ранее [10, 11]. К двукратным разведениям аллантаоисного вируса в 96-луночном планшете добавляли равный объем 0,5% суспензии куриных эритроцитов, инкубировали при 4 °С в течение 1 ч, после чего регистрировали гемагглютинирующий титр вируса (эффективность элюции оценивалась относительно этого титра). Далее планшеты инкубировали 5 ч при 37 °С, и каждый час в течение этого времени инкубации учитывали сохраняющийся гемагглютинирующий титр вируса.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) и секвенирование реадaptированных вариантов. Вирусную РНК выделяли из вирусосодержащей аллантаоисной жидкости с помощью набора «RNeasy Mini kit» (QIAGEN, Германия). Обратнo-транскриптазную реакцию и ПЦР проводили с праймерами, специфическими для генов вируса гриппа А. Продукты ПЦР очищали, используя набор «QIAquick PCR purification kit» (QIAGEN, Германия). ДНК секвенировали с помощью секвенатора DNA ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, США) и BigDye Terminator v3.1 kit. Нуклеотидные последовательности обрабатывали с помощью программы DNASTAR sequence analysis software package (DNASTAR Inc, США.).

Результаты

В данном исследовании проанализировали фенотипические свойства 14 эскейп-мутантов и 2 реадaptированных вариантов вируса гриппа А(H1N1)pdm09,

которые содержали аминокислотные замены в различных областях молекулы НА. Мутации K156E, G158E, N159D и K163N располагаются в антигенном сайте Sa; мутации D190N, D190E, Q192L и A198E – в антигенном сайте Sb; мутации S210N и G228E – в рецептор-связывающем сайте; а мутация K285M находится в непосредственной близости от стержневого региона молекулы НА.

Как ранее показало параллельное титрование инфекционности на мышах и на куриных эмбрионах, эскейп-мутант m10G2(6) (D190N) обладал сниженной вирулентностью по сравнению с вирусом дикого типа ReM8 и вызывал гибель мышей только при инокуляции высокой дозы вируса [12]. Была предпринята попытка повысить вирулентность этого эскейп-мутанта посредством серийных пассажей в легких мышей при интраназальной инокуляции, т.е. провести его реадaptацию. Для первичного заражения мышей была использована вирусосодержащая аллантаоисная жидкость куриных эмбрионов, а для дальнейшего пассирования – осветленный гомогенат лёгочной ткани инфицированных мышей. При пассажах происходит селекция варианта, способного более активно размножаться в легких мышей, так что после серии пассажей вирус вызывает у мышей летальную лёгочную инфекцию. В итоге для низковирулентного эскейп-мутанта было получено 2 реадaptированных варианта. Последующее секвенирование генов НА реадaptированных вариантов показало, что оба реадaptированных варианта RAm 10G2(6)1 и RAm 10G2(6)3 сохранили аминокислотную замену D190N и приобрели дополнительную замену N133D, а вариант RAm 10G2(6)1 приобрел еще и дополнительно замену A198E (табл. 1).

Низковирулентный эскейп-мутант, селекционированный МКАТ 10G2, в перекрёстной РТГА не реагировал только с МКАТ, с помощью которого он был получен. Оба реадaptированных варианта RAm10G2(6)1 и RAm10G2(6)3, как и эскейп-мутант m10G2(6), не взаимодействовали с МКАТ 10G2. Реадaptант RAm10G2(6)3, так же как эскейп-мутант m10G2(6), реагировал со всеми остальными МКАТ использованной панели [8] – 1E7, 3D9, 5F7, 6A3 и 3A3, снижая при этом уровень связывания с

Таблица 1

Антигенная специфичность низковирулентного эскейп-мутанта и его реадaptированных вариантов в РТГА*

Вирус	Аминокислотная замена	Титр МКАТ к А/Moscow/01/09(H1N1)sw1					
		1E7	3D9	5F7	6A3	3A3	10G2
ReM8	-	102 400**	102 400	51 200	102 400	102 400	51 200
m10G2(6)	D190N	25 600	12 800	25 600	51 200	25 600	<200
RAm 10G2(6)1	D190N, N133D, A198E	<200	<200	12800	<200	<200	<200
RAm 10G2(6)3	D190N, N133D	102 400	12 800	25 600	6400	25 600	<200

Примечание. * Приведены данные одного из трех типичных экспериментов; ** приведены обратные величины титра МКАТ в РТГА. Расшифровка аббревиатур дана в тексте.

РТГА исследуемых вирусов с сыворотками мышей

Вирус	Аминокислотная замена	Титр* поликлональной мышшиной сыворотки к ReM8 (H1N1) с вирусами	Титр* нормальной мышшиной сыворотки с вирусами
ReM8	-	160**	128
m3D9(9)	K156E	160	128
m10G2(6)	D190N	80	512
m3D9(12)	K163N Q192L	80	16
m3A3(3)	N159D	320	128
m5F7(10)	G158E	320	64
m10G2(7)	D190N S210N	160	64
m3D9(9)-5F7(14)	K156E G158E	160	64
m3D9(9)-5F7(17)	K156E N129D	160	64
m5F7(10)-10G2	G158E D190N	160	128
m3A3(3)-10G2	N159D D190N	80	256
m6A3(5)-10G2	G158E D190E	80	256
m3A3(3)-5F7(28)	N159D N129S	80	64
m3A3(3)-5F7 (29)	G158E N159D	80	128
m10G2(12)	D190E G228E K285M	160	256
RAm 10G2(6)1	D190N N133D A198E	80	64
RAm 10G2(6)3	D190N N133D	80	64

Пр и м е ч а н и е. * Приведены данные одного из трех типичных экспериментов; ** приведены обратные величины титра сывороток в РТГА.

МКАТ 6A3. Однако, реадaptант RAm10G2(6)1, несущий дополнительную замену A198E, сохранял реакцию только с одним антителом использованной панели – 5F7. Ранее нами установлено, что данное МКАТ направлено к консервативному эпитопу HA, тогда как остальные антитела опознают вариабельные эпитопы [13]. Таким образом, результаты перекрестной РТГА полученных реадaptантов с панелью МКАТ показали, что приобретённая в процессе реадaptации аминокислотная замена в позиции 198 приводит к резким изменениям антигенной специфичности вируса (см. табл. 1).

Взаимодействие вируса гриппа с клеткой хозяина может тормозиться неспецифическими ингибиторами, которые присутствуют в нормальных сыворотках животных (α -, β - и γ -ингибиторы). Аминокислотные замены в молекуле HA, сопровождающие адаптацию вируса гриппа к условиям репликации в легких мышей, могут способствовать приобретению резистентности к действию сывороточных ингибиторов [14–16]. В данном исследовании показано, что снижение вирулентности у эскейп-мутанта m10G2(6), ассоциированное с заменой D190N, коррелировало с увеличением гемагглютинирующего титра к ингибиторам в нормальной мышшиной сыворотке (табл. 2).

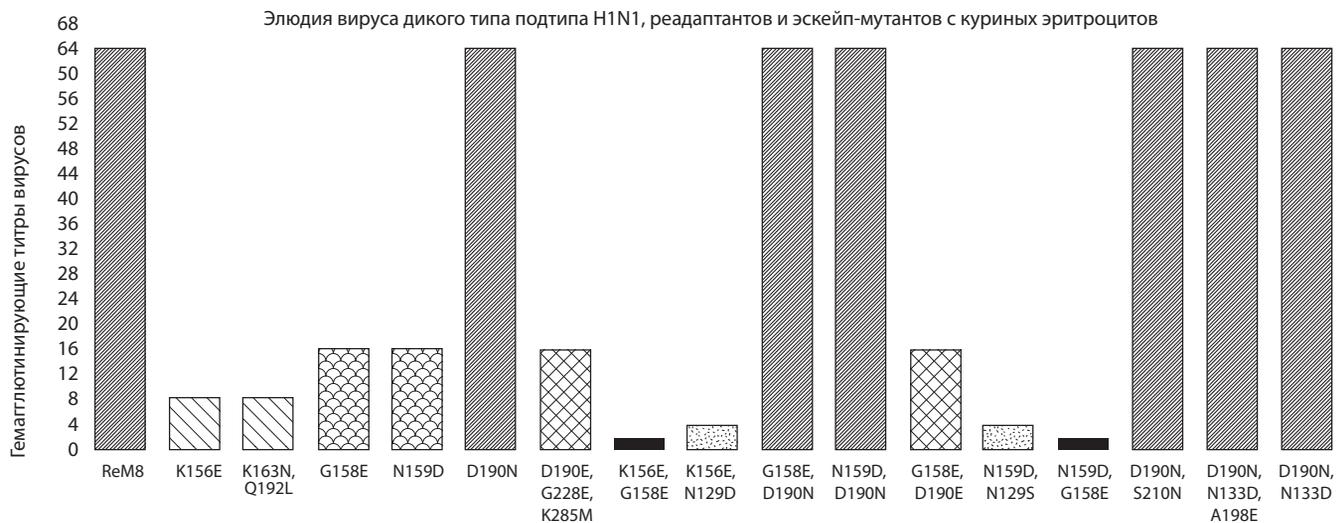
Высокая продуктивность использованного для получения эскейп-мутантов штамма-реассортанта ReM8, а также его иммуногенность, выявляемая в опытах иммунной защиты на мышах [6], дают возможность рассматривать вирус-реассортант ReM8 как штамм – кандидат для производства инактивированных и субъединичных вакцин против пандемического вируса гриппа [17]. В настоящем исследовании нами продемонстрировано (см. табл. 2), что даже по-

сле однократной иммунизации вирусом-родителем ReM8 уровень антител в поликлональной мышшиной сыворотке ко всем эскейп-мутантам и реадaptантам был аналогичен уровню антител к ReM8.

Ранее было показано, что высокая аффинность HA к сиаловым рецепторам затрудняет элюцию вируса с эритроцитов [10, 11]. На рисунке приведены гемагглютинирующие титры вирусов после 5 ч инкубации при 37 °C. Наиболее высокие значения титров соответствуют наименьшей скорости элюции. Выявлены различия в способности эскейп-мутантов элюировать с куриных эритроцитов, причем увеличение скорости элюции коррелировало с ослаблением способности эскейп-мутантов связываться с сиаловыми рецепторами [18]. Аминокислотная замена D190N у мутанта m10G2(6) не меняет скорость элюции по сравнению с вирусом дикого типа ReM8. Присутствие у реадaptантов (RAm 10G2(6)1, RAm 10G2(6)3) и эскейп-мутантов второго поколения (m5F7(10)-10G2, m3A3(3)-10G2) замены D190N восстанавливает медленную элюцию с куриных эритроцитов, свойственную соответствующему эскейп-мутанту первого поколения m10G2(6) [4]. Скорость элюции у реадaptантов, несущих замену D190N, не изменилась по сравнению со скоростями элюции у эскейп-мутанта m10G2(6) и вирусом дикого типа ReM8 (см. рисунок).

Обсуждение

В данной работе проведено сравнительное изучение антигенной специфичности и рецепторсвязывающей активности эскейп-мутантов, полученных к HA вируса гриппа A/Moscow/01/2009(H1N1)sw1, и реадaptированных вариантов. Обнаружено, что при-



Изменение в степени элюции с куриных эритроцитов реадaptантов и эскейп-мутантов по сравнению с вирусом дикого типа подтипа H1N1*.

* После реакции гемагглютинации при 4 °C планшеты с вирусами инкубировали при 37 °C.

По оси ординат указаны обратные величины гемагглютинирующих титров вирусов после 5 ч инкубации при 37 °C. Наиболее высокие значения титров соответствуют наименьшей скорости элюции.

обретенная в процессе реадaptации аминокислотная замена A198E, расположенная в антигенном сайте Sb, приводит к изменениям антигенной специфичности, выявляемым в РТГА с панелью МКАТ к вирусу A/PV-Moscow/01/2009 (H1N1)sw1. Ранее нами было показано, что аминокислотные замены в позиции 198 восстанавливают вирулентность для мышей у низковирулентного эскейп-мутанта, полученного к HA вируса гриппа A подтипа H9 [19, 20]. По-видимому, аминокислотные замены в позиции 198 в структуре молекулы HA играют компенсаторную роль в усилении вирулентности вирусов гриппа A.

Авторы выявили корреляцию между снижением вирулентности у низковирулентного эскейп-мутанта, ассоциированным с заменой D190N в молекуле HA, и увеличением гемагглютинирующего титра к ингибиторам в нормальной мышинной сыворотке. Аналогичный эффект, связанный с заменой D126N, наблюдался ранее в работе, характеризующей эскейп-мутанты вируса гриппа подтипа H5 [21].

Показано, что варианты вируса с низкой аффинностью к аналогам клеточных рецепторов и несущие аминокислотные замены, которые приводят к снижению электростатического заряда поверхности молекулы HA, обладают повышенной способностью элюировать с куриных эритроцитов, и наоборот, эскейп-мутанты и реадaptированные варианты с высокой аффинностью элюируют медленнее.

Представленные в данной работе результаты демонстрируют влияние аминокислотных замен в молекуле HA вируса гриппа A(H1N1)pdm09 на такие важные функциональные свойства вируса как изменение антигенной специфичности; вирулентность для мышей, коррелирующая с чувствительностью к

сывороточным ингибиторам; адсорбция-элюция на клеточных рецепторах, связанная с аффинностью к сиаозидам. Полученные сведения можно рассматривать как один из этапов фенотипической характеристики эскейп-мутантов и их реадaptированных вариантов вируса гриппа A(H1N1)pdm09. Низкая встречаемость в природных изолятах вируса гриппа подтипа H1N1 мутаций, гомологичных тем, которые наблюдаются у лабораторных эскейп-мутантов и реадaptантов [12], указывает на ограничение антигенного дрейфа пандемического вируса A(H1N1)pdm09 и является следствием неблагоприятных фенотипических характеристик этих вирусных вариантов. Однако эволюционные процессы у вирусов гриппа A подтипа H1N1 подтверждают, что циркуляция этих вирусов в популяциях диких птиц может представлять постоянную потенциальную угрозу возникновения новых пандемических вариантов [22]. Мы полагаем, что мониторинг плеiotропного эффекта мутаций в молекуле гемагглютинина подтипа H1 необходим для прогнозирования вариантов вируса, обладающих пандемическим/эпидемическим потенциалом [23].

Заключение

Обнаруженное в работе влияние мутаций в молекуле HA вируса гриппа A(H1N1)pdm09 на фенотипические свойства вируса может способствовать выявлению в природных изолятах вирусных вариантов, обладающих эпидемическим потенциалом.

