

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

ЛР № 010215 от 29.04.97

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

Вёрстка *Е.М. Архипова*

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

ISSN 0507-4088. *Вопр. вирусологии*. 2019. Т. 64. № 6. 257-312.

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

Учредители: **ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Общероссийская общественная организация «Всероссийское научно-практическое общество эпидемиологов, микробиологов и паразитологов»**

ВОПРОСЫ ВИРУСОЛОГИИ

ДВУХМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Основан в 1956 г.

6

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., член-корр. РАН)

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)

Жирнов О.П. (д.б.н., проф., член-корр. 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.)

Колобухина Л.В. (д.м.н., проф.)

Лобзин Ю.В. (д.м.н., проф., акад. РАН)

Малеев В.В. (д.м.н., проф., акад. РАН)

Онищенко Г.Г. (д.м.н., проф., акад. РАН)

Попова А.Ю. (д.м.н., проф., Главный санитарный врач РФ)

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)

Антонов В.А. (д.м.н., проф.; Волгоград, Россия)

Бовин Н.В. (д.х.н., проф.; 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)

Васин А.В. (д.б.н.; Санкт-Петербург, Россия)

Глотов А.Г. (д.в.н., проф.; пос. Краснообск, Новосибирская обл., Россия)

Глулов В.В. (д.б.н., проф.; Новосибирск, Россия)

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

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

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

Корзая Л.И. (д.м.н., проф.; Сочи, 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)

Локтев В.Б. (д.б.н., проф.; Новосибирск, Россия)

Лукашов А.Н. (д.м.н., проф., член-корр. РАН; Москва, Россия)

Макаров В.В. (д.б.н., проф.; Москва, Россия)

Мальшев Н.А. (д.м.н., проф.; Москва, Россия)

Манапова Э.Р. (д.м.н., Казань, 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)

Панин А.Н. (д.в.н., проф., акад. РАН; 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)

Савельев С.И. (д.м.н., проф., Липецк, Россия)

Сметанина С.В. (к.м.н.; Москва, Россия)

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

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

Чвала И.А. (к.в.н.; г. Владимир, Россия)

Чумаков П.М. (д.б.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)

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

МЕЖДУНАРОДНЫЙ РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

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

Fouchier R.A.M. (PhD, Prof, Rotterdam, Netherlands)

Goujgoulova G. (PhD; Sofia, Bulgaria)

Hoenen T. (PhD; Greifswald - Insel Riems, Germany)

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

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

Kuhn J.H. (MD, PhD, PhD, M.Sc.; Frederick, USA)

Liu W.J. (PhD, Prof., Beijing, P.R. China)

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

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

Oxford J. (DSc; London, UK)

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)

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

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

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

Webby R. (PhD, Memphis, USA)

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

Founders: Central Research Institute of Epidemiology,
Russian Scientific Society of Epidemiologists, Microbiologists and Parasitologists

VOPROSY VIROLOGII

PROBLEMS OF VIROLOGY (Russian Journal)

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

Volume 64 • 6 • 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,

Corresponding Member of RAS

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; **Zhirnov O.P.** – Doctor of Biological Sciences, Prof., Corresponding Member 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.; **Kolobukhina L.V.** – MD, PhD, DSc, Prof.; **Lobzin Yu.V.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS; **Maleev V.V.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS; **Onishchenco G.G.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS; **Popova A.Yu.** – MD, PhD, DSc, Prof., Chief Sanitary Doctor of the Russian Federation; **Uryvaev L.V.** – 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)

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

Bovin N.V. – Sc.D., Prof. (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)

Vasin A.V. – Sc.D. (Saint-Petersburg, Russia)

Glotov A.G. – Sc.D., Prof. (Krasnoobsk, Russia)

Glupov V.V. – Sc.D., Prof. (Novosibirsk, 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)

Korzaya L.I. – MD, PhD, DSc (Sochi, 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)

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

Lukashov A.N. – MD, PhD, DSc, Prof., Corr. Member of RAS (Moscow, Russia)

Makarov V.V. – Sc.D., Prof. (Moscow, Russia)

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

Manapova E.R. – MD, PhD, DSc (Kazan, 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)

Panin A.N. – Sc.D., Prof., Academician of RAS (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)

Smetanina S.V. – PhD (Moscow, Russia)

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

Tutel'yan A.V. – MD, PhD, DSc, Prof., Corr. Member of RAS (Moscow, Russia)

Chvala I.A. – PhD (Vladimir, Russia)

Chumakov P.M. – Sc.D., 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)

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

INTERNATIONAL EDITORIAL COUNCIL

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

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

Fouchier R.A.M. (PhD, Prof, Rotterdam, Netherlands)

Goujgoulova G. (PhD; Sofia, Bulgaria)

Hoenen T. (PhD; Greifswald - Insel Riems, Germany)

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

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

Kuhn J.H. (MD, PhD, PhD, M.Sc.; Frederick, USA)

Liu W.J. (PhD, Prof., Beijing, P.R. China)

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

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

Oxford J. (DSc; London, UK)

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)

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

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

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

Webby R. (PhD, Memphis, USA)

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

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРЫ

- Акимкин В.Г., Алимов А.В., Захарова Ю.А., Болгарова Е.В., Питерский М.В., Сисин Е.И.**
Обзор актуальных вопросов диагностики и профилактики гемоконтактных нозокомиальных вирусных инфекций 262

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Дерябин П.Г., Гараев Т.М., Финогенова М.П., Одноров А.И.**
Оценка противовирусной активности соединения 2HCl*H-His-Rim в сравнении с противогриппозным препаратом «Арбидол» в отношении высоковирулентного штамма вируса гриппа A/duck/Novosibirsk/56/05 (H5N1) (*Influenza A virus, Alphainfluenzavirus, Orthomyxoviridae*) 268
- Кюрегян К.К., Поляков А.Д., Потемкин И.А., Карлсен А.А., Исаева О.В., Лопатухина М.А., Муллин Е.В., Слукинова О.С., Малинникова Е.Ю., Щибрик Е.В., Оглезнева Е.Е., Михайлов М.И.**
Белгородская область – эндемичный по гепатиту E регион 274
- Громов К.Б., Киреев Д.Е., Мурзакова А.В., Лопатухин А.Э., Казеннова Е.В., Бобкова М.Р.**
Анализ полиморфизма белка Nef вариантов ВИЧ-1 (*Human immunodeficiency virus-1, Lentivirus, Orthoretrovirinae, Retroviridae*), циркулирующих в странах бывшего СССР 281
- Полтавченко А.Г., Ерш А.В., Таранов О.С., Якубицкий С.Н., Филатов П.В.**
Быстрый иммунохимический метод выявления ортопоксвирусов (*Orthopoxvirus, Chordopoxvirinae, Poxviridae*) 291
- Бутырский А.Ю., Мухачева А.В., Мовсисянц А.А., Саркисян К.А.**
Анализ результатов определения вируснейтрализующих антител в сыворотках крови лиц, привитых от бешенства 298
- Савиных Н.А., Дехтерева Н.В., Савиных М.В., Калужских Т.И.**
Эпизоотическая характеристика бешенства и антирабическая помощь на территории Кировской области в 2010–2018 гг. 306
- Указатель статей, опубликованных в журнале «Вопросы вирусологии» в 2019 г.** 311

CONTENTS

REVIEWS

- Akimkin V.G., Alimov A.V., Zakharova Yu.A., Bolgarova E.V., Piterskiy M.V., Sisin E.I.**
Review of current issues of diagnosis and prevention of blood-borne nosocomial viral infections 262

ORIGINAL RESEARCH

- Deryabin P.G., Garaev T.M., Finogenova M.P., Odnovorov A.I.**
Assessment of the antiviral activity of 2HCl*H-His-Rim compound compared to the anti-influenza drug Arbidol for influenza caused by A/duck/Novosibirsk/56/05 (H5N1) (*Influenza A virus, Alphainfluenzavirus, Orthomyxoviridae*) 268
- Kyuregyan K.K., Polyakov A.D., Potemkin I.A., Karlsen A.A., Isaeva O.V., Lopatukhina M.A., Mullin E.V., Slukinova O.S., Malinnikova E.Yu., Shibrik E.V., Oglezneva E.E., Mikhailov M.I.**
Belgorod region – the territory endemic for hepatitis E 274
- Gromov K.B., Kireev D.E., Murzakova A.V., Lopatukhin A.E., Kazennova E.V., Bobkova M.R.**
Analysis of HIV-1 (*Human immunodeficiency virus-1, Lentivirus, Orthoretrovirinae, Retroviridae*) Nef protein polymorphism of variants circulating in the former USSR countries 281
- Poltavchenko A.G., Ersh A.V., Taranov O.S., Yakubitskiy S.N., Filatov P.V.**
Rapid immunochemical method for the detection of orthopoxviruses (*Orthopoxvirus, Chordopoxvirinae, Poxviridae*) 291
- Butirskiy A.Yu., Muhacheva A.V., Movsesyants, A. A., Sarkisyan K.A.**
Analysis of determination of rabies virus neutralizing antibody titres in the sera of vaccinated humans 298
- Savinykh N.A., Dehtereva N.V., Savinykh M.V., Kaluzhskich T.I.**
Epizootic characteristics of rabies and rabies assistance in the territory of the Kirov region in the years 2010-2018 306
- Index of articles published in 2019** 311

ОБЗОРЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Акимкин В.Г.¹, Алимов А.В.², Захарова Ю.А.², Болгарова Е.В.², Питерский М.В.², Сисин Е.И.²

Обзор актуальных вопросов диагностики и профилактики гемоконтактных нозокомиальных вирусных инфекций

¹ ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, 111123, г. Москва, Россия;² ФБУН «Екатеринбургский научно-исследовательский институт вирусных инфекций» Роспотребнадзора, 620030, г. Екатеринбург, Россия

Обеспечение инфекционной безопасности в трансплантологии и трансфузиологии является актуальной и значимой задачей, достижение которой зависит от качества медицинского отбора доноров и лабораторной диагностики получаемой крови. В настоящее время известно большое количество вирусов, передающихся гемоконтактным путём, вместе с тем в России при обследовании пациентов в Службе крови перечень тестируемых возбудителей вирусных инфекций ограничивается тремя: ВИЧ, вирусами гепатита С и В.

В обзорной статье на основании данных зарубежной научной литературы показана необходимость внедрения дополнительных лабораторных тестов на возбудители актуальных гемоконтактных вирусных инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, с использованием риск-ориентированного подхода: на конкретных территориях и в группах высокого риска. Представлена методология определения количественного показателя остаточного риска трансфузионного инфицирования для оценки эффективности обеспечения вирусологической безопасности в Службе крови.

Ключевые слова: гемоконтактные нозокомиальные вирусные инфекции; гемотрансфузия; остаточный риск трансфузионного инфицирования; обзор.

Для цитирования: Акимкин В.Г., Алимов А.В., Захарова Ю.А., Болгарова Е.В., Питерский М.В., Сисин Е.И. Обзор актуальных вопросов диагностики и профилактики гемоконтактных нозокомиальных вирусных инфекций. *Вопросы вирусологии*. 2019; 64(6): 262-267. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-6-262-267>

Информация об авторах:Акимкин В.Г., <https://orcid.org/0000-0003-4228-9044>Алимов А.В., <https://orcid.org/0000-0003-0511-9409>Захарова Ю.А., <https://orcid.org/0000-0003-3416-0902>Болгарова Е.В., <https://orcid.org/0000-0001-6140-2546>Питерский М.В., <https://orcid.org/0000-0001-5506-2389>Сисин Е.И., <https://orcid.org/0000-0001-5003-1110>

Для корреспонденции: Захарова Юлия Александровна, доктор медицинских наук, заместитель директора по научной работе ФБУН «Екатеринбургский научно-исследовательский институт вирусных инфекций» Роспотребнадзора, 620030, г. Екатеринбург, ул. Летняя, 23; <https://orcid.org/0000-0003-3416-0902>. E-mail: z.y.alexandrovna@mail.ru

Akimkin V.G.¹, Alimov A.V.², Zakharova Yu.A.², Bolgarova E.V.², Piterskiy M.V.², Sisin E.I.²

Review of current issues of diagnosis and prevention of blood-borne nosocomial viral infections

¹ Central Institute of Epidemiology, Moscow, 111123, Russia;² Yekaterinburg Research Institute of Viral Infections, Yekaterinburg, 620030, Russia

Provision of infection security in transplantology and transfusiology is a challenging and significant problem that depends on the quality of medical donor selection and laboratory diagnosis of the blood collected. At present, a large number of blood-borne viruses are known; nevertheless, in Russia, the list of viral agents to be tested during the examination by the blood service boils down to three ones: HIV, hepatitis C and hepatitis B viruses.

The review article demonstrates the need for implementation of additional laboratory tests for the agents of the priority healthcare-associated blood-borne infections (HAI) using a risk-based approach, i.e., on specified sites and in high risk groups. It presents a methodology for determination of a quantitative blood-induced infection residual risk (BIRR) index to be used while evaluating the efficiency of viral security provision in the blood service.

Keywords: blood-borne nosocomial viral infections; hemotransfusion; residual risk of a blood-induced infection; review.

For citation: Akimkin V.G., Alimov A.V., Zakharova Yu.A., Bolgarova E.V., Piterskiy M.V., Sisin E.I. Review of current issues of diagnosis and prevention of blood-borne nosocomial viral infections. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2019; 64(6): 262-267. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-6-262-267>

For correspondence: Yulia A. Zakharova, Holder of postdoctoral degree in Medicine, Deputy Director for Science, Yekaterinburg Research Institute of Viral Infections, Yekaterinburg, 620030, 23 Letnya str., Russia; <https://orcid.org/0000-0003-3416-0902>. E-mail: z.y.alexandrovna@mail.ru

Information about authors:

Akimkin V.G., <https://orcid.org/0000-0003-4228-9044>
 Alimov A.V., <https://orcid.org/0000-0003-0511-9409>
 Zakharova Yu.A., <https://orcid.org/0000-0003-3416-0902>
 Bolgarova E.V., <https://orcid.org/0000-0001-6140-2546>
 Piterskiy M.V., <https://orcid.org/0000-0001-5506-2389>
 Sisin E.I., <https://orcid.org/0000-0001-5003-1110>

Contribution: approval of the final manuscript – V.G. Akimkin.; supervision, approval of the final manuscript – A.V. Alimov; supervision, literature analysis, article writing, approval of the final manuscript – Yu.A. Zakharova; literature analysis, article edition – E.V. Bolgarova; literature analysis, article edition – M.V. Piterskiy, literature analysis – E.I. Sisin.

Acknowledgments. The study was performed as part of the state task.

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

Received 08 October 2019
 Accepted 28 November 2019

Инфекционная безопасность в современных условиях является одной из актуальных эпидемиологических и клинических проблем, прежде всего при инфекциях, связанных с оказанием медицинской помощи, с гемоконтактным механизмом передачи. В рамках обсуждаемой темы необходимо учитывать риски инфицирования при переливании крови и её компонентов, трансплантации органов и тканей, инвазивных процедурах в случаях нарушения правил асептики, заражения медицинских работников в результате травмы или несчастного случая (проколы, порезы кожных покровов, разбрызгивание заражённой крови с попаданием на кожу или слизистые оболочки).

Особое внимание при гемотрансфузиях следует уделять вопросам качественного отбора доноров, лабораторного исследования донорской крови, карантинизации цельной крови и её компонентов с повторным обследованием доноров (через 6 мес после донации), с применением технологий микробной инактивации плазмы и тромбоцит-содержащих компонентов. Однако остаточные риски трансфузионного инфицирования (ОРТИ) реципиентов невозможно полностью устранить в силу ряда причин.

При расшифровке этиологической структуры инфекционного заболевания, связанного с гемотрансфузией, выбор скрининговых тестов в современных условиях преимущественно базируется на ретроспективных данных о циркуляции наиболее часто встречаемых патогенов. Следовательно, такой скрининг нельзя признать эффективным в отношении новых и редких видов микроорганизмов. Как свидетельствует практика, перечень вирусных патогенов, маркёры которых подлежат обязательному лабораторному исследованию в службе крови (ВИЧ, вирусы гепатита В и С), существенно меньше перечня возбудителей, которые могут передаваться с компонентами крови [1]. Часть из них представлена ниже.

Семейство *Retroviridae*

Вирус иммунодефицита человека 1-го и 2-го типа (HIV-1, HIV-2) относят к роду *Lentivirus*. Лабораторное исследование донорской крови на ВИЧ-инфекцию в соответствии с рекомендациями ВОЗ является обязательным. В странах с высоким уровнем доходов для скрининга донорской крови чаще используют опреде-

ление раннего вирусного антигена р24 ВИЧ-1, антител классов IgM и IgG к HIV-1, HIV-2, а также рибонуклеиновой кислоты (РНК) HIV-1, HIV-2.

T-лимфотропные вирусы человека (HTLV-I, HTLV-II) относят к роду *Deltaretrovirus*. Лабораторное исследование донорской крови на T-лимфотропные вирусы человека является обязательным в службе крови США, большинства европейских стран, в эндемичных странах (Япония, страны Центральной Африки и Карибского бассейна).

Семейство *Hepadnaviridae*

Лабораторное исследование донорской крови на маркёры вируса гепатита В (HBV) является обязательным в службе крови всех стран мира. Набор маркёров для скрининга в службе крови США включает поверхностный антиген HBV (HBsAg), антитела к ядерному антигену HBV (anti-HBc), кроме того, в образцах крови определяется ДНК HBV.

В России вопрос о включении anti-HBc в перечень обязательных маркёров для скрининга обсуждается. Некоторые учреждения РФ внедряют данный маркёр для скрининга донорской крови в инициативном порядке с целью повышения безопасности гемотрансфузий детям и пациентам с иммунодефицитными состояниями (в отделениях трансплантологии). Включение данного маркёра в стандарты оказания медицинской помощи позволит выявлять случаи «оккультного» (скрытого) гепатита В, при котором тесты на HBsAg дают отрицательный результат, а ДНК HBV может иметь низкую концентрацию, не выявляемую после исследования образцов в «минипулах».

Семейство *Flaviviridae*

Вирус гепатита С (HCV) в современной классификации относится к роду *Hepacivirus*, виду *Hepacivirus C* [2]. Лабораторное исследование донорской крови на маркёры HCV является обязательным мероприятием обеспечения безопасности донорской крови. Набор маркёров для скрининга включает определение антител к HCV и РНК HCV. Разрешено дополнительно с РНК HCV определять антиген HCV. Основная проблема выявления маркёров HCV заключается в большом генетическом разнообразии вируса, у которого выявлено более 100 генотипов.

Вирус гепатита G (HGV) в современной классификации относят к роду *Pegivirus*, виду *Pegivirus C* (новая аббревиатура: HPgV – *Human pegivirus*). Связь HGV с вирусным гепатитом у человека считается сомнительной [3].

Human hepegivirus (HHPgV), открытый в 2015 г., был обнаружен как коинфекция при вирусном гепатите C и сначала носил название *Human pegivirus 2* (HPgV-2), однако вскоре был выделен в отдельный вид *Pegivirus H* [4, 5].

Вирусы HPgV и HHPgV до настоящего времени изучены недостаточно. Их скрининг в Службе крови России не проводится.

Угрозу безопасности гемотрансфузий также могут создавать зоонозные вирусные инфекции, передающиеся комарами. Эти инфекции могут быть обусловлены вирусами лихорадки Западного Нила (WNV), лихорадки Денге (DENV) и Зика (ZIKV). Все они относятся к роду *Flavivirus*. В эндемичных странах внедряются мероприятия по скринингу на данные вирусные инфекции [6–9].

Семейство *Hepeviridae*

Вирус гепатита E (HEV) относится к роду *Orthohepevirus*, виду *Orthohepevirus A*. С 2006 по 2013 г. во Франции было зарегистрировано 16 случаев трансфузионной передачи HEV, в Германии – 8 таких случаев (два в 2013 г. и по три в 2014 и 2015 гг.). В Испании первый симптоматический случай заболевания был зарегистрирован в 2015 г. У иммунокомпетентного пациента развились клинические и лабораторные признаки острого гепатита более чем через 1 мес после переливания 8 ед. эритроцитной массы во время и после операции [10]. В настоящее время в европейских странах рассматривается внедрение обязательного скрининга на HEV в службе крови. Ирландия и Великобритания уже внедрили скрининг донорской крови на РНК HEV, Нидерланды и Швейцария планировали начать скрининг с 2017 г. В Германии и Франции скрининг на РНК HEV выполняется в нескольких учреждениях службы крови при исследовании донорской крови для реципиентов из групп высокого риска. В Греции, Португалии, Италии и Испании руководство службы крови продолжает оценивать ситуацию. Дания отказалась от внедрения скрининга донорской крови на РНК HEV.

Семейство *Anelloviridae*

Вирус *Torque Teno* (TTV), относящийся к роду *Alphatorquevirus*, был открыт в 1997 г. в качестве возможного возбудителя посттрансфузионного гепатита в Японии [11].

Несмотря на обнаружение ДНК TTV в гепатоцитах роль данного вируса в этиологии вирусного гепатита не доказана [12, 13]. Известно, что вирус часто обнаруживается в крови практически здоровых лиц и доноров, наряду с другими представителями семейства *Anelloviridae*, однако его связь с клиническими проявлениями инфекции недостаточно изучена. Скрининг в целях обеспечения безопасности крови и её компонентов в России не проводится.

Семейство *Parvoviridae*

Парвовирус человека B19 (PVB19) относится к роду *Erythrovirus*. Вирус вызывает полиартропатию, анемические кризы у лиц с гематологическими заболеваниями (талассемией, серповидно-клеточной анемией), внутриутробную инфекцию плода [14]. К. Nagahar и соавт. сообщали о клинических проявлениях посттрансфузионной парвовирусной инфекции, сопровождавшейся нарушением эритропоэза и тромбоцитопенией [15], несмотря на отрицательный результат скрининга антигена PVB19 в донорской крови. Исследования проведены в Японии, где обязателен скрининг на выявление данного вируса.

Парвовирус человека 4 (PARV4), открытый методом метагеномного секвенирования у пациента с симптомами острой вирусной инфекции [16], передаётся больным гемофилией с препаратами факторов свёртывания крови [17].

Риски трансфузионного инфицирования

Таким образом, как показывает практика, многие вирусные инфекции в стадии виремии у донора могут передаваться с компонентами крови реципиенту. Однако широкое внедрение дополнительных лабораторных тестов для обследования доноров влечёт существенные материальные и временные затраты и диктует необходимость расчёта показателей инцидентности и превалентности по отдельным вирусным инфекциям на конкретных территориях, а также их локального использования в группах риска. Например, определение вирусов из семейства *Herpesviridae* обоснованно у неиммунных лиц или лиц с иммунодефицитными состояниями (онкогематологических больных, новорождённых, пациентов с трансплантированными органами). В период серологического и молекулярно-биологического окна у доноров в настоящее время не определяют маркёры вирусной инфекции, однако компоненты крови могут содержать инфицирующую дозу патогена. Кроме того, современные коммерческие тест-системы не способны выявить часть мутантных форм вирусных антигенов (белков) и нуклеиновых кислот.

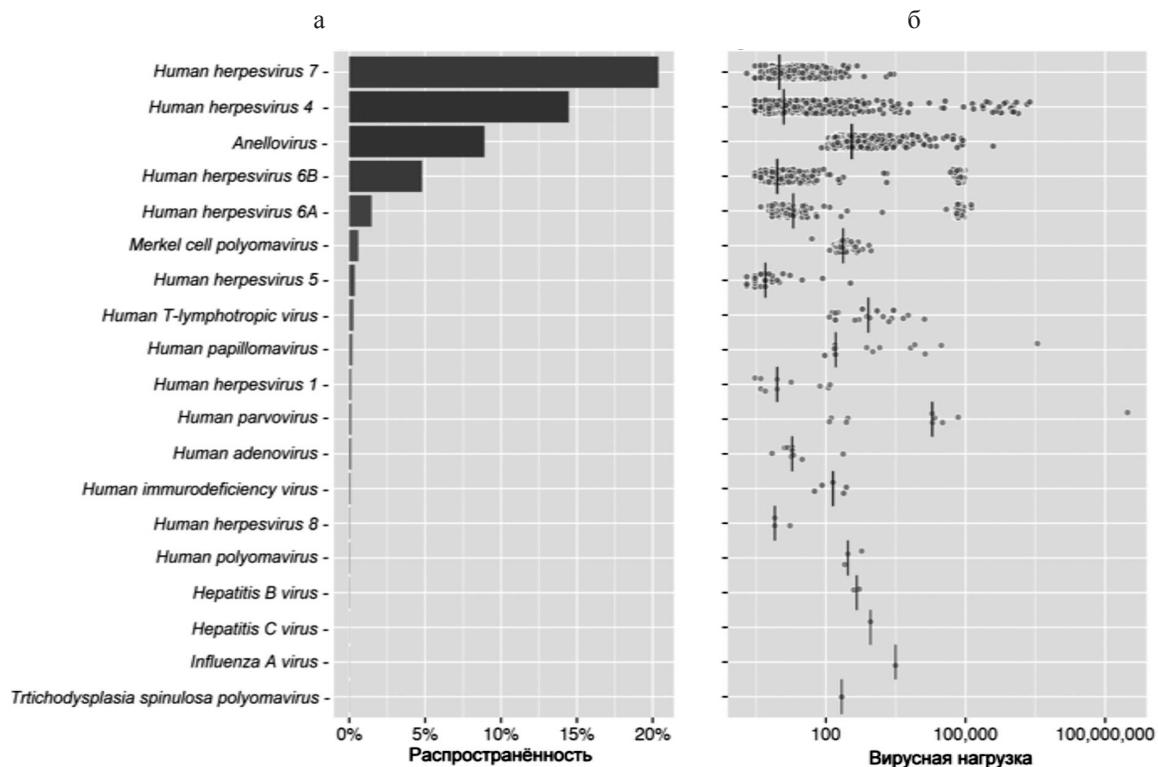
Современным альтернативным подходом к решению обозначенных проблем является исследование виroma (всех идентифицируемых вирусных нуклеотидных последовательностей) в образцах человеческой крови. Одним из решений также является использование готовых данных, полученных в результате полногеномного секвенирования. При этом виде исследования последовательности ДНК-геномных вирусов и провирусов являются побочным продуктом полного секвенирования человеческого генома (РНК-геномные вирусы могут быть обнаружены при секвенировании полного транскриптома). Несмотря на «невидимость» РНК-геномных вирусов (за исключением ретровирусов, образующих ДНК-провирусы), метагеномный подход позволяет оценить превалентность виремии, вирусную нагрузку (в расчёте на 10^5 клеток) и генотипы ДНК-содержащих вирусов у практически здоровых лиц биоинформатическими методами.