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1, 2, 4, 7, 9-12, 19-22)
СМ. REFERENCES

3. Львов Д.К., Бурцева Е.И., Прилипов А.Г., Базарова М.В., Колобухина Л.В., Меркулова Л.Н. и др. Изоляция 24.05.09 и депонирование в государственную коллекцию вирусов (ГКВ 2452 от 24.05.09) первого штамма A/IIV-Moscow/01/09 (H1N1)sw1, подобного свиному вирусу A(H1N1) от первого выявленного 24.05.09 больного в Москве. *Вопросы вирусологии*. 2009; 54(5): 10-4.
5. Каверин Н.В., Руднева И.А., Тимофеева Т.А., Игнатьева А.В. Антигенная структура гемагглютиниона вируса гриппа. *Вопросы вирусологии*. 2012; (Прил. 1): 148-58.
6. Игнатьева А.В., Руднева И.А., Тимофеева Т.А., Шилов А.А., Забережный А.Д., Алипер Т.И. и др. Высокопродуктивный вирус-реассортант, содержащий гемагглютинин и нейраминидазу пандемического вируса гриппа A/Moscow/01/2009 (H1N1). *Вопросы вирусологии*. 2011; 56(4): 9-14.
8. Климова Р.Р., Масалова О.В., Бурцева Е.И., Чичев Е.В., Леснова Е.И., Оскерко Т.А. и др. Моноклональные антитела к пандемическому вирусу гриппа A/IIV-Moscow/01/2009 (H1N1)sw1, обладающие высокой вируснейтрализующей активностью. *Вопросы вирусологии*. 2011; 56(3): 15-20.
13. Масалова О.В., Чичев Е.В., Федякина И.Т., Мукашева Е.А., Климова Р.Р., Щелканов М.Ю. и др. Выявление консервативных и вариабельных эпитопов гемагглютиниона штаммов пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09 с помощью моноклональных антител. *Вопросы вирусологии*. 2014; 59(3): 34-40.
14. Шилов А.А., Синицын Б.В. Мутации в гемагглютине, ассоциированные с приобретением вирусом гриппа устойчивости к β -ингибиторам сывороток животных. *Доклады Академии наук*. 1994; 334(4): 539-40.
15. Шилов А.А., Синицын Б.В. Изменения в гемагглютине при адаптации вируса гриппа к мышам и их роль в приобретении вирулентных свойств и устойчивости к сывороточным ингибиторам. *Вопросы вирусологии*. 1994; 39(4): 153-7.
16. Шилов А.А., Синицын Б.В. Варианты вируса гриппа A H1N1, адаптированные к легким мышам и ингибиторам сыворотки крови мышам, различаются по свойствам и структуре гемагглютиниона. *Вопросы вирусологии*. 2000; 45(3): 16-9.
17. Каверин Н.В., Руднева И.А., Тимофеева Т.А., Шилов А.А., Игнатьева А.В. Реассортант ReM8 – вакцинный штамм вируса гриппа A подтипа H1N1. Патент РФ №2457245; 2012.
18. Тимофеева Т.А., Игнатьева А.В., Руднева И.А., Мочалова Л.В., Бовин Н.В., Каверин Н.В. Влияние мутаций, меняющих антигенную специфичность, на рецепторсвязывающую активность гемагглютиниона вирусов гриппа A подтипов H1 и H5. *Вопросы вирусологии*. 2013; 58(1): 24-7.
23. Тимофеева Т.А., Асатрян М.Н., Альшттейн А.Д., Народицкий Б.С., Гинцбург А.Л. Прогнозирование эволюционной изменчивости вируса гриппа A. *Acta Naturae*. 2017; 9(3): 51-8.
7. Timofeeva T.A., Ignatieva A.V., Rudneva I.A., Shilov A.A., Kaverin N.V. Yields of virus reassortants containing the HA gene of pandemic influenza 2009 virus. *Acta Virol*. 2012; 56(2): 149-51.
8. Klimova R.R., Masalova O.V., Burtseva E.I., Chichev E.V., Lesnova E.I., Oskerko T.A., et al. Monoclonal antibodies with high virus-neutralizing activity against pandemic influenza virus A/IIV-Moscow/01/2009 (H1N1)sw1. *Voprosy virusologii*. 2011; 56(3): 15-20. (in Russian)
9. Palmer D.F., Dowdle W.R., Colman M.T., Schield G.C. Advanced laboratory techniques for influenza diagnosis. In: *U.S. Department of Health, Education, and Welfare, Immunology Series no. 6. Centers for Disease Control*. Atlanta, GA; 1975.
10. Wagner R., Wolff T., Herwig A., Pleschka S., Klenk H. Interdependence of hemagglutinin glycosylation and neuraminidase as regulators of influenza virus growth: a study by reverse genetics. *J. Virol*. 2000; 74(14): 6316-23. Doi: <https://doi.org/10.1128/jvi.74.14.6316-6323.2000>
11. Imai H., Shinya K., Takano R., Muramoto Y., Sakabe S., et al. The HA and NS genes of human H5N1 influenza A virus contribute to high virulence in ferrets. *PLoS Pathog*. 2010; 6(9): e1001106. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001106>
12. Rudneva I.A., Timofeeva T.A., Mukasheva E.A., Ignatieva A.V., Shilov A.A., Burtseva E.I., et al. Pleiotropic effects of hemagglutinin amino acid substitutions of influenza A(H1N1)pdm09 virus escape mutants. *Virus Res*. 2018; 251: 91-9. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2018.05.002>
13. Masalova O.V., Chichev E.V., Fedyakina I.T., Mukasheva E.A., Klimova R.R., Shchelkanov M.Yu., et al. Detection of conservative and variable epitopes of the pandemic influenza virus A(H1N1)pdm09 hemagglutinin using monoclonal antibodies. *Voprosy virusologii*. 2014; 59(3): 34-40. (in Russian)
14. Shilov A.A., Sinitsyn B.V. Mutations in haemagglutinin associated with acquisition by influenza virus of resistance to β -inhibitors of serums of animals. *Doklady Akademii nauk*. 1994; 334(4): 539-40. (in Russian)
15. Shilov A.A., Sinitsyn B.V. Mutations in hemagglutinin accompanying influenza virus adaptation to mice and their role in acquiring virulent properties and resistance to serum inhibitors. *Voprosy virusologii*. 1994; 39(4): 153-7. (in Russian)
16. Shilov A.A., Sinitsyn B.V. Influenza virus A (H1N1) variants adapted to mouse lungs and blood serum resistant to β -inhibitors of mouse serum differ by biological properties and hemagglutinin structure. *Voprosy virusologii*. 2000; 45(3): 16-9. (in Russian)
17. Kaverin N.V., Rudneva I.A., Timofeeva T.A., Shilov A.A., Ignat'eva A.V. Reassortant ReM8 – vaccine strain of influenza A virus subtype H1N1. Patent RF №2457245; 2012. (in Russian)
18. Timofeeva T.A., Ignat'eva A.V., Rudneva I.A., Mochalova L.V., Bovin N.V., Kaverin N.V. Effect of mutations changing the antigenic specificity on the receptor-binding activity of the influenza virus hemagglutinin of H1 and H5 subtypes. *Voprosy virusologii*. 2013; 58(1): 24-7. (in Russian)
19. Rudneva I.A., Ilyushina N.A., Timofeeva T.A., Webster R.G., Kaverin N.V. Restoration of virulence of escape mutants of H5 and H9 influenza viruses by their readaptation to mice. *J. Gen. Virol*. 2005; 86(Pt. 10): 2831-8. Doi: <https://doi.org/10.1099/vir.0.81185-0>
20. Ilyushina N.A., Rudneva I.A., Khalkenkov A.M., Timofeeva T.A., Krylov P.S., Webster R.G., et al. Readaptation of a low-virulence influenza H9 escape mutant in mice: the role of changes in hemagglutinin as revealed by site-specific mutagenesis. *Arch. Virol*. 2010; 155(1):107-10. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00705-009-0535-1>
21. Kaverin N.V., Rudneva I.A., Ilyushina N.A., Varich N.L., Lipatov A.S., Smirnov Y.A., et al. Structure of antigenic sites on the haemagglutinin molecule of H5 avian influenza virus and phenotypic variation of escape mutants. *J. Gen. Virol*. 2002; 83(Pt. 10): 2497-505.
22. Kocer Z., Carten R., Wu G., Zhang J., Webster R.G. The genomic contributions of avian H1N1 influenza A viruses to the evolution of Mammalian strains. *Plos One*. 2015; 10(7): e0133795. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133795>
23. Timofeeva T.A., Asatryan M.N., Al'tshetein A.D., Naroditskiy B.S., Gintsburg A.L. Predicting the Evolutionary Variability of the Influenza A Virus. *Acta Naturae*. 2017; 9(3): 51-8. (in Russian)

REFERENCES

Поступила 01.10.18

Принята в печать 31.10.18

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Котова В.О., Троценко О.Е., Балахонцева Л.А., Базыкина Е.А.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВАРИАНТОВ ВИЧ-1, ВЫДЕЛЕННЫХ В СУБЪЕКТАХ ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО ФЕДЕРАЛЬНОГО ОКРУГА

ФБУН «Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора, 680610, г. Хабаровск, Россия

Введение. Молекулярно-генетический мониторинг, включающий слежение за циркуляцией резистентных форм вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) и анализ территориальной специфики распространения различных геновариантов вируса, является важной частью системы эпидемиологического надзора за распространением ВИЧ-инфекции. **Цель исследования** – проанализировать распространенность вариантов ВИЧ-1 Среди ВИЧ-инфицированных пациентов, проживающих на территориях Дальневосточного федерального округа (ДФО). **Материал и методы.** Молекулярно-генетическим анализом фрагмента области гена *pol*, кодирующей Протеазу и часть обратной транскриптазы, охвачено 206 образцов плазмы крови от ВИЧ-инфицированных пациентов, проживающих на территории Сахалинской, Магаданской, Амурской, Еврейской автономной областей, Хабаровского края, Республики Саха (Якутия) и Чукотского автономного округа, входящих в ДФО. **Результаты.** Установлено, что в большинстве регионов доминирует ВИЧ-1 суб-субтипа А6, на долю которого пришлось $72,1 \pm 3,1\%$. В 14 ($6,8 \pm 1,8\%$) случаях был выявлен субтип В и у 4 ($1,9 \pm 1,0\%$) пациентов субтип С. На отдельных территориях обнаружены рекомбинантные формы ВИЧ-1 и определен их спектр. Выявлено 5 типов циркулирующих рекомбинантных форм ВИЧ-1: CRF03_AB – 2 ($0,9 \pm 0,7\%$), CRF02_AG – 8 ($3,9 \pm 1,3\%$), CRF63_02A1 – 27 ($13,1 \pm 2,4\%$), CRF11_cpx – 1 ($0,5 \pm 0,5\%$), CRF01_AE – 3 ($1,5 \pm 0,8\%$). Высокая гетерогенность вируса отмечена в Еврейской автономной области. **Обсуждение.** Проведенные исследования выявили генетические различия в пейзаже циркулирующих субтипов ВИЧ-1 и частоте распространения рекомбинантных форм ВИЧ-1. Вероятно, это объясняется увеличением миграционных потоков, которые могут способствовать трансграничному завозу и дальнейшему распространению различных генетических вариантов ВИЧ-1 среди населения ДФО. **Заключение.** Проведенные исследования показали, что молекулярно-генетический мониторинг циркуляции геновариантов ВИЧ-1 должен охватывать не только неблагополучные по ВИЧ-инфекции территории РФ, но и регионы с низкими показателями заболеваемости и поражённости населения.

Ключевые слова: ВИЧ-1; рекомбинантные формы; субтипы; филогенетический анализ.

Для цитирования: Котова В.О., Троценко О.Е., Балахонцева Л.А., Базыкина Е.А. Молекулярно-генетическая характеристика вариантов ВИЧ-1, выделенных в субъектах Дальневосточного федерального округа. *Вопросы вирусологии*. 2019; 64(2): 79-89.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-2-79-89>

Kotova V.O., Trotsenko O.E., Balakhontseva L.A., Bazykina E.A.

MOLECULAR GENETIC CHARACTERISTICS OF HIV-1 VARIANTS ISOLATED IN THE SUBJECTS OF THE RUSSIAN FAR EAST

Khabarovsk Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Khabarovsk, 680610, Russian Federation

Introduction. Molecular-genetic monitoring of human immunodeficiency virus (HIV) drug-resistant strains circulation as well as analysis of territorial peculiarities of different genetic variants prevalence of the virus is a crucial part of epidemiological surveillance over HIV-infection spread. Objective of the research – to analyze the prevalence of HIV-1 genetic variants among HIV-positive people living in different constituent entities of the Far Eastern Federal District. **Material and methods.** Molecular-genetic analysis of the *Pol*-gene that is coding protease and a part of reverse transcriptase of HIV-1 was performed for a total number of 206 blood plasma samples. The biological material was collected from HIV-positive people living in Sakhalin, Magadan and Amur regions, Jewish Autonomous District, Khabarovsk region, Republic of Sakha (Yakutia) and Chukotka Autonomous Region (constituent entities of the Russian Federation in the Russian Far East). **Results.** The research demonstrated that HIV-1 sub-subtype A6 continues to be dominant and comprises $72.1 \pm 3.1\%$ of all isolated subtypes in the regions of the Russian Far East. HIV-1 subtype B was identified in 14 cases ($6.8 \pm 1.8\%$) and subtype C in 4 cases ($1.9 \pm 1.0\%$). Spectrum of HIV-1 recombinant forms was determined for some regions. We identified five types of HIV-1 circulating recombinant forms (CRF): CRF03_AB – 2 ($0.9 \pm 0.7\%$), CRF02_AG – 8 ($3.9 \pm 1.3\%$), CRF63_02A1 – 27 ($13.1 \pm 2.4\%$), CRF11_cpx – 1 ($0.5 \pm 0.5\%$), CRF01_AE – 3 ($1.5 \pm 0.8\%$). High heterogeneity of the virus was registered in the Jewish Autonomous District. **Discussion.** The conducted research revealed genetic differences in the landscape of HIV-1 subtypes circulation as well as differences in HIV-1 recombinant forms distribution frequency in the Russian Far East. Current findings are due to expansion of migration flows that promote cross-border importation and further spread of different HIV-1 genetic variants among population of the Far Eastern Federal District. **Conclusion.** The conducted research revealed that the molecular-genetic monitoring of HIV-1 genovariants should involve not only regions with high HIV-abundance but also with low HIV-prevalence and incidence.

Keywords: HIV-1, recombinant forms, subtypes, phylogenetic analysis.

For citation: Kotova V.O., Trotsenko O.E., Balakhontseva L.A., Bazykina E.A. Molecular genetic characteristics of HIV-1 variants isolated in the subjects of the Russian Far East. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2019; 64(2):79-89. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-2-79-89>

Для корреспонденции: Котова Валерия Олеговна, зав. лабораторией эпидемиологии и профилактики вирусных гепатитов и СПИДа ФБУН "Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии" Роспотребнадзора, 680610, г.Хабаровск. E-mail: kotova.valeriya@mail.ru; dvaid@mail.ru

For correspondence. Valeriya O. Kotova, Head of the Laboratory of Epidemiology and Prevention of Viral Hepatitis and AIDS of Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology. Khabarovsk, 680610, Russian Federation. E-mail: kotova.valeriya@mail.ru; dvaids@mail.ru

Information about authors:

Kotova V.O., <http://orcid.org/0000-0001-9824-7025>

Trotsenko O.E., <http://orcid.org/0000-0003-3050-4472>

Acknowledgments. The authors are grateful researchers from Regional Center for Prevention and Control of AIDS and Infectious Diseases in the Far Eastern Federal District: in the Magadan, Jewish Autonomous, Sakhalin, Amur regions, the Republic of Sakha (Yakutia), the Chukotka Autonomous Okrug, the Khabarovsk Territory for the information provided and biological material. The study had no sponsorship.

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

Received 07 June 2018

Accepted 19 June 2018

ВИЧ-инфекция является одной из значимых проблем здравоохранения во всём мире. В Дальневосточном федеральном округе (ДФО), как и в целом по стране, с каждым годом увеличивается число людей, инфицированных ВИЧ. На 31.12.2016 общее число ВИЧ-инфицированных в округе достигло 22 873. Эпидемический процесс ВИЧ-инфекции в ДФО характеризуется ежегодным приростом числа новых случаев. Так, среди граждан РФ в округе в 2016 г. зарегистрирован 2241 новый случай ВИЧ-инфекции, что на 67 больше, чем в 2015 г. Темпы прироста ежегодно составляют $10,3 \pm 0,26\%$ [1]. Показатель поражённости населения ВИЧ-инфекцией в 2017 г. составил 299,6 случая на 100 тыс. населения (267,6 в 2015 г.), что в 2,2 раза ниже общероссийского уровня (594,3). Распространение ВИЧ-инфекции на территориях ДФО неравномерное. Так, до 2017 г. включительно по показателю поражённости лидировал Приморский край (506,2 на 100 тыс. населения). Наименьшие показатели зарегистрированы в 2017 г. в Амурской области (65,48), Еврейской автономной области (ЕАО, 118,2), Республике Саха (Якутия) (96,7).

Эпидемиологические особенности возникновения и распространения ВИЧ-инфекции в ДФО обусловлены географическим положением и специфической демографической ситуацией. Постоянные изменения в численности населения округа находятся под воздействием двух основных факторов: естественной убыли и миграции, как внутренней, так и международной. Количество иностранных граждан, въезжающих на административные территории округа по рабочим визам из стран ближнего и дальнего зарубежья, постоянно увеличивается.

В последние годы в лабораторную диагностику ВИЧ-инфекции широко внедряются современные молекулярно-генетические методы исследования (генотипирование, филогенетический анализ). Эти технологии позволяют изучать генетическое разнообразие ВИЧ, а также проводить анализ мутаций, приводящих к формированию резистентности ВИЧ к антиретровирусным препаратам (АРВП). Благодаря изучению генетических характеристик ВИЧ-1 стало возможным проведение эпидемиологических исследований случаев ВИЧ-инфекции, в том числе в эпидемических очагах с вероятной внутрибольничной передачей вируса.

В настоящее время молекулярная структура и гете-

рогенность ВИЧ-1 являются предметом углублённого изучения многочисленных исследований в мире.

На основании анализа нуклеотидных последовательностей геномов ВИЧ-1 все известные варианты вируса подразделяют на 3 филогенетические группы: М, N и О. Недавно была обнаружена ещё одна филогенетическая группа вируса (Р), имеющая происхождение от гориллы [2]. В группе М, которая включает наиболее распространённые варианты вируса, сформировались филогенетические кластеры, представленные субтипами, обозначаемыми буквами от А до К и циркулирующими рекомбинантными формами (circulating recombinant forms, CRFs), которые произошли в результате рекомбинации вирусов разных подтипов [2–4]. Первые рекомбинантные формы вируса были описаны в Таиланде и Центральной Африке. Кроме того, существует множество уникальных рекомбинантных форм (unique recombinant form, URF), которые не отвечают требованиям включения в CRF (известная последовательность, наличие трёх не связанных между собой случаев инфицирования) [5].

Внутри подтипов А и F выделяются дополнительные суб-субтипы, обозначаемые, как А1-А4 и А6, а также F1 и F2 [6–9]. По нуклеотидному составу между собой суб-субтипы различаются на 25–30% для гена *env*, на 20% для *gag* и на 10% для *pol* [10, 11].

Распределение различных субтипов и вариантов вируса в мире неоднородно. Практически все подтипы ВИЧ-1, а также ВИЧ-2 можно обнаружить в странах Центральной и Западной Африки. Субтип С в наибольшей степени распространён в странах Юго-Восточной Азии. В Северной и Южной Америке, Западной Европе, Австралии, Юго-Восточной Азии и Японии чаще встречается вирус субтипа В [12, 13]. Наиболее распространёнными рекомбинантными формами в мире являются CRF01_AE и CRF02_AG, которые встречаются главным образом в странах Африки и Юго-Восточной Азии [14].

Молекулярно-генетический мониторинг, который проводится на территории РФ, начиная с первого случая ВИЧ-инфекции в 1987 г., показал, что в России циркулирует более 10 генетических вариантов ВИЧ-1 [15, 16]. Наиболее распространён генетический вариант IDU-A (injecting drug use - A), впервые обнаруженный в группе потребителей инъекционных наркотиков (ПИН) и позднее классифицированный как суб-субтип А6. В настоящее время он доминирует на

большинстве территорий РФ [17]. Другие субтипы и рекомбинантные формы встречаются реже, занимая различные доли в зависимости от региона. В последние годы на отдельных территориях страны регистрируется все более активное распространение новой циркулирующей рекомбинантной формы ВИЧ-1, обозначаемой CRF63_02-A1 [18–20].

Исследования, проводимые с целью изучения генетических вариантов, циркулирующих на территории Дальнего Востока, носят эпизодический характер. Так, молекулярно-генетический анализ, проведённый в 2004–2005 гг. группой исследователей на территории Хабаровского края и Сахалинской области, показал, что на тот период времени в Хабаровском крае доминировал генетический вариант ВИЧ-1 IDU-A. В Сахалинской области была обнаружена более высокая гетерогенность ВИЧ-1. Наряду с подтипом А здесь была отмечена циркуляция подтипов В, D и рекомбинантной формы CRF01_AE [21]. В 2013 г. на территории Сахалинской области были выявлены варианты вируса подтипа G и рекомбинантная форма CRF63_02A1, а также две уникальные рекомбинантные формы URF02_AG и впервые в России был обнаружен рекомбинант CRF11_srx [22]. В Республике Саха (Якутия), кроме доминирующего варианта IDU-A, в 2007 г. выявлен подтип IDU-B-East у пациента, заразившегося гетеросексуальным путём, что свидетельствует о выходе данного штамма за пределы группы риска ПИН [23].

Исследования, проведённые в 2012–2013 гг. на территории Хабаровского, Приморского краёв и Амурской области, показали изменения в профиле циркулирующих генетических вариантов ВИЧ-1. Так, в Хабаровском крае наряду с вариантом ВИЧ-1 IDU-A были обнаружены варианты вируса подтипов В, С, рекомбинантные формы CRF02_AG и CRF63_02A1 [24]. На территории Приморского края, где отмечается наиболее высокий в ДФО уровень заболеваемости ВИЧ-инфекцией, установлено явное преобладание восточноевропейского варианта вируса подтипа В [25].

Изучение генетических характеристик ВИЧ-1 как постоянно циркулирующих, так и появляющихся

новых вариантов на территории РФ представляется крайне актуальным в связи с тем, что генетические варианты вируса могут различаться по своим биологическим свойствам, по скорости эволюции вируса и прогрессирования заболевания.

Таким образом, в настоящее время молекулярно-эпидемиологический мониторинг, включающий как слежение за формированием и циркуляцией резистентных форм ВИЧ, так и анализ территориальной специфики распространения различных генетических вариантов вируса (в том числе новых рекомбинантных форм) в конкретных очагах, группах риска и т.д., является важной составной частью системы эпидемиологического надзора за распространением ВИЧ-инфекции.

Цель исследования: на основании изучения нуклеотидных последовательностей фрагментов гена *pol* провести анализ распространённости генетических вариантов ВИЧ-1 среди ВИЧ-инфицированных пациентов, проживающих на территории ДФО, включая регионы с низким показателем поражённости.

Материал и методы

Молекулярно-генетическим анализом охвачено 206 образцов плазмы крови от ВИЧ-инфицированных пациентов, проживающих на территории ДФО: в Хабаровском крае – 53 (25,7%), в ЕАО – 51 (24,8%), Республике Саха (Якутия) – 35 (16,9%), Магаданской области – 14 (6,8%), Амурской области – 11 (5,3%), Сахалинской области – 38 (18,4%) и в Чукотском автономном округе – 4 (1,9%). Все пациенты были зарегистрированы в региональных Центрах по профилактике и борьбе со СПИД с диагнозом «ВИЧ-инфекция» с 2013 по 2016 г. Получены информированные согласия всех пациентов на участие в исследовании и одобрение Комитета по этике ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора (протокол № 1 от 18.03.2015). Сбор образцов крови осуществляли на базе территориальных центров по профилактике и борьбе со СПИД субъектов ДФО. Средний возраст пациентов составил $39 \pm 3,8$ года. Среди обследованных было 123 (59,7%) мужчины и

Таблица 1

Территориальное распределение охваченных наблюдением ВИЧ-инфицированных пациентов в Дальневосточном федеральном округе по предполагаемым способам (путям) заражения

Территория	Предполагаемый способ (путь) заражения							Итого...
	Употребление инъекционных наркотиков	Гетеросексуальные контакты	Гомосексуальные контакты	Вертикальная передача	Переливание инфицированной крови	Прочие	Путь заражения не установлен	
Хабаровский край	6	38	6	0	0	0	3	53
Еврейская автономная область	17	34	0	0	0	0	0	51
Сахалинская область	8	27	1	1	0	0	1	38
Республика Саха (Якутия)	12	20	0	2	0	1	0	35
Магаданская область	8	6	0	0	0	0	0	14
Амурская область	3	6	1	0	1	0	0	11
Чукотский автономный округ	0	4	0	0	0	0	0	4
Всего...	54	135	8	3	1	1	4	206

83 (40,3%) женщины. На момент забора крови 85 пациентов находились на лечении АРВП, 1 пациент прервал терапию, 120 пациентам АРВП не назначали.

Распределение ВИЧ-инфицированных пациентов, охваченных наблюдением по предполагаемым способам (путям) заражения, представлено в табл. 1.

РНК ВИЧ-1 выделяли с использованием коммерческого набора «РИБО-золь-Е» (ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва). Нуклеотидные последовательности генома ВИЧ-1 выявляли методом секвенирования амплифицированных фрагментов области гена *pol*, кодирующей протеазу и часть обратной транскриптазы ВИЧ-1, с использованием тест-системы «АмплиСенс® HIV-Resist-Seq» (производства ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора), согласно инструкции производителя.

Секвенирование очищенных амплифицированных фрагментов ДНК проводили с использованием набора реагентов «BigDye Terminator™ v 3.1» на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (Life Technologies, США). Для сборки нуклеотидных последовательностей применяли специальное программное обеспечение «ДЕОНА» (ООО «МедАйТи Групп», Россия). Для выравнивания полученных нуклеотидных последовательностей использовали программу BioEdit v.7.1.9.

Для идентификации близкородственных штаммов ВИЧ-1 полученные нуклеотидные последовательности анализировали в программе BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Оценку подтиповой принадлежности первоначально проводили с применением специализированных онлайн-программ REGA HIV-1 Subtyping Tool (версия 3), представленных на сайте Стэнфордского университета (<http://hivdb.stanford.edu>), а также программы COMET HIV-1/2 () [26]. Филогенетический анализ выполняли с помощью программы MEGA 6.0, путём построения филогенетических деревьев методом ближайших соседей. Генетические дистанции между нуклеотидными последовательностями рассчитывали по двухпараметрическому методу Kimura. Для оценки достоверности филогенетических связей использовали бутстрэп-

анализ (bootstrap) для 500 независимых построений каждого филогенетического дерева [27].

Следует отметить, что при проведении филогенетического анализа не были исключены образцы с мутациями лекарственной устойчивости (ЛУ), так как их присутствие не привело к существенной деформации филогенетических деревьев.

Для получения информации о мутациях ЛУ использовали базу данных Стэнфордского университета HIVdb Program (<https://hivdb.stanford.edu/>).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета прикладных программ Microsoft Excel 2010. Ошибку репрезентативности определяли по формуле:

$$m_p = \sqrt{\frac{Pq}{n}}$$

Результаты

В результате исследований 206 полученных нуклеотидных последовательностей были подвергнуты предварительному анализу для определения генетического варианта ВИЧ-1 с помощью онлайн-программ REGA HIV-1 Subtyping Tool (версия 3 и COMET HIV-1. Результаты этого анализа представлены в табл. 2.

Установлено, что среди ВИЧ-инфицированных, постоянно проживающих на территории ДФО, продолжает доминировать суб-субтип А6, который выявлен в 147 (72,1 ± 3,1%) случаях. У 14 (6,8 ± 1,8%) человек был определён субтип В, у 4 (1,9 ± 1,0%) – субтип С, у 3 (1,5 ± 0,8%) – рекомбинантная форма CRF01_AE, в 2 (0,9 ± 0,7%) случаях выявлена рекомбинантная форма CRF03_AB и 1 (0,5 ± 0,5%) образец был определён как рекомбинантная форма CRF11_crx (Сахалинская область).

Необходимо отметить, что в 35 (16,9 ± 2,6%) случаях по результатам предварительного генотипирования с помощью программы REGA HIV-1 Subtyping Tool (версия 3) была определена рекомбинантная форма вируса подтипа А/Г – CRF02_AG, которая в настоящее время более широко распространена в странах Западной и Центральной Африки, в Казахстане, Узбекистане, Таджикистане, а на территории РФ – в Ал-

Таблица 2

Распространённость геновариантов ВИЧ-1 на территории Дальневосточного федерального округа*

Территория	Количество образцов	Субтип А	Субтип В	Субтип С	CRF02_AG	CRF01_AE	CRF03_AB	CRF11_crx
Хабаровский край	53	41	4	0	6	2	0	0
Еврейская автономная область	51	22	6	2	21	0	0	0
Амурская область	11	8	0	1	2	0	0	0
Магаданская область	14	13	0	0	1	0	0	0
Республика Саха (Якутия)	35	28	2	1	4	0	0	0
Сахалинская область	38	31	2	0	1	1	2	1
Чукотский автономный округ	4	4	0	0	0	0	0	0
Всего...	206	147 (72,1%)	14 (6,8%)	4 (1,9%)	35 (16,9%)	3 (1,5%)	2 (0,9%)	1 (0,5%)

* По результатам генотипирования с использованием программы REGA HIV-1 Subtyping Tool (версия 3).

Таблица 3

Распределение генетических вариантов ВИЧ-1 в Дальневосточном федеральном округе по предполагаемым путям (способам) заражения*

Путь (способ) заражения	Генетический вариант ВИЧ-1							Итого...
	A6	B	C	CRF02-AG	CRF03_AB	CRF01_AE	CRF11_cpx	
Употребление инъекционных наркотиков	35	0	0	17	1	1	0	54
Гетеросексуальные контакты	101	12	4	15	1	1	1	135
Гомосексуальные контакты	4	1	0	2	0	1	0	8
Вертикальная передача	2	0	0	0	0	0	0	2
Переливание инфицированной крови	1	0	0	0	0	0	0	1
Прочие	2	0	0	0	0	0	0	2
Путь заражения не установлен	2	1	0	1	0	0	0	4
Всего...	147	14	4	35	2	3	1	206

* По результатам генотипирования с использованием программы REGA HIV-1 Subtyping Tool (версия 3).

тайском крае и в Новосибирской области [28].

При дополнительном анализе этих образцов с помощью программы COMET HIV-1 32 из 35 проб были отнесены к рекомбинантной форме CRF63_02A1, и в 3 случаях получен неопределённый результат.

С целью выявления возможной связи проведен сопоставительный анализ распределения геновариантов ВИЧ-1 в ДФО и предполагаемых путей инфицирования пациентов, охваченных данным обследованием.

Как следует из данных, представленных в табл. 3, у подавляющего большинства ($68,7 \pm 3,8\%$) пациентов с суб-субтипом A6 ВИЧ-1 при эпидемиологическом расследовании установлено заражение в результате гетеросексуальных контактов, удельный вес инфицирования при употреблении инъекционных наркотических препаратов оказался менее значимым ($23,8 \pm 3,5\%$), а доля возможного заражения при гомосексуальных контактах у лиц с суб-субтипом A6 составила всего $2,7 \pm 1,3\%$. В структуре предполагаемых путей (способов) распространения субтипа B ВИЧ-1 отмечена ведущая роль гетеросексуальных контактов (12 из 14 проб), а для пациентов с рекомбинантной формой CRF02-AG частота случаев инфицирования путём гетеросексуальных контактов и при употреблении инъекционных наркотиков оказалась примерно одинаковой (соответственно 15 и 17 из 35 проб).

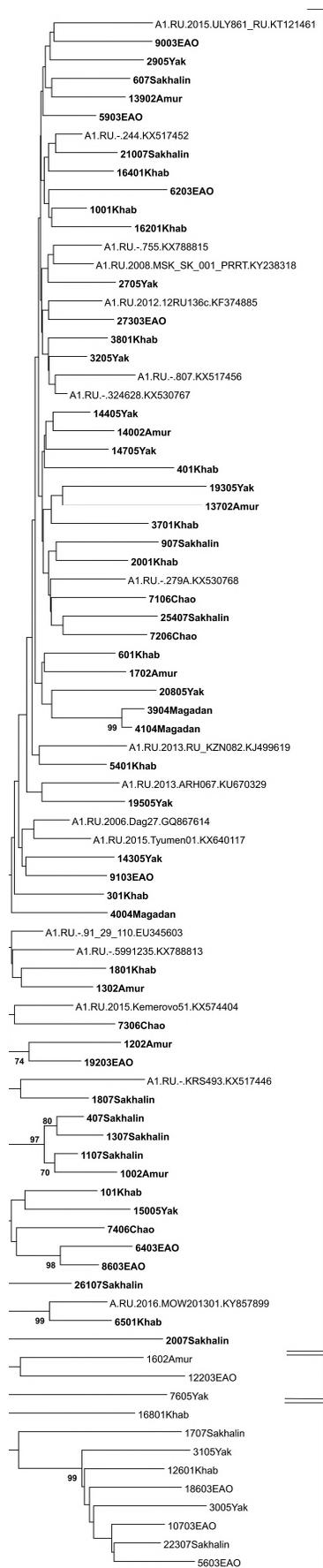
Для подтверждения результатов генотипирования, а также выяснения происхождения и возможного родства вариантов ВИЧ, циркулирующих на территориях ДФО, был проведен филогенетический анализ 206 нуклеотидных последовательностей области гена *pol*, кодирующей протеазу и обратную транскриптазу. Для подбора образцов последовательностей ВИЧ-1 в качестве групп сравнения использовали базу данных Лос-Аламосской национальной лаборатории, США (<http://hiv.lanl.gov>). Последовательности пациентов, получающих АРВП были включены в окончательный филогенетический анализ, поскольку предварительный анализ указывал на отсутствие искажения филогенетического дерева при объединении этих образцов с полученными от «наивных» пациентов.