Данный подход был реализован А. Moustafa и соавт. (2017) [1], изучившими ряд нуклеотидных последовательностей, не относящихся к человеческому геному, в образцах крови от 8240 лиц. Сдаввшие анализ для полногеномного секвенирования лица не имели установленного диагноза инфекционного заболевания. В рамках биоинформационного анализа были использованы 1,0 петабайта (10^{15} байтов) данных о нуклеотидных последовательностях и выполнено 0,5 трлн сравнений. С учётом предела чувствительности метода (два вирусных генома на 10^5 клеток) были выявлены нуклеотидные последовательности 94 различных вирусов, включая 19 человеческих ДНК-геномных вирусов (см. рисунок), провирусов и даже ДНК-копии фрагментов генома двух РНК-геномных вирусов (вирусов гепатита С и гриппа). У 42% лиц, включённых в исследование, были обнаружены последовательности герпесвирусов, анелловирусов, папилломавирусов, полиомавирусов, аденовирусов, ВИЧ, человеческих Т-лимфотропных вирусов (HTLV), вируса гепатита В, PVB19, вируса гепатита С (в форме ДНК-провируса) и вируса гриппа (ДНК-копии фрагментов генов М1 и М2).

Обнаружение ДНК-копии вируса гепатита С, вероятно, указывало на возможность его интеграции в геном за счёт обратной транскриптазы другого вируса. ДНК-копия вируса гриппа была связана с иммунизацией ДНК-вакциной против гриппа.

Из вирусов, относящихся к семейству *Herpesviridae*, герпесвирус обследованных 7-го типа (HHV-7) был идентифицирован у 1678 (20%) человек, вирус Эпштейна–Барр (EBV/HHV-4) – у 1190 (14%). Герпесвирусы человека 6-го типа (HHV-6А и HHV-6В) обнаружены у 121 (1,5%) и 395 (5%) человек соответственно. Реже встречались нуклеотидные последовательности других герпесвирусов: вируса простого герпеса 1-го типа (HSV1/HHV-1) – у 10 (0,1%) человек, цитомегаловируса (CMV/HHV-5) – у 29 (0,4%), вируса саркомы Капоши (KSHV/HHV-8) – у 3 (0,04%). Провирусная ДНК HIV-1/2 выявлена у 5 (0,06%) человек. Неожиданной оказалась высокая частота обнаружения вирусов из семейства *Anelloviridae* – у 734 (9%) обследованных [18]. В их числе преобладали вирус TTV, относящийся к роду *Alphatorquevirus*, и вирус TTV-like mini virus (TLMV) рода *Betatorquevirus*. У 49 (0,6%) обследованных был обнаружен онкогенный полиомавирус клеток Меркеля (MCPyV), у 13 (0,2%) – папилломавирус (HPV), у 6 (0,1%) – PVB19.

В целом результаты проведённого исследования у практически здоровых людей доказали высокую актуальность изучения виремии с участием ДНК-геномных вирусов: герпесвирусов, анелловирусов, онкогенных полиомавирусов клеток Меркеля, парвовирусов. Поскольку перечисленные инфекции широко распространены как среди доноров, так и среди реципиентов, вероятность клинически выраженного



Ранжированные частоты обнаружения для 19 вирусов человека (а) и вирусная нагрузка, выраженная в количестве копий соответствующего вирусного генома на 100 000 (ядросодержащих) клеток крови (б).

исхода нозокомиальной гемоконтактной инфекции будет определяться наличием типоспецифического иммунитета к конкретному вирусу у конкретного реципиента. Наиболее уязвимыми контингентами риска являются дети и лица с иммунодефицитными состояниями, что обосновывает необходимость вирусинактивации всех переливаемых компонентов крови.

Таким образом, определение ОРТИ является единственным известным объективным количественным показателем обеспечения вирусной безопасности в службе крови. Количественные оценки ОРТИ могут выполняться с помощью трёх основных методических подходов [19].

Мониторинг ОРТИ по результатам ретроспективного эпидемиологического расследования случаев заражения реципиентов обеспечивает получение надёжных фактических значений ОРТИ, однако имеет недостатки. Известно, что инкубационный период для гемотрансмиссивных инфекций составляет недели и месяцы, поэтому не все случаи трансфузионной передачи заканчиваются установлением диагноза и источника инфицирования по причине смертности среди реципиентов, получающих многократные трансфузии и имеющих наибольший риск заражения. Длительные периоды между заражением и установлением диагноза гемотрансмиссивной инфекции могут затруднять разграничение трансфузионного инфицирования и инфицирования другим путём.

Вторым методом является *проспективное эпидемиологическое наблюдение* на больших выборках реципиентов. Метод применяется крайне редко из-за высокой стоимости таких исследований и организационных трудностей при их проведении.

Наконец, *расчётные методы оценки ОРТИ*, которые позволяют вычислить ожидаемые величины рисков, предусматривают идентификацию обстоятельств, способных привести к выдаче инфицированного компонента из службы крови в медицинскую организацию, оценку вероятности отдельных видов риска и суммарную оценку рисков. Рассматривается вероятность донации в раннем периоде серологического окна у донора, когда используемые тесты не выявляют маркёры инфекции, но компоненты крови уже содержат инфицирующую дозу вируса. Данную вероятность можно рассчитывать двумя способами. Во-первых, как произведение инцидентности (первичной заболеваемости конкретной инфекцией среди повторных доноров) и продолжительности серонегативного периода. Во-вторых, исходя из оценки вероятности того, что предыдущая донация у донора с выявленной сероконверсией произошла в период серонегативного окна. Чем выше первичная заболеваемость конкретной инфекцией на определённой территории, тем выше вероятность донации в периоде серонегативного окна. Увеличение чувствительности детекции инфекции за счёт внедрения молекулярно-биологических методов скрининга в службе крови сокращает период серонегативного окна при одной и той же величине инцидентности. Напротив, переход к менее чувствительным методам молекулярно-биологического скри-

нинга увеличивает период окна, а следовательно, и вероятность донации в этом периоде.

Ещё одной составляющей расчётного ОРТИ является вероятность получения ложноотрицательного результата лабораторного теста с выдачей инфицированного компонента крови. Эта вероятность зависит от превалентности, т. е. от распространённости конкретной инфекции на определённой территории, а также от того, что ни один лабораторный тест не обладает абсолютной (100%) чувствительностью. К ложноотрицательным результатам может привести отсутствие чувствительности теста к некоторым субтипам или вариантам вирусов. Таким образом, чем выше распространённость инфекции, тем выше вероятность выдачи инфицированного компонента в результате ложноотрицательного результата по причине недостаточной чувствительности имеющихся тест-систем.

Важной составляющей расчёта ОРТИ также является вероятность ошибки производственного процесса, т. е. ошибки человека или оборудования при регистрации данных, тестировании или выбраковки инфицированных компонентов. Вероятность выдачи инфицированного компонента крови в таких случаях будет зависеть от распространённости конкретной инфекции на определённой территории.

Участие авторов: утверждение окончательного варианта статьи – В.Г. Акимкин; руководство, утверждение окончательного варианта статьи – А.В. Алимов; руководство, анализ литературы, написание статьи, утверждение окончательного варианта статьи – Ю.А. Захарова; анализ литературы, редактирование статьи – Е.В. Болгарова; анализ литературы, редактирование статьи – М.В. Питерский; анализ литературы – Е.И. Сисин.

Финансирование. Работа выполнена в рамках Госзадания (Рег. № НИОКТР АААА-А16-116061710035-3).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Moustafa A., Xie C., Kirkness E., Biggs W., Wong E., Turpaz Y., et al. The blood DNA virome in 8,000 humans. *PLoS Pathog.* 2017; 13(3): e1006292. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006292>
2. Smith D.B., Becher P., Bukh J., Gould E.A., Meyers G., Monath T., et al. Proposed update to the taxonomy of the genera Hepacivirus and Pegivirus within the Flaviviridae family. *J. Gen. Virol.* 2016; 97(11): 2894-907. Doi: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000612>
3. Stapleton J.T., Fong S., Muerhoff A.S., Bukh J., Simmonds P. The GB viruses: a review and proposed classification of GBV-A, GBV-C (HGV), and GBV-D in genus Pegivirus within the family Flaviviridae. *J. Gen. Virol.* 2011; 92 (Pt. 2): 233-46. Doi: <https://doi.org/10.1099/vir.0.027490-0>
4. Genus: Pegivirus – Flaviviridae – Positive sense RNA viruses. International Committee on Taxonomy of Viruses. Available at: http://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae/363/genus-pegivirus/
5. Berg M.G., Lee D., Coller K., Frankel M., Aronson A., Cheng K., et al. Discovery of a novel human Pegivirus in blood associated with Hepatitis C virus co-infection. *PLoS Pathog.* 2015; 11(12): e1005325. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005325>
6. Pisani G., Cristiano K., Pupella S., Liembruno G.M. West Nile virus in Europe and safety of blood transfusion. *Transfus. Med. Hemother.* 2016; 43(3): 158-67.

- Doi: <https://doi.org/10.1159/000446219>
7. Goodnough L.T., Marques M.B. Zika virus and patient blood management. *Anesth. Analg.* 2017; 124(1): 282-9.
Doi: <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000001770>
 8. Marano G., Pupella S., Vaglio S., Liumbruno G.M., Grazzini G. Zika virus and the never-ending story of emerging pathogens and transfusion medicine. *Blood Transfus.* 2016; 14(2): 95-100.
Doi: <https://doi.org/10.2450/2015.0066-15>
 9. Pozzetto B., Memmi M., Garraud O. Is transfusion-transmitted dengue fever a potential public health threat? *World J. Virol.* 2015; 4(2): 113-23.
Doi: <https://doi.org/10.5501/wjv.v4.i2.113>
 10. Domanovic D., Tedder R., Blümel J., Zaaijer H., Gallian P., Niederhauser C., et al. Hepatitis E and blood donation safety in selected European countries: a shift to screening? *Euro Surveill.* 2017; 22(16): pii: 30514.
Doi: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.16.30514>
 11. Nishizawa T., Okamoto H., Konishi K., Yoshizawa H., Miyakawa Y., Mayumi M. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997; 241(1): 92-7.
Doi: <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.7765>
 12. Poovorawan Y., Tangkijvanich P., Theamboonlers A., Hirsch P. Transfusion transmissible virus TTV and its putative role in the etiology of liver disease. *Hepatogastroenterology.* 2001; 48(37): 256-60.
 13. Ali S., Fevery J., Peerlinck K., Verslype C., Schelstraete R., Gyselincx F., et al. TTV infection and its relation to serum transaminases in apparently healthy blood donors and in patients with clotting disorders who have been investigated previously for hepatitis C virus and GBV-C/HGV infection in Belgium. *J. Med. Virol.* 2002; 66(4): 561-6.
 14. Parvoviridae – ssDNA viruses (2011) – ssDNA viruses (2011). International Committee on Taxonomy of Viruses. Available at: http://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/ssdna-viruses-2011/w/ssdna_viruses/151/parvoviridae/
 15. Nagaharu K., Sugimoto Y., Hoshi Y., Yamaguchi T., Ito R., Matsubayashi K., et al. Persistent symptomatic parvovirus B19 infection with severe thrombocytopenia transmitted by red blood cell transfusion containing low parvovirus B19 DNA levels. *Transfusion.* 2017; 57(6): 1414-8.
Doi: <https://doi.org/10.1111/trf.14088>
 16. Jones M.S., Kapoor A., Lukashov V.V., Simmonds P., Hecht F., Delwart E. New DNA viruses identified in patients with acute viral infection syndrome. *J. Virol.* 2005; 79(13): 8230-6.
Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.79.13.8230-8236.2005>
 17. Sharp C.P., Lail A., Donfield S., Gomperts E.D., Simmonds P. Virologic and clinical features of primary infection with human parvovirus 4 in subjects with hemophilia: frequent transmission by virally inactivated clotting factor concentrates. *Transfusion.* 2012; 52(7): 1482-9.
Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2011.03420.x>
 18. Anelloviridae – ssDNA viruses (2011) – ssDNA viruses (2011). International Committee on Taxonomy of Viruses. Available at: http://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/ssdna-viruses-2011/w/ssdna_viruses/139/anelloviridae/
 19. Soldan K., Davison K. How to assess risk: prospective studies and calculations. In: Barbara J.A.J., Regan F.A.M., Contreras M.C., eds. *Transfusion Microbiology*. Cambridge: Cambridge University Press; 2008: 330-40.

Поступила 08.10.19

Принята в печать 28.11.19

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Дерябин П.Г.¹, Гараев Т.М.¹, Финогонова М.П.¹, Одноров А.И.²

Оценка противовирусной активности соединения 2НСI*Н-His-Rim в сравнении с противогриппозным препаратом «Арбидол» в отношении высоковирулентного штамма вируса гриппа A/duck/Novosibirsk/56/05 (H5N1) (*Influenza A virus, Alphainfluenzavirus, Orthomyxoviridae*)

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

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

Введение. Возникновение штаммов вируса гриппа с лекарственной устойчивостью к противовирусным препаратам требует поиска новых соединений, потенциальных ингибиторов прямого действия. Препараты адамантанового ряда, применявшиеся с 1960-х годов, утратили свою активность ввиду возникшей резистентности. Для лечения гриппа Всемирная организация здравоохранения одобрила только препараты – ингибиторы нейраминидазы, такие как занамивир и осельтамивир. В России, Китае и в большинстве республик постсоветского пространства для лечения гриппа активно применяется российский фармацевтический препарат «Арбидол» (Umifenovirum). В данной работе представлено новое производное аминоадамантиана – дихлоргидрат L-гистидил-1-адамантилэтиламин (2НСI*Н-His-Rim), который показал высокий уровень ингибирования штаммов вируса гриппа А *in vitro*.

Цель исследования – сравнение противовирусных свойств нового синтетического низкомолекулярного ингибитора репликации вируса гриппа А и отечественного препарата «Арбидол».

Материал и методы. Соединение 2НСI*Н-His-Rim было получено методами классического пептидного синтеза. Идентифицировано методами масс-спектрометрии, инфракрасной спектроскопии и спектроскопии ядерного магнитного резонанса. Его противовирусные свойства *in vitro* изучены на монослое клеток Vero-E6, инфицированных высоковирулентным штаммом вируса гриппа A/duck/Novosibirsk/56/06 (H5N1) при различных схемах введения исследуемых соединений.

Результаты. Противовирусная активность соединения 2НСI*Н-His-Rim в отношении высокопатогенного штамма вируса гриппа А/H5N1 была несколько выше, чем у известного аптечного препарата «Арбидол».

Обсуждение. Разница в противовирусной активности этих двух соединений объясняется различными механизмами действия на вирусную частицу.

Заключение. Соединение 2НСI*Н-His-Rim ввиду достаточно высокой эффективности, а также экономической и синтетической доступности может быть рекомендовано в качестве кандидата на доклинические и клинические испытания с целью получения этиотропного противовирусного препарата на его основе. Синтетическое соединение 2НСI*Н-His-Rim действует на варианты вируса гриппа А, резистентные к препаратам «Римантадин» и «Амантадин».

Ключевые слова: вирус гриппа А; лекарственная устойчивость; арбидол; противовирусная активность; адамантан.

Для цитирования: Дерябин П.Г., Гараев Т.М., Финогонова М.П., Одноров А.И. Оценка противовирусной активности соединения 2НСI*Н-His-Rim в сравнении с противогриппозным препаратом «Арбидол» в отношении высоковирулентного штамма вируса гриппа A/duck/Novosibirsk/56/05 (H5N1) (*Influenza A virus, Alphainfluenzavirus, Orthomyxoviridae*). *Вопросы вирусологии*. 2019; 64(6): 268-273.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-6-268-273>

Информация об авторах:

Дерябин П.Г., <https://orcid.org/0000-0002-8522-9554>

Гараев Т.М., <https://orcid.org/0000-0002-3651-5730>

Финогонова М.П., <https://orcid.org/0000-0002-3611-3897>

Одноров А.И., <https://orcid.org/0000-0001-9355-2522>

Для корреспонденции: Гараев Тимур Мансурович, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва; <https://orcid.org/0000-0002-3651-5730>. E-mail: tmgaraev@gmail.com

Deryabin P.G.¹, Garaev T.M.¹, Finogenova M.P.¹, Odnovorov A.I.²

Assessment of the antiviral activity of 2HCl*H-His-Rim compound compared to the anti-influenza drug Arbidol for influenza caused by A/duck/Novosibirsk/56/05 (H5N1) (*Influenza A virus, Alphainfluenzavirus, Orthomyxoviridae*)

¹ National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russia;

² Russian Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, 117198, Russia

Introduction. The emergence of influenza virus strains with drug resistance to antiviral drugs requires finding new compounds, potential direct-acting inhibitors. Adamantane compounds drugs used since the 1960s have lost their activity the resulting due to resistance. Only neuraminidase inhibitors such as zanamivir and oseltamivir have been approved by WHO for influenza treatment. The Russian pharmaceutical drug Arbidol (Umifenovirum) is actively used in Russia. This drug is used to treat influenza in Russia, China and most post-Soviet republics. This work presents a new derivative of aminoadamantane - dichlorohydrate L-histidyl-1-adamantyl ethylamine (2HCl*H-His-Rim), which showed a high level of inhibition of strains of influenza virus *A in vitro*.

Objectives. Comparison of antiviral properties of the new synthetic low-molecular inhibitor of influenza A virus replication and Arbidol drug pharmacy.

Methods. The compound 2HCl*H-His-Rim was obtained by classical peptide synthesis methods. It was identified by methods of mass spectrometry, infrared spectroscopy (IR) and nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR). Its antiviral properties have been studied in vitro for monolayer of cells Vero-E6 infected with a high-virulent strain of A/duck/Novosibirsk/56/05 (H5N1) influenza virus at various injection schemes of the investigated compounds.

The results. The antiviral activity of the 2HCl*H-His-Rim compound against the highly pathogenic strain of the influenza A/H5N1 virus was slightly higher than for the known pharmacy drug arbidol.

Discussion. The difference in antiviral activity of these two compounds is explained by different mechanisms of action on the viral particle.

Conclusion. The 2HCl*H-His-Rim compound can be recommended as a candidate for preclinical and clinical trials in order to obtain an etiotropic antiviral drug based on it, due to its high efficacy and economic and synthetic availability. The synthetic compound 2HCl*H-His-Rim acts on influenza A virus variants resistant to Rimantadine and Amantadine.

Keywords: *Influenza A virus; drug resistance; arbidol; antiviral activity; adamantan*

For citation: Deryabin P.G., Garaev T.M., Finogenova M.P., Odnovorov A.I. Assessment of the antiviral activity of 2HCl*H-His-Rim compound compared to the anti-influenza drug Arbidol for influenza caused by A/duck/Novosibirsk/56/05 (H5N1) (*Influenza A virus, Alphainfluenzavirus, Orthomyxoviridae*). *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2019; 64(6): 268-273. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-6-268-273>

For correspondence: Timur M. Garaev, PhD., Lead Researcher of the laboratory of molecular diagnostics «National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-3651-5730>. E-mail: tmgaraev@gmail.com

Information about authors:

Deryabin P.G., <https://orcid.org/0000-0002-8522-9554>

Garaev T.M., <https://orcid.org/0000-0002-3651-5730>

Finogenova M.P., <https://orcid.org/0000-0002-3611-3897>

Odnovorov A.I., <https://orcid.org/0000-0001-9355-2522>

Acknowledgments. The publication has been prepared with the support of the «RUDN university program 5-100».

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

Received 03 December 2019

Accepted 24 December 2019

Введение

Первыми эффективными противогриппозными препаратами были аминопроизводные адамантанового карбоцикла «Римантадин» (Rimantadine) и «Амантадин» (Amantadine) [1]. Соединения адамантанового ряда, а именно аминоадамантаны, использовали для лечения и профилактики гриппа А с 1980-х годов. Их экономическая и синтетическая доступность делала эти препараты идеальными для борьбы с сезонными эпидемиями гриппа во всём мире. Ингибирующее действие этих соединений направлено на протон-проводящую функцию белка М2 [2]. Однако широкое использование препаратов адамантанового ряда в результате химического прессинга на вирус гриппа А привело к генетическим перестройкам, и вирус стал нечувствителен к их действию [3, 4].

У современных циркулирующих штаммов вируса гриппа А/Н1N1pdm2009, А/Н3N2, а также у высоко-вирулентного штамма вируса гриппа А птиц – Н5N1 резистентность к препаратам адамантанового ряда превышает 90%. Согласно Руководству ВОЗ по фармакологическому лечению пандемического гриппа А(Н1N1) 2009 и других вирусов гриппа от 2010 г. [5], современные циркулирующие штаммы вируса гриппа типа А устойчивы к действию производных адамантана, а потому эти препараты больше не рекомендованы для профилактики и лечения гриппа. Стоит отметить, что римантадина гидрохлорид включён в список лекарственных препаратов Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) и рекомендован для лечения гриппа А с указанием, что современные штаммы вируса гриппа устойчивы к амантадину и римантадину.

Резистентность к римантадину обусловлена мутацией в трансмембранном домене протон-проводящего канала, образованного белком М2 вируса гриппа А.

На данный момент Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA) утверждено четыре противовирусных препарата, рекомендованных Центрами по контролю и борьбе с вирусными инфекциями (CDC) в сезоне 2018–2019 г. Три из них являются ингибиторами нейраминидазы: осельтамивир для перорального применения, занамивир для орального вдыхания с помощью ингалятора и периамибир для внутривенного введения. Четвёртый препарат, для перорального применения, балоксавир марбоксил – это ингибитор кэп-зависимой эндонуклеазы, специфического для вируса гриппа фермента в его РНК-полимеразном комплексе, требуемого для вирусной транскрипции. Балоксавир одобрен FDA для использования в США в октябре 2018 г. [6].

В 2000-х годах на протяжении нескольких лет российский фармацевтический препарат «Арбидол» (Umifenovirum) применялся при гриппе и простуде и был самым продаваемым лекарственным средством в России. Данный препарат используется для лечения гриппа в России, Китае и большинстве постсоветских республик. Препарат не включён в «Рекомендации ВОЗ по фармакологическому лечению пандемического гриппа А(H1N1) 2009 и других вирусов гриппа» по причине «недостаточных данных об эффективности или безопасности, либо по обоим причинам» [6]. Однако довольно много данных о механизме действия арбидола на вирусную частицу. Противовирусное действие арбидола направлено на угнетение функции поверхностного гликопротеина вируса гриппа – гемагглютинина (НА). Механизм действия арбидола заключается в ингибировании процесса слияния липидной оболочки вируса с мембранами эндосом. При низком рН внутри эндосомы происходит дестабилизация конформации тримера НА вируса гриппа, что приводит к слиянию мембран, высвобождению нуклеокапсида и началу транскрипции вирусного генома. Арбидол блокирует этот процесс, оставляя вирус в эндосомальных пузырьках без возможности начать размножаться в клетке хозяина [7–10]. Установлено, что арбидол способен индуцировать в клетках

организма выработку собственного (эндогенного) интерферона и активировать фагоцитоз для выделения из организма патогенов. Все эти свойства обеспечили выраженную активность арбидола в отношении антигенных типов вируса гриппа А и В на ранних стадиях репродукции вируса и высокую безопасность препарата [8].