Филогенетический анализ произвольно выбранных образцов, отнесенных по результатам генотипирования к суб-субтипу A6, показал, что все нуклеотидные последовательности из анализируемых регионов кла-

стеризуются на одной ветви филогенетического дерева с ранее полученными последовательностями той же области вариантов IDU-A, выделенных в разных регионах РФ (рис. 1). Для популяции ВИЧ-1 субтипа IDU-A, циркулирующей на изучаемых территориях ДФО, характерна высокая генетическая гомогенность и отсутствие выраженной кластеризации по каким-либо признакам.

Филогенетический анализ 14 образцов ВИЧ-1 субтипа B показал, что исследуемые варианты ВИЧ-1, выделенные от пациентов, проживающих на территории ДФО, имеют тенденцию к кластеризации по предполагаемым путям инфицирования (рис. 2). В качестве референсных использовались нуклеотидные последовательности, представленные в GenBank из разных регионов мира. Первый кластер был сформирован 12 последовательностями ВИЧ-1 от пациентов, заражённых в результате гетеросексуальных контактов. Шесть из них проживали на территории ЕАО (5603, 10203, 18603, 5803, 10703, 26903), 3 – на территории Хабаровского края (6901, 12601, 13501), 2 – в Республике Саха (Якутия) (3105, 3005) и 1 – в Сахалинской области (22307). Данная группа ВИЧ-1 оказалась наиболее близка к штаммам ВИЧ-1, которые уже были описаны в 2012 г. группой исследователей на некоторых территориях ДФО (в Приморском и Хабаровском краях, в Амурской области), а также с образцами, выделенными в 2009 г. в Армении (GenBank KF720955) и в 2002 г. на Украине (GenBank DQ055294) [24, 25, 29, 30]. Два образца ВИЧ-1 (16801 1707) от ВИЧ-инфицированных мужчин из Хабаровского края (Комсомольск-на-Амуре), путь заражения которых не установлен, и один образец из Сахалинской области от мужчины, инфицированного при гомосексуальном контакте, образовали самостоятельный кластер, который был наиболее близок к вариантам ВИЧ, изолированным в группе мужчин, имеющих секс с мужчинами, в 2007 и 2009 гг. в Санкт-Петербурге, в 2012 г. – в г. Ноябрьске (Ямало-Ненецкий автономный округ), в 2010 г. – в Новосибирской области, в 2007 и 2016 гг. – в Москве.

Проведен филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей вариантов ВИЧ-1 субтипа C, выявленных в ДФО, по сравнению с последовательностями данного субтипа из разных регионов, представленных в GenBank (<http://www.hiv.lanl.gov>). Два



суб-субтип А6

варианта ВИЧ-1 субтипа С (12103, 12203) из ЕАО объединились на одной ветви с образцами, выделенными в 2012 г. в Хабаровском и Приморском краях (рис. 2). Вариант 7605 от ВИЧ-инфицированной пациентки из Республики Саха (Якутия) был родственен пробам из Ботсваны (1999 г.) и Южной Африки (2007 г.). Образец 1602 из Амурской области имел меньшую степень гомологии с представителями образовавшегося кластера.

Помимо субтипов А, В и С, на территории ДФО, в последние годы регистрируется появление циркулирующих рекомбинантных форм ВИЧ-1.

Филогенетический анализ, проведенный для 2 рекомбинантных вариантов ВИЧ-1, выделенных от пациентов, проживающих на территории Сахалинской области, подтвердил их принадлежность к рекомбинантной форме вируса подтипа А/В - CRF03_AB, которая была впервые изолирована в Калининграде и получила распространение среди ПИН в России и Украине (рис. 2). Один вариант был выделен от пациентки, инфицированной в 1997 г. при гетеросексуальном контакте с бисексуальным партнером, не употребляющим наркотики, а второй – от пациентки, инфицированной в 2013 г. при гетеросексуальном контакте с ВИЧ-инфицированным ПИН. Оба образца составили единый кластер с аналогичными рекомбинантными вирусами, выделенными в Калининграде в 1997 г., в Литве и Белоруссии в 2000 г.

В образце 507 (GenBank № KY514097), полученном от ВИЧ-инфицированного пациента из Сахалинской области, в результате предварительного субтипирования обнаружена рекомбинантная форма 11_srx. Варианты srx представляют собой рекомбинантные формы, полученные из генов 3 субтипов. Так, CRF11_srx включает подтипы А, G, J, CRF01_AE и встречается в странах Центральной Африки. Данная рекомбинантная форма была впервые описана в 2000 г. [31, 32]. В результате филогенетического анализа полученная нуклеотидная последовательность образовала единый кластер с вариантами, выделенными в Сенегале в 1998 г., в Чаде – в 2006 г., в Камеруне – в 2008 г., что может свидетельствовать о завозном характере заболевания.

В последние годы особый интерес представляет рекомбинантная форма А/Г. В России впервые рекомбинант А/Г обнаружен в Новосибирской области в 2006 г., в пределах СНГ – в Узбекистане в 2003 г. [28, 33].

По результатам предварительного субтипирования 35 образцов из ДФО были определены как рекомбинантная форма вируса подтипа А/Г - CRF02_AG. Для всех проб проведен филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей области гена *pol* (рис. 3). Генетические варианты ВИЧ-1 распределились на

Рис. 1. Результат филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей области гена *pol* генетических вариантов суб-субтипа А6 ВИЧ-1, выделенных от пациентов, проживающих на территории ДФО.

Здесь и на рис. 2 и 3: последовательности ВИЧ-1, изученные в данной работе, выделены жирным шрифтом, обозначения референс-последовательностей ВИЧ-1 соответствуют коду GenBank. Уровень бутстрэп-поддержки оценивали при числе повторов 500. Указаны значения бутстрэп-индекса, превышающие 70.

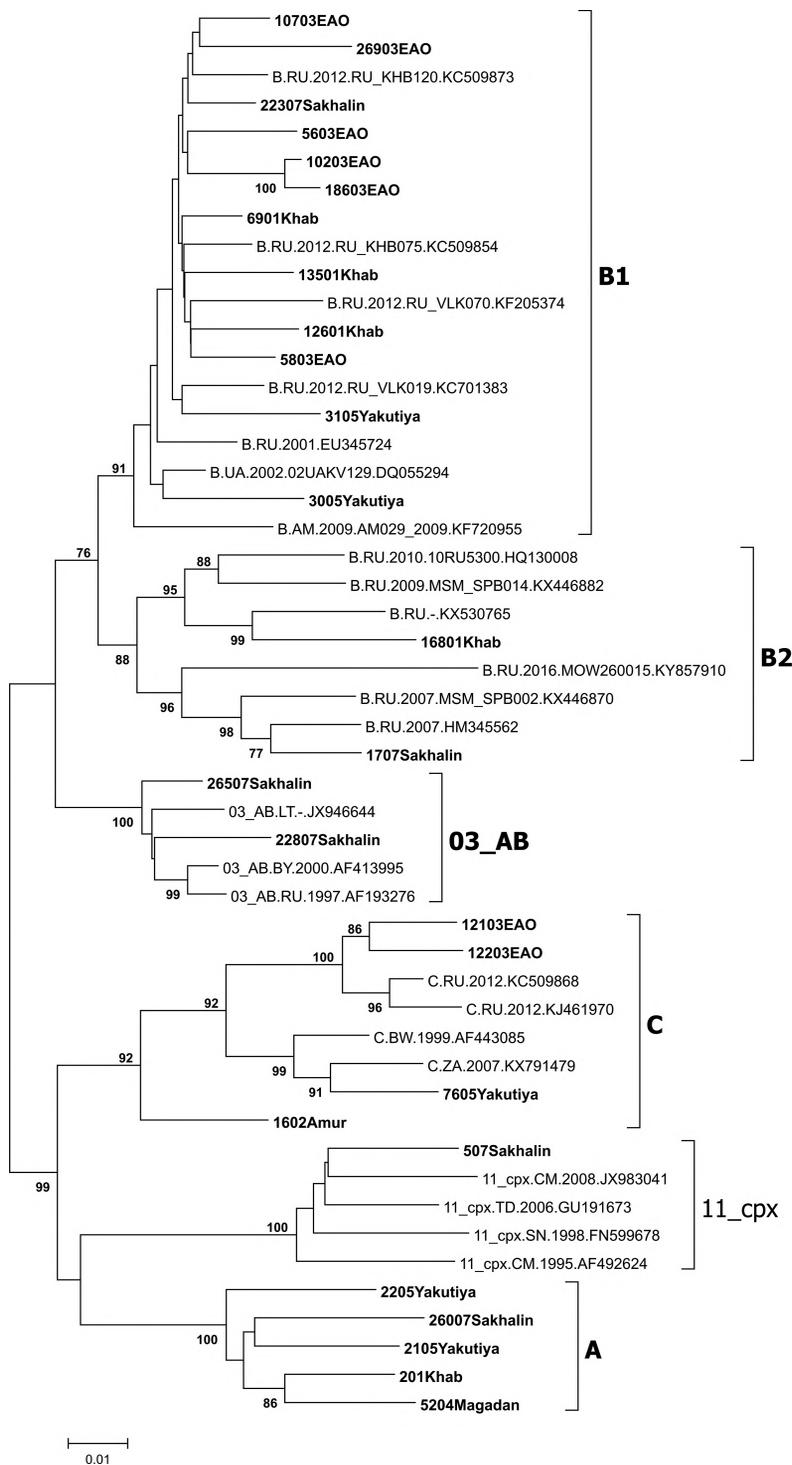


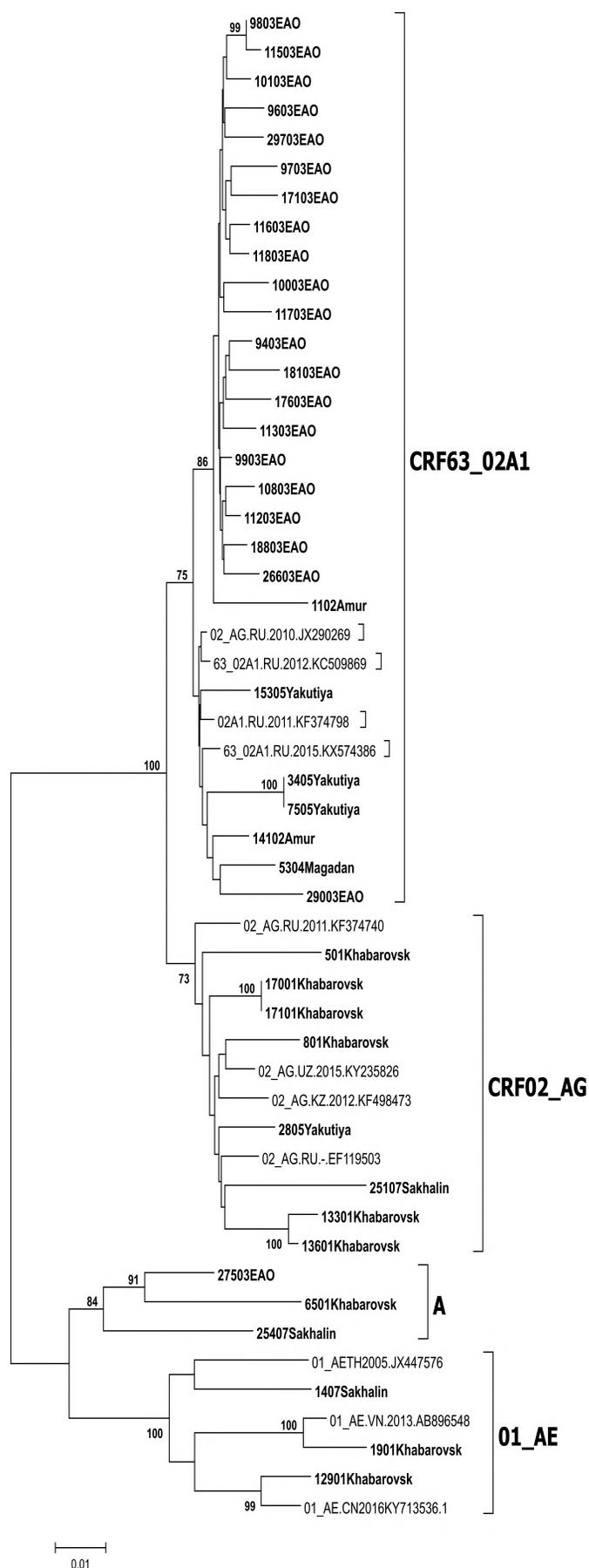
Рис. 2. Результат филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей области гена *pol* генетических вариантов субтипов В, С, 03_AB и 11_cpx ВИЧ-1, выделенных от пациентов, проживающих на территории Дальневосточного федерального округа.

филограмме на 2 группы. В первую группу вошли 6 изолятов, выделенных от пациентов, проживающих на территории Хабаровского края и впервые зарегистрированных в 2015–2016 гг. (501, 17001, 17101, 801, 13301, 13601), а также по 1 пробе из Республики Саха (Якутия)

(2805) и Сахалинской области (25107). Штаммы первой группы оказались наиболее близкими к генетическим вариантам CRF02_AG ВИЧ-1, выделенным ранее в Новосибирской области (2010, 2011 гг.), Республике Калмыкия, Узбекистане (2013, 2015 гг.) и Казахстане (2012 г.). Все образцы второй группы разделились на 2 кластера. Первый кластер был сформирован 20 нуклеотидными последовательностями из ЕАО и 1 образцом из приграничной с ней территории Амурской области, что указывает на тенденцию к кластеризации ВИЧ по географическому признаку. Второй кластер был также образован вариантами из территориально связанных субъектов ДФО – Республики Саха (Якутия) (15305, 3405, 7505), Амурской (14102), Магаданской (5304) областями и ЕАО (29003). Однако штаммы второго кластера сформировали общую ветвь с последовательностями циркулирующей рекомбинантной формы ВИЧ-1 CRF63_02A1, выделенной в Новосибирской и Кемеровской областях в 2010–2011 гг. и Хабаровском крае в 2012 г. Следует отметить, что генетический вариант CRF63_02A1 впервые был выявлен в 2008 г. в Новосибирске и представляет собой продукт рекомбинации субтипа А и CRF02_AG ВИЧ-1, распространённый на территории азиатской части России и странах центральной Азии [17, 26].

Проведённый в ДФО филогенетический анализ подтвердил принадлежность 3 образцов к форме CRF01_AE. Данная рекомбинантная форма распространена в странах Юго-Восточной Азии, но происходит из Центральной Африки [13]. Все исследуемые в ДФО варианты CRF01_AE по результатам предварительного субтипирования ВИЧ-1 сформировали единый кластер с референс-штаммами. Так, образец 1901 из Хабаровского края с высокой достоверностью сформировал общую ветвь с образцом из Вьетнама (AB896548), образец 12901, выделенный от ВИЧ-инфицированного мужчины из Комсомольска-на-Амуре (Хабаровский край), был родственен образцу из Китая (KY713536.1), а проба 1407 из Сахалинской области оказалась наиболее близка варианту вируса из Таиланда (JX.447576) (см. рис. 3).

Среди субъектов ДФО особый интерес представляет ЕАО, которая относится к территориям с низкой поражённостью населения ВИЧ-инфекцией: в 2017 г. этот показатель составил 118,2 на 100 тыс. населения ЕАО против 594,3 на 100 тыс. населения России. На 01.01.2018 в области зарегистрировано 257 случаев ВИЧ-инфекции. Исследованием был охвачен 51 (19,8%) ВИЧ-инфицированный пациент. Исследование 51 нуклеотидной последовательности от ВИЧ-инфицированных пациентов ЕАО выявило наибольшую частоту встречаемости рекомбинантной



формы CRF63_02A1- 41,2%. Все образцы, отнесенные к CRF63_02A1, сформировали единый кластер с высоким уровнем bootstrap-поддержки (97%), что может свидетельствовать о высокой генетической гомогенности, указывающей на существование эпидемиологической связи в анализируемой группе пациентов (рис. 4). Однако этот факт нуждается в подтверждении данными эпидемиологического расследования и планируется стать предметом последующих исследований.

В результате проведенного анализа 120 нуклеотидных последовательностей гена обратной транскриптазы и гена протеазы ВИЧ, изолированных от ВИЧ-инфицированных пациентов из Хабаровского края и ЕАО, не получавших АРВП, только в 2 ($1,7 \pm 1,2\%$) случаях была выявлена мутация K103N в гене обратной транскриптазы, которая обеспечивает резистентность высокого уровня к эфавирензу и невирапину. Остальные выявленные мутации были отнесены либо к мутациям полиморфизма, либо к вторичным, т.е. мутациям, которые могут вносить свой вклад в формирование устойчивости, но в присутствии первичных мутаций и сами по себе резистентность не вызывают. Мутация A62V, характерная для подтипа А, встречалась у 52 ($43,3 \pm 4,5\%$) пациентов этой группы.

Среди 85 обследованных пациентов, получающих АРВП, в 32 ($37,6 \pm 5,3\%$) случаях была выявлена хотя бы одна мутация резистентности к какому-либо классу препаратов. Мутации, определяющие резистентность ВИЧ к нуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы, обнаружены у 13 ($40,6 \pm 8,7\%$) человек, к препаратам группы ненуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы – у 3 ($9,4 \pm 5,2\%$) пациентов, к препаратам группы ингибиторов протеазы – у 1 ($3,1 \pm 3,1\%$) человека У 15 ($46,9 \pm 8,8\%$) пациентов выявлен штамм ВИЧ, резистентный сразу к двум классам препаратов – нуклеозидным и ненуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы. В 30 ($93,8 \pm 4,3\%$) случаях идентифицирована мутация M184V, которая является причиной высокого уровня резистентности к ламивудину, эмтрицитабину.

Обсуждение

Таким образом, молекулярно-генетическое исследование показало, что на большинстве анализируемых территорий ДФО в 2015–2017 гг., как в группе ПИН, так и в группе пациентов, заразившихся половым путем, доминировал генетический вариант IDU-A, на долю которого пришлось $72,1 \pm 3,1\%$. Результаты филогенетического и генотипического онлайн-анализа области гена *pol*, кодирующей протеазу и часть обратной транскриптазы ВИЧ-1, подтвердили принадлежность исследуемых образцов суб-субтипа A6 к варианту IDU_A, доминирующему в России и странах СНГ.

Рис. 3. Результат филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей области гена *pol* генетических вариантов субтипов CRF63_02A1, CRF02_AG, 01_AE ВИЧ-1, выделенных от пациентов, проживающих на территории Дальневосточного федерального округа.

ратов были выявлены в 37,6% случаях.

Необходимо отметить, что для получения более полной картины принадлежности циркулирующих на территориях ДФО штаммов ВИЧ-1 к той или иной рекомбинантной форме целесообразно проведение анализа нуклеотидных последовательностей не только в области гена *pol*, который отличается высокой консервативностью, но и в других областях генома.

Заключение

Проведённые исследования показали, что молекулярно-генетический мониторинг циркуляции геновариантов ВИЧ-1 должен охватывать не только наиболее неблагополучные по ВИЧ-инфекции территории РФ, но и регионы, где фиксируются низкие показателями заболеваемости и поражённости населения.

Регулярный мониторинг циркуляции геновариантов ВИЧ-1 на территориях ДФО, особенно среди вновь выявляемых случаев ВИЧ-инфекции, позволит получить полную картину генетического ландшафта и провести анализ территориальной специфики распространения различных геновариантов ВИЧ-1, включая резистентные штаммы на территории РФ.

В GenBank были депонированы полученные нуклеотидные последовательности под номерами: KX147551-KX147557, KX147559-KX147560, MG969350-MG969353, MG969350-MG969353 (образцы из Хабаровска); KX147558, KX147561-KX147563 (образцы из Амурской области); KX147564-KX147565, MG969357-MG969379, MG969357-MG969379 (образцы из ЕАО); KY514097-KY514106 (образцы из Сахалинской области); KY514107-514110 (образцы из Чукотского автономного округа); KY514111-KY514124 (образцы из Магаданской области); MG969354-MG969356 (образцы из Республики Саха (Якутия)), MG99354-MG969356 (образцы из Республики Саха (Якутия)).

Благодарность. За предоставленные сведения и биологический материал авторы выражают благодарность сотрудникам региональных центров по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями в ДФО: в Магаданской, Еврейской автономной, Сахалинской, Амурской областях, Республике Саха (Якутия), Чукотском автономном округе, Хабаровском крае.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 3-10, 12, 14, 17, 18, 25, 27, 30-33 см. REFERENCES)

1. Таенкова И.О., Балахонцева Л.А., Котова В.О., Троценко О.Е. Эпидемиология и профилактика ВИЧ-инфекции в Дальневосточном федеральном округе на современном этапе. *Дальневосточный журнал инфекционной патологии*. 2017; (32): 68-72.
2. Бобкова М.Р. *Лекарственная устойчивость ВИЧ*. М.: Человек; 2014.
11. Беляков Н.А., Рахманова А.Г., ред. *Вирус иммунодефицита человека – медицина*. СПб.; 2011.
13. Шарман А. *Синдром приобретенного иммунодефицита. Эпидемиология, молекулярно-клеточные аспекты, принципы диагностики, терапии, профилактики ВИЧ-инфекции и синдрома приобретенного иммунодефицита*. Бетезда, США: NeiroNex; 2006.

15. Вазкез де Парга Е., Рахманова А.Г., Перез-Альварес Л., Виноградова А.Н., Дельгадо Е., Томсон М. и др. Анализ мутаций, связанных с лекарственной резистентностью, у нелеченных пациентов, зараженных различными генетическими формами ВИЧ 1 типа, распространенными в странах бывшего Советского Союза. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии*. 2009; 1(2): 50-6.
16. Дементьева Н.Е., Сизова Н.В., Лисицина З.Н., Маклакова В.А., Крутицкая Л.И., Беляков Н.А. Анализ субтипов и фармако-резистентных вариантов ВИЧ, циркулирующих среди ВИЧ-инфицированных пациентов Санкт-Петербурга. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии*. 2011; 3(4): 34-43.
19. Гашникова Н.М., Сафронов П.Ф., Никонорова Ю.В., Унагаева Н.В., Лаптева Т.А. Свойства изолятов CRF02_AG ВИЧ-11, циркулирующих на территории Новосибирской области. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2011; (3): 38-43.
20. Богачев В.В., Тотменин А.В., Барышев П.Б., Мещерякова Ю.В., Черноусова Н.Я., Гашникова Н.М. Молекулярно-генетическая характеристика вариантов ВИЧ-1 субтипов А и В, выделенных на территории Новосибирской области. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2012; (6): 45-52.
21. Троценко О.Е., Казеннова Е.В., Бобков А.Ф., Богач В.В., Балахонцева Л.А., Котова В.О. Молекулярно-эпидемиологические исследования среди ВИЧ-инфицированных пациентов в Дальневосточном федеральном округе. *Дальневосточный журнал инфекционной патологии*. 2004; (4): 54-60.
22. Туманов А.С., Казеннова Е.В., Громов К.Б., Ломакина Е.А., Зозуля Е.Ю., Берсенов П.Г. и др. Молекулярно-эпидемиологический анализ ВИЧ-инфекции в Сахалинской области. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии*. 2017; 9(3): 113-20.
23. Казеннова Е.В., Антонова О.В., Кузин С.Н., Серкина Е.П., Соколова С.С., Васильев А.В. и др. Молекулярно-эпидемиологическое исследование распространения ВИЧ-1 на территории Республики Саха (Якутия). *Вопросы вирусологии*. 2011; 56(5): 30-4.
24. Казеннова Е.В., Нешумаев Д.А., Рукавицин Д.В., Лаповок И.А., Лага В.Ю., Ракчеева О.В. и др. Молекулярно-эпидемиологический анализ эпидемии ВИЧ-инфекции в Благовещенске и Хабаровске (Дальний Восток России). *Вопросы вирусологии*. 2014; 59(4): 31-6.
26. Казеннова Е.В., Лаповок И.А., Васильев А.В., Лага В.Ю., Гренина Л.А., Волова Л.Ю. и др. Проблемы субтипирования ВИЧ-1 на основе анализа гена *pol* и способы их разрешения. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии*. 2010; 3(2): 42-8.
28. Москалейчик Ф.Ф., Лага В.Ю., Дельгадо Е., Вега И., Фернандес-Гарсия А., Перес-Альварес Л. и др. Стремительное распространение циркулирующей рекомбинантной формы CRF02-AG ВИЧ-1 на территории России и сопредельных стран. *Вопросы вирусологии*. 2015; 60(6): 14-9.
29. Казеннова Е.В., Васильев А.В., Лаповок И.А., Гришечкин А.Е., Лага В.Ю., Саламов Г.Г. и др. Генетические варианты ВИЧ-1 в азиатской части России (2005-2010). *Вопросы вирусологии*. 2013; 58(4): 28-35.

REFERENCES

1. Taenkova I.O., Balakhontseva L.A., Kotova V.O., Trotsenko O.E. Epidemiology and prevention of HIV-infection in the Far Eastern Federal District at the Present Stage. *Dal'nevostochnyy zhurnal infektsionnoy patologii*. 2017; (32): 68-72. (in Russian)
2. Bobkova M.R. *Drug Resistance of HIV [Lekarstvennaya ustoychivost' VICH]*. Moscow: Chelovek; 2014. (in Russian)
3. Arien K.K., Vanham G., Arts E.J. Is HIV-1 evolving to a less virulent form in humans? *Nat. Rev. Microbiol.* 2007; 5(2): 141-51.
4. Robertson D.L., Anderson J.P., Bradac J.A., Carr J.K., Foley B., Funkhouser R.K., et al. *HIV-1 Nomenclature Proposal: A Reference Guide to HIV-1 Classification. Human Retroviruses and AIDS 1999*. Los Alamos, NM: Los Alamos National Laboratory; 1999.
5. Hemelaar J. Implications of HIV diversity for the HIV-1 pandemic. *J. Infect.* 2013; 66(5): 391-400. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2012.10.026>
6. Thomson M.M., Delgado E., Manjon N., Ocampo A., Villahermosa M.L., Mariño A., et al. HIV-1 genetic diversity in Galicia, Spain: BG intersubtype recombinant viruses circulating among injecting drug users. *AIDS*. 2001; 15(4): 509-16.
7. Delgado E., Thomson M.M., Villahermosa M.L., Sierra M., Ocampo A., Miralles C., et al. Identification of a newly characterized HIV-1 BG intersubtype circulating recombinant form in Galicia, Spain, which exhibits a pseudotype-like virion structure. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2002; 29(5): 536-43.
8. Esteves A., Parreira R., Veneno T., Franco M., Piedade J., Germano de Sousa J., et al. Molecular epidemiology of HIV type 1

- infection in Portugal: high prevalence of non-B subtypes. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2002; 18(5): 313-25. Doi: <https://doi.org/10.1089/088922202753519089>
9. Foley B.T., Leitner T., Paraskevis D., Peeter M. Primate immunodeficiency virus classification and nomenclature. *Infect. Genet. Evol.* 2016; 46: 150-8. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.10.018>
 10. Tebit D.M. Tracking a century of global expansion and evolution of HIV to drive understanding and to combat disease. *Lancet. Infect. Dis.* 2011; 11(1): 45-56. Doi: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099-\(10\)70186-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099-(10)70186-9)
 11. Belyakov N.A., Rakhmanova A.G., eds. *Human Immunodeficiency Virus – Medicine [Virus immunodefitsita cheloveka – meditsina]*. St. Petersburg; 2011. (in Russian)
 12. Korber B., Theiler J., Wolinsky S. Limitations of a molecular clock applied to considerations of the origin of HIV-1. *Science*. 1998; 280(5371): 1868-71.
 13. Sharman A. *Acquired Immune Deficiency Syndrome. Epidemiology, Molecular Cell Aspects, Principles of Diagnosis, Therapy, Prevention of HIV Infection and Acquired Immunodeficiency Syndrome [Sindrom priobretennogo immunodefitsita. Epidemiologiya, molekulyarno-kletochnye aspekty, printsipy diagnostiki, terapii, profilaktiki VICH-infektsii i sindroma priobretennogo immunodefitsita]*. Bethesda, USA: NeiroNex; 2006. (in Russian)
 14. Hemelaar J., Gouws E., Ghys P.D., Osmanov S. Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007. *AIDS*. 2011; 25(5): 679-89. Doi: <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e328342ff93>
 15. Vazquez de Parga E., Rakhmanova A.G., Perez-Alvarez L., Vinogradova A.N., Delgado E., Tomson M., et al. Analysis of HIV-1 drug resistance-associated mutations in untreated individuals Infected with different HIV-1 strains prevalent in Fsu countries. *VICH-infektsiya i immunosupressii*. 2009; 1(2): 50-6. (in Russian)
 16. Dement'eva N.E., Sizova N.V., Lisitsina Z.N., Maklakova V.A., Krutitskaya L.I., Belyakov N.A. Analysis of HIV subtypes and drug-resistant variants circulating in Saint-Petersburg. *VICH-infektsiya i immunosupressii*. 2011; 3(4): 34-43. (in Russian)
 17. Bobkova M. Current status of HIV-1 diversity and drug resistance monitoring in the former USSR. *AIDS Rev*. 2013; 15(4): 204-12.
 18. Baryshev P.B., Bogachev V.V., Gashnikova N.M. Genetic characterization of an isolate of HIV type 1 AG recombinant form circulating in Siberia, Russia. *Arch. Virol.* 2012; 157(12): 2335-41. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1442-4>
 19. Gashnikova N.M., Safronov P.F., Nikonorova Yu.V., Unagaeva N.V., Lapteva T.A. Properties of CRF02_AG HIV-1 isolates circulating in Novosibirsk region. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2011; (3): 38-43. (in Russian)
 20. Bogachev V.V., Totmenin A.V., Baryshev P.B., Meshcheryakova Yu.V., Chernousova N.Ya., Gashnikova N.M. Molecular-genetic characteristic of HIV-1 A and B subtypes variants isolated in Novosibirsk region. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2012; (6): 45-52. (in Russian)
 21. Trotsenko O.E., Kazennova E.V., Bobkov A.F., Bogach V.V., Balakhontseva L.A., Kotova V.O. Molecular-epidemiological researches among HIV-infected patients in the far Eastern Federal District. *Dal'nevostochnyy zhurnal infektsionnoy patologii*. 2004; (4): 54-60. (in Russian)
 22. Tumanov A.S., Kazennova E.V., Gromov K.B., Lomakina E.A., Zozulya E.Yu., Bersenev P.G., et al. The molecular epidemiological analysis of HIV infection in Sakhalin region, Russia. *VICH-infektsiya i immunosupressii*. 2017; 9(3): 113-20. (in Russian)
 23. Kazennova E.V., Antonova O.V., Kuzin S.N., Serkina E.P., Sokolova S.S., Vasil'ev A.V., et al. Molecular and epidemiology studies of HIV-1 prevalence in the Republic of Sakha (Yakutia). *Voprosy virusologii*. 2011; 56(5): 30-4. (in Russian)
 24. Kazennova E.V., Neshumayev D.A., Rukavitsin D.V., Lapovok I.A., Laga V.Yu., Rakcheeva O.V., et al. Molecular epidemiological analysis of the HIV infection in the Blagoveshchensk and Khabarovsk Area (Russian Far East). *Voprosy virusologii*. 2014; 59(4): 31-6. (in Russian)
 25. Kazennova E., Laga V., Lapovok I., Glushchenko N., Neshumayev D., Vasilyev A., et al. HIV-1 Genetic Variants in the Russian Far East. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2014; 30(8): 742-52. Doi: <https://doi.org/10.1089/AID.2013.0194>
 26. Kazennova E.V., Lapovok I.A., Vasil'ev A.V., Laga V.Yu., Grezina L.A., Volova L.Yu., et al. Problems of subtyping of HIV-1 on the base of Pol gene and ways of their permission. *VICH-infektsiya i immunosupressii*. 2010; 3(2): 42-8. (in Russian)
 27. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 2013; (30): 2725-29. Doi: <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
 28. Moskaleychik F.F., Laga V.Yu., Delgado E., Vega I., Fernandes-Garsiya A., Peres-Alvares L., et al. Rapid spread of the HIV-1 circular recombinant CRF02-AG in Russia and neighboring countries. *Voprosy virusologii*. 2015; 60(6): 14-9. (in Russian)
 29. Kazennova E.V., Vasil'ev A.V., Lapovok I.A., Grishechkin A.E., Laga V.Yu., Salamov G.G. HiV-1 Genetic Variants in the Asian Part of Russia: a Study (2005-2010). *Voprosy virusologii*. 2013; 58(4): 28-35. (in Russian)
 30. Saad M.D., Shcherbinskaya A.M., Nadai Y., Kruglov Y.V., Antonenko S.V., Lyulchuk M.G., et al. Molecular Epidemiology of HIV Type 1 in Ukraine: Birthplace of an Epidemic. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2006; 22 (8): 709-14. Doi: <https://doi.org/10.1089/aid.2006.22.709>
 31. Wilbe K., Casper C., Albert J., Leitner T. Identification of two CRF11-cpxgenomes and two preliminary representatives of a new circulating recombinant form (CRF13_cpx) of HIV type 1 in Cameroon. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2002; 18(12): 849-56. Doi: <https://doi.org/10.1089/08892220260190326>
 32. Montavon C., Vergne L., Bourgeois A., Mpoudi-Ngole E., Malonga-Mouellet G., Butel C., et al. Identification of a new circulating recombinant form of HIV type 1, CRF11-cpx, involving subtypes A, G, J, and CRF01-AE, in Central Africa. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2002; 18(3): 231-6. Doi: <https://doi.org/10.1089/08892220252781301>
 33. Carr J.K., Nadai Y., Eyzaguirre L., Saad M.D., Khakimov M.M., Yakubov S.K., et al. Outbreak of a West African recombinant of HIV-1 in Tashkent, Uzbekistan. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2005; 39(5): 570-5.