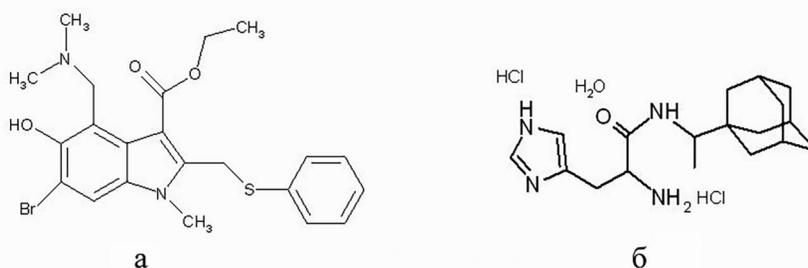
Целью данной работы было сравнение противовирусных свойств арбидола и нового синтетического ингибитора канала М2 класса адамантана (L-гистидил-1-адамантилэтиламин) [11] (см. рисунок) в отношении высоковирулентного штамма вируса гриппа A/duck/Novosibirsk/56/05 (H5N1) *in vitro*.

Материал и методы

При синтезе гистидил-римантадина использовали рацемический римантадин (Zhejiang Kangyu Pharmaceutical Co, Китай), L-гистидин, изо-бутилхлорформат (IBCF), N-метилморфолин (NMM) и субстанцию арбидола гидрохлорид (Sigma-Aldrich, США). Все используемые для конденсации, выделения соединения и удаления защитных групп растворители предварительно очищали и перегоняли по стандартным методикам.

Степень полноты прохождения реакции контролировали с помощью ТСХ на пластинах Silufol (Чехия) в системах элюентов: метанол-хлороформ, 13:60 (А), втор-бутанол – 3% аммиак, 100:44 (В), н-бутанол – уксусная кислота – вода – пиридин, 30:3:12:10 (С). Масс-спектры МАЛДИ получали на масс-спектрометре Bruker autoflex speed (Bruker Daltonics Inc., Германия). Инфракрасные спектры были получены на ИК-спектрометре «Фурье ИнфраЛЮМ ФТ-10». Удельное оптическое вращение полученного соединения определяли в стандартных условиях на автоматическом поляриметре «А1-ЕПЛ» (1% раствор в этиловом спирте, длина кюветы 0,5 дм). Температуру плавления конечного соединения измеряли на приборе «SMP 20» (Stuart Scientific, Великобритания).

Синтез соединения был осуществлен методами классического пептидного синтеза с использованием метода смешанных ангидридов. Аминокислоту гистидина защищали по аминогруппе трет-бутилоксикарбонильной (Boc-) защитой, которая впоследствии удалялась в мягких условиях.



Структурные формулы соединений ингибиторов современных штаммов вируса гриппа.

а – препарат «Арбидол»; б – соединение 2HCl*H-His-Rim.

(*Вос*)₂-*His-OH* (*ди-трет-бутилоксикарбонил-L-гистидин*). 4,0 г (25,78 мМ) гидрохлорида гистидина и 1,13 г (28,25 мМ) NaOH растворяли в смеси 5,0 мл H₂O и 4,0 мл трет-бутилового спирта. При перемешивании при температуре 45–50 °С тремя порциями в течение 2 ч добавляли 12,37 г (56,69 мМ) ди-трет-бутилдикарбоната (пирокарбонат). Вносили 5,0 мл трет-бутилового спирта и оставляли на 18 ч при 5 °С. Реакционную массу разбавляли водой в 1,5 раза и промывали гексаном (15,0 мл × 3). Затем водный раствор подкисляли раствором 3,0 г KHSO₄ в 10,0 мл H₂O до pH 3–3,5.

Полученный продукт экстрагировали этилацетатом (25,0 мл × 3). Этилацетатные вытяжки объединяли и сушили безводным Na₂SO₄, растворитель удаляли в вакууме (50 °С / 15 мм рт.ст.). Оставшееся масло сушили в вакууме до получения сухой белой пены. Выход аморфного продукта 7,55 г (92,8%), R_f 0,41 (А), R_f 0,67 (В), R_f 0,64 (С), [α]_D²⁰ = +26° (с 1, СН₃ОН).

(*Вос*)₂-*His-Rim* (*ди-трет-бутилоксикарбонил-L-гистидил-1-адамантаилэтиламин*). К 1,77 г (5 мМ) (*Вос*)₂-*His-OH* в 10,0 мл СНCl₃ добавляли 0,55 мл (5,0 мМ) NMM. Смесь охлаждали до -25 °С затем добавляли 0,65 мл (5,0 мМ) IBCF. Перемешивали 5 мин и вносили раствор 1,08 г (5,0 мМ) гидрохлорида 1-(1-адамантаил)этиламина в 10 мл СНCl₃ с 0,55 мл (5,0 мМ) NMM. Перемешивали 30 мин при -15 °С, затем ещё 1 ч при 0 °С и оставляли на 18 ч при комнатной температуре.

Растворитель удаляли в вакууме (50 °С / 15 мм рт.ст.). Остаток растворяли в смеси 35,0 мл этилацетата и 10,0 мл H₂O. Раствор последовательно промывали 10% лимонной кислотой (4,0 мл × 1), 0,5н NaHCO₃ (10,0 мл × 2), H₂O (5,0 мл × 1). Органический слой отделяли и сушили безводным Na₂SO₄. Растворитель удаляли на ротонном испарителе (50 °С / 15 мм рт.ст.), получали вспененное масло, которое при растирании в гексане кристаллизуется.

Выход: 3,13 г (83%), R_f 0,86 (А), R_f 0,64 (В), R_f 0,94 (С), [α]_D²⁰ + 6° (с 1, СН₃ОН).

*HCl*H-His-Rim* (*гидрохлорид L-гистидил-1-адамантаилэтиламина*). К раствору 0,15 г (0,36 мМ) (*Вос*)₂-*His-Rim* в 2,0 мл этилацетата при 5 °С добавляли 2,4 мл этилацетата, насыщенного 4н HCl. Реак-

ционную смесь выдерживали в течение 1 ч при 20 °С, периодически помешивая. Прохождение реакции контролировали по ТСХ. По завершении реакции продукт высаждали диэтиловым эфиром. Растворители декантировали. Остаток сушили в вакууме. Полученное масло при растирании в смеси диэтиловый эфир – этиловый спирт (9 : 1) кристаллизовалось. Кристаллы растворяли в минимуме этилового спирта и хроматографировали на колонке с силикагелем (элюент MeOH – СНCl₃ 13 : 66).

Выход 0,11 г (92%). Тпл. 210 °С (с разл.); [α]_D²⁰ + 6°, R_f 0,50 (В), R_f 0,75 (С). Инфракрасная спектроскопия (ИК): ν(NH) – 3248 см⁻¹; ν(NH^{im}) – 3139 см⁻¹; ν(C=O) – 167 см⁻¹. Методом масс-спектрометрии (МС) найдено [M+H]⁺: 317,746; [M+Na]⁺: 339,761; вычислено М (C₁₈H₂₈N₄O) 316,441. Методом спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР): 1H ЯМР (D₂O, м.д.), δ: 8.77 C2(д. 1H J=16.1 Гц), 7.48 C4(д. 1H J=17.1 Гц), 4.29 C5(м. 1H), 3.47 C6(м. 1H), 3.29 C11(м. 2H), 1.79 C10(м. 3H), 1.6-1.3 C7,C8(м. 12H), 0.79 C12(д. 3H J=17.1 Гц). 13C ЯМР (D₂O, м.д.), δ: 166.9(C1), 134.1(C2), 126.3(C3), 118.4(C4), 54.7(C5), 52.5(C6), 37.7(C7), 36.3(C8), 35.1(C9), 27.8(C10), 26.2(C11), 13.1(C12).

Вирус. Вирус получен из Государственной коллекции вирусов Института вирусологии им. Д.И. Иванова «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. В работе использовали высоковирулентный штамм вируса гриппа А птиц (H5N1), A/duck/Novosibirsk/56/05 (H5N1) [12]. Вирусосодержащий материал представлял собой культуральную жидкость, собранную из заражённых вирусом А(H5N1) культур клеток почки эмбриона свиней (СПЭВ) на высоте развития цитопатических проявлений. Инфекционный титр штаммов вируса для культур клеток Vero-V 4,0 lg 50% тканевой цитопатической инфекционной дозы (ТЦИД₅₀/100 мкл). Множественность заражения составляла около 0,1 ТЦИД₅₀/кл.

Клетки. Опыты по выявлению противовирусных свойств соединений проводили на 96-луночных планшетах со сформировавшимся монослоем клеток линии Vero (клетки эпителия почки африканской зеленой маргаритки (*Chlorocebus aethiops*)). Клеточная линия Vero-E6 была чувствительна к репродук-

Подавление репликации вируса гриппа А/H5N1 соединениями в условиях *in vitro*

Время внесения соединений	Соединение	Рабочие концентрации соединений, мкг/мл											Без препаратов
		250,0	125	62,5	31,2	15,6	7,8	3,9	1,9	0,9	0,45	0,22	
количество погибших клеток, %													
За 6 ч до заражения	Арбидол	ЦД ₇₅	0	0	0	50	100	100	100	100	100	100	100
	H-His-Rim	ЦД ₁₀₀	0	0	0	0	0	0	0	0	25	50	100
В момент заражения	Арбидол	ЦД ₇₅	0	0	0	50	100	100	100	100	100	100	100
	H-His-Rim	ЦД ₁₀₀	0	0	0	0	0	0	0	0	50	100	100
Через 6 ч после заражения	Арбидол	ЦД ₇₅	0	0	50	100	100	100	100	100	100	100	100
	H-His-Rim	ЦД ₅₀	5	15	10	5	15	20	40	50	75	100	100

Примечание. ЦД – цитотоксическая доза, при которой погибает 50, 75, или 100% клеточного монослоя в результате токсического действия вещества.

ции вируса гриппа А/Н5N1. Выращивали монослой в пластиковых планшетах с использованием ростовой среды Игла МЭМ («ПанЭко», Москва), соединённой с 7% эмбриональной телячьей сывороткой («ПанЭко», Москва) при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ с добавлением глутамина и антибиотиков (100 ЕД/мл пенициллина и 100 ЕД/мл стрептомицина). Средой поддержки после адсорбции вируса служила среда Игла МЭМ, содержащая глутамин и антибиотики в той же концентрации и 1% сыворотки эмбриона телят (Sigma, США).

Результаты

Оценка противовирусной активности соединения 2HCl*H-His-Rim по сравнению с противогриппозным препаратом «Арбидол» в отношении вируса A/duck/Novosibirsk/56/05 (H5N1). Противовирусную активность исследуемых соединений тестировали *in vitro* в трёх схемах внесения соединений и вируса на монослой клеток: за 6 ч до заражения вирусом (профилактический эффект соединения), в момент заражения (лечебно-профилактический эффект) и через 6 ч после заражения (лечебный эффект). Противовирусную активность соединений определяли по состоянию клеточного монослоя после окрашивания метиленовой синькой с помощью цитометра. В опыте изучали способность соединений защищать клеточный монослой (% выживших клеток) Vero-E6 от цитопатического действия высоковирулентного штамма вируса гриппа A/duck/Novosibirsk/56/06 (H5N1) [12] при различных схемах введения и концентрациях исследуемых соединений.

Готовили растворы соединений: H-His-Rim 10 мг в 1 мл H₂O, арбидол 10 мг в DMSO, после чего делали 10-кратные разведения каждого соединения на среде Игла МЭМ и получали концентрацию препаратов, равную 1,0 мг/мл. Затем делали двукратные разведения препаратов и в опытах использовали разведения соединений от 1 : 4 до 1 : 4096, что соответствовало концентрациям препаратов от 250 до 0,22 мкг/мл. По 50 мкл каждой из полученных концентраций вносили в лунки с монослоем клеток. Данные представлены в таблице.

Видно, что производное римантадина гидрохлорида с остатком гистидина эффективно защищало монослой клеток Vero-E6, в предложенных схемах внесения соединения ИД₅₀ составила:

0,22 мкг/мл (0,00094 μM) до инфицирования;

0,45 мкг/мл (0,0014 μM) для одномоментного введения;

0,9 мкг/мл (0,0028 μM) для лечебной схемы введения.

Препарат «Арбидол» достигал ИД₅₀ при более высоких концентрациях. ИД₅₀ составила 15,6 мкг/мл (0,032 μM) для схем до инфицирования и одномоментного введения и 31,2 мкг/мл (0,065 μM) для лечебной схемы введения.

Токсичность ЦД₅₀ соединений в отношении клеточного монослоя Vero-E6 оказалась соизмеримой, несколько менее 250 мкг/мл или около 0,5 μM (см. табли-

цу). Аналогичные результаты ЦД₅₀ для арбидола в отношении клеточной линии Vero получили авторы [13].

Обсуждение

Экономически доступный и выгодный путь, позволяющий восстановить противовирусную активность карбоцикла адамантана, это присоединение к его аминогруппе дополнительных функционально-активных групп (имдазольной, гуанидиновой и др.), используя аминокислоты или пептиды. Аминокислоты и другие физиологически активные соединения конденсировали с римантадином методами классического пептидного синтеза и в результате биологического скрининга было отобрано соединение-лидер 2HCl*H-His-Rim [14].

В результате сравнения противовирусных свойств *in vitro* в отношении высоковирулентного штамма А/Н5N1 предложенного соединения и коммерческого препарата «Арбидол» были получены различные значения. Разница в уровне противовирусной активности этих двух соединений объясняется различными механизмами действия на вирусную частицу. Предположительный механизм действия H-His-Rim, вероятно, сходен с механизмом действия римантадина, т.е. он является блокатором протон-селективного канала M2 в оболочке вируса гриппа А.

Заключение

Полученные значения эффективных концентраций для соединения 2HCl*H-His-Rim в отношении высокопатогенного штамма вируса гриппа А/Н5N1 были несколько меньше, чем для известного лекарственного препарата «Арбидол». Таким образом, предложенное синтетическое соединение проявляло противовирусный эффект при меньших концентрациях, чем арбидол. Соединение 2HCl*H-His-Rim ввиду его достаточно высокой эффективности, а также экономической и синтетической доступности может быть рекомендовано в качестве кандидата на доклинические и клинические испытания с целью получения этиотропного противовирусного препарата на его основе. Такой препарат может быть использован и для профилактики, и для лечения заболевания, вызванного современными штаммами вирусов гриппа А, как самостоятельное средство, так и в составе комплексной терапии.

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1-10, 13 см. REFERENCES)

11. Дерябин П.Г., Гараев Т.М., Финогенова М.П., Ботиков А.Г., Шибнев В.А. Аминокислотные производные адамантанового карбоцикла способны ингибировать репликацию высоковирулентного вируса птичьего гриппа А/Н5N1. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2014; 157(1): 73-6.
12. Прилипов А.Г., Львов Д.К., Щелканов М.Ю., Алипер Т.И., Дерябин П.Г., Непоклонов Е.А. и др. Метод первичной изоляции штаммов вируса гриппа А, штамм virus A/duck/Novosibirsk/56/05 H5N1 для приготовления диагностических,

профилактических и лечебных препаратов, для оценки противовирусной активности различных соединений. Патент РФ 2309983; 2005.

14. Шибнев В.А., Гараев Т.М., Финогенова М.П., Шевченко Е.С., Бурцева Е.И. Некоторые пути преодоления резистентности вирусов гриппа А к препаратам адамантанового ряда. *Химико-фармацевтический журнал*. 2012; 46(1): 36-40.

REFERENCES

1. Stouffer A.L., Acharya R., Salom D., Levine A.S., Di Costanzo L., Soto C.S., et al. Structural basis for the function and inhibition of an influenza virus proton channel. *Nature*. 2008; 451(7178): 596-9. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature06528>
2. Duong-Ly K.C., Nanda V., Degrado W.F., Howard K.P. The conformation of the pore region of the M2 proton channel depends on lipid bilayer environment. *Protein Sci*. 2005; 14(4): 856-61. DOI: <https://doi.org/10.1110/ps.041185805>
3. Bright R.A., Medina M.J., Xu X., Perez-Oronoz G., Wallis T.R., Davis X.M., et al. Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern. *Lancet*. 2005; 366(9492): 1175-81. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67338-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67338-2)
4. Wang C., Takeuchi K., Pinto L.H., Lamb R.A. Ion channel activity of influenza A virus M2 protein: characterization of the amantadine block. *J. Virol*. 1993; 67(9): 5585-94.
5. WHO Guidelines for Pharmacological Management of Pandemic Influenza A(H1N1) 2009 and other Influenza Viruses: Part I. Geneva: WHO; 2010.
6. Centers for Disease Control and Prevention Recommendations: CS HCVG-15-FLU-107; 2018.
7. Boriskin Y., Leneva I., Pécheur E.I., Polyak S.J. Arbidol: a broad-spectrum antiviral compound that blocks viral fusion. *Curr. Med. Chem*. 2008; 15(10): 997-1005. DOI: <https://doi.org/10.2174/092986708784049658>
8. Leneva I.A., Russell R.J., Boriskin Y.S., Hay A.J. Characteristics of arbidol-resistant mutants of influenza virus: implications for the mechanism of anti-influenza action of arbidol. *Antiviral Res*. 2009; 81(2): 132-40. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2008.10.009>
9. Nasser Z.H., Swaminathan K., Müller P., Downard K.M. Inhibition of influenza hemagglutinin with the antiviral inhibitor arbidol using a proteomics based approach and mass spectrometry. *Antiviral Res*. 2013; 100(2): 399-406. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.08.021>
10. Brancato V., Peduto A., Wharton S., Martin S., More V., Di Mola A., et al. Design of inhibitors of influenza virus membrane fusion: synthesis, structure-activity relationship and in vitro antiviral activity of a novel indole series. *Antiviral Res*. 2013; 99(2): 125-35. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.05.005>
11. Deryabin P.G., Garaev T.M., Finogenova M.P., Botikov A.G., Shибнев V.A. Amino Acid Derivatives of Adamantane Carbocycle are Capable of Inhibiting Replication of Highly Virulent Avian Influenza A/H5N1 Virus. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2014; 157(1): 73-6. (in Russian)
12. Prilipov A.G., L'vov D.K., Shchelkanov M.Yu., Aliper T.I., Deryabin P.G., Nepoklonov E.A., et al. Method of primary isolation of strains of influenza A virus, strain virus A/duck/Novosibirsk/56/05 H5N1 for preparation of diagnostic, prophylactic and medical preparations, for evaluation of antiviral activity of different compounds. Patent RF 2309983; 2005. (in Russian)
13. Haviernik J., Štefáňik M., Fojtíková M., Kali S., Tordo N., Rudolf I., et al. Arbidol (Umifenovir): A Broad-Spectrum Antiviral Drug That Inhibits Medically Important Arthropod-Borne Flaviviruses. *Viruses*. 2018; 10(4): E184. DOI: <https://doi.org/10.3390/v10040184>
14. Шибнев В.А., Гараев Т.М., Финогенова М.П., Шевченко Е.С., Бурцева Е.И. Some Pathways to Overcoming Drug Resistance of Influenza a Virus. *Xhimiko-farmatsevticheskiy zhurnal*. 2012; 46(1): 36-40. (in Russian)

Поступила 03.12.19

Принята в печать 24.12.19



Кюрегян К.К.^{1,2}, Поляков А.Д.^{3,4}, Потемкин И.А.^{1,2}, Карлсен А.А.^{1,2}, Исаева О.В.^{1,2}, Лопатухина М.А.¹, Муллин Е.В.¹, Слукинова О.С.¹, Малинникова Е.Ю.^{1,2}, Щибрик Е.В.⁵, Оглезнева Е.Е.^{4,6}, Михайлов М.И.^{1,2}

Белгородская область – эндемичный по гепатиту E регион

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 105064, г. Москва, Россия;

² ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, 125993, г. Москва, Россия;

³ Сколковский территориальный отдел Управления Роспотребнадзора по городу Москве, 143026, г. Москва, Россия;

⁴ ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», 308015, г. Белгород, Россия;

⁵ Департамент здравоохранения и социальной защиты населения Белгородской области, 308005, г. Белгород, Россия;

⁶ Управление Роспотребнадзора по Белгородской области, 308023, г. Белгород, Россия

Введение. Белгородская область – регион с наиболее высокой регистрируемой заболеваемостью гепатитом E (ГЕ) в Российской Федерации.

Целью исследования была всесторонняя характеристика циркуляции вируса гепатита E (ВГЕ) в Белгородской области, включающая изучение популяционного иммунитета к вирусу, определение распространённости инфекции среди поголовья свиней и анализ генетического разнообразия ВГЕ, выделяемого от заболевших людей и от животных.

Материал и методы. Образцы сыворотки крови условно здорового населения ($n = 2027$) всех возрастных групп тестировали на анти-ВГЕ IgG и IgM методом иммуноферментного анализа с коммерческими диагностикумами. РНК ВГЕ определяли в образцах фекалий от свиней в возрасте 2–4 мес ($n = 526$), в сточных водах свиноферм ($n = 10$), а также в образцах стула пациентов с ГЕ ($n = 6$) методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией. Филогенетический анализ выполняли для амплифицированного фрагмента длиной 300 нт, соответствующего открытой рамке считывания 2 ВГЕ.

Результаты и обсуждение. Частота выявления анти-ВГЕ IgG среди условно здорового населения составила в среднем 16,4% (95% доверительный интервал (ДИ) 14,8–18,1; 332/2027). Доля лиц, имевших одновременно анти-ВГЕ IgM и IgG, составила в среднем 2,8% (95% ДИ 2,2–3,6; 57/2027). Частота выявления анти-ВГЕ IgG имела чёткую тенденцию к росту с возрастом, увеличиваясь от 2,8% (95% ДИ 1,3–5,8) среди детей в возрасте 1–14 лет до 40,1% (95% ДИ 34,9–45,6) среди лиц в возрасте 70 лет и старше. Частота выявления РНК ВГЕ среди обследованного поголовья свиней составила 20% (95% ДИ 16,8–23,6; 105/526). В 2 из 10 образцов сточных вод была выявлена РНК ВГЕ. Последовательности ВГЕ, выделенные на территории Белгородской области от заболевших людей, от свиней и из образцов сточных вод, принадлежали генотипу 3 ВГЕ, имели между собой степень сходства 95–100% и формировали единые кластеры на филогенетическом дереве.

Заключение. Широкое распространение ВГЕ среди поголовья свиней послужило причиной формирования эндемичного региона на территории Белгородской области, являющейся центром свиноводства. Для контроля за ВГЕ-инфекцией необходимы мероприятия, направленные на снижение циркуляции ВГЕ среди поголовья свиней и обеззараживание сточных вод свиноферм.

Ключевые слова: гепатит E; вирус гепатита E; зооноз.

Для цитирования: Кюрегян К.К., Поляков А.Д., Потемкин И.А., Карлсен А.А., Исаева О.В., Лопатухина М.А., Муллин Е.В., Слукинова О.С., Малинникова Е.Ю., Щибрик Е.В., Оглезнева Е.Е., Михайлов М.И. Белгородская область – эндемичный по гепатиту E регион. *Вопросы вирусологии*. 2019; 64(6): 274-280.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-6-274-280>

Информация об авторах:

Кюрегян К.К., <http://orcid.org/0000-0002-3599-117X>

Поляков А.Д., <https://orcid.org/0000-0002-7140-2897>

Потемкин И.А., <https://orcid.org/0000-0001-7559-4219>

Карлсен А.А., <https://orcid.org/0000-0002-6013-7768>

Исаева О.В., <https://orcid.org/0000-0002-2656-3667>

Лопатухина М.А., <https://orcid.org/0000-0001-6853-4154>

Малинникова Е.Ю., <https://orcid.org/0000-0002-5501-5707>

Михайлов М.И. <https://orcid.org/0000-0002-6636-6801>

Для корреспонденции: Кюрегян Карен Каренович, доктор биологических наук, главный научный сотрудник Научно-исследовательского института молекулярной и персонализированной медицины ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, ведущий научный сотрудник лаборатории вирусных гепатитов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 105064, г. Москва; <http://orcid.org/0000-0002-3599-117X>. E-mail: karen-kyuregyan@yandex.ru

Kyuregyan K.K.^{1,2}, Polyakov A.D.^{3,4}, Potemkin I.A.^{1,2}, Karlsen A.A.^{1,2}, Isaeva O.V.^{1,2}, Lopatukhina M.A.¹, Mullin E.V.¹, Slukinova O.S.¹, Malinnikova E.Yu.^{1,2}, Shibrik E.V.⁵, Oglezneva E.E.^{4,6}, Mikhailov M.I.^{1,2}

Belgorod region – the territory endemic for hepatitis E

¹ Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, 105064, Russia;

² Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, 125993, Russia;

³ Skolkovo Territorial Division of the Office of Rospotrebnadzor for the City of Moscow Russia, Moscow, 143026, Russia;

⁴ Belgorod State National Research University, Belgorod, 308015, Russia;

⁵ Department of Health and Social Protection of the Population of Belgorod Region, Belgorod, 308005, Russia;

⁶ Belgorod Regional Department of Rospotrebnadzor, Belgorod, 308023, Russia

Introduction. Belgorod region is the territory with the highest incidence of hepatitis E in the Russian Federation.

The aim of the study was to comprehensively characterize the circulation of hepatitis E virus (HEV) in the Belgorod region, including the study of population immunity to the virus, determining the prevalence of infection among the pig population and analysis of the genetic diversity of HEV from patients and animals.