Поступила 07.06.18

Принята в печать 19.06.18

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Куш А.А.¹, Климова Р.Р.¹, Фёдорова Н.Е.¹, Масалова О.В.¹, Никонова А.А.², Леснова Е.И.¹,
Момотюк Е.Д.¹, Демидова Н.А.¹, Самарцева Т.Г.², Зверев В.В.².

ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К F-БЕЛКУ РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНОГО ВИРУСА, НЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ ИНФЕКЦИОННУЮ АКТИВНОСТЬ ВИРУСА В КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЕ

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

² ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 105064, г. Москва, Россия

Введение. Респираторно-синцициальный вирус (РСВ) является наиболее распространённой причиной острых инфекционных заболеваний респираторного тракта. Отсутствие широкого спектра терапевтических препаратов, а также вакцин для профилактики и лечения РСВ-инфекции свидетельствует о высокой актуальности их разработки. **Цель** работы – получение высокоактивных и специфичных моноклональных антител (МкАТ), способных обнаружить РСВ в заражённых клетках и нейтрализовать инфекционную активность вируса *in vitro*. **Материал и методы.** РСВ эталонных штаммов 2 субгрупп группы А (А2 и Long) размножали в перевиваемых клетках HEp-2 и MA-104 соответствующим образом. Мышей иммунизировали очищенным вирусом, МкАТ получали с помощью гибридомной технологии. **Результаты.** Получена панель из 6 МкАТ, взаимодействующих с РСВ (А2 и Long) и с F-белком РСВ: 4 МкАТ принадлежали к иммуноглобулинам класса G, изотипам IgG2a или IgG2b; 2 МкАТ – к классу IgM. Тип лёгкой цепи во всех моноклональных Ig был карра. Полученные МкАТ активно взаимодействовали с РСВ в иммуноферментном анализе, в реакциях иммунофлюоресценции и иммунопероксидазной окраски заражённых клеток, а также в иммунодоте. 5 из 6 МкАТ нейтрализовали инфекционную активность вируса в клеточной культуре. Обнаружены значительные различия в способности МкАТ реагировать с F-белком в иммунохимических и биологических реакциях, что предполагает направленность МкАТ к разным антигенным сайтам. **Обсуждение.** Сравнительный анализ с опубликованными данными свидетельствует о том, что полученные МкАТ можно использовать для разработки диагностических препаратов и тест-систем, для обнаружения РСВ в клинических материалах и для доказательства этиологии инфекции при выделении вируса, в том числе быстрым культуральным методом. **Заключение.** Высокая активность и специфичность показывают, что разработанные МкАТ могут служить основой для создания новых профилактических препаратов и вакцин.

Ключевые слова: моноклональные антитела; респираторно-синцициальный вирус; реакция биологической нейтрализации; иммуноферментный анализ; F-белок; иммунофлюоресцентная и иммунопероксидазная детекция респираторно-синцициального вируса в зараженных клетках; иммунодот.

Для цитирования: Куш А.А., Климова Р.Р., Фёдорова Н.Е., Масалова О.В., Никонова А.А., Леснова Е.И., Момотюк Е.Д., Демидова Н.А., Самарцева Т.Г., Зверев В.В. Получение и свойства моноклональных антител к F-белку респираторно-синцициального вируса, нейтрализующих инфекционную активность вируса в клеточной культуре. *Вопросы вирусологии.* 2019; 64(2):90-96. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-2-90-96>

Kushch A.A.¹, Klimova R.R.¹, Fedorova N.E.¹, Masalova O.V.¹, Nikonova A.A.², Lesnova E.I.¹,
Momotyuk E.D.¹, Demidova N.A.¹, Samartseva T.G.², Zverev V.V.²

DEVELOPMENT AND PROPERTIES OF NEUTRALIZING MONOCLONAL ANTIBODIES FOR FUSION PROTEIN OF RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS

¹ Ivanovsky Institute of Virology «National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named honorary academician NF Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation;

² Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, 105064, Russian Federation

Introduction. Respiratory syncytial virus (RSV) is the most common cause of lower respiratory tract infections in infants and the elderly. The absence of a wide range of therapeutic drugs and vaccines indicates to the high relevance of the development of new effective drugs for the prevention and treatment of RSV infections. **Purpose:** to obtain highly active and specific monoclonal antibodies (MAbs) capable of detecting RSV in infected cells and neutralizing the infectious activity of the virus *in vitro*. **Material and methods.** RSV reference strains of group A 2 subgroups (A2 and Long) were propagated in HEp-2 and MA-104 cell lines, respectively. Mice were immunized with purified RSV A2 virus. MAbs were obtained using hybridoma technology. **Results.** A panel of 6 MAbs reacting with RSV strains A2 and Long has been obtained. Four MAbs were IgG (IgG2a or IgG2b subtype), two MAbs were IgM. All MAbs reacted with RSV F-protein in immunochemical tests. The MAbs actively reacted with RSV in ELISA, in immunofluorescence and peroxidase staining of infected cells, and in immunodot test. Five out of 6 MAbs neutralized of RSV in cell culture. Different properties of MAbs suggest that they target different antigenic sites of F-protein. **Discussion.** Comparative analysis suggests that the obtained MAbs can be used for the development of diagnostic preparations, for RSV detection in clinical materials and confirmation of infection etiology by rapid culture method. **Conclusion.** High activity and specificity of MAbs indicate that they can serve as a basis for development vaccines and preventive medicines.

Keywords: monoclonal antibodies; respiratory syncytial virus; reaction of biological neutralization; immunoenzyme assay; F-protein, immunofluorescence and immunoperoxidase detection of RSV in infected cells; immunodot.

Для корреспонденции: Куш Алла Александровна, д-р биол. наук, профессор, руководитель лаборатории ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», Минздрава России, 123098, г. Москва. E-mail: vitalku@mail.ru

For citation: Kushch A.A., Klimova R.R., Fedorova N.E., Masalova O.V., Niconova A.A., Lesnova E.I., Momotyuk E.D., Demidova N.A., Samartseva T.G., Zverev V.V. Development and properties of neutralizing monoclonal antibodies for fusion protein of respiratory syncytial virus. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2019; 64(2):90-96. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-2-90-96>

For correspondence: Alla A. Kushch, professor, head of the laboratory of the Ivanovsky Institute of Virology «Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation. E-mail: vitaliku@mail.ru

Information about authors:

Kushch A.A., <http://orcid.org/0000-0002-3396-5533>
 Klimova R.R., <http://orcid.org/0000-0002-4147-8444>
 Fedorova N.E., <http://orcid.org/0000-0001-8466-7993>
 Masalova O.V., <https://orcid.org/0000-0001-5571-5669>
 Demidova N.A., <http://orcid.org/0000-0003-1961-9789>

Niconova A.A., <https://orcid.org/0000-0001-9610-0935>
 Lesnova E.I., <https://orcid.org/0000-0002-2801-6843>
 Momotyuk E.D., <http://orcid.org/0000-0002-6217-5311>
 Samartseva T.G., <https://orcid.org/0000-0003-3264-6722>
 Zverev V.V., <https://orcid.org/0000-0002-0017-1892>

Acknowledgment. This work was supported by a grant from the Russian Science Foundation No. 17-15-01525.

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

Received 20 October 2018

Accepted 31 October 2018

Введение

Острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ) широко распространены во всем мире и нередко приводят к смерти пациента. Возбудителями ОРВИ являются вирусы, относящиеся к разным таксономическим группам. Наиболее распространённой причиной острых инфекционных заболеваний нижних отделов респираторного тракта среди детей в возрасте младше 5 лет является респираторно-синцитиальный вирус (РСВ) [1]. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), в мире ежегодно инфицируются РСВ 64 млн человек и 160 тыс. человек умирают [2]. Все дети в течение первых 2 лет жизни по крайней мере 1 раз инфицируются РСВ [3], причём смертность детей в возрасте до 1 года от РСВ-инфекции более высокая, чем от любого другого патогена, кроме малярии [4]. В США от РСВ-инфекции ежегодно умирают более 100 тыс. детей [5]. В Российской Федерации данная проблема не менее актуальна. Эпидемиологическое исследование, проведённое в 2011–2013 гг. в Санкт-Петербурге, показало, что в этиологической структуре ОРВИ госпитализированных детей первых 5 лет жизни доминировала РСВ-инфекция [6]. У взрослых людей в группах высокого риска (со сниженным иммунитетом, с заболеваниями лёгких, сердечно-сосудистой системы), а также у лиц старшего возраста РСВ-инфекция протекает с тяжёлыми последствиями и нередко со смертельным исходом [7].

В то же время единственное разрешённое средство борьбы с РСВ-инфекцией – препарат паливизумаб (palivizumab, Synagis®) – гуманизированное моноклональное антитело (МкАТ), полученное методами молекулярной и клеточной биотехнологии [8]. Этот препарат снижает заболеваемость в группах риска [9], но не предотвращает реинфекции и у части пациентов вызывает образование устойчивых к паливизумабу вариантов РСВ [10, 11]. Оценка эффективности паливизумаба в разных исследованиях варьирует от 39 до 78% [12]. Следует отметить, что высокая стоимость препарата существенно ограничивает возможность его использования для профилактики заболевания. Отсутствие более широкого спектра терапевтических препаратов, а также вакцин свидетельствуют о высокой актуальности разработки новых более эффективных препаратов для профилактики и лечения РСВ-инфекции. Не менее актуально усовершенствование дифференциальной диагностики это-

го заболевания, так как успех терапии зависит от своевременного, эффективного и специфичного обнаружения возбудителя при сходных клинических проявлениях у пациентов с острой инфекцией респираторного тракта. В то же время, согласно данным, опубликованным группой европейских авторов [13], при стандартном подходе дифференциальная диагностика респираторных инфекций более чем в 50% случаев оказывается неудовлетворительной.

Цель настоящей работы – получение высокоактивных и специфичных МкАТ, способных обнаруживать РСВ в заражённых клетках и нейтрализовать инфекционную активность вируса *in vitro*.

Материал и методы

Вирус и клетки. Использовали РСВ двух эталонных штаммов (A2 и Long, подгруппа А) из коллекции ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова. РСВ А2 размножали в перевиваемой клеточной культуре HEp-2 (человек, эпидермоидная карцинома гортани), в среде RPMI, содержащей 5% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), глутамин и гентамицин (ООО «Панэко», Россия), при 37 °C в атмосфере 5% CO₂. РСВ Long культивировали с использованием перевиваемой культуры клеток MA-104 (макака резус, эмбриональная почка) в среде Игла MEM. Концентрировали и очищали вирусы из клеток преципитацией с PEG6000. Осадок, содержащий вирус, растворяли в 20% сахарозе. При концентрировании вируса использовали методику согласно О. Уеба [14]. Для титрования вирусов использовали клетки MA-104, так как на них хорошо проявляется классическое цитопатогенное действие РСВ (образование синцитиев), которое можно учитывать при контроле монослоя с использованием микроскопа. Титр вирусов рассчитывали по формуле Спирмена–Кербера. Титр РСВ А2 после концентрирования составил 9lg тканевой 50% цитопатической дозы в 1 мл (ТЦД₅₀/мл), РСВ Long – 7lg ТЦД₅₀/мл. Концентрацию белка в вирусном препарате определяли на микроспектрофотометре NanoDrop (Thermo Scientific, США) при длине волны 280 нм против 20% сахарозы или с помощью реагента Брэдфорда (Sigma, США) в соответствии с инструкцией.

Иммунизация мышей. Иммунизацию мышей (самки линии BALB/c), полученных из питомника «Пушино» (Московская обл.), проводили с использованием 2 схем (1-я группа и 2-я группа, по 5 животных в каждой груп-

пе). Доза РСВ А2 при каждой инъекции составляла 100 мкг/мышь. В качестве адъювантов использовали полный адъювант Фрейнда (ПАФ) и неполный адъювант Фрейнда (НАФ) (Sigma, США). Мышей 1-й группы иммунизировали 3 раза с 2-недельным интервалом, 2-й группы – 5 раз с недельным интервалом: 1-е введение РСВ с ПАФ, следующие – с НАФ. Исследования выполняли согласно Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных (приказ Минздрава России от 19.06.2003 № 266).

Иммуноферментный анализ (ИФА) антител к РСВ в сыворотках крови мышей, в культуральных жидкостях от гибридных клеток, а также МкАТ проводили в непрямом варианте: вносили по 50 мкл РСВ в концентрации 10 мкг/мл в 0,1 М фосфатно-солевом буфере, pH 7,2 (PBS) в лунки 96-луночных планшетов (Thermo Scientific, США) на 24 ч при 4 °С. После отмывки раствором PBS с твином (0,1% твин-20 в PBS) в лунки вносили: сыворотки мышей в серийных разведениях; или культуральные жидкости (КЖ) из лунок с гибридными клетками; или КЖ из лунок с моноклонами, и инкубировали в течение 1 ч при 37 °С. После отмывки добавляли козы антигена к иммуноглобулинам мыши, меченные пероксидазой («Сорбент», Россия), в разведении 1 : 500. В качестве субстрата использовали тетраметилбензидин гидрохлорид (ТМБ; US Biomedical, США). Для торможения реакции добавляли 1N серную кислоту. Оптическую плотность (ОП) измеряли на планшетном иммуноферментном анализаторе «Sunrise» (Tecan, Швейцария) при длине волны 450 нм, референс-волны – 620 нм. За титр антител принимали обратное разведение, ОП которого в 2 раза превосходила ОП отрицательных контролей – преиммунные мышьиные сыворотки или КЖ из лунок, не содержащих гибридные клетки.

Гибридизация и клонирование. Миеломные и гибридомные клетки культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 4,5 г/л глюкозы, 3 мМ глутамин, 60 мкг/мл гентамицина (ООО «ПанЭко», Россия) с добавлением 20% ЭТС (Gibco, Invitrogen, США) и 0,2 ед/мл инсулина (Lilly, Франция). Культивирование проводили в CO₂-инкубаторе при 37 °С в атмосфере 5% CO₂. Для слияния использовали клетки мышьиной миеломы Sp2/0, не продуцирующие собственные иммуноглобулины.