Material and methods. Serum samples of a conditionally healthy population ($n = 2027$) of all age groups were tested for anti-HEV IgG and IgM by ELISA with commercial assays. HEV RNA was determined in fecal samples from pigs aged 2–4 months ($n = 526$), in sewage samples from pig farms ($n = 10$), as well as in stool samples from patients with hepatitis E ($n = 6$) using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Phylogenetic analysis was performed for an amplified 300 nt fragment corresponding to HEV open reading frame 2.

Results and discussion. The prevalence of anti-HEV IgG in general population averaged 16.4% (95% CI: 14.8–18.1; 332/2027). The proportion of individuals who had both anti-HEV IgM and IgG averaged 2.8% (95% CI: 2.2–3.6; 57/2027). The incidence rate of anti-HEV IgG increased with age, from 2.8% (95% CI: 1.3–5.8) in children aged 1–14 years to 40.1% (95% CI: 34.9–45.6) in people 70 years or older. The detection rate of HEV RNA in pigs was 20% (95% CI: 16.8–23.6; 105/526). HEV RNA was detected in 2 out of 10 sewage samples. The HEV sequences isolated from patients with hepatitis E, pigs, and sewage samples in Belgorod region belonged to the HEV genotype 3, had a 95–100% homology, and formed common clusters on a phylogenetic tree.

Conclusions. The high prevalence of HEV in pigs population has led to the formation of an endemic territory in the Belgorod region, which is the center of pig breeding. Measures aimed at reducing the circulation of HEV among pig population and decontamination of sewage from pig farms are necessary to control HEV infection.

Keywords: hepatitis E; hepatitis E virus; zoonosis.

For citation: Kyuregyan K.K., Polyakov A.D., Potemkin I.A., Karlsen A.A., Isaeva O.V., Lopatukhina M.A., Mullin E.V., Slukinova O.S., Malinnikova E.Yu., Shibrik E.V., Oglezneva E.E., Mikhailov M.I. Belgorod region – the territory endemic for hepatitis E. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2019; 64(6): 274–280. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-6-274-280>

For correspondence: Karen K. Kyuregyan, Dr. Sci. Biol., Chief Researcher of the Research Institute of Molecular and Personalized Medicine at Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Lead Researcher of laboratory of viral hepatitis «I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera», Moscow, 105064, Russia; <http://orcid.org/0000-0002-3599-117X>. E-mail: karen-kyuregyan@yandex.ru

Information about authors:

Kyuregyan K.K., <http://orcid.org/0000-0002-3599-117X>

Polyakov A.D., <https://orcid.org/0000-0002-7140-2897>

Potemkin I.A., <https://orcid.org/0000-0001-7559-4219>

Karlsen A.A., <https://orcid.org/0000-0002-6013-7768>

Isaeva O.V., <https://orcid.org/0000-0002-2656-3667>

Lopatukhina M.A., <https://orcid.org/0000-0001-6853-4154>

Malinnikova E.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-5501-5707>

Mikhailov M.I., <https://orcid.org/0000-0002-6636-6801>

Acknowledgments. The study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Agreement № 075-15-2019-1481 from 15.08.2019, unique identifier of the project RFMEFI61319X0091).

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

Received 08 December 2019

Accepted 24 December 2019

Введение

Вирус гепатита E (ВГЕ) является представителем семейства *Hepeviridae* рода *Orthohepevirus* и имеет одноцепочечный РНК-содержащий геном положительной полярности [1]. Ежегодно регистрируется около 3 млн случаев гепатита E (ГЕ), преимущественно в развивающихся странах тропического пояса, и более 44 тыс. летальных исходов заболевания, в основном среди беременных женщин [2]. Накопленные за последние годы сведения о циркуляции ВГЕ в странах умеренного климата позволили пересмотреть подход к ГЕ как к исключительно региональной проблеме. Возросший интерес к ГЕ обусловлен ростом завозных (автохтон-

ных) случаев заболевания в странах, ранее считавшихся неэндемичными, относительно высокой частотой выявления антител к ВГЕ у населения этих регионов, а также данными о возможности неврологических проявлений ВГЕ-инфекции и её хронизации у пациентов с иммуносупрессией.

Эпидемиология ГЕ определяется генотипом вируса. ВГЕ-инфекция, вызываемая генотипами 1 и 2 ВГЕ, является антропонозом и широко распространена в тропических странах. Ведущий путь передачи этих генотипов – водный, его реализация приводит к возникновению вспышек и многочисленных спорадических случаев. За исключением завозных случаев,

ВГЕ генотипов 1 и 2 не встречается в странах с умеренным климатом [3]. Генотипы ВГЕ 3 и 4 способны, помимо человека, инфицировать копытных животных (домашние и дикие свиньи, олени), которые являются основным резервуаром ВГЕ в странах умеренного климата [4]. Таким образом, инфекция, вызываемая 3 и 4 генотипами ВГЕ, представляет собой антропозооноз и, по-видимому, относительно часто протекает бессимптомно, что приводит к образованию анамнестических антител (анти-ВГЕ IgG) у большого числа лиц, не имевших в анамнезе острый гепатит [5]. В среднем частота выявления анти-ВГЕ IgG на неэндемичных территориях варьирует от 4 до 16%, в зависимости от страны, обследованных контингентов и аналитических характеристик применявшихся диагностикумов [6].

Особый интерес представляют отдельные территории в неэндемичных по ГЕ регионах, где регистрируется повышенная заболеваемость ГЕ и отмечается интенсивная циркуляция ВГЕ. Такой территорией является юго-запад Франции [7], где регулярно регистрируются случаи заболевания ГЕ, а распространённость анти-ВГЕ IgG среди первичных доноров крови составляет 52% [8]. Предположительно, подобный регион есть и на территории РФ. В 2011 г. в Белгородской области было отмечено резкое увеличение числа случаев ГЕ, всего зарегистрировано 88 заболевших (5,8 на 100 тыс. населения). В 2011–2013 гг. среди населения в Белгородской области было зарегистрировано более 100 случаев острого ГЕ. При этом в структуре всех вирусных гепатитов ГЕ в регионе составил 54,4%, а количество заболевших острым гепатитом А (ОГА) было более чем в два раза меньше (32 человека) [9]. В последующие годы заболеваемость ГЕ в Белгородской области несколько снизилась, однако и в настоящее время этот регион лидирует (0,52 на 100 тыс. населения против 0,26 на 100 тыс. населения в среднем по России в 2017 г.).

Цель данного исследования – всесторонняя характеристика циркуляции ВГЕ в Белгородской области, включающая изучение популяционного иммунитета к вирусу, определение распространённости инфекции среди поголовья свиней и анализ генетического разнообразия ВГЕ, выделяемого от заболевших людей и от животных.

Материал и методы

Исследованы образцы сыворотки крови условно здорового населения Белгородской области. В исследование были включены 8 возрастных когорт: 1 год – 14 лет, 15–19, 20–29, 30–39, 40–49, 50–59, 60–69, 70 лет и старше. Соотношение полов во всех возрастных когортах было примерно равным. Всего обследованы 2027 человек, что составляет около 0,13% от населения области (1 547 418 человек по данным Росстата на 2019 г. [http://www.gks.ru/free_doc/new_site/population/demo/Popul2019.xls]). В исследование включали лиц, проходящих рутинную диспансеризацию; посетителей вакцинального кабинета, проходящих рутинную вакцинацию; па-

циентов, посещающих поликлинику по причинам, не связанным с инфекционными заболеваниями.

Информированное согласие и анкеты с демографическими данными, сведениями о перенесённых заболеваниях печени и факторах риска инфицирования вирусными гепатитами были получены от всех участников исследования. При включении в исследование все участники проходили первичное медицинское обследование, подтвердившее отсутствие у них признаков острого заболевания печени.

Анти-ВГЕ классов IgG и IgM определяли во всех образцах сыворотки крови методом иммуноферментного анализа с использованием наборов реагентов «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G» и «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-M» (НПО «Диагностические системы», Россия), согласно инструкции производителя.

Для мониторинга циркуляции ВГЕ были протестированы на РНК ВГЕ образцы фекалий 526 свиней в возрасте от 2 до 4 мес, собранные на четырёх фермах Белгородской области. Также на РНК ВГЕ исследовали 10 образцов сточных вод двух из четырёх обследованных свиноферм (по 5 образцов с каждой). Образцы сточных вод концентрировали из исходного объёма 5 л до 1 мл с помощью коммерческого набора «Вирсорб-М» (ЗАО БТК «Биосервис», Россия). Метод концентрирования основан на связывании отрицательно заряженных вирусных частиц на поверхности магнитных частиц, покрытых полимером диоксида кремния [10]. Нуклеиновые кислоты выделяли из концентрата объёмом 1 мл с помощью набора «MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Large Volume Kit I – Large Volume» (Roche Applied Science, Германия).

Кроме того, на РНК ВГЕ были исследованы образцы стула от 6 пациентов с диагнозом «острый ГЕ», проживавших в Белгородской области.

Для выделения нуклеиновых кислот из образцов фекалий готовили 10% осветлённый фекальный экстракт. Из него выделяли нуклеиновые кислоты на приборе «MagNA Pure Compact» (Roche Diagnostics Ltd., Швейцария) с использованием наборов для выделения «MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I» из 400 мкл образца. РНК ВГЕ определяли методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) по описанной ранее методике [11]. Продукты ПЦР величиной 350 пар оснований вырезали из агарозного геля и очищали с помощью набора «QIAquick Gel Extraction kit» (QIAGEN, США). Первичную нуклеотидную последовательность определяли на автоматическом секвенаторе «3500 Genetic Analyzer» (ABI, США) с использованием набора «Big Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit». Выравнивание всех нуклеотидных последовательностей ВГЕ выполняли с помощью программного обеспечения MEGA 7.0.18. Филогенетический анализ выполняли для фрагмента длиной 300 нт, соответствующего ОРС2 ВГЕ (нуклеотидные позиции 5996–6295, нумерация по штамму M73218) с референсными последовательностями для известных субгенотипов ВГЕ, предложенными D.B. Smith и соавт. [12]. Филогене-

Таблица 1

Частота выявления анти-ВГЕ IgG и IgM среди условно здорового населения Белгородской области

Возрастная группа, годы	Число обследованных	<i>p</i>	Анти-ВГЕ IgG, % (95% ДИ*)	Анти-ВГЕ IgG + IgM, % (95% ДИ)	<i>p</i>
1–14	250	< 0,01	2,8 (1,3–5,8)	0,4 (0,1–2,5)	< 0,05
15–19	266		7,5 (4,9–11,4)	2,3 (0,9–5,0)	
20–29	258		8,1 (5,3–12,2)	1,6 (0,5–4,1)	
30–39	260	< 0,01	9,2 (6,2–13,4)	1,5 (0,5–4,0)	< 0,05
40–49	261		16,1 (12,1–21,1)	4,2 (2,3–7,5)	
50–59	239		20,1 (16,2–26,5)	4,2 (2,2–7,6)	
60–69	174	< 0,01	23,0 (17,3–29,8)	5,2 (2,6–9,7)	> 0,05
70 и старше	319		40,1 (34,9–45,6)	3,8 (2,1–6,5)	

Примечание. * 95% доверительный интервал.

тические деревья строили с помощью PHYLML 3.0 по модели GTR (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>) с использованием метода корректировки деревьев SPR (http://www.atgc-montpellier.fr/download/papers/phyml_spr_2005.pdf) и Байесовского теста (<https://academic.oup.com/sysbio/article/60/5/685/1644562>). Аннотацию деревьев выполняли с помощью TreeAnnotator v.1.8.4 для 1000 повторов и визуализировали с помощью FigTree v.1.4.3.

Статистическую обработку данных выполняли с помощью программ Excel 2010 и GraphPadPrism 4. Рассчитывали 95% доверительный интервал (ДИ) и критерий χ^2 для определения достоверности различий между средними значениями показателей в сравниваемых группах (различия оценивали как достоверные при $p < 0,05$).

Результаты

Анти-ВГЕ IgG были выявлены в среднем среди 16,4% (95% ДИ 14,8–18,1; 332/2027) условно здорового населения Белгородской области. Доля лиц, имевших одновременно анти-ВГЕ IgM и IgG, составила в среднем 2,8% (95% ДИ 2,2–3,6; 57/2027). Распределение серопозитивных случаев по возрастным группам обследованного населения приведено в табл. 1. Частота выявления анти-ВГЕ IgG имела чёткую тенденцию к росту с увеличением возраста обследованного населения. Отмечено несколько возрастных групп, в которых происходит статистически значимый подъём частоты выявления анти-ВГЕ IgG по сравнению с младшими возрастными группами: 15–19, 40–49, 70 лет и старше (см. табл. 1). Статистически значимое увеличение доли лиц, позитивных одновременно по анти-ВГЕ IgM и IgG, также было отмечено в возрастных группах 15–19 и 40–49 лет по сравнению с младшими возрастными группами (см. табл. 1). Различия по частоте выявления анти-ВГЕ IgM и IgG между группами 60–69 лет и 70 лет и старше не были статистически значимыми.

Результаты выявления РНК ВГЕ в образцах фекалий свиней в возрасте 2–4 мес приведены в табл. 2. Случаи ВГЕ-инфекции у свиней были выявлены на всех четырёх обследованных фермах. В среднем частота выявления РНК ВГЕ среди обследованного поголовья животных составила 20% (95% ДИ 16,8–23,6; 105/526).

Таблица 2

Частота выявления РНК ВГЕ в образцах фекалий домашних свиней

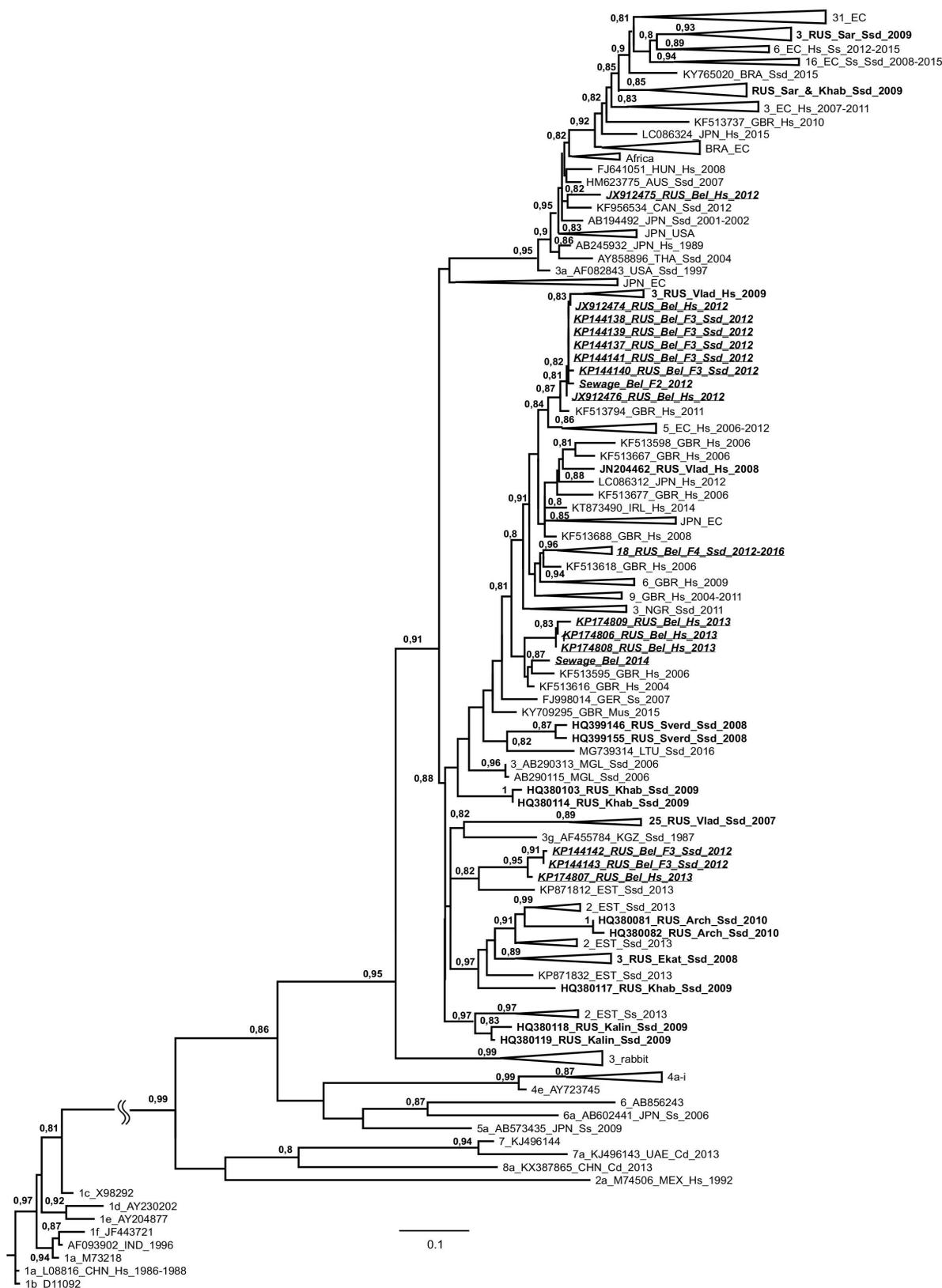
Ферма, №	Число исследованных образцов фекалий	Число образцов, позитивных по РНК ВГЕ (% [95% ДИ*])
1	69	5 (7,25 [2,8–16,2])
2	107	4 (3,74 [1,2–9,5])
3	101	50 (49,50 [40,0–59,1])
4	249	46 (18,5 [14,1–23,8])

Примечание. * 95% доверительный интервал.

В 2 из 10 образцов сточных вод свиноферм также была выявлена РНК ВГЕ. На рисунке представлены результаты филогенетического анализа последовательностей ВГЕ, выделенных от заболевших ГЕ жителей Белгородской области, от домашних свиней из этого региона и из сточных вод свиноферм, а также последовательностей ВГЕ от свиней из других регионов РФ (Архангельской, Владимирской, Калининградской, Саратовской, Свердловской областей и Хабаровского края). Все выделенные на территории РФ последовательности ВГЕ относились к генотипу 3 ВГЕ и, как правило, образовывали специфические для каждого региона кластеры. Последовательности ВГЕ, выделенные на территории Белгородской области от заболевших людей, от свиней и из образцов сточных вод, группировались вместе, что указывает на наличие эпидемиологической связи между ними. В одном случае последовательности, выделенные из сточных вод, были идентичны последовательностям, полученным от заболевшего человека и от свиней на одной из обследованных свиноферм. В других случаях степень сходства между последовательностями, выделенными от животных, из сточных вод свиноферм и от заболевших людей, составляла 95–98%.

Обсуждение

Результаты анализа структуры популяционного иммунитета к ВГЕ указывают на широкую распространённость ВГЕ-инфекции в Белгородской области. Средний показатель выявления анти-ВГЕ IgG среди условно здорового населения этого региона (16,4%) в несколько раз превышает аналогичные показатели



Филогенетическое дерево для частичной последовательности открытой рамки считывания 2 генома вируса гепатита E (300 нуклеотидов, позиции 5996–6295, нумерация по прототипному изоляту Вигма – M73218).

В узлах дерева указаны показатели достоверности группирования. Для каждого изолята на филогенетическом дереве указаны номер в базе данных GenBank, страна и год выделения, а также организм, из которого он выделен (Ssd – свинья домашняя (*Sus scrofa domestica*), Hs – человек (*Homo sapiens*), Sewage – образцы сточных вод). Российские последовательности выделены жирным шрифтом, последовательности из Белгородской области выделены жирным шрифтом и подчёркиванием. F3, F4 – номера обследованных ферм.

в других регионах РФ, определявшиеся с теми же тест-системами (2,1–7,5%) [13]. Данное наблюдение в сочетании с показателями регистрируемой заболеваемости подтверждает предположение об интенсивной циркуляции ВГЕ в Белгородской области. Ранее консенсусной группой по ГЕ была предложена градация территорий в отношении данного заболевания на основании частот выявления анти-ВГЕ IgG в общей популяции: регионы с низкой степенью эндемичности (анти-ВГЕ IgG < 10%), с промежуточной степенью эндемичности (анти-ВГЕ IgG 10–20%) и гиперэндемичные регионы (анти-ВГЕ IgG > 20%) [14]. На основании данного критерия Белгородская область относится к территориям средней эндемичности, тогда как остальные регионы РФ – к регионам с низкой степенью эндемичности.

Обращают на себя внимание крайне высокие показатели выявления анamnестических анти-ВГЕ IgG среди пожилых людей, обнаруженные в данном исследовании. В целом, увеличение доли серопозитивных лиц с возрастом характерно для многих эндемичных территорий как в Европе, так и в России [13, 15]. Данное наблюдение ставит вопрос о причине широкой распространённости анamnестических антител среди пожилых лиц: является ли это отражением контакта с вирусом в далёком прошлом или свидетельствует об интенсивной циркуляции ВГЕ среди лиц старшего возраста в настоящее время? В пользу последнего свидетельствуют случаи выявления анти-ВГЕ IgM среди пожилых лиц с частотой, сходной с наблюдаемой в остальных возрастных группах. Кроме того, именно среди пожилых людей зачастую регистрируются клинически выраженные случаи заболевания [16, 17]. Также нами ранее было показано, что в отличие от постинфекционных антител к вирусу гепатита А, сохраняющихся пожизненно, анти-ВГЕ IgG может исчезать через несколько десятков лет после контакта с вирусом [18].

В целом для Белгородской области характерно постепенное увеличение с возрастом доли лиц, встречавшихся с ВГЕ, при этом показатели выявления анти-ВГЕ IgM, свидетельствующие о недавнем контакте с вирусом, указывают на увеличение риска инфицирования среди лиц старше 40 лет. Все независимые случаи ВГЕ-инфекции на территории РФ, в том числе в Белгородской области, связаны с генотипом 3 ВГЕ. Поскольку для него основным резервуаром являются домашние свиньи [19], по-видимому, именно широкая циркуляция ВГЕ среди свиней определяет высокую частоту контакта с вирусом среди населения Белгородской области.

Эндемичные территории на юге Франции также связаны с циркуляцией зоонозных генотипов 3 и 4 ВГЕ [20]. По-видимому, причиной формирования эндемичных территорий, связанных с ВГЕ генотипов 3 и 4, является сосредоточение свиноферм в определенных регионах. Так, в Германии было показано, что анти-ВГЕ IgG значительно чаще встречаются у населения свиноводческих регионов, имеющих непосредственный контакт со свиньями [21]. Счита-

ется, что не только непосредственно употребление в пищу продуктов свиноводства (непрожаренное мясо, печень и прочие субпродукты), но в первую очередь контаминация вирусом объектов внешней среды приводит к высокому риску контакта человека с ВГЕ [6]. В пользу этого служат многочисленные сообщения последних лет о выявлении РНК ВГЕ в сточных водах [22–24], а также свидетельство о длительном выявлении РНК ВГЕ в сточных водах после пищевой вспышки ВГЕ во Франции [25].

Полученные в нашем исследовании данные о высокой частоте ВГЕ-инфекции среди поголовья свиней, случаи выявления РНК ВГЕ в сточных водах свиноферм и высокая степень генетического сходства последовательностей ВГЕ, выделенных от заболевших людей, от свиней и из сточных вод, свидетельствуют о зоонозном характере инфекции в регионе. Белгородская область, по данным Росстата, является крупнейшим центром свиноводства в Российской Федерации, что, по-видимому, и служит причиной сложившейся эпидемической ситуации. Аналогично территориям на юге Франции, причиной широкой распространённости ВГЕ-инфекции в Белгородской области, очевидно, является не только непосредственный контакт с животными или продуктами свиноводства, но и попадание вируса со свиноферм в окружающую среду.

Заключение

Таким образом, широкое распространение ВГЕ среди поголовья свиней послужило причиной формирования эндемичного региона на территории Белгородской области, являющейся центром свиноводства. Для контроля за ВГЕ-инфекцией необходимы мероприятия, направленные на снижение циркуляции ВГЕ среди поголовья свиней и обеззараживание сточных вод свиноферм.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (Соглашение № 075-15-2019-1481 от 15.08.2019 г., уникальный идентификатор проекта RFMEFI61319X0091).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1-8, 12, 14, 15, 17, 19-25 см. REFERENCES)

- Кюрегян К.К., Малинникова Е.Ю., Дьяррассуба А., Мохаммед А., Землянский О.А., Поляков А.Д. Заболеваемость острым гепатитом Е в Российской Федерации. *Современные проблемы науки и образования*. 2014; (2): 509.
- Оксанич А.С., Файзулов Е.Б., Никонова А.А., Кривцов Г.Г., Зверев В.В. Концентрирование кишечных вирусов из воды на магнитных микрочастицах, покрытых полимером диоксида кремния. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2008; (1): 46-50.
- Гуляев С.А., Потемкин И.А., Кичатова В.С., Карлсен А.А., Исаева О.В., Гуляева Т.В. и др. Моделирование вирусного гепатита Е на карликовых домашних свиньях. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2017; (4): 48-54. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2017-4-48-54>
- Кюрегян К.К., Михайлов М.И. *Молекулярно-биологические основы контроля вирусных гепатитов*. М.: Икар; 2013.
- Малинникова Е.Ю., Зайцев О.В., Исаева О.В., Кюрегян К.К., Ильченко Л.Ю., Михайлов М.И. Сравнительная клиническая

характеристика гепатита А и Е при групповой заболеваемости. *Инфекционные болезни*. 2011; 9(4): 11-6.

18. Кюрегян К.К., Потёмкин И.А., Лопатухина М.А., Попова О.Е., Исаева О.В., Малинникова Е.Ю. и др. Длительность сохранения анamnестических антител к вирусу гепатита Е. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 63(5): 310-4.
DOI: <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-5-310-314>
- REFERENCES**
1. Meng X.J., Anderson D., Arankalle V.A., Emerson S.U., Harrison T.J., Jameel S., et al. Hepviridae. In: King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J., eds. *Virus Taxonomy: Ninth Report of the ICTV*. London: Elsevier/Academic Press; 2012: 1021-8.
 2. Rein D.B., Stevens G.A., Theaker J., Wittenborn J.S., Wiersma S.T. The global burden of hepatitis E virus genotypes 1 and 2 in 2005. *Hepatology*. 2012; 55(4): 988-97.
DOI: <https://doi.org/10.1002/hep.25505>
 3. Purcell R.H., Emerson S.U. Hepatitis E: an emerging awareness of an old disease. *J. Hepatol.* 2008; 48(3): 494-503.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2007.12.008>
 4. Kamar N., Bendall R., Legrand-Abravanel F., Xia N.S., Ijaz S., Izopet J., et al. Hepatitis E. *Lancet*. 2012; 379(9835): 2477-88.
DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61849-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61849-7)
 5. Clemente-Casares P., Ramos-Romero C., Ramirez-Gonzalez E., Mas A. Hepatitis E virus in industrialized countries: The silent threat. *Biomed Res. Int.* 2016; 2016: 9838041.
DOI: <https://doi.org/10.1155/2016/9838041>
 6. Dalton H.R., Izopet J. Transmission and epidemiology of hepatitis E virus genotype 3 and 4 infections. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2018; 8(11): a032144.
DOI: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a032144>
 7. Izopet J., Labrique A.B., Basnyat B., Dalton H.R., Kmush B., Heaney C.D., et al. Hepatitis E virus seroprevalence in three hyperendemic areas: Nepal, Bangladesh and southwest France. *J. Clin. Virol.* 2015; 70: 39-42.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2015.06.103>
 8. Mansuy J.M., Bendall R., Legrand-Abravanel F., Sauné K., Miéoudouge M., Ellis V., et al. Hepatitis E virus antibodies in blood donors, France. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17(12): 2309-12.
DOI: <https://doi.org/10.3201/eid1712.110371>
 9. Kyuregyan K.K., Malinnikova E.Yu., D'yarrassuba A., Mokhammed A., Zemlyanskiy O.A., Polyakov A.D. The incidence of acute hepatitis E in the Russian Federation. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2014; (2): 509. (in Russian)
 10. Oksanich A.S., Fayzuloev E.B., Nikonova A.A., Krivtsov G.G., Zverev V.V. Concentration of intestinal viruses from water on magnetic microparticles coated with a silicon dioxide polymer. *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii*. 2008; (1): 46-50. (in Russian)
 11. Gulyaev S.A., Potemkin I.A., Kichatova V.S., Karlsen A.A., Isaeva O.V., Gulyaeva T.V., et al. Modeling viral hepatitis E in dwarf domestic pigs. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2017; (4): 48-54.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2017-4-48-54> (in Russian)
 12. Smith D.B., Simmonds P., Izopet J., Oliveira-Filho E.F., Ulrich R.G., Johne R., et al. Proposed reference sequences for hepatitis E virus subtypes. *J. Gen. Virol.* 2016; 97(3): 537-42.
DOI: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000393>
 13. Kyuregyan K.K., Mikhaylov M.I. *Molecular Biological Basis for the Control of Viral Hepatitis [Molekulyarno-biologicheskie osnovy kontrolya virusnykh gepatitov]*. Moscow: Ikar; 2013. (in Russian)
 14. Petrik J., Lozano M., Seed C.R., Faddy H.M., Keller A.J., Prado Scuracchio P.S., et al. Hepatitis E. *Vox Sang.* 2016; 110(1): 93-103.
DOI: <https://doi.org/10.1111/vox.12285>
 15. Holm D.K., Moessner B.K., Engle R.E., Zaaijer H.L., Georgsen J., Purcell R.H., et al. Declining prevalence of hepatitis E antibodies among Danish blood donors. *Transfusion*. 2015; 55(7): 1662-7.
DOI: <https://doi.org/10.1111/trf.13028>
 16. Malinnikova E.Yu., Zaytsev O.V., Isaeva O.V., Kyuregyan K.K., Il'chenko L.Yu., Mikhaylov M.I. Comparative clinical characteristics of hepatitis A and E in outbreaks. *Infektsionnye bolezni*. 2011; 9(4): 11-6. (in Russian)
 17. Kamar N., Dalton H.R., Abravanel F., Izopet J. Hepatitis E Virus Infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 2014; 27(1): 116-38.
DOI: <https://doi.org/10.1128/CMR.00057-13>
 18. Kyuregyan K.K., Potemkin I.A., Lopatukhina M.A., Popova O.E., Isaeva O.V., Malinnikova E.Yu., et al. Duration of preservation of anamnestic antibodies to the hepatitis E virus. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2018; 63(5): 310-4.
DOI: <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-5-310-314> (in Russian)
 19. Dalton H.R., Bendall R., Ijaz S., Banks M. Hepatitis E: An emerging infection in developed countries. *Lancet Infect. Dis.* 2008; 8(11): 698-709.
DOI: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(08\)70255-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(08)70255-X)
 20. Lhomme S., Abravanel F., Dubois M., Chapuy-Regaud S., Sandres-Saune K., Mansuy J.M., et al. Temporal evolution of the distribution of hepatitis E virus genotypes in Southwestern France. *Infect Genet. Evol.* 2015; 35: 50-5.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.07.028>
 21. Krumbholz A., Joel S., Dremsek P., Neubert A., Johne R., Dürrwald R., et al. Seroprevalence of hepatitis E virus (HEV) in humans living in high pig density areas of Germany. *Med. Microbiol. Immunol.* 2014; 203(4): 273-82.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s00430-014-0336-3>
 22. La Rosa G., Pourshaban M., Iaconelli M., Vennarucci V.S., Muscillo M. Molecular detection of hepatitis E virus in sewage samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 2010; 76(17): 5870-3.
DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.00336-10>
 23. Masclaux F.G., Hotz P., Friedli D., Savova-Bianchi D., Oppliger A. High occurrence of hepatitis E virus in samples from wastewater treatment plants in Switzerland and comparison with other enteric viruses. *Water Res.* 2013; 47(14): 5101-9.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.05.050>
 24. Smith D., Paddy J.O., Simmonds P. The use of human sewage screening for community surveillance of hepatitis E virus in the UK. *J. Med. Virol.* 2016; 88(5): 915-8.
DOI: <https://doi.org/10.1002/jmv.24403>
 25. Miura T., Lhomme S., Le Saux J.C., Le Mehaute P., Guillois Y., Couturier E., et al. Detection of Hepatitis E Virus in Sewage After an Outbreak on a French Island. *Food Environ. Virol.* 2016; 8(3): 194-9.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s12560-016-9241-9>

Поступила 08.12.19

Принята в печать 24.12.19



Громов К.Б.¹, Киреев Д.Е.², Мурзакова А.В.², Лопатухин А.Э.², Казеннова Е.В.¹, Бобкова М.Р.¹

Анализ полиморфизма белка Nef вариантов ВИЧ-1 (*Human immunodeficiency virus-1, Lentivirus, Orthoretrovirinae, Retroviridae*), циркулирующих в странах бывшего СССР

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 ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, 111123, г. Москва, Россия

Введение. Белок Nef вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) является одним из ключевых факторов, определяющих инфекционность и репликативные свойства ВИЧ. Обладая способностью к взаимодействию с многочисленными белками хозяйской клетки, этот белок обеспечивает максимальный уровень продукции вируса и защиту его от иммунной системы. Основные активности Nef связывают со снижением экспрессии CD4-рецептора и молекул главного комплекса гистосовместимости I типа (MHC-I), а также с перестройкой цитоскелета. Эти свойства белка определяются структурой нескольких мотивов в составе кодирующего его гена *nef*, имеющих вариабельную природу.

Цели и задачи. Основной целью работы был анализ особенностей белка Nef варианта А6 ВИЧ-1, доминирующего в странах бывшего СССР. Задачей работы послужил сравнительный анализ естественных полиморфизмов в гене *nef* ВИЧ-1 суб-субтипов А6 и А1 и субтипа В.

Материал и методы. Материалом для работы послужили последовательности генома ВИЧ-1, полученные в ходе предшествующей работы лаборатории, а также референс-последовательности из GenBank. В работе использованы методы секвенирования по Сэнгеру и секвенирования нового поколения, а также методы биоинформационного анализа.

Результаты и обсуждение. Продемонстрированы различия в частоте встречаемости естественных полиморфизмов белка Nef (A32P, E38D, I43V, A54D, Q104K, H116N, Y120F, Y143F, V168M, H192T, V194R, R35Q, D108E, Y135F, E155K, E182M, R184K и F191L), некоторые из которых являются характеристическими мутациями для варианта А6.

Заключение. Обнаружены характеристические замены в составе Nef, потенциально способные ослаблять репликативные свойства варианта А6 ВИЧ-1.

Ключевые слова: ВИЧ-1; суб-субтип А6; мутации; полиморфизм; ген *nef*.

Для цитирования: Громов К.Б., Киреев Д.Е., Мурзакова А.В., Лопатухин А.Э., Казеннова Е.В., Бобкова М.Р. Анализ полиморфизма белка Nef вариантов ВИЧ-1 (*Human immunodeficiency virus-1, Lentivirus, Orthoretrovirinae, Retroviridae*), циркулирующих в странах бывшего СССР. *Вопросы вирусологии*. 2019; 64(6): 281-290.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-6-281-290>

Информация об авторах:

Громов К.Б., <https://orcid.org/0000-0002-9316-1975>

Киреев Д.Е., <https://orcid.org/0000-0002-7896-2379>

Мурзакова А.В., <https://orcid.org/0000-0002-1390-8021>

Лопатухин А.Э., <https://orcid.org/0000-0002-2826-699X>

Казеннова Е.В., <https://orcid.org/0000-0002-7912-4270>

Бобкова М.Р., <https://orcid.org/0000-0001-5481-8957>

Для корреспонденции: Бобкова Марина Ридовна, доктор биологических наук, заведующая лабораторией вирусов лейкозов, Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18; <https://orcid.org/0000-0001-5481-8957>. E-mail: mrbobkova@mail.ru

Gromov K.B.¹, Kazennova E.V.¹, Kireev D.E.², Murzakova A.V.², Lopatukhin A.E.², Bobkova M.R.¹

Analysis of HIV-1 (*Human immunodeficiency virus-1, Lentivirus, Orthoretrovirinae, Retroviridae*) Nef protein polymorphism of variants circulating in the former USSR countries

¹National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russia;

²Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, 111123, Russia

Introduction. The human immunodeficiency virus (HIV) Nef protein is one of the key factors determining the infectivity and replicative properties of HIV. With the ability to interact with numerous proteins of the host cell, this protein provides the maximum level of virus production and protects it from the immune system. The main activities of Nef are associated with a decrease in the expression of the CD4 receptor and major histocompatibility complex class I molecules (MHC-I), as well as the rearrangement of the cytoskeleton. These properties of the protein are determined by the structure of several motifs in the structure of the *nef* gene encoding it, which is quite variable.

Goals and tasks. The main goal of the work was to analyze the characteristics of Nef protein of HIV-1 variant A6, which dominates in the countries of the former USSR. The objective of the work was a comparative analysis of natural polymorphisms in the *nef* gene of HIV-1 sub-subtypes A6 and A1 and subtype B.

Material and methods. The sequences of the HIV-1 genome obtained during the previous work of the laboratory were used, as well as the reference sequence from GenBank. In this work, Sanger sequencing and new generation sequencing methods, as well as bioinformatics analysis methods were used.

Results and discussion. The existence of noticeable differences in the prevalence of Nef natural polymorphisms (A32P, E38D, I43V, A54D, Q104K, H116N, Y120F, Y143F, V168M, H192T, V194R, R35Q, D108E, Y135F, E155K, E182M, R184K and F191L), some of which are characteristic mutations for variant A6, was shown.

Conclusion. Characteristic substitutions were found in the Nef structure, potentially capable of weakening the replicative properties of HIV-1 variant A6.

Keywords: HIV-1; sub-subtype A6; mutations; polymorphism; nef gene.

For citation: Gromov K.B., Kazennova E.V., Kireev D.E., Murzakova A.V., Lopatukhin A.E., Bobkova M.R. Analysis of HIV-1 (*Human immunodeficiency virus-1, Lentivirus, Orthoretrovirinae, Retroviridae*) Nef protein polymorphism of variants circulating in the former USSR countries. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2019; 64(6): 281-290. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-6-281-290>

For correspondence: Marina R. Bobkova, MD, PhD, Dr Biol Sci, chief researcher, head of T-lymphotropic viruses laboratory, Ivanovsky Institute of Virology, National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, 18, Gamaleya street, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5481-8957>. E-mail: mrbobkova@mail.ru

Information about authors:

Gromov K.B., <https://orcid.org/0000-0002-9316-1975>

Kireev D.E., <https://orcid.org/0000-0002-7896-2379>

Murzakova A.V., <https://orcid.org/0000-0002-1390-8021>

Lopatukhin A.E., <https://orcid.org/0000-0002-2826-699X>

Kazennova E.V., <https://orcid.org/0000-0002-7912-4270>

Bobkova M.R., <https://orcid.org/0000-0001-5481-8957>

Acknowledgments. The study was carried out as a part of the international CARE project and supported from the sources of Ministry of science and higher education grant (unique number RFMEFI61019X0020).

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

Received 21 November 2019

Accepted 28 November 2019

Введение

Рост эпидемии ВИЧ-инфекции во всём мире продолжается, и вместе с ним повышается социальная значимость этого заболевания. В числе наиболее эффективных способов сдерживания эпидемии – антиретровирусная терапия, современный вариант которой потенциально способен уравнивать качество и продолжительность жизни инфицированных со средними показателями людей, не имеющих инфекции. Основными препятствиями для достижения тотального успеха являются феномен лекарственной устойчивости ВИЧ, генетически предопределённые особенности людей, способные снижать эффект лекарственной терапии, а также невозможность полного излечения от инфекции, обусловленная существованием резервуаров. Эти и другие причины приводят к необходимости разработки всё новых лекарственных средств, целью воздействия которых являются новые (вирусные и не только) мишени. Одной из таких мишеней могут стать неструктурные белки ВИЧ.

Геном ВИЧ отличается небольшими размерами (менее 10 тыс. н.п.) и кодирует всего несколько белков, среди которых структурные белки групп Gag, Pol и Env, а также так называемые регуляторные белки (Tat и Rev) и вспомогательные белки (Vif, Vpr, Vpr и Nef), объединяемые названием неструктурных.

В отличие от структурных белков, обнаруживаемых в значительных количествах в составе вирусных частиц (Gag и Env) либо в клетке в период размножения вируса (Pol), неструктурные белки продуцируются в небольших количествах и в составе вирионов могут

вообще отсутствовать. Как это часто бывает у вирусов с ограниченным объёмом генетической информации, немногочисленность этих белков компенсируется их многофункциональностью. Именно эти белки, каждый из которых обладает несколькими, порой непосредственно не связанными между собой активностями, обеспечивают инфекционные свойства вируса, высокий уровень его репликации и защиту от иммунной системы организма-хозяина. Вопросы участия неструктурных белков ВИЧ в патогенезе вызываемой им инфекции интенсивно изучаются, и в фокусе интереса исследователей находится белок Nef.

Первые упоминания об этом белке связывали его с ингибированием транскрипции вируса, именно поэтому он получил своё название (от англ. negative factor), однако недоразумение вскоре прояснилось, и стала очевидной связь Nef с повышением вирусной нагрузки и прогрессированием патогенеза ВИЧ-инфекции. Одним из наиболее убедительных доказательств является присутствие Nef-дефектных вирусов у длительных непрогрессоров (long term non-progressors, LTNP) [1, 2].

Ген *nef* локализуется на 3'-конце генома ВИЧ-1, а также ВИЧ-2 и вирусов иммунодефицита обезьян, частично перекрываясь с последовательностью 3'-LTR – длинного концевой повтора. Трансляция Nef происходит на матрице множественно сплайсированной РНК и приводит к формированию белка размером 27–32 кДа, в значительных количествах присутствующего в клетке на ранних стадиях инфекционного процесса.

В составе белка Nef выделяют три области: структурированный глобулярный центральный домен, включающий неупорядоченную подвижную петлю, а также подвижные N-концевую часть и C-концевую петлю [3–5]. Все менее структурированные подвижные участки Nef распределены по его поверхности, склонны к конформационным превращениям и легко вступают во взаимодействия с другими белками, которых в клетке насчитывается не менее полусотни [6]. Участки белка, имеющие критическое значение для выполнения его функций, можно встретить во всех указанных областях.

Nef – миристилированный белок, что наряду с наличием протяжённого участка щелочных аминокислот на его N-конце способствует взаимодействию с клеточной мембраной. Это свойство Nef позволяет ему присутствовать в составе вирусных частиц, хотя функция «упакованного» белка пока не ясна.

Nef, как и другие неструктурные белки ВИЧ-1, не имеет ферментативных активностей, при этом в силу вышеперечисленных особенностей обладает феноменальной способностью к взаимодействию с многочисленными белками хозяйской клетки и прежде всего с аппаратом внутриклеточного транспорта и сигнальной трансдукции. В ходе размножения ВИЧ в клетке белок Nef продуцируется в избытке и поступает в окружающие ткани и кровоток. Благодаря этому Nef приобретает способность влиять как на внутриклеточные процессы репликации ВИЧ, так и на процессы взаимодействия с иммунными и неиммунными клетками, одновременно обеспечивая максимальный уровень продукции вируса и защиту его от иммунной системы.

Как и другие белки ВИЧ, Nef отличается значительной вариабельностью, однако локализация функционально важных мотивов в составе белка пока изучена недостаточно. Следует отметить, что у пациентов с естественным течением ВИЧ-инфекции некоторая часть этих мотивов (например, ответственных за регуляцию CD4-рецептора и молекул главного комплекса гистосовместимости I типа (MHC-I, см. далее)

высококонсервативна, что подчёркивает важность их функции. Тем не менее легко понять, что функциональные различия между вирусами должны иметь физическую основу, иными словами, объясняться особенностями их генома, т. е. генетическим полиморфизмом.

К числу наиболее хорошо охарактеризованных свойств Nef, имеющих значение для патогенеза инфекции, относятся снижение экспрессии CD4-рецептора и молекул MHC-I, усиление инфекционности вирусных частиц и активация PAK-2 (p21-activated kinase), связанная с перестройкой цитоскелета (два последних свойства весьма трудноотделимы друг от друга). Некоторые данные мировой литературы, касающиеся этих вопросов, приводятся ниже. Наиболее обоснованные сведения, связывающие особенности гена *nef* с функцией кодируемого им белка, представлены в табл. 1.

Влияние Nef на репликацию ВИЧ. Оптимизируя клеточное окружение для повышения уровня репликации вируса, Nef достигает нескольких целей: во-первых, увеличивает число продуцируемых клеткой вирусных частиц; во-вторых, повышает эффективность передачи инфекции в контакте «клетка–клетка»; в-третьих, усиливает способность вновь образованных вирионов инфицировать новые мишени, иными словами, повышает инфекционность вируса. Для решения этих задач Nef использует несколько механизмов, реализуемых преимущественно на уровне транскрипции, при этом каждый из них не до конца понятен (рис. 1).

Усиление вирусной продукции отчасти достигается путём вмешательства Nef в процесс активации LTR-промотора ВИЧ-1. Известно, что взаимодействие этого главного и единственного промотора ВИЧ-1 с регуляторным белком Tat и клеточными белками ядерного фактора κB (NF-κB) или ядерного фактора активированных T-клеток (NFAT) определяет эффективность транскрипции вирусного генома. Как именно Nef влияет на этот процесс, в точности неизвестно, однако очевидно, что речь идёт не о прямом взаимодействии с NF-κB, а, скорее, о регуляции ответа на

Таблица 1

Некоторые из основных мотивов и мутаций молекулы белка Nef ВИЧ-1 и их свойства

Мотивы и мутации вирусного белка Nef	Свойства Nef	Ссылка
⁵⁵ CAWLEAQ ⁶¹	Снижение уровня экспрессии CD4 и MHC-I	[23]
⁶² EEEE ⁶⁵	Снижение уровня экспрессии MHC-I (взаимодействие с PACS-1 и PACS-2)	[5, 15]
⁷² PxxPxR ⁷⁷	Усиление продукции ВИЧ (активация Src-киназ); снижение экспрессии CCR5 и CXCR4	[4, 5, 7, 14]
¹⁶⁰ ExxxLL ¹⁶⁵	Снижение уровня экспрессии MHC-I (взаимодействие с AP-1)	[5]
¹⁷⁴ ED ¹⁷⁵	Снижение экспрессии CCR5 и CXCR4	[14]
Эффект мутации		
R35Q	Отмена снижения уровня экспрессии CD4	[2]
A83G, H101Y, S162C	Связь со СПИД-ассоциированной деменцией	[18]
R106A	Отмена взаимодействия с PAK-2 и повышения инфекционности ВИЧ	[24]
D108E, Y135F, E155K, E182M, R184K	Отмена снижения уровня экспрессии CD4	[2]
F191A/L	Отмена усиления продукции ВИЧ (дефект взаимодействия с PAK-2 и нарушения цитоскелета)	[8, 9, 25, 26]

его стимуляцию (сигнальную трансдукцию) с участием мембранных структур [3]. В этих событиях задействованы многие клеточные киназы, как тирозиновые (Src-киназа) [4, 5, 7], так и сериновые и треониновые, среди которых лучше других изучена PAK-2 [8, 9].

Этот же приём непрямого воздействия использует Nef, принимая участие в активации клеток, когда он привлекает сигнальные белки к внутренним клеточным мембранам и липидным «плотикам», тем самым обеспечивая их тесное взаимодействие. Эти контакты, в свою очередь, сопровождаются модуляцией ферментативной активности и инициацией активации. Поскольку для эффективной репликации ВИЧ необходимо активированное состояние клетки-мишени, уровень транскрипционной активности LTR-промотора в результате такой деятельности Nef закономерно повышается. Кроме этого, в активное состояние приходят многие гены хозяйской клетки, в том числе и ответственные за экспрессию факторов транскрипции, что дополнительно улучшает условия для продукции новых вирусных частиц [3]. Именно активация вносит наиболее заметный вклад в Nef-опосредованное повышение репликации ВИЧ. Среди аминокислотных мотивов Nef, задействованных в выполнении вышеперечисленных функций, находятся богатый пролином мотив RxxP, а также α -спираль на N-конце и гидрофобная область в составе С-концевой петли [4].

Способность Nef к перестройке цитоскелета клеток-мишеней, которая будет далее обсуждаться в ста-

тье, может быть также причиной ускорения и облегчения передачи вирусных частиц между клетками, однако эта гипотеза пока остаётся в разряде рабочих. Отметим, что эффективность заражения в контакте «клетка–клетка» в тысячи раз выше, чем в контакте «вирион–клетка» [10].

Влияние Nef на инфекционность ВИЧ. Наиболее известной функцией Nef является его очевидная способность повышать инфекционность вирусных частиц ВИЧ. Под инфекционностью, как правило, понимают способность патогена вызывать инфекцию у хозяина, иными словами, комбинацию репликативных и трансмиссивных свойств вируса. Применительно к ВИЧ этим термином обычно обозначают вполне конкретный количественный показатель, характеризующий уровень репликации ВИЧ в одном цикле размножения при заражении чувствительной культуры HeLa-CD4-клеток бесклеточной суспензией вируса.