Гибридизацию проводили по методу [15] с модификациями, как описано ранее [16]. Суспензию спленоцитов мыши смешивали с клетками Sp2/0 в соотношении 2 : 1, соответственно, и добавляли раствор PEG/DMSO solution (Hybri-Max™, Sigma, США). После слияния клетки ресуспендировали в селективной среде гипоксантин-аминоптерин-тимидин (ГАТ) (Hybri-Max™, Sigma, США), вносили в 96-луночные панели и инкубировали при 37 °С в атмосфере 5% CO₂. Клетки культивировали в селективной среде ГАТ в течение 14 дней после слияния. КЖ из лунок, содержащих гибридные клетки, тестировали на наличие антител к РСВ в ИФА, как описано выше, и в реакции биологической нейтрализации (РБН).

Реакция биологической нейтрализации. КЖ от гибридных культур или моноклонов инкубировали с РСВ А2 (инфекционная множественность 10⁴ ТЦД₅₀/мл) в течение 2 ч при 37 °С в присутствии 5% CO₂ и затем вносили на монослой клеток МА-104. Через 1 ч обработанные клетки промывали средой без сыворотки и вносили среду поддержки с 2% ЭТС, содержащую двойную концентрацию глутамин. Цитопатогенное действие (ЦПД) вируса на клетки оценивали через 72–96 ч, когда

в инфицированной, но не обработанной культуре развивалось ЦПД.

Иммунофлюоресцентный анализ РСВ в заражённых клетках проводили методом непрямого иммунофлюоресцентного анализа. Клетки МА-104 в концентрации 4x10⁴ клеток/мл вносили в лунки 24-луночных панелей с покровными стеклами, на следующий день заражали РСВ с инфекционной множественностью 10⁴ ТЦД₅₀/мл. Через 4 сут после заражения клетки фиксировали метанолом 20 мин при -20 °С. На фиксированные препараты наносили МкАТ и инкубировали 1 ч при 37 °С. Затем промывали PBS и наслаивали антимишью сыворотку, меченную ФИТЦ (ДАКО, Дания). Клетки докрашивали эвансом синим («Biochem», Франция). Окрашивание наблюдали с помощью флюоресцентного микроскопа AxioScope A1 (Carl Zeiss, Германия) при длине волны 520–560 нм. Результаты оценивали по интенсивности окраски и выражали в условных обозначениях: +++ соответствовали яркой изумрудно-зелёной окраске, ++ – менее яркой окраске, + – слабой окраске.

Иммуноферментный анализ F-белка РСВ проводили с использованием 96-луночных планшетов MAXISORP NUNC-IMMUNO PLATE (Thermo Scientific, США). В лунки вносили рекомбинантный F-белок (Sino Biological, Республика Корея) РСВ А2 в концентрации 0,5 мкг/мл в 0,1 М фосфатно-солевом буфере, pH 7,2 (PBS) и инкубировали в течение 18 ч при 4 °С. Затем вносили МкАТ и выполняли ИФА, как описано выше.

Субтипы МкАТ и типы лёгких цепей определяли методом ИФА с помощью набора «Pierce Rapid ELISA Mouse mAb Isotyping Kit» (Thermo Scientific, США) в соответствии с инструкцией: КЖ от МкАТ вносили в лунки планшета, преадсорбированного антителами к иммуноглобулинам мыши классов G (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3), IgA и IgM, а также к субтипам легкой цепи kappa и lambda. После инкубации добавляли поливалентный конъюгат к IgG + IgA + IgM, меченный пероксидазой, после инкубации – субстрат ТМБ. Принадлежность МкАТ определяли по максимальному сигналу с определённым субтипом Ig и типом лёгкой цепи.

Иммунопероксидазное выявление антигена РСВ в заражённых клетках. Клетки, содержащие РСВ, выявляли иммуноцитохимическим окрашиванием *in situ* с помощью полученных МкАТ. Клетки фиксировали охлаждённым метанолом, обрабатывали МкАТ и инкубировали 1 ч при 37 °С. Антитела отмывали PBS, наслаивали антимишью антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (anti-mouse PX, PO260; Dako, Дания), и инкубировали 1 ч при 37 °С. Препараты промывали PBS и наносили раствор 3,3'-диаминобензидина в концентрации 1 мг/мл в буфере 0,05 М Трис-НСl (pH 7,4) с добавлением 3% пероксида водорода. Реакцию останавливали через 10 мин внесением дистиллированной воды. Результаты иммунопероксидазного окрашивания оценивали с использованием светового микроскопа AxioVert A1.

Иммунодот. Образцы (концентрированные препараты вирусов, F-белок, лизаты заражённых и незаражённых клеток) наносили в серийных разведениях на нитроцеллюлозную мембрану 0,45 мкм (Schleicher & Schuell, Германия) с помощью вакуумного насоса с использованием Bio-Dot apparatus (Bio-Rad, США), как описано ранее [17]. Инкубацию с МкАТ в блокирующем растворе PBS, содержащем 5% обезжиренного сухого молока и 0,1% твин-20, проводили в течение 2 ч на качалке при комнатной температуре, затем – в течение 1 ч с антимишьюными

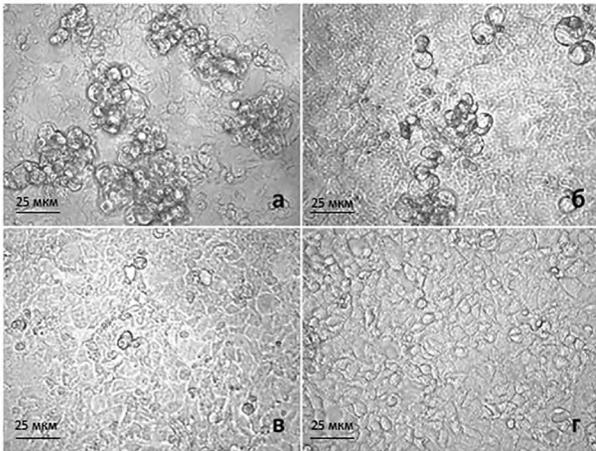


Рис. 1. Морфологические проявления вируснейтрализующей активности моноклональных антител против респираторно-синциального вируса (PCV) в клетках культуры МА-104 в реакции биологической нейтрализации.

а – цитопатогенное действие РСВ, контроль заражения; *б* – подавление инфекционной активности РСВ моноклональными антителами (МкАТ) 7Н5 на 60%; *в* – подавление МкАТ 11F6 на 80%; *г* – неинфицированные клетки МА-104, контроль. Фазовый контраст. Ув. 400×.

антителами, меченными пероксидазой хрена (Jackson Immuno Research, США) в разведении 1 : 500. Реакцию проявляли раствором субстрата 3,3'-диаминобензидина (Sigma, США) (0,05 М трис-НСl, рН 7,4; 0,03% H₂O₂; 0,5 мг/мл 3,3'-диаминобензидина). Результаты оценивали визуально по интенсивности пятен.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программ MS Office Excel 2010 и Statistica 6. Достоверность различий оценивали по *t*-критерию Стьюдента; различия считали статистически значимыми при *p* < 0.05.

Результаты

Таблица 1

Сравнительный анализ специфической активности антител в сыворотках иммунизированных мышей в отношении РСВ А2

Схема иммунизации	Мыши, № п/п	Титр антител в ИФА*, класс и субклассы Ig			Титр в РБН**
		IgG1	IgG2a	IgG суммарный	
1-я схема (3 иммунизации через 2 нед с ПАФ и НАФ)	1	7 · 10 ⁵	6 · 10 ⁵	7,8 · 10 ⁵	160
	2	10 ⁵	3 · 10 ⁴	4 · 10 ⁵	160
	3	7 · 10 ⁴	10 ⁵	5,6 · 10 ⁵	80
	4	10 ⁵	2 · 10 ⁵	4,9 · 10 ⁵	80
	5	2 · 10 ⁵	2 · 10 ⁵	6 · 10 ⁵	40
	6	2 · 10 ⁵	10 ⁵	1,6 · 10 ⁵	< 40
2-я схема (5 иммунизаций через 1 нед с ПАФ и НАФ)	7	10 ⁵	2 · 10 ⁴	4 · 10 ⁵	< 40
	8	10 ⁵	3 · 10 ⁴	4 · 10 ⁵	< 40
	9	10 ⁵	10 ⁵	4 · 10 ⁵	160
	10	6 · 10 ⁵	5 · 10 ⁵	7,8 · 10 ⁵	80
Неиммунизированные мыши		< 250	< 250	< 250	< 40

Примечание. * За титр принято обратное предельное разведение сыворотки; ** за титр принято обратное предельное разведение сыворотки, при котором цитопатогенное действие РСВ А2 подавлено на 50%. Жирным шрифтом выделены лучшие показатели активности антител. Расшифровка аббревиатур дана в тексте.

Сравнительный анализ иммунного ответа мышей, иммунизированных по 2 схемам, проводили через 7 дней после последней иммунизации. Схемы различались количеством введений РСВ и интервалами между ними, как описано в разделе «Материал и методы». Определяли титр антител при тестировании суммарных IgG, а также антител изотипов IgG1 и IgG2a к РСВ А2. Результаты определения антител в сыворотках крови мышей методом ИФА и способности антител нейтрализовать инфекционную активность РСВ в РБН показали, что после 2-й иммунизации иммунный ответ мышей в обеих группах был относительно слабым, титры суммарных Ig анти-РСВ не превышали 1 : 10⁴; титры в РБН составляли 1 : 10, что статистически значимо не отличалось от уровня контрольных неиммунизированных животных. После иммунизации животных по 1-й и 2-й схемам активность иммунного ответа возрастала (табл. 1).

Сыворотки неиммунизированных мышей не реагировали с РСВ А2: ОП всех разведений в ИФА была *p* < 0.05. Среднегеометрические титры антител к РСВ, иммунизированных по 1-й схеме, составляли 1 : 5,6 · 10⁵, по 2-й схеме – 1 : 3,8 · 10⁵, различия статистически незначимы (*p* > 0,05). Анализ сывороток в РБН показал, что вируснейтрализующие антитела образовались у всех животных, иммунизированных по схеме 1, и характеризовались титрами 1 : 40 – 1 : 160. Напротив, в группе мышей, иммунизированных по схеме 2, только у 2 животных детектировали вируснейтрализующие антитела. Для получения гибридом, продуцирующих МкАТ к РСВ, были отобраны 2 мыши, имевшие лучшие показатели активности сывороточных антител к РСВ (табл. 1).

В результате экспериментов по гибридизации клеток было получено 768 гибридных культур, устойчивых к селективной среде ГАТ. Первичный скрининг КЖ установил, что 180 гибридных культур продуцировали антитела к белкам РСВ А2 (23%), которые реагировали с РСВ только в ИФА или только в РБН или в обеих реакциях. Проведено клонирование положительных культур с последующим изучением стабильности продукции антител при сохранении пролиферативной активности. Сравнительный анализ позволил отобрать 6 моноклонов для подробного изучения продуцируемых ими МкАТ. Данные представлены в табл. 2 и на рис. 1 и 2 (см. рис. 2 на третьей полосе обложки).

Определены субтипы моноклональных иммуноглобулинов: 3 МкАТ принадлежали к IgG, изотипам IgG2a или IgG2b; 2 МкАТ – к IgM. Тип лёгкой цепи во всех моноклональных Ig был каппа.

Результаты ИФА показали, что МкАТ 3F3 и 1В7 одинаково интенсивно реагировали как со штаммом РСВ А2, к которому были получены, так и со штаммом РСВ Long и с F-белком РСВ. Другие МкАТ более слабо реагировали с РСВ Long. В то же время все МкАТ взаимодействовали с F-белком, хотя и в разной степени. Важно отметить, что 5 из 6 МкАТ проявили значительную вируснейтрализующую активность, подавляя ЦПД РСВ *in vitro* на 60–80%.

Все полученные клоны выявляли РСВ в заражённых клетках, но с разной активностью (см. табл. 2). Иммунофлуоресцентный анализ (ИФл) показал, что МкАТ выявляли F-белок РСВ А2 в цитоплазме клеток. На рис. 2 а–д можно видеть, что МкАТ 3F3 и 11F6 взаимо-

Таблица 2

Свойства моноклональных антител к респираторно-синцитиальному вирусу

МкАТ	Изотип Ig, тип лёгкой цепи	РБН, % ингибирования	ИФА: ОП с КЖ*			ИФл**
			PCB A2	PCB Long	Ф-белок	
7Н5	IgG2a, κ***	60	3,0	1,1	1,0	++
11F6	IgG2a, κ	80	2,6	0,8	0,5	+++
3F3	IgM, κ	70	3,4	3,3	3,5	+++
5G8	IgG2b, κ	70	1,1	0,3	0,4	+
5D5	IgM, κ	70	3,2	0,8	0,8	+
1В7	IgG2b, κ	<50	2,8	2,3	2,4	+

Примечание. * Показатели оптической плотности (ОП) при анализе моноклональных антител (МкАТ) в культуральных жидкостях (КЖ) от гибридом; ** ИФл – сравнительная оценка интенсивности флюоресценции в клетках, зараженных РСВ и окрашенных МкАТ, условные обозначения; *** κ – обозначение лёгкой цепи.

Таблица 3

Чувствительность выявления Ф-белка респираторно-синцитиального вируса в вирусных препаратах методом иммунодота

МкАТ	Ф-белок	Концентрированные РСВ, штаммы		Лизат клеток МА-104, инфицированных РСВ, штамм А2
		А2	Long	
7Н5	100 нг*	600 нг	2,0 мкг	20 мкг
11F6	50 нг	600 нг	4,8 мкг	20 мкг
3F3	20 нг	200 нг	500 нг	5 мкг
1В7	20 нг	100 нг	300 нг	1 мкг

Примечание. * Минимальное количество белка, выявляемое указанными моноклональными антителами (МкАТ).

действовали с РСВ не только в синцитиях с видимым ЦПД, но также с вирусом в неслившихся клетках, соседних с синцитиями. Остальные МкАТ реагировали преимущественно с РСВ, локализованном в синцитиях. Такая же реакция с внутриклеточным вирусом была характерна и для поликлональной мышиной сыворотки к РСВ, которую использовали в качестве контроля. На рис. 2 ж приведён пример раннего обнаружения РСВ в клетках культуры методом иммунопероксидазного окрашивания.

4 МкАТ были испытаны в реакции иммунодота на способность выявлять Ф-белок РСВ. На рис. 3 в качестве примера представлены данные взаимодействия МкАТ 7Н5. Можно видеть, что исследованные МкАТ специфично реагировали с Ф-белком (1-я полоска) и препаратами РСВ А2 (2-я полоска) и Long (3-я полоска), не выявляя его в неинфицированных клетках (5-я полоска). Чувствительность детекции варьировала: для рекомбинантного Ф-белка от 20 до 100 нг, для концентрированных вирусов РСВ – от 100 до 600 нг (А2) и 300–4800 нг (Long), для клеток, инфицированных РСВ А2, – от 1 до 20 мкг/пятно (табл. 3).