Значительное число экспериментальных работ так и не дали окончательного ответа на вопрос о механизме влияния Nef на инфекционность ВИЧ, и для более подробного описания состояния вопроса читателя можно отослать к обзорным работам [3, 4, 11]. Если говорить кратко, то, используя свою способность к консолидированию белков, Nef может оказывать позитивное влияние на инфекционные свойства вирионов, находясь в их составе, а также на этапах почкования частиц, например, способствуя формированию липидных «плотиков» – участков почкования,

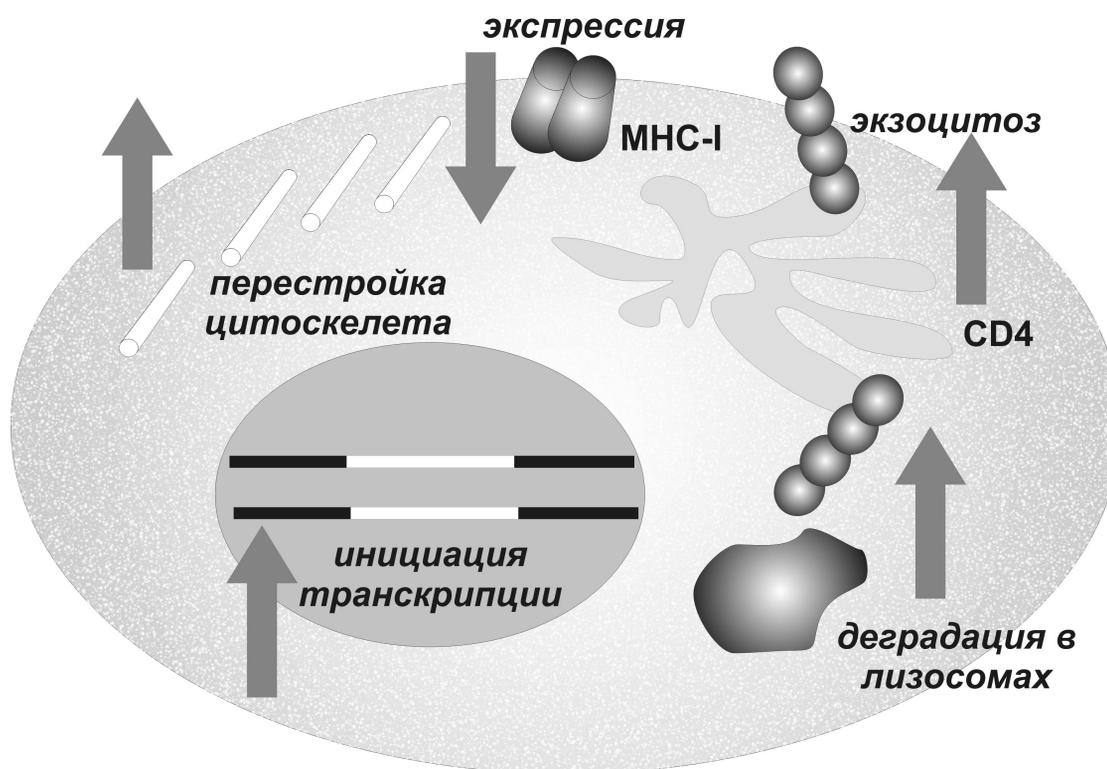


Рис. 1. Основные активности белка Nef ВИЧ в клетке-мишени.

либо контролируя и упорядочивая процесс сборки. Ещё один механизм связан с «обезвреживанием» Nef недавно описанного белка SERINC3/5 (serine incorporator 3 and 5), который в составе вирионов противодействует заражению клеток ВИЧ. Nef удаляет SERINC3/5 из мембранного участка сборки вирионов, препятствуя его включению в новые частицы [12]. Nef-зависимое снижение экспрессии (downregulation) белка SERINC5 считается наиболее значимым вкладом Nef в инфекционность ВИЧ-1 и находится в настоящее время в центре внимания исследований вируса.

К этому следует добавить возможный эффект Nef-зависимого включения клеточных белков – HLA, костимулирующих молекул CD80 и CD86, а также многих других белков хозяйской клетки, способствующих процессу заражения клеток-мишеней [4, 11].

На этапе почкования вирусных частиц важным оказалось взаимодействие Nef с многофункциональным белком PAK-2, которое обычно происходит в области липидных «плотиков» [8]. Структура этого белка чрезвычайно консервативна даже среди разных групп лентивирусов. Одно из объяснений его стимулирующей активности в отношении репликации ВИЧ заключается в способствовании пересечению актинового барьера хозяйской клетки и последующей перестройке цитоскелета, ускоряющей выход вирусных частиц из клетки и связанной с фосфорилированием белка кофилина [9]. Кроме этого, PAK-2 участвует в инактивации проапоптотических белков Bad, тем самым блокируя апоптоз инфицированной клетки и повышая продукцию вируса. Взаимодействие PAK-2 с Nef также оказывает стимулирующее влияние на развитие и мобильность Т-клеток [8].

Влияние взаимодействия Nef/PAK-2 на цитоскелет клетки проявляется также в ограничении передачи сигнала внутриклеточных сигнальных путей, связанных с активацией; тем самым, как считается, белок Nef предотвращает избыточную активацию клетки и ее неизбежную гибель от апоптоза [9].

Nef и молекулы иммунной системы. Способность Nef обеспечивать уход ВИЧ от иммунного ответа связана прежде всего с модуляцией экспрессии поверхностных молекул клетки-мишени (downregulation), среди которых лучше изучены CD4-рецепторы и MHC-I – главные участники цитотоксического противовирусного ответа. Активность Nef при этом проявляется на посттрансляционном уровне. Большинство механизмов регуляции экспрессии поверхностных белков со стороны Nef связывают с адапторными комплексами AP-1 либо AP-2, которые становятся, таким образом, ахиллесовой пятой для ингибирования активностей Nef [5].

CD4 – трансмембранный белок, способный связывать поверхностный белок ВИЧ-1 Env и выступающий в роли основного рецептора для присоединения вируса к клеткам-мишеням. Избыточная аккумуляция интегрированных вирусных геномов может быть причиной усиления цитотоксического иммунного ответа против инфицированной клетки, поэтому после завершения

интеграции провируса ВИЧ наличие молекул CD4 на поверхности клетки становится балластом, избавиться от которого помогает белок Nef. Основным механизмом этого вида его деятельности связан с экзоцитозом поверхностных молекул CD4 с привлечением белка AP-2 – представителя семейства клатринового адапторного комплекса, направляющего рецептор в лизосомы с его последующей деградацией.

Эти события закономерно ослабляют проведение внутриклеточных сигналов, связанных с апоптозом клетки, а также помогают защитить инфицированные клетки от антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности [13].

Снижение уровня экспрессии CD4-рецепторов не только приводит к предотвращению суперинфекции, но и облегчает высвобождение новых вирусных частиц из клетки, препятствуя связыванию молекул Env и CD4 в эндоплазматической сети, куда обе они попадают по завершении трансляции [3, 5, 6, 11].

Исследования мутаций Nef в составе лабораторных штаммов определили связь между высококонсервативными мотивами ¹⁶⁴LL¹⁶⁵ и ¹⁷⁴DD¹⁷⁵ и снижением экспрессии CD4 [14]; разрушение указанных мотивов приводило к отмене этой функции белка Nef.

Молекулы MHC-I, презентующие вирусные антигены на поверхности инфицированных клеток (в первую очередь HLA-A и HLA-B), играют основную роль в их распознавании и деструкции цитотоксическими клетками (CTL). После связывания антигена молекулы MHC-I поступают в эндоплазматическую сеть и затем через аппарат Гольджи доставляются на мембрану клетки. Выполнив свою функцию, MHC-I могут быть интернализированы для «повторного использования» (рециклизации) либо направлены в лизосому с последующей деградацией.

Белок Nef, как наиболее обильно продуцируемый на ранних этапах инфицирования клетки, идеально подходит на роль помехи для презентации вирусных пептидов и препятствия разрушению вновь инфицированных клеток – иными словами, снижению эффективности цитотоксического ответа. Способов вмешательства Nef в нарушение трафика MHC-I (MHC-I downregulation) несколько, и хотя изучаются они очень интенсивно, молекулярные детали этих процессов понятны не вполне.

Известно, что экспрессия адапторного белка AP-1 является критичной для регуляции MHC-I, при этом AP-2 и AP-3 оказываются не нужны. В процессе взаимодействия с AP-1 задействованы мотивы Nef ⁶²EEEE⁶⁵ и ¹⁶⁰EXXXLL¹⁶⁵ [5]. Другие белки хозяйской клетки, предложенные на роль регуляторов экспрессии MHC-I – сортирующие белки PACS-1 и PACS-2 (phosphofurin acidic cluster sorting protein) [15]. Используя тот же Nef-мотив (⁶²EEEE⁶⁵), PACS-1 способствует ускорению рециклизации MHC-I, рекрутируя эти молекулы в эндосомы; одновременно с этим PACS-2 направляет MHC-I в аппарат Гольджи [7]. Есть мнение [5], что Nef также использует механизм деградации обеих молекул (MHC-I и CD4)

с помощью лизосом, и хотя доказательств этого пока немного, обе модели не являются взаимоисключающими, и мультвалентные способности Nef вполне допускают такую возможность.

Наконец, Nef способен также оказывать ингибирующее влияние на продукцию корцепторов CCR5 и CXCR4 [14].

Nef и патогенез ВИЧ-инфекции. Наблюдения, касающиеся влияния Nef на патогенез ВИЧ-инфекции, в основном группировались вокруг двух видов исследований – прогрессирования инфекции и её патологических проявлений.

Главным объектом первой группы работ стали не-прогрессоры (LTNP) и элитные контроллеры, способные удерживать неопределяемый уровень вирусной нагрузки в отсутствие терапии ВИЧ-инфекции. Как оказалось, у этих пациентов действительно отмечаются многочисленные нарушения функции Nef. Следствием этого становится прежде всего отмена снижения экспрессии ключевых иммунных молекул – MHC-I и CD4, а значит, по крайней мере частичное восстановление цитотоксического ответа, снижение/отсутствие вирусной нагрузки и клиническое благополучие. Причиной нарушения функциональных свойств Nef могли быть как более или менее обширные делеции гена *nef*, так и единичные замены в его составе, среди которых отмечались мутации A84D, Y135F и G140R [16]. Кроме того, функционально дефектный ген мог содержать замены в составе мотивов ⁵⁶CAWLEAQ⁶¹ и ²²Rxx²⁴, а также полиморфизмы R25, RD35/36, T80, GL96/97, D108, D111, DW123/124, RY134/135, C142, EE154/155, LL164/165, DD174/175, RRE179, RF184/185 [2].

Вторая группа исследований была сосредоточена на поиске ассоциаций между структурой Nef и наличием/отсутствием специфических клинических проявлений иммунодефицита, связанных с ВИЧ-инфекцией. Образуясь в инфицированных клетках в значительных количествах, Nef не обладает способностью к секреции, однако в момент апоптоза клеток высвобождается во внеклеточное пространство, а затем в результате интернализации проникает практически во все компартменты и клетки организма и становится причиной множества патогенных эффектов.

Попадая таким образом в иммунные клетки, в макрофагах Nef ингибирует высвобождение свободных радикалов, являющихся важным фактором защиты от патогенов и опухолевых клеток [17]. В дендритных клетках Nef способствует формированию иммунологических синапсов с CD4⁺ Т-клетками, тем самым усиливая распространение вируса.

Растворимый Nef является важнейшим фактором нейротоксичности при ВИЧ-инфекции, и степень его влияния (вплоть до деменции) прямо связана со структурой белка [18]. Поиск мутаций, связанных с ВИЧ-ассоциированной деменцией (НАД), продемонстрировал очень тесную связь между её наличием и присутствием тех или иных аминокислот в положениях 83 (G – НАД либо A – non-НАД), 101 (Y либо H), 181 (V/M либо Q), а также 162, причём эта послед-

няя позиция содержала цистеин не только у вирусов, обнаруживаемых у пациентов с НАД, но и у большинства вирусов субтипа D, известных своей «агрессивностью» [18].

Ещё один вид патологии, достоверно ассоциированной с полиморфизмом Nef, – это сердечно-сосудистые нарушения, характерные для ВИЧ-инфекции. Известно, что Nef создает серьёзные помехи для функции эндотелия сосудов, разрушая клетки и формируя основу для атеросклероза. Интересно, что Nef способен проявлять и противоположный эффект, способствуя неоваскуляризации опухолевой ткани саркомы Капоши [19] у ВИЧ-инфицированных пациентов.

Наиболее детальные исследования, выявившие значимые полиморфизмы Nef, относились к гипертензии легочной артерии [20] – частому проявлению ВИЧ-инфекции. У пациентов, имеющих эту патологию, достоверно чаще выявляли вирусы, имеющие замены в составе мотива PxxP (P150), а также единичные полиморфизмы L58V (CD4 downregulation), E63G (секвестрация MHC-I в аппарат Гольджи), Y81F (участок связывания протеинкиназы C) и некоторые другие.

Nef как потенциальная мишень антиретровирусной терапии. Описанные выше многочисленные активности Nef не позволяют сомневаться в том, что возможность ингибировать его функции могла бы стать большим успехом антиретровирусной терапии, а может быть, и внести заметный вклад в разработку стратегий излечения ВИЧ-инфекции, – в этом отношении на Nef возлагаются особенно большие надежды [7].

Работ, посвящённых созданию ингибиторов Nef, пока немного, однако их результаты, полученные в культуре клеток, дают основания надеяться на успешный исход. Так, на основе молекулярного моделирования разработан новый класс соединений DPPD (diphenylpyrazolodiazene), способных непосредственно связывать Nef и ингибировать репликацию ВИЧ в культуре клеток [21]. Совместно с российскими специалистами разрабатывается другой подход к ингибированию функции Nef, направленный на ограничение патогенного влияния этого белка ВИЧ на метаболизм холестерина и предотвращение атеросклероза [22]. Очевидно, что работы такого рода и в будущем будут проводиться в растущих масштабах.

Итак, структура белка Nef включает несколько функциональных участков, каждый из которых связан с выполнением одной или нескольких задач в обеспечении инфекционности и защиты вируса, и каждый из них может стать потенциальной мишенью для терапии ВИЧ-инфекции. Поиск особенностей генетических вариантов ВИЧ, способных повлиять на стратегию и тактику разработки таких препаратов, по нашему мнению, является важной задачей изучения ВИЧ-инфекции.

Появление в арсенале исследователей новых методов полногеномного секвенирования позволяет эффективно проводить анализ не только структурных генов *gag*, *pol* и *env*, но и всех других участков генома. Данная работа, основанная на применении указанных

методов, начинает серию статей, посвящённых анализу особенностей неструктурных белков генетических вариантов ВИЧ, характерных для эпидемии ВИЧ-инфекции в России.

Целью настоящего исследования был сравнительный анализ полиморфизмов в составе гена *nef* ВИЧ-1 суб-субтипа А6, доминирующего в России, и других генетических вариантов вируса, а также анализ потенциального влияния особенностей *Nef* на биологические и патогенные свойства вируса.

Материал и методы

В работе использованы образцы плазмы крови от ВИЧ-инфицированных пациентов из разных регионов России, ранее идентифицированные по гену *pol* как содержащие вирусы ВИЧ-1 суб-субтипа А6.

Для анализа были получены 47 полногеномных последовательностей вирусов А6 с применением технологии секвенирования MiSeq и наборов MiSeq reagent kits V2 (Illumina, США). Образцы анализировали путём массового параллельного секвенирования с помощью набора «АмплиСенс®HIV-Resist-NGS» согласно инструкции производителя (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия). Секвенирование образцов было выполнено с помощью MiSeq (Illumina) путём анализа четырёх перекрывающихся специфических фрагментов (общая протяжённость анализируемого фрагмента 704–9563 по HXB2).

Также для работы были подобраны праймеры для получения ампликонов области генома, кодирующей *Nef*, методом гнездовой полимеразной цепной реакции (ПЦР): два внешних праймера – *Nef1p* (5'GTAGCTGGGTGGACAGATAGGGTTAT 8688→8713) и *Nef1o* (5'GCACTCAAGGCAAGCTTTATTGAG GC 9632→9610) и два внутренних – *Nef2p* (5'ACATACCTAGgAGAATcAGACAGGGC 8749→8774) и *Nef2o* (5' CCGCGGAAAGTCCCTTGTCAG 9448→9431), после чего были получены и секвенированы 54 *Nef*-ампликона. Дополнительно для анализа использовали 32 полногеномные последовательности ВИЧ-1 суб-субтипа А6 из GenBank, полученные от пациентов из стран бывшего СССР. Для проведения сравнительного и филогенетического анализа было выгружено также из GenBank по 100 последовательностей суб-субтипа А1 и субтипа В. Были построены консенсусы последовательностей А6, А1 и В и проведён их сравнительный анализ с использованием онлайн-программ MEGA 6.0, MEGA 7.0 [27, 28] и отечественной программы UGENE [29]. Для филогенетического анализа была использована программа iqtree [30].

Результаты

В начале исследования был проведён филогенетический анализ последовательностей *nef* с использованием референс-последовательностей известных генетических вариантов ВИЧ-1 для подтверждения субтиповой принадлежности вирусов, предварительно определённой по последовательностям гена *pol*. Проведённый анализ подтвердил результаты пред-

варительного субтипирования и показал (рис. 2), что ген *nef* ВИЧ-1 суб-субтипа А6 имеет существенные различия с геном *nef* суб-субтипа А1, достаточные для образования отдельного субкластера в составе кластера субтипа А. На рис. 2 хорошо видны отдельные кластеры А1, А6 и В (4 образца субтипа С играют роль группы сравнения).

В ходе работы выполнен сравнительный анализ между всеми 133 аминокислотными последовательностями гена *nef* ВИЧ-1 суб-субтипа А6, 100 последовательностями суб-субтипа А1 и столько же – субтипа В. В качестве референс-штамма использовали HXB2 [31]. Для сравнения были построены консенсусные последовательности (участок гена *nef*, кодирующий 181 аминокислоту с 26-й по 206-ю позицию) всех анализированных генетических вариантов. От включения в консенсусы первых 25 аминокислот пришлось отказаться, так как в них содержится множество вставок.

Анализ консенсусных последовательностей суб-субтипа А6 не обнаружил заметных делеций и вставок как в участках, имеющих существенное функциональное значение, так и в прочих участках *nef*. Также не выявлено сколько-нибудь существенных отличий от референс-вариантов в отдельных позициях, находящихся в составе функционально значимых мотивов *nef* (см. табл. 1).

Дальнейший анализ касался сравнения индивидуальных аминокислотных позиций гена *nef* вирусов подтипа В и суб-субтипов А1 и А6 с референс-штаммом субтипа В HXB2. Результаты анализа представлены в табл. 2. В ней приводятся только те позиции, в которых частота аминокислотных замен существенно различалась между анализированными генетическими вариантами ВИЧ-1.

Как видно из данных табл. 2, в целом генетические отличия гена *nef* суб-субтипа А6 были заметно выражены, причём не только по отношению к вирусам субтипа В, но и применительно к близкородственному варианту А1 (например, в позициях А32Р, Е38D, I43V, А54D, Q104K, Н116N, Y120F, Y143F, V168M, Н192Т, V194R). Биологическое значение полиморфизмов в указанных позициях в литературе не упоминается, однако обращает на себя внимание высокая частота встречаемости некоторых замен, которые могут считаться характеристическими мутациями для варианта А6.

Некоторые распространённые замены в составе гена *nef* варианта А6 были связаны с известными из данной литературы эффектами; к ним относятся R35Q (90%), D108E (80%), Y135F (67%), E155K (90%), E182M (80%), R184K (94%) и F191L (88%), причём, если первые четыре из них типичны для подтипа А в целом, то последние три мутации в списке являются характеристическими только для А6-варианта.

Обсуждение

Из описанных во введении экспериментальных данных известно, что любые изменения в структуре исследованных доменов *Nef* отрицательно влияют на его функцию. Это может выражаться главным образом

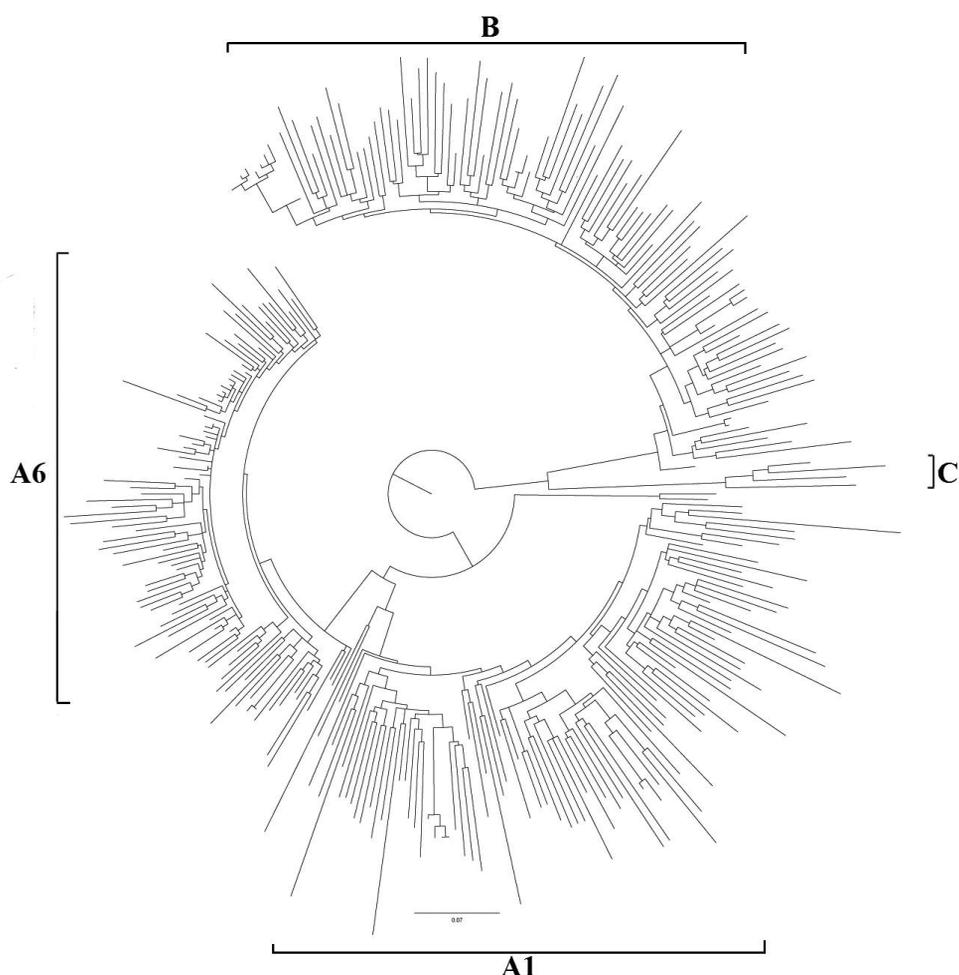


Рис. 2. Результаты филогенетического анализа последовательностей гена *nef* ВИЧ-1 методом максимального правдоподобия (maximum likelihood).

Модель для построения GTR+F+I+G4; бутстрэп-поддержка 4000; анализ проводился с применением программы iqtree.

в снижении инфекционных свойств вируса и уровне его продукции. В данном исследовании не обнаружено существенных дефектов в составе функционально значимых мотивов Nef, таких как делеции и вставки, и такой результат предсказуем, так как значительные дефекты гена неминуемо привели бы к критическому снижению всех его активностей и, как следствие, элиминации соответствующего варианта вируса. Также не было выявлено замен в составе этих мотивов, способных существенно нарушить их структуру и функцию.

Тем не менее в составе гена *nef* вирусов генетического варианта А6, типичного для эпидемии ВИЧ-инфекции в России, было обнаружено несколько характеристических замен, обращающих на себя внимание в связи с их потенциальной способностью влиять на биологические свойства этого вируса.

Большинство обнаруженных мутаций варианта А6 возникает в участках гена *nef*, ассоциированных с его свойством снижать уровень экспрессии CD4, а значит, потенциально может эту функцию серьезно нарушать. Мутация F191L способна вызывать дефект

взаимодействия Nef с PAK-2 и таким образом препятствовать нарушению цитоскелета клетки-мишени, что может отразиться как на эффективности инициации транскрипции LTR-промотора, так и на результатах почкования вирусных частиц. Совместное действие этих мутаций, по сути, является однонаправленным и теоретически может приводить к снижению продукции вируса.

Таким образом, на основании проведенного сравнительного молекулярно-генетического и филогенетического анализа были выявлены заметные отличия гена, кодирующего белок Nef у суб-субтипа А6, от такового у других генетических вариантов ВИЧ-1.

Обнаружены характеристические для А6 мутации, частота которых превышает 80%; набор этих мутаций позволяет с уверенностью отличить этот вариант ВИЧ-1 от прочих. Некоторые из этих мутаций затрагивают функционально значимые мотивы белка Nef и потенциально могут ограничивать его способность к репликации. Для прояснения действительного влияния полиморфизма Nef варианта А6 на инфекционность и репли-

Таблица 2.

Частота встречаемости мутаций (единичных замен)* в гене *nef* вариантов суб-субтипов A1, A6 и субтипа В ВИЧ-1

Мутация	Частота встречаемости, %			Мутация	Частота встречаемости, %			Мутация	Частота встречаемости, %		
	В	A1	A6		В	A1	A6		В	A1	A6
D28T	1	67	20	Q104K	3	19	87	L170Q	58	99	98
A32P	3	2	99	D108E	20	80	82	P176E	0	88	91
A33V	48	99	96	H116N	30	55	4	R178K	38	14	52
R35Q	9	96	90	Y120F	25	61	3	V180T	0	63	0
E38D	6	65	93	V133I	32	38	61	E182M	43	16	80
I43V	7	46	92	Y135F	31	66	67	E182K	0	33	7
T48I	4	74	0	Y143F	95	94	28	R184K	82	46	94
T51N	51	99	35	E149D	40	91	93	F191L	41	37	88
N52H	0	74	0	K152E	10	100	70	H192K	0	70	34
A53P	7	99	0	E155K	22	79	90	H192T	0	2	55
A54D	57	0	95	N157T	38	70	99	V194M	42	0	0
A54S	0	94	0	N161D	4	51	1	V194I	0	39	7
V85L	51	40	10	V168M	64	25	3	V194R	5	14	76
V85F	13	50	58	V168I	11	53	96				
Q104R	0	80	8	S169C	4	91	98				

Примечание. * Мутациями считали замены в указанных позициях в сравнении с референс-штаммом HXB2.

кативные свойства ВИЧ-1 необходимы исследования культуральных свойств вируса и анализ особенностей его поведения в условиях распространения в популяции и развития инфекции у пациентов.

Финансирование. Исследование проведено в рамках выполнения международного проекта CARE и поддержано Министерством науки и высшего образования (уникальный номер проекта RFMEFI61019X0020).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Saksena N.K., Ge Y.C., Wang B., Xiang S.H., Dwyer D.E., Randle C., et al. An HIV-1 infected long-term non-progressor (LTNP): molecular analysis of HIV-1 strains in the *vpr* and *nef* genes. *Ann. Acad. Med. Singapore*. 1996; 25(6): 848-54.
- Wang B. Viral factors in non-progression. *Front. Immunol.* 2013; 4: 355. Doi: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00355>
- Arhel N.J., Kirchhoff F. Implications of Nef: host cell interactions in viral persistence and progression to AIDS. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2009; 339: 147-75. Doi: https://doi.org/10.1007/978-3-642-02175-6_8
- Basmaciogullari S., Pizzato M. The activity of Nef on HIV-1 infectivity. *Front. Microbiol.* 2014; 5: 232. Doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00232>
- Pereira E.A., daSilva L.L. HIV-1 Nef: Taking Control of Protein Trafficking. *Traffic*. 2016; 17(9): 976-96. Doi: <https://doi.org/10.1111/tra.12412>
- Jager S., Cimermancic P., Gulbahce N., Johnson J.R., McGovern K.E., Clarke S.C., et al. Global landscape of HIV-human protein complexes. *Nature*. 2011; 481(7381): 365-70. Doi: <https://doi.org/10.1038/nature10719>
- Dekaban G.A., Dikeakos J.D. HIV-1 Nef inhibitors: a novel class of HIV-specific immune adjuvants in support of a cure. *AIDS Res. Ther.* 2017; 14(1): 53. Doi: <https://doi.org/10.1186/s12981-017-0175-6>
- Van den Broeke C., Radu M., Chernoff J., Favoreel H.W. An emerging role for p21-activated kinases (Paks) in viral infections. *Trends Cell Biol.* 2010; 20(3): 160-9. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2009.12.005>
- Stolp B., Fackler O.T. How HIV takes advantage of the cytoskeleton in entry and replication. *Viruses*. 2011; 3(4): 293-311. Doi: <https://doi.org/10.3390/v3040293>
- Sourisseau M., Sol-Foulon N., Porrot F., Blanchet F., Schwartz O. Inefficient human immunodeficiency virus replication in mobile lymphocytes. *J. Virol.* 2007; 81(2):1000-12. Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.01629-06>
- Vermeire J., Vanbillemont G., Witkowski W., Verhasselt B. The Nef-infectivity enigma: mechanisms of enhanced lentiviral infection. *Curr. HIV Res.* 2011; 9(7): 474-89. Doi: <https://doi.org/10.2174/157016211798842099>
- Rosa A., Chande A., Ziglio S., De Sanctis V., Bertorelli R., Goh S.L., et al. HIV-1 Nef promotes infection by excluding SERINC5 from virion incorporation. *Nature*. 2015; 526(7572): 212-7. Doi: <https://doi.org/10.1038/nature15399>
- Lama J. The physiological relevance of CD4 receptor down-modulation during HIV infection. *Curr. HIV Res.* 2003; 1(2): 167-84. Doi: <https://doi.org/10.2174/1570162033485276>
- Toyoda M., Ogata Y., Mahiti M., Maeda Y., Kuang X.T., Miura T., et al. Differential Ability of Primary HIV-1 Nef Isolates To Down-regulate HIV-1 Entry Receptors. *J. Virol.* 2015; 89(18): 9639-52. Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.01548-15>
- Dikeakos J.D., Thomas L., Kwon G., Elferich J., Shinde U., Thomas G. An interdomain binding site on HIV-1 Nef interacts with PACS-1 and PACS-2 on endosomes to down-regulate MHC-I. *Mol. Biol. Cell.* 2012; 23(11): 2184-97. Doi: <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-11-0928>
- Lewis M.J., Lee P., Ng H.L., Yang O.O. Immune selection in vitro reveals human immunodeficiency virus type 1 Nef sequence motifs

- important for its immune evasion function in vivo. *J. Virol.* 2012; 86(13): 7126-35.
Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.00878-12>
17. Olivetta E., Arenaccio C., Manfredi F., Anticoli S., Federico M. The Contribution of Extracellular Nef to HIV-Induced Pathogenesis. *Curr. Drug Targets.* 2016; 17(1): 46-53.
Doi: <https://doi.org/10.2174/1389450116666151001110126>
 18. Lamers S.L., Poon A.F., McGrath M.S. HIV-1 nef protein structures associated with brain infection and dementia pathogenesis. *PLoS One.* 2011; 6(2): e16659.
Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016659>
 19. Anand A.R., Rachel G., Parthasarathy D. HIV Proteins and Endothelial Dysfunction: Implications in Cardiovascular Disease. *Front. Cardiovasc. Med.* 2018; 5: 185.
Doi: <https://doi.org/10.3389/fcvm.2018.00185>
 20. Almodovar S., Knight R., Allshouse A.A., Roemer S., Lozupone C., McDonald D., et al. Human Immunodeficiency Virus nef signature sequences are associated with pulmonary hypertension. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 2012; 28(6): 607-18.
Doi: <https://doi.org/10.1089/AID.2011.0021>
 21. Emert-Sedlak L.A., Loughran H.M., Shi H., Kulp J.L., Shu S.T., Zhao J., et al. Synthesis and evaluation of orally active small molecule HIV-1 Nef antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2016; 26(5): 1480-4.
Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.01.043>
 22. Hunegnaw R., Vassilyeva M., Dubrovsky L., Pushkarsky T., Sviridov D., Anashkina A.A., et al. Interaction Between HIV-1 Nef and Calnexin: From Modeling to Small Molecule Inhibitors Reversing HIV-Induced Lipid Accumulation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2016; 36(9): 1758-71.
Doi: <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.307997>
 23. Corro G., Rocco C.A., De Candia C., Catano G., Turk G., Mangano A., et al. Genetic and functional analysis of HIV type 1 nef gene derived from long-term nonprogressor children: association of attenuated variants with slow progression to pediatric AIDS. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 2012; 28(12): 1617-26.
Doi: <https://doi.org/10.1089/AID.2012.0020>
 24. Foster J.L., Denial S.J., Temple B.R., Garcia J.V. Mechanisms of HIV-1 Nef function and intracellular signaling. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 2011; 6(2): 230-46.
Doi: <https://doi.org/10.1007/s11481-011-9262-y>
 25. O'Neill E., Kuo L.S., Krisko J.F., Tomchick D.R., Garcia J.V., Foster J.L. Dynamic evolution of the human immunodeficiency virus type 1 pathogenic factor, Nef. *J. Virol.* 2006; 80(3): 1311-20.
Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.80.3.1311-1320.2006>
 26. Usmani S.M., Murooka T.T., Deruaz M., Koh W.H., Sharaf R.R., Di Pilato M., et al. HIV-1 Balances the Fitness Costs and Benefits of Disrupting the Host Cell Actin Cytoskeleton Early after Mucosal Transmission. *Cell. Host Microbe.* 2019; 25(1): 73-86.
Doi: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.12.008>
 27. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 2016; 33(7): 1870-4. Doi: <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
 28. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 2013; 30(12): 2725-9.
Doi: <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
 29. Golosova O., Henderson R., Vaskin Y., Gabrielian A., Grekhov G., Nagarajan V., et al. Unipro UGENE NGS pipelines and components for variant calling, RNA-seq and ChIP-seq data analyses. *PeerJ.* 2014; 2: e644.
Doi: <https://doi.org/10.7717/peerj.644>
 30. Nguyen L.T., Schmidt H.A., von Haeseler A., Minh B.Q. IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 2015; 32(1): 268-74.
Doi: <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>
 31. Ratner L., Haseltine W., Patarca R., Livak K.J., Starcich B., Josephs S.F., et al. Complete Nucleotide-Sequence of the AIDS Virus, HTLV-III. *Nature.* 1985; 313(6000): 277-84.
Doi: <https://doi.org/10.1038/313277a0>

Поступила 21.11.19

Принята в печать 28.11.19



Полтавченко А.Г., Ерш А.В., Таранов О.С., Якубицкий С.Н., Филатов П.В.

Быстрый иммунохимический метод выявления ортопоксвирусов (*Orthopoxvirus*, *Chordopoxvirinae*, *Poxviridae*)

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

Введение. Значительное снижение популяционного иммунитета к поксвирусам вследствие отмены всеобщей вакцинации против оспы сделало основную часть населения восприимчивой к заражению патогенными ортопоксвирусами. Тяжелые последствия такого заражения обуславливают необходимость разработки чувствительных и оперативных методов индикации патогенов.

Цель исследования – разработка чувствительного, быстрого и простого в применении иммунохимического метода для выявления ортопоксвирусов во внелабораторных условиях.

Материал и методы. В работе использовали культуральный вирус осповакцины (ВОВ) с разной степенью очистки и кроличьи поликлональные антиоспенные антитела класса IgG. Анализ выполняли на основе ранее разработанного набора для дот-иммуноанализа на плоских белковых матрицах.

Результаты и обсуждение. Установлено, что одностадийный дот-иммуноанализ может быть выполнен с использованием поликлональных антител как в качестве иммобилизованного на подложке реагента захвата, так и связанного с частицами коллоидного золота реагента детекции. Показана обратная зависимость эффективности выявления ВОВ от степени очистки препаратов от субвирусных структур. В неочищенном препарате чувствительность ускоренного определения вируса оказалась примерно в 30 раз выше, чем в чистом вирусном материале. Увеличение чувствительности, вероятно, происходит за счёт формирования на субвирусных структурах крупных агрегатов сенсibilизированных частиц золота и одновременного связывания их с антителами захвата на подложке. Тест специфичен и не выявляет перекрёстных реакций с гетерогенными вирусами, вызывающими экзантематозные заболевания.

Заключение. Ускоренный вариант дот-иммуноанализа позволяет сократить определение до 40 мин и обеспечить чувствительность выявления ВОВ в неочищенных вирусных препаратах до диапазона 10^5 – 10^4 БОЕ/мл. Полная укомплектованность, простота выполнения анализа и возможность визуального учёта результатов позволяют применять тест во внелабораторных условиях.

Ключевые слова: ортопоксвирусы; быстрое выявление; плоские белковые матрицы; дот-иммуноанализ.

Для цитирования: Полтавченко А.Г., Ерш А.В., Таранов О.С., Якубицкий С.Н., Филатов П.В. Быстрый иммунохимический метод выявления ортопоксвирусов (*Orthopoxvirus*, *Chordopoxvirinae*, *Poxviridae*). *Вопросы вирусологии*. 2019; 64(6): 291-297.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-6-291-297>

Информация об авторах:

Полтавченко А.Г., <https://orcid.org/0000-0003-2408-5611>

Ерш А.В., <https://orcid.org/0000-0002-9220-1250>

Таранов О.С., <https://orcid.org/0000-0002-6746-8092>

Филатов П.В. <https://orcid.org/0000-0001-7763-3808>

Для корреспонденции: Полтавченко Александр Георгиевич, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела разработки и производства средств диагностики вирусных заболеваний ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область; <https://orcid.org/0000-0003-2408-5611>. E-mail: poltav@vector.nsc.ru

Poltavchenko A.G., Ersh A.V., Taranov O.S., Yakubitskiy S.N., Filatov P.V.

Rapid immunochemical method for the detection of orthopoxviruses (*Orthopoxvirus*, *Chordopoxvirinae*, *Poxviridae*)

State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Kol'tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russia

Introduction. The abolition of smallpox vaccination has led to the disappearance of population immunity to pox viruses. However, the threat of infection by pathogenic orthopoxviruses persists and determines the need to develop sensitive and operational methods for indicating pathogens.

Objectives and purposes. Development of a sensitive, fast and easy-to-use immunochemical test for the detection of orthopoxviruses in the «point of care» format.

Material and methods. We used preparations of cultural vaccinia virus (VV) with varying degrees of purification, polyclonal antibodies from hyperimmune rabbit serum, and equipment from a previously developed autonomous kit for dot-immunoassay on flat protein arrays.

Results and discussion. It has been established that rabbit polyclonal antibodies can be used in a single-stage dot-analysis, both as a capture agent immobilized on a substrate and as a detection reagent bound with colloidal gold particles. It is shown that the effectiveness of the detection of VV is inversely related to the degree of purification of viruses from sub-viral structures. The sensitivity of the rapid detection of viruses in a crude preparation was about 30 times higher than in pure viral material. The increase in sensitivity, presumably, occurs due to binding to the capture antibodies of sub-viral structures, which form large aggregates of sensitized gold particles. The test does not detect cross-reactions with heterogeneous viruses (measles, rubella and chickenpox) that cause exantematous diseases.

Conclusion. The one-stage variant of the dot-immunoassay reduces the analysis time to 40 minutes and improves the detection sensitivity of orthopoxviruses in crude viral preparations to the range of 10^5 - 10^4 PFU / ml. Full makeup, ease of analysis and the ability to visually accounting for results allow the test to be used outside of laboratories.

Keywords: *orthopoxviruses; rapid detection; plane protein arrays; dot-immunoassay.*

For citation: Poltavchenko A.G., Ersh A.V., Taranov O.S., Yakubitskiy S.N., Filatov P.V. Rapid immunochemical method for the detection of orthopoxviruses (*Orthopoxvirus, Chordopoxvirinae, Poxviridae*). *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2019; 64(6): 291-297. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-6-291-297>

For correspondence: Alexandr G. Poltavchenko, Dr. Sci. Biol., Lead Researcher of the department of State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Kol'tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-2408-5611>. E-mail: poltav@vector.nsc.ru

Information about authors:

Poltavchenko A.G., <https://orcid.org/0000-0003-2408-5611>

Ersh A.V., <https://orcid.org/0000-0002-9220-1250>

Taranov O.S., <https://orcid.org/0000-0002-6746-8092>

Filatov P.V., <https://orcid.org/0000-0001-7763-3808>

Acknowledgments. The study was conducted under state assignment GZ-9/19.

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

Received 20 November 2019

Accepted 28 November 2019

Введение

Значительное снижение популяционного иммунитета к поксвирусам вследствие отмены всеобщей вакцинации против оспы сделало основную часть населения восприимчивой к заражению патогенными ортопоксвирусами. Однако прекращение рутинной иммунизации против поксвирусов и сохранение вируса натуральной оспы в архивных хранилищах создали возможность для преднамеренного высвобождения и использования вируса натуральной оспы или модифицированного вируса натуральной оспы в качестве биологического оружия или агента биотеррора [1]. Кроме того, описаны многочисленные случаи заражения другими патогенными для человека ортопоксвирусами, такими как вирус оспы обезьян, в том числе и в неэндемичных регионах. Специалисты не исключают возможности возникновения в природе других не менее патогенных ортопоксвирусов [2]. Восприятие этой угрозы привело к тому, что значительное число исследовательских учреждений возродило изучение биологии поксвирусов, а также разработку новых средств их профилактики, диагностики и лечения.

Диагностика таких заболеваний должна быть оперативной, поскольку от неё зависит эффективность лечебных и карантинных мероприятий. Диагноз инфекции может быть установлен лабораторными методами, основанными на выявлении ДНК вируса или родоспецифических антигенов. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), в том числе её экспрессные варианты, позволяют выявлять сотни [3] и даже десятки [4] копий вирусной ДНК и дифференцировать виды ортопоксвирусов. Однако выполнение ПЦР-анализа требует строго контролируемых лабораторных условий, дорогостоящего оборудования и реагентов [5].

Иммунохимические тесты менее чувствительны, чем ПЦР, обычно они позволяют определять специфические антигены в диапазоне концентраций от 10 до 0,1 нг/мл. Однако такая чувствительность

более чем достаточна при анализе проб окружающей среды после биологической атаки или содержимого оспенных пул, где вирусы могут присутствовать в огромных количествах [6]. Кроме того, недостатком иммунодиагностики является неспособность иммунохимических тестов дифференцировать виды ортопоксвирусов вследствие выраженной перекрёстной реактивности их антигенных детерминант, однако в совокупности с характерными симптомами эти методы позволяют установить инфицированность патогенными видами поксвирусов, что позволяет принять неотложные меры по изоляции и лечению пациентов.

С другой стороны, методы иммунодиагностики менее прихотливы, чем ПЦР, к условиям выполнения анализа и позволяют более оперативно получать результаты. Известны иммунохимические тесты, позволяющие с высокой чувствительностью и специфичностью выявлять патогены как в лабораторных, так и в полевых условиях в течение 20–40 мин [7]. Они полностью укомплектованы и выполняются путём несложных манипуляций с простой интерпретацией результатов, что важно при проведении анализа в соответствии с протоколами BSL 3 или 4 биоконтроля.

Ранее мы сообщали о разработке иммунохимических тестов на основе плоских белковых матриц. Такие тесты автономны, просты в применении, снабжены встроенными контролями, допускают визуальный учёт результатов и позволяют оперативно выполнять анализ во внелабораторных условиях [8, 9].

Цель настоящей работы – создание на базе указанных разработок чувствительного, простого в применении и оперативного иммунохимического теста для выявления ортопоксвирусов в формате «у постели больного».

Материал и методы

BOV1 – вирус осповакцины (ВОВ) штамм ЛИВП, наработанный на перевиваемой культуре клеток поч-

ки африканской зелёной мартышки (линия 4647) и ростовой питательной среды ДМЕМ, содержащей 2% телячьей эмбриональной сыворотки. После достижения максимального цитопатического эффекта инфицированные клетки разрушали троекратным замораживанием и оттаиванием и ультразвуковой обработкой. Избавлялись от клеточного дебриса низкоскоростным центрифугированием (5000 об/мин в течение 15 мин при 4 °С) и осаждали вирусный материал высокоскоростным центрифугированием (14 000 об/мин в течение 2 ч при 4 °С) с использованием «подушки» из 30% сахарозы. Инфекционный титр вируса определяли безагарозным методом бляшек на культуре клеток 4647. Биологическая активность препарата VOB1 составляла $3 \cdot 10^8$ БОЕ/мл.

VOB2 получали так же, как VOB1, за исключением того, что осаждение вируса высокоскоростным центрифугированием выполняли без сахарозной «подушки». Биологическая активность препарата VOB2 составляла $6,9 \cdot 10^8$ БОЕ/мл.

Антиген вируса кори, штамм НовО/96 получали культивированием на монослое клеток Vero, очищали и концентрировали в градиенте плотности сахарозы. Вирусную активность инактивировали прогреванием в течение 1 ч при 56 °С.

Антиген вируса краснухи, представляющий собой композицию рекомбинантных белков E1, E2 и С, закупали у фирмы «Капель» (Москва, Россия).

Антиген вируса ветряной оспы (Varicella native antigen кат. № FPZ0039) закупали у фирмы Faron Inc. (Китай).

Am1 – противооспенные антитела класса IgG из сыворотки иммунизированного кролика выделяли осаждением сульфатом аммония [10].

Am2 – нормальные антитела класса IgG из сыворотки неиммунизированного кролика выделяли осаждением сульфатом аммония.

Иммунозоль (Au-Am1). Получение золей золота (15–20 нм) восстановлением тетрахлорзолотой кислоты цитратом натрия, коагуляционный тест для определения дозы нагрузки золя At1 и процедуру нагрузки проводили, как описано ранее [11]. Полученный иммунозоль стабилизировали добавлением бычьего сывороточного альбумина до 1%. Очистку иммунозолей проводили центрифугированием при 15 000 g в течение 30 мин при 4 °С.

Электронная микроскопия. Изучали морфологию и определяли физический титр вирусной суспензии на медных сеточках, покрытых плёнкой-подложкой из формвара и стабилизированных углеродом. Для контрастирования биоконструкций препараты окрашивали 2% водным раствором уранилацетата по общепринятой методике. Образцы исследовали под электронным микроскопом JEM 1400 (Jeol, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ. Фотосъёмку проводили встроенной цифровой камерой «Jeol» и цифровой камерой бокового вывода «Veleta» (SIS, Германия). Анализ и обработку изображения осуществляли с помощью программного пакета iTEM (SIS, Германия).

Белковые матрицы. Подложки белковых матриц вырубали из синтетической бумаги на основе поливинилхлорида «Pentaprint» марки PR-M480/09-07/8101-2D8 (Klöckner Pentaplast, Германия) с применением типографского пресса, отмывали дистиллированной водой и высушивали. Иммунореагенты разводили на 0,005 М боратном буферном растворе (pH 6,0) и наносили на лицевую сторону [12] рабочей зоны каждой подложки аликвотами по 2 мкл по схеме: в верхней части (тестовая зона) наносили специфические антитела At1, в средней части (зона отрицательного контроля) – антитела нормальной сыворотки At2, а в нижней (зона положительного контроля) – вирусный препарат VOB2. Рабочие разведения иммунореагентов подбирали эмпирически. Матрицы высушивали в течение 20 ч при 50 °С, блокировали погружением на 2 ч в 0,2% раствор казеина на 0,01 М фосфатном буферном растворе (pH 7,4), тщательно просушивали и использовали в работе.

Аналитические ванны. Анализ выполняли в многоячеечных полипропиленовых аналитических ваннах, содержащих 5 блоков по 12 рядов ячеек, заполненных готовыми растворами. Для отмывок использовали ФСБ-Т (0,02 М натрий-фосфатный буферный раствор, содержащий 0,8% NaCl, 0,1% твин-20 и 0,1% азида натрия, pH 7,2) и дважды дистиллированную воду; для разведения образцов – ФСБ-Т, содержащий 0,02% казеина, pH 8,0; для разведения иммунозолей – ФСБ-Т, содержащий 0,02% ПЭГ-20 000, pH 7,4. Для проявления использовали ячейки, содержащие по таблетке (4 мг) сухого компонента физического проявителя (смесь метола и лимонной кислоты в соотношении 2 : 5). При получении проявителя в ячейки с таблетками сухой смеси добавляли по 200 мкл бидистиллированной воды для растворения таблеток и непосредственно перед проявлением вносили в ячейки по 200 мкл 0,4% раствора нитрата серебра. Для усиления и стабилизации окраски использовали ячейки, содержащие раствор 1% тиомочевины и 1% NaOH в дистиллированной воде.

Дот-иммуноанализ выполняли при температуре от 20 до 25 °С с объёмом рабочих растворов в ячейках аналитической ванны 0,3–0,4 мл.

В рутинной (двухстадийной) постановке вирусные препараты вносили в ряд ячеек аналитической ванны, заполненных раствором для разведения образцов; погружали в них белковые матрицы и инкубировали 25 мин; дважды отмывали матрицы ФСБ-Т; инкубировали 25 мин с рабочим разведением иммунозоля, дважды отмывали ФСБ-Т и дважды дистиллированной водой, проявляли, отмывали водой, усиливали оптический сигнал в щелочном растворе тиомочевины, ополаскивали водой и визуально учитывали результаты. Положительным считали образец, формирующий ясно различимое тёмное пятно в тестовой зоне белковой матрицы при интенсивном окрашивании зоны положительного контроля и отсутствии окраски в зоне отрицательного контроля.

В ускоренной (одностадийной) постановке вирус-

ные препараты вносили в ряд ячеек ванны, заполненных иммунозолом; инкубировали матрицы 25 мин в полученной смеси и далее выполняли отмыжки и проявление так, как описано для рутинного метода. Схемы анализов представлены на рис. 1.

Результаты

Результаты оценки специфичности дот-иммуноанализа с использованием различных разведений иммунозоля приведены на рис. 2.

Результаты выявления BOB1 и BOB2 в двух- и одностадийном дот-иммуноанализе приведены на рис. 3 и в таблице.

Электронно-микроскопические снимки смесей вирусных препаратов с иммунозолом приведены на рис. 4.

Обсуждение

В настоящей работе использована платформа для дот-иммуноанализа маркёров инфекционных заболеваний, включающая плоские белковые матрицы и многоячеечные аналитические ванны, позволяющая выполнять анализ при комнатной температуре во внелабораторных условиях. Дот-анализ основан на применении иммунозоль – коллоидного золота, связанного с детекторными антителами. Концентрация (рабочее разведение) иммунозоля в системе влияет как на чувствительность, так и на специфичность анализа. Использование слишком разбавленных золь снижает чувствительность определения аналита, а высокие концентрации могут формировать неспецифические оптические сигналы в тестовой зоне.