Обсуждение

Поиски эффективных средств борьбы с РСВ-инфекцией продолжают в течение более 50 лет, однако до сих пор не удаётся существенно снизить заболеваемость среди детей и лиц старшего возраста. Отчасти это объясняется особенностями патогенеза РСВ-инфекции, при которой включаются механизмы иммунного ускольза-

ния. На ранних сроках после заражения РСВ иммунный ответ слабый и в дальнейшем характеризуется низкой стойкостью, что способствует частым реинфекциям даже при заражении структурно близкими штаммами вируса [18, 19]. Результаты настоящей работы подтверждают это наблюдение: даже после двукратной иммунизации цельным вирусом гуморальный ответ мышей был невысоким и сыворотки крови практически не содержали вируснейтрализующих антител. Поскольку для получения МкАТ необходимо индуцировать у мышей сильный антительный иммунный ответ к целевому антигену, мы использовали 2 схемы иммунизации животных с различным количеством инъекций и разными интервалами между введениями РСВ. Это позволило отобрать животных с высокими титрами сывороточных антител к РСВ и способностью нейтрализовать инфекционную активность вируса. В результате использования гибридомной технологии был получен набор гибридом и выбраны 6 моноклонов, продуцирующих вирусспецифические МкАТ. В ИФА все МкАТ обнаруживали РСВ двух референс-штаммов группы А (А2 и Long) и реагировали с Ф-белком РСВ, при этом МкАТ 3F3 и 1В7 – с одинаково высокой активностью, другие МкАТ реагировали со штаммом Long и Ф-белком значительно слабее. Одно из возможных объяснений состоит в различных свойствах моноклональных иммуноглобулинов, относящихся к разным типам и субтипам, в том числе в их способности реагировать с антигенными детерминантами на Ф-белке. Более вероятно, что МкАТ направлены к разным эпитопам Ф-белка. В пользу сделанного предположения свидетельствуют данные о том, что 6 антигенных сайтов на Ф-белке, индуцирующих РСВ-нейтрализующие антитела, существен-

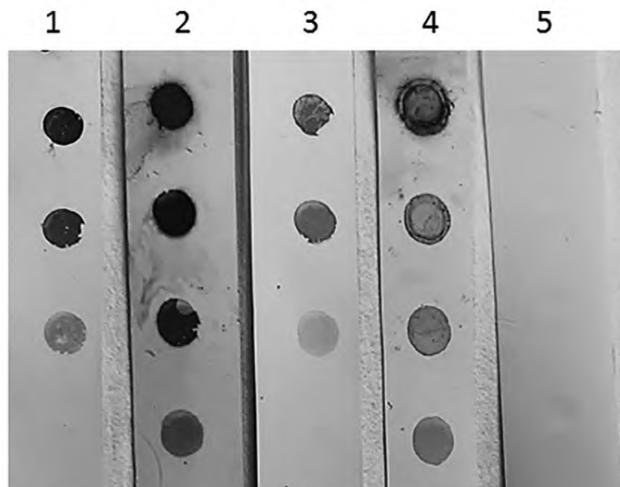


Рис. 3. Анализ взаимодействия моноклональных антител с РСВ А2 и Long в реакции иммунодота.

На нитроцеллюлозную мембрану нанесены следующие препараты в серийных разведениях с шагом 1 : 5. Начальные разведения: 1-я полоска – рекомбинантный Ф-белок – 2,5 мкг; 2-я полоска – концентрированный вирус РСВ А2 – 75 мкг; 3-я полоска – концентрированный вирус РСВ Long – 50 мкг; 4-я полоска – лизат клеток МА-104, заражённых РСВ А2 – 2,5 мкг; 5-я полоска – лизат незаражённых клеток МА-104 – 2,5 мкг. Мембраны инкубировали с КЖ 7Н5, реакцию проявляли, как описано в тексте (см. раздел «Материал и методы»).

но различаются по нейтрализующему потенциалу [20]. Что касается МкАТ 1В7, активно реагирующего в ИФА с F-белком, но не подавляющего инфекционную активность РСВ, то очевидно, что это МкАТ взаимодействует с эпитопом в другом антигенном регионе, возможно, локализованном не на апикальной поверхности F-белка, а на участке, приближенном к вирусной мембране.

В настоящее время несколько научных групп в разных странах проводят интенсивные исследования, направленные на разработку новых антител с улучшенными характеристиками [21–23].

Одна из целей получения новых МкАТ – использование их для лабораторной диагностики. Для респираторных инфекций диагностика имеет особое значение в связи со сходством клинических проявлений заболеваний различной этиологии. Среди полученных нами 2 МкАТ (3F3 и 1В7) высоко активно детектировали РСВ в ИФА, и по крайней мере еще 2 МкАТ (11F6 и 3F3) эффективно выявляли РСВ в зараженных клетках методом ИФл. Оба метода прямого обнаружения вирусного антигена широко используются в настоящее время наряду с молекулярными методами как в Европе, так и в США [24, 25]. В еженедельных сводках Центра по контролю за заболеваемостью и профилактикой инфекционных болезней США (Centers for Disease Control and Prevention) публикуются сведения о диагностике РСВ-инфекции, которая проводится тремя методами: детекция антигена, изоляция вируса и полимеразная цепная реакция (ПЦР). Согласно полученным данным, в 2018 г. количество положительных проб на РСВ при обнаружении антигена было выше, чем при использовании ПЦР и изоляции вируса: 14, 4 и 0% соответственно. О том, что стандартная ПЦР-диагностика РСВ-инфекции требует усовершенствования, свидетельствуют данные С. Lowe и соавт. [26], показавших, что при рутинной ПЦР-диагностике респираторных инфекций 30% случаев были пропущены.

Один из методов, используемых в диагностике для идентификации возбудителя, – выделение вируса. Его применяют для доказательства этиологии заболевания. В классическом варианте клинические материалы вносят в культуру чувствительных клеток и наблюдают развитие ЦПД с последующей идентификацией патогена разными методами. МкАТ позволяют идентифицировать вирус на ранних стадиях после заражения, до развития ЦПД. Этот вариант (так называемый быстрый культуральный метод), как показали данные ИФл-анализа, может использоваться с помощью полученных нами МкАТ.

Прямая детекция антигена РСВ продемонстрирована нами также в реакции иммунодота. Представляет интерес, что наибольшей чувствительностью обладали МкАТ 1В7, не способные нейтрализовать инфекционный вирус. Так, рекомбинантный F-белок выявлялся с чувствительностью 20 нг, в составе концентрированных препаратов РСВ А2 и Long – 100–300 нг, зараженных клеток – 1 мкг. Сходные характеристики получены для МкАТ к белкам РСВ, описанным ранее [27]. Таким образом, МкАТ1В7 могут быть использованы для разработки «быстрых» тестов для определения антигена РСВ на основе иммунодота, пригодных для скрининговых исследований и диагностики «у постели больного». В то же время МкАТ используют при разработке новых современных диагностических платформ, в том числе на основе нанотехнологий [28]. Усовершенствование диа-

гностики необходимо для надежной дифференциации РСВ-инфекции от других вирусных заболеваний, в том числе от гриппа, а также от бактериальных инфекций респираторного тракта, что позволяет начать терапию специфическими противогриппозными препаратами и ограничить применение антибиотиков. МкАТ являются полезным инструментом для скрининга антивирусных препаратов, мониторинга эпидемий и оценки эффективности вакцин. Новые МкАТ, в том числе полученные в данной работе, нужны для повышения качества и доступности лабораторной диагностики, для достижения баланса между новыми сложными мультиплексными платформами, требующими дорогостоящего оборудования и специалистов для обслуживания, и достаточно быстрыми и простыми методами для применения непосредственно в местах оказания первой медицинской помощи.

Важно отметить, что большинство полученных нами МкАТ нейтрализовали инфекционную активность РСВ в клеточной культуре. Особого внимания заслуживают МкАТ 3F3, которые проявили высокую активность во всех изученных иммунохимических и биологических реакциях, в том числе во взаимодействии с F-белком. F-белок обеспечивает проникновение вируса в клетку путем слияния вирусной и клеточной мембран, участвует в почковании и распространении вируса от клетки к клетке, и что важно, характеризуется меньшей изменчивостью, чем поверхностный гликопротеин G. МкАТ к F-белку послужили основой для получения паливизумаба – первого и единственного разрешенного препарата для профилактики РСВ-инфекции в группах высокого риска. В настоящее время предпринимаются усилия для разработки улучшенного препарата на основе новых МкАТ, направленных к другому, апикально экспонированному антигенному сайту на F-белке – Ø [19]. Использование новых МкАТ, в том числе полученных в настоящей работе, для изучения тонкой антигенной структуры F-белка РСВ – одно из необходимых условий для создания эффективной вакцины против РСВ-инфекции.

Заключение

Суммируя результаты проделанной работы, можно сделать вывод, что получен набор из 6 МкАТ, показана способность МкАТ взаимодействовать с F-белком РСВ и нейтрализовать инфекционную активность вируса в клеточной культуре. Полученные МкАТ можно использовать для разработки диагностических препаратов, для иммуноферментного и иммунофлюоресцентного методов обнаружения РСВ в клинических материалах и для доказательства этиологии инфекции при выделении вируса. Кроме того, они могут стать основой для создания новых профилактических препаратов и вакцин.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 17-15-01525.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1-5, 7-15, 17-21, 23-28 см. REFERENCES)

- Евдокимов К.В., Ровный В.Б., Бабаченко И.В., Шарипова Е.В. Респираторно-синцитиальная инфекция у детей раннего возраста. *Медицинский совет*. 2017; (4): 7-10.
- Климова Р.Р., Масалова О.В., Бурцева Е.И., Чичев Е.В., Леснова Е.И., Оскерко Т.А. и др. Моноклональные антитела к пандемическому вирусу гриппа A/HIV-Moscow/01/2009 (H1N1)swl, обла-

дающие высокой вируснейтрализующей активностью. *Вопросы вирусологии*. 2011; 56(3): 15-20.

22. Кривичкая В.З., Синцова К.С., Петрова П.Е., Сверлова М.В., Соколин Е.В., Царева Т.Р. и др. Генетическая и антигенная характеристика штаммов РСВ, выделенных в Санкт-Петербурге в 2013-2016 гг. *Вопросы вирусологии*. 2017; 62(6): 273-82.

REFERENCES

- Jain S., Self W., Wunderink R., Fakhran S., Balk R., Bramley A., et al. Community-acquired pneumonia requiring hospitalization among U.S. Adults. *N. Engl. J. Med.* 2015; 373(5): 415-27. Doi: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1500245>
- Carbonell-Estrany X., Simoes E., Dagan R., Hall C., Harris B., Hultquist M., et al. Motavizumab for prophylaxis of respiratory syncytial virus in high-risk children: a noninferiority trial. *Pediatrics*. 2010; 125(1): 35-51. Doi: <https://doi.org/10.1542/peds.2008-1036>
- Shi T., McAllister D., O'Brien K., Simoes E., Madhi S., Gessner B., et al. Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: a systematic review and modelling study. *Lancet*. 2017; 390(10098): 946-58. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30938-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30938-8)
- Lozano R., Naghavi M., Foreman K., Lim S., Shibuya K., Aboyans V., et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2013; 380(9859): 2095-128. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61728-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61728-0)
- Zhou H., Thompson W., Viboud C., Ringholz C., Cheng P., Steiner C., et al. Hospitalizations associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States, 1993-2008. *Clin. Infect. Dis.* 2012; 54(10): 1427-36. Doi: <https://doi.org/10.1093/cid/cis211>
- Evdokimov K.V., Rovnyy V.B., Babachenko I.V., Sharipova E.V. Respiratory syncytial infection in young children. *Meditsinskiy sovet*. 2017; (4): 7-10. (in Russian)
- Falsey A., Hennessey P., Formica M., Cox C., Walsh E. Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults. *N. Engl. J. Med.* 2005; 352(17): 1749-5. Doi: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043951>
- Johnson S., Oliver C., Prince G., Hemming V., Pfarr D., Wang S., et al. Development of a humanized monoclonal antibody (MEDI-493) with potent in vitro and in vivo activity against respiratory syncytial virus. *J. Infect. Dis.* 1997; 176(5): 1215-24. Doi: <https://doi.org/10.1086/514115>
- The IMPact-RSV Study Group. Palivizumab, a humanized respiratory syncytial virus monoclonal antibody, reduces hospitalization from respiratory syncytial virus infection in high-risk infants. *Pediatrics*. 1998; 102(3): 531-7.
- Zhu Q., McAuliffe J., Patel N., Palmer-Hill F., Yang C., Liang B., et al. Analysis of respiratory syncytial virus preclinical and clinical variants resistant to neutralization by monoclonal antibodies palivizumab and/or motavizumab. *J. Infect. Dis.* 2011; 203(5): 674-82. Doi: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiq100>
- Zhao X., Sullender W. In vivo selection of respiratory syncytial viruses resistant to palivizumab. *J. Virol.* 2005; 79(7): 3962-8. Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.79.7.3962-3968.2005>
- Wegzyn C., Toh L., Notario G., Biguenet S., Unnebrink K., Park C., et al. Safety and Effectiveness of Palivizumab in Children at High Risk of Serious Disease Due to Respiratory Syncytial Virus Infection: A Systematic Review. *Infect. Dis. Ther.* 2014; 3(2): 133-58. Doi: <https://doi.org/10.1007/s40121-014-0046-6>
- Alchikh M., Conrad T., Hoppe C., Ma X., Broberg E., Penttinen P., et al. Are we missing respiratory viral infections in infants and children? Comparison of a hospital-based quality management system with standard of care. *Clin. Microbiol. Infect.* 2019; 25(3):380. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.05.023>
- Ueba O. Respiratory syncytial virus concentration and purification of the infectious virus. *Acta. Med. Okayama*. 1978; 32(4): 265-72.
- Köhler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1976; 256(5517): 495-7.
- Klimova R.R., Masalova O.V., Burtseva E.I., Chichev E.V., Lesnova E.I., Oskerko T.A., et al. Monoclonal antibodies with high virus-neutralizing activity against pandemic influenza virus A/H1N1-Moscow/01/2009 (H1N1)swl. *Voprosy virusologii*. 2011; 56(3): 15-20. (in Russian)
- Masalova O.V., Klimova R.R., Chichev E.V., Fediakina I.T., Loginova S.Y., Borisevich S.V., et al. Development of monoclonal antibodies to highly pathogenic avian influenza H5N1 virus and their application to diagnostics, prophylaxis, and therapy. *Acta Virol.* 2011; 55(1): 3-14.
- Graham B.S. Biological Challenges and Technological Opportunities for Respiratory Syncytial Virus Vaccine Development. *Immunol. Rev.* 2011; 239(1): 149-66. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00972.x>
- González P., Carreño L., Bueno S., Riedel C., Kalergis A. Understanding respiratory syncytial virus infection to improve treatment and immunity. *Curr. Mol. Med.* 2013; 13(7): 1122-39.
- Graham B. Vaccine development for respiratory syncytial virus. *Curr. Opin. Virol.* 2017; 23: 107-112. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2017.03.012>
- Detalle L., Stohr T., Palomo C., Piedra P., Gilbert B., Mas V., et al. Generation and Characterization of ALX-0171, a Potent Novel Therapeutic Nanobody for the Treatment of Respiratory Syncytial Virus Infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015; 60(1): 6-13. Doi: <https://doi.org/10.1128/AAC.01802-15>
- Krivitskaya V.Z., Sintsova K.S., Petrova R.E., Sverlova M.V., Sorokin E.V., Tsareva T.R., et al. Genetic and antigenic characterization of RSV strains isolated in St. Petersburg in 2013–2016. *Voprosy virusologii*. 2017; 62(6): 273-82. (in Russian)
- Mejias A., Garcia-Maurino C., Rodriguez-Fernandez R., Peeples M., Ramilo O. Development and clinical applications of novel antibodies for prevention and treatment of respiratory syncytial virus infection. *Vaccine*. 2017; 35(3): 496-502. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.09.026>
- Broberg E., Waris M., Johansen K., Snacken R., Penttinen P. European Influenza Surveillance Network. Seasonality and geographical spread of respiratory syncytial virus epidemics in 15 European countries, 2010 to 2016. *Euro Surveill.* 2018; 23(5): 17-00284. Doi: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.5.17-00284>
- The National Respiratory and Enteric Virus Surveillance System (NREVSS). Available at: <https://www.cdc.gov/surveillance/nrevss/rsv/index.html>
- Lowe C., Leung V., Karakas L., Merrick L., Lawson T., Romney M. Targeted Management of Influenza A/B Outbreaks Incorporating the cobas® Influenza A/B&RSV into the Virology Laboratory. *J. Hosp. Infect.* 2018; 101(1): 38-41. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2018.08.014>
- Gómez R., Mora J., Cortés C., Riedel C., Ferrés M., Bueno S., et al. Respiratory syncytial virus detection in cells and clinical samples by using three new monoclonal antibodies. *J. Med. Virol.* 2014; 86(7): 1256-66. Doi: <https://doi.org/10.1002/jmv.23807>
- Tripp R., Alvarez R., Anderson B., Jones L., Weeks C., Chen W. Bioconjugated nanoparticle detection of respiratory syncytial virus infection. *Int. J. Nanomedicine*. 2007; 2(1): 117-24.

Поступила 20.10.18

Принята в печать 31.10.18