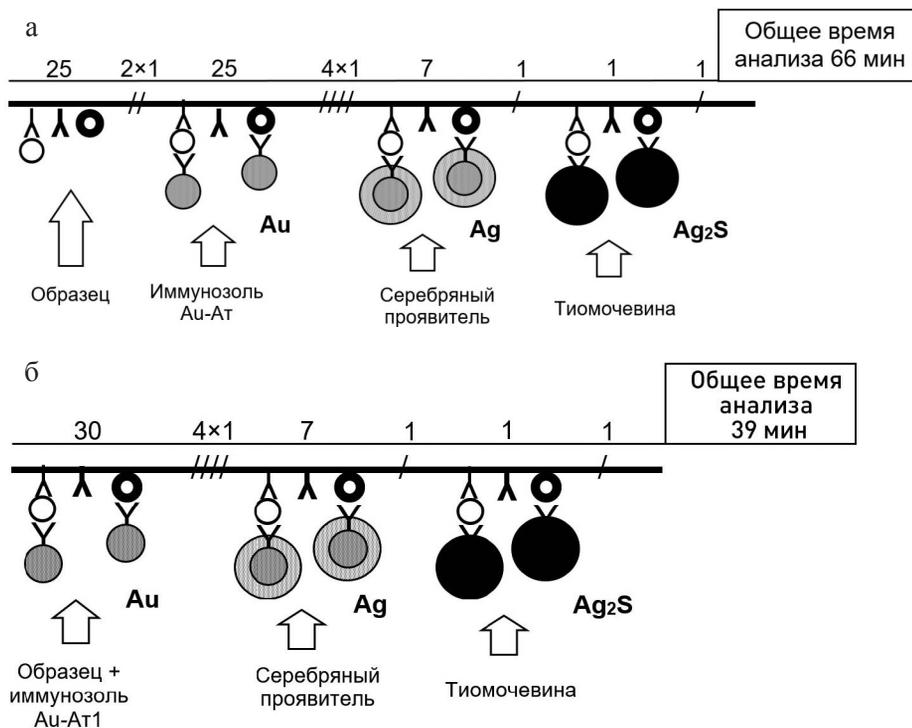


Рис. 1. Принципиальные схемы дот-иммуноанализа антигенов ортопоксвирусов с использованием золь золота, связанных с поликлональными антителами, серебряного проявления, а также стабилизации оптического сигнала щелочным раствором тиомочевина.

а – рутинная двухстадийная постановка; б – экспрессная одностадийная постановка.

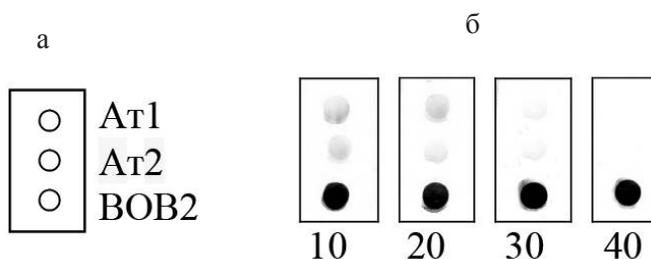


Рис. 2. Влияние разведения иммунозоля на специфичность анализа.

а – схема размещения иммунореагентов захвата на подложке белковой матрицы; б – вид матриц, не имевших контакта с вирусным материалом, после выполнения анализа с различными разведениями иммунозоля. Цифры под матрицами указывают факторы разведений золь. Расшифровка аббревиатур дана в тексте.

и в зоне отрицательного контроля. Результаты эксперимента по выбору оптимального разведения золя приведены на рис. 2. Матрицы, не контактировавшие с вирусом, обрабатывали разными разведениями иммунозоля и проявляли. Отчётливо видно прямое связывание иммунозоля с антителами как из специфической, так и из нормальной кроличьей сыворотки в разведениях золя менее 1 : 40. Таким образом, дальнейшие эксперименты выполняли с рабочим разведением иммунозоля 1 : 50.

Рутинная постановка дот-анализа предусматривает выполнение ряда последовательных операций (см. рис. 1, а). Сначала матрицу инкубируют с исследуемым образцом и вирусные антигены (если они есть в пробе) связываются со специфическими антителами захвата на подложке. На второй стадии подложку обрабатывают иммунозолом, при этом сенсibilизированные частицы коллоидного золота связываются с выделенными из пробы антигенами. Далее следуют процедуры проявления (осевшие на подложке частицы золота катализируют восстановление серебра из раствора, содержащего соль серебра и слабый восстановитель) и стабилизации окраски (осевшее на подложку серебро переводится в интенсивно окрашенный и химически стабильный сульфид серебра). Все операции чередуются с отмывками от несвязавшихся компонентов. Общее время выполнения двухстадийного анализа составляет 60–70 мин.

Сократить время анализа можно за счёт совмещения стадий инкубации белковых матриц в образце и иммунозоле и уменьшения числа отмывок (см. рис. 1, б). Обычно одностадийные варианты иммунохимического анализа выполняют с использованием пары моноклональных антител против разных антигенных детерминант аналита. Один вид антител служит реагентом захвата на подложке, а второй – реагентом детекции, связанным с иммунозолом. При использовании в таком варианте постановки анализа поликлональных антител связывание вирусных структур с антителами на иммунозоле и подложке матрицы происходит параллельно. Однако поскольку

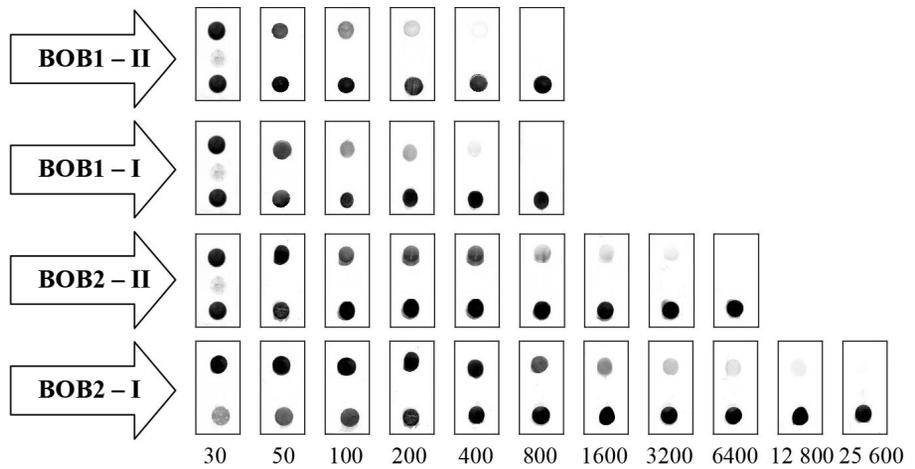


Рис. 3. Вид белковых матриц после выявления препаратов вируса осповакцины в разных вариантах условий постановки дот-иммуноанализа.

Обозначения вирусных препаратов приведены в разделе «Материал и методы». II и I – соответственно двух- и одностадийный варианты дот-анализа. Кратность разведения вирусных материалов приведена под изображениями матриц. Расшифровка аббревиатур дана в тексте.

иммунная реакция в растворе протекает быстрее, чем у поверхности плотной подложки, существует вероятность блокирования антигенных детерминант на поверхности вируса частицами иммунозоля, препятствующего связыванию комплексов «вирус–иммунозоль» на поверхности подложки и ограничивающего чувствительность.

Для проверки изложенных выше предположений параллельно выполняли двух- и одностадийный анализ очищенного на сахарозной подушке (BOB1) и неочищенного (BOB2) вирусного материала с использованием Ат1 и в качестве антител захвата, и в качестве антител детекции. Все эксперименты выполняли в одинаковых условиях с рабочим разведением иммунозоля 1 : 50.

Представленные на рис. 3 и в таблице данные свидетельствуют о том, что эффективность выявления вирусов имеет обратную зависимость от степени очистки анализируемых препаратов от субвирусных структур. Чувствительность определения вирусных антигенов в неочищенном препарате BOB2 в рутинной постановке дот-иммуноанализа в 8 раз, а в экспрессной постановке в 32 раза выше, чем в чистом вирусном материале. В очищенном материале вирусные антигены в том и другом варианте постановки анализа выявляются с примерно одинаковой чувствительностью, тогда как в неочищенном препарате чув-

Чувствительность выявления препаратов вируса осповакцины в разных вариантах условий постановки дот-иммуноанализа

Вирусный препарат	Очистка препарата	Биоактивность исходного препарата, БОЕ/мл	Чувствительность выявления, БОЕ/мл	
			две стадии	одна стадия
ВОВ штамм ЛИВП (ВОВ1)	Осаждение клеточного дебриса. Сахарозная подушка	$3 \cdot 10^8$	1/400	1/400
			$7,5 \cdot 10^5$	$7,5 \cdot 10^5$
ВОВ штамм ЛИВП (ВОВ2)	Осаждение клеточного дебриса	$7 \cdot 10^8$	1/3200	1/12 800
			$2,2 \cdot 10^5$	$5,5 \cdot 10^4$

Примечание. Расшифровка аббревиатур дана в тексте.

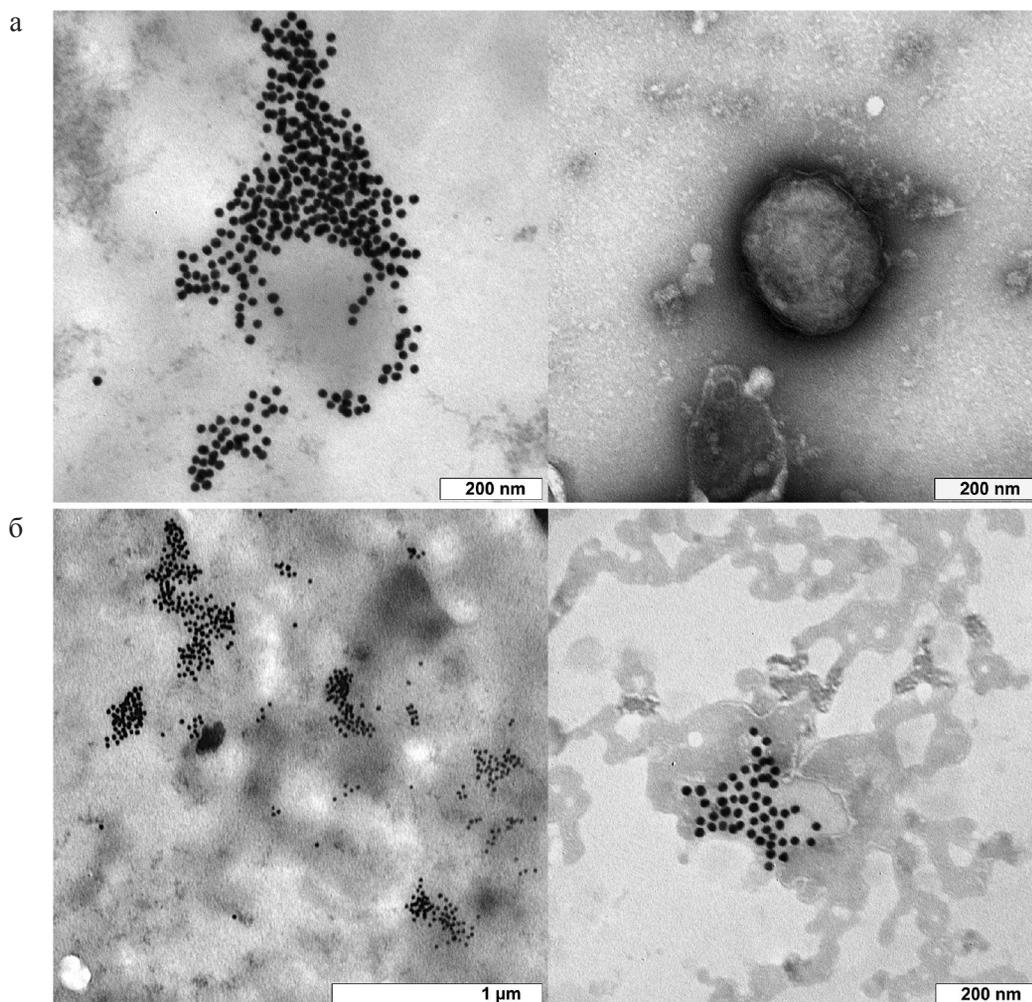


Рис. 4. Вид очищенного (а) и неочищенного (б) вирусов осповакцины с иммунозолем Au-At1 под электронным микроскопом.

Объяснение дано в тексте.

ствительность одностадийного метода заметно возрастает. Механизм этого эффекта становится понятен при электронно-микроскопическом исследовании смесей вирусных препаратов BOB1 и BOB2 с иммунозолем Au-At1.

На снимках наиболее типичных видов таких смесей, приведённых на рис. 4, видно, что частицы иммунозоля образуют крупные конгломераты на вирусных частицах и субвирусных структурах, причём в неочищенном материале таких скоплений частиц золя на субвирусных образованиях визуально определяется значительно больше, чем в чистом препарате. Вероятно, усиление оптического сигнала и, соответственно, повышение эффективности выявления в анализе происходит именно за счёт связывания на подложке крупных агрегатов частиц коллоидного золота, образующихся на субвирусных структурах. Об этом свидетельствует тот факт, что в очищенном препарате BOB1 чувствительность одно- и двухстадийного методов анализа практически одинакова. Как видно на рис. 3, а, часть вирусных частиц связывает имму-

нозоль только отдельными участками своей поверхности, а часть вирусов вообще не реагирует с золем. Предположительно, такой эффект может быть объяснён частичным или полным покрытием вирусов неактивными мембранами культуральных клеток. Вероятно, ограничение реакционных зон на поверхности вирусов и их массивная изоляция частицами золя препятствуют эффективному связыванию комплексов «вирус-иммунозол» с антителами на подложке и увеличению чувствительности.

Следует обратить внимание на вид зон положительного контроля после выполнения одностадийного анализа образцов с малыми разведениями вирусных материалов (см. рис. 2). Для неочищенных препаратов в диапазоне разведений от 1 : 50 до 1 : 200 видна обратная зависимость интенсивности окраски точек положительного контроля от концентрации вируса. Это может свидетельствовать о предпочтительном связывании золя вирусными структурами в жидкой фазе, приводящем к дефициту иммунозоля, реагирующего с антигеном в контрольной точке на поверхности матрицы.

Косвенно на истощение концентрации золя указывает и отсутствие сигнала в зоне отрицательного контроля при анализе образца в разведении 1 : 30. С уменьшением концентрации вируса интенсивность окраски контроля повышается, в разведении 1 : 200 она достигает насыщения и не изменяется при дальнейшем разведении вирусного препарата, что указывает на избыточное содержание золя в смеси. В очищенных материалах такой эффект незаметен, что свидетельствует о меньшем содержании в них антигенно активных структур.

Обычно поксвирусные инфекции дифференцируют с другими экзантематозными заболеваниями, такими как ветряная оспа, краснуха и корь [4]. Для оценки специфичности экспресс-теста в отношении гетерогенных инфекций выполняли анализ с использованием антигенов кори, краснухи и ветряной оспы в концентрации 50 мкг/мл. Ни в одном анализе с гетерогенными инфекциями не отмечено положительного срабатывания, что подтверждает специфичность отработанного теста.

Заключение

Чувствительность выявления ВОВ зависит от степени очистки препаратов от субвирусных структур. Эффективность определения вирусных антигенов в неочищенном препарате ВОВ2 в рутинной постановке дот-иммуноанализа в 8 раз, а в ускоренной постановке в 32 раза выше, чем в чистом вирусном материале.

Поликлональные антитела против ВОВ могут быть использованы в дот-иммуноанализе для выявления ортопоксвирусов, как в качестве реагента захвата, иммобилизованного на подложке; так и в качестве антител детекции, связанных с частицами коллоидного золота.

Ускоренный вариант дот-иммуноанализа позволяет сократить время анализа до 40 мин и увеличить чувствительность выявления ортопоксвирусов в неочищенных вирусных препаратах до диапазона 10^5 – 10^4 БОЕ/мл. Увеличение чувствительности анализа, предположительно, происходит за счёт формирования на субвирусных структурах крупных агрегатов сенсibilизированных частиц золота и одновременного связывания этих структур с антителами захвата на подложке.

Финансирование. Исследование проводилось в рамках выполнения государственного задания ГЗ-9/19.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1, 3, 5-7, 9, 11, 12 см. REFERENCES)

2. Бондарев В.П., Терентьев А.И., Мельников С.А., Бондарева Т.А. Внедрение таблетированной оспенной вакцины «ГЭОВАК» в серийное производство для обеспечения биологической безопасности населения Российской Федерации. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2010; (2): 66-8.

4. Максютлов Р.А. Комплексный подход к видоспецифичной детекции вируса оспы коров. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016; (4): 60-3.
DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2016-4-60-63>

8. Ерш А.В., Полтавченко А.Г., Пьянков С.А., Агафонов А.П., Кривенчук Н.А., Буторин Д.В. Метод комплексной оценки гуморального иммунитета к детским вакциноуправляемым вирусным инфекциям. *Вопросы вирусологии*. 2015; 60(1): 45-9.

10. Скоупс Р. *Методы очистки белков*. Пер с англ. М.: Мир; 1985: 66-72.

REFERENCES

- Rimoin A.W., Graham B.S. Whither monkeypox vaccination. *Vaccine*. 2011; 29(Suppl. 4): D60-4.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.09.004>
- Bondarev V.P., Terent'ev A.I., Mel'nikov S.A., Bondareva T.A. Introduction of the pelleted smallpox vaccine «TEOVAK» into serial production to provide biosafety of the population of the Russian Federation. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2010; (2): 66-8. (in Russian)
- Fitzgibbon J.E., Sagripanti J. Simultaneous identification of orthopoxviruses and alphaviruses by oligonucleotide macroarray with special emphasis on detection of variola and Venezuelan equine encephalitis viruses. *J. Virol. Methods*. 2006; 131(2): 160-7.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.08.007>
- Maksyutov R.A. Complex approach to species-specific detection of cowpox virus. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2016; (4): 60-3.
DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2016-4-60-63> (in Russian)
- Pulford D., Meyer H., Brightwell G., Damon I., Kline R., Ulaeto D. Amplification refractory mutation system PCR assays for the detection of variola and Orthopoxvirus. *J. Virol. Methods*. 2004; 117(1): 81-90.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2004.01.001>
- Probst A., Besse A., Favry E., Imbert G., Tanchou V., Castell F.A., et al. Human CD4 T cell epitopes selective for Vaccinia versus Variola virus. *Mol. Immunol.* 2013; 53(4): 453-9.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2012.10.011>
- Chen L., Wang H., Guo T., Xiao C., Liu L., Zhang X., et al. A rapid point-of-care test for dengue virus-1 based on a lateral flow assay with a near-infrared fluorescent dye. *J. Immunol. Methods*. 2018; 456: 23-7.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jim.2018.02.005>
- Ersh A.V., Poltavchenko A.G., P'yankov S.A., Agafonov A.P., Krivenchuk N.A., Butorin D.V. The multiplex method of estimation of humoral immunity to vaccine regulated childhood infections. *Voprosy virusologii*. 2015; 60(1): 45-9. (in Russian)
- Poltavchenko A.G., Nechitaylo O.V., Filatov P.V., Ersh A.V., Gureyev V.N. Multiplex method for initial complex testing of antibodies to blood transmitted diseases agents. *J. Virol. Methods*. 2016; 236: 231-6.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.08.003>
- Scopes R.K. *Protein Purification. Principles and Practice*. New York: Springer-Verlag; 1982.
- Poltavchenko A.G., Zaytzev B.N., Ersh A.V., Korneev D.V., Taranov O.S., Filatov P.V., et al. The selection and optimization of the detection system for self-contained multiplexed dot-immunoassay. *J. Immunoassay Immunochem*. 2016; 37(5): 540-54.
DOI: <https://doi.org/10.1080/15321819.2016.1174134>
- Poltavchenko A.G., Zaitsev B.N., Ersh A.V., Taranov O.S., Korneev D.V., Nikonov A.M. Selection of Substrate Material for Protein Matrices. *Prot. Met. Phys. Chem+*. 2016; 52(2): 301-7.
DOI: <https://doi.org/10.1134/S2070205116020234>

Поступила 20.11.19

Принята в печать 28.11.19



Бутырский А.Ю., Мухачева А.В., Мовсесянц А.А., Саркисян К.А.

Анализ результатов определения вируснейтрализующих антител в сыворотках крови лиц, привитых от бешенства

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

Введение. Бешенство – инфекционное заболевание, характеризующееся 100% летальным исходом в случае развития у пациента клинической картины. Единственной возможностью предотвратить возникновение данного заболевания у людей является вакцинопрофилактика.

Цель работы – охарактеризовать уровень иммунного ответа у лиц, получивших курс лечебно-профилактической вакцинации против бешенства, рассмотреть роль факторов, которые могут влиять на формирование поствакцинального антирабического иммунитета.

Материал и методы. В лаборатории вирусных вакцин ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России изучен уровень вируснейтрализующих антител (ВНА) к вирусу бешенства в 48 сыворотках крови пациентов, получивших курс лечебно-профилактической вакцинации после поврежденных, нанесённых больными или с подозрением на бешенство животными. Титр ВНА к вирусу бешенства в сыворотках крови привитых, определяемый в разведении не ниже, чем 1 : 64 (соответствует уровню ВНА не менее 0,5 МЕ/мл), при постановке реакции биологической нейтрализации на белых мышах, свидетельствует об эффективности проведённой вакцинопрофилактики.

Результаты и обсуждение. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии статистически значимых различий уровней ВНА в группах привитых, получивших полный и незавершённый (5 прививок) курс лечебно-профилактической вакцинации против бешенства. В зависимости от уровня ВНА все пациенты распределены на группы с условно низким, средним и высоким содержанием антител в сыворотках крови.

Заключение. Показано, что правильно проведённая вакцинация в большинстве случаев способствует формированию напряжённого иммунитета. Отсутствие защитного уровня ВНА требует дополнительного введения вакцины и анализа факторов, повлиявших на неэффективность вакцинации. В ряде случаев показано обязательное определение уровня ВНА после курса лечебно-профилактической вакцинации.

Ключевые слова: бешенство; вирус бешенства; вакцинопрофилактика; поствакцинальный антирабический иммунитет; вируснейтрализующие антитела к вирусу бешенства; вакцины для профилактики бешенства.

Для цитирования: Бутырский А.Ю., Мухачева А.В., Мовсесянц А.А., Саркисян К.А. Анализ результатов определения вируснейтрализующих антител в сыворотках крови лиц, привитых от бешенства. *Вопросы вирусологии.* 2019; 64(6):298-305. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-6-298-305>

Информация об авторах:

Бутырский А.Ю., <https://orcid.org/0000-0002-0352-522X>Мухачева А.В., <https://orcid.org/0000-0003-0769-6867>Мовсесянц А.А., <https://orcid.org/0000-0003-2132-0962>Саркисян К.А., <https://orcid.org/0000-0003-0445-7086>

Для корреспонденции: Бутырский Алексей Юрьевич, ведущий эксперт лаборатории вирусных вакцин ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, 127051, г. Москва; <https://orcid.org/0000-0002-0352-522X> . E-mail: Butirskiy@expmed.ru

Butirskiy A.Yu., Muhacheva A.V., Movsesyants A. A., Sarkisyan K.A.

Analysis of determination of rabies virus neutralizing antibody titres in the sera of vaccinated humans

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, 127051, Russia

Introduction. Rabies is an infectious disease that is always fatal following the onset of clinical symptoms. The only way to prevent the cases of rabies in humans is timely carried out the rabies post-exposure prophylaxis in accordance with the recommended schedule.

The aim of the study was to characterize the level of immune response in persons that received a post-exposure prophylaxis against rabies, to consider the role of the factors of the formation immune responses to rabies vaccines .

Material and methods. In the laboratory of viral vaccines of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, the 48 sera of patients that received the post-exposure prophylaxis of rabies after wounds from a rabid or suspected rabid animal has been studied. The titer of virus neutralizing antibodies (VNA) to the rabies virus in the sera of the vaccinated not less than 1:64 (corresponding to a level of VNA at least 0,5 IU /ml) in the mouse neutralization test indicates the effective vaccination.

Results and discussion. Our data confirm the absence of statistically significant differences in the level of VNA in the vaccinated persons that received a complete and incomplete (5 doses) course of post-exposure vaccination against rabies. Depending on the level of VNA, all patients are divided into groups with conditionally low, medium and high content of antibodies in sera.

Conclusion. It has been shown that in most cases properly administered vaccination contributed to the formation of effective immune response. The lack of a protective level of BHA requires additional administration of the vaccine and analysis of the factors that influenced the ineffectiveness of vaccination. In some patients the determination of rabies virus neutralizing antibody titres is necessary.

Keywords: rabies; rabies virus; vaccination; immune response to rabies virus; rabies virus neutralizing antibody; rabies vaccine.

For citation: Butirskiy A.Yu., Muhacheva A.V., Movsesyants, A.A., Sarkisyan K.A. Analysis of determination of rabies virus neutralizing antibody titres in the sera of vaccinated humans. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2019; 64(6): 298-305. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-6-298-305>

For correspondence: Aleksey Yu. Butirskiy, leading expert of viral vaccines laboratory, Scientific Center for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, 127051, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-0352-522X>. E-mail: Butirskiy@expmed.ru

Information about authors:

Butirskiy A.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-0352-522X>

Muhacheva A.V., <https://orcid.org/0000-0003-0769-6867>

Movsesyants A.A., <https://orcid.org/0000-0003-2132-0962>

Sarkisyan K.A., <https://orcid.org/0000-0003-0445-7086>

Acknowledgments. This work was conducted within the framework of the State assignment of Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products No 056-00154-19-00 for conducting applied research (Agreement No AAAA-A18-118021590046-9).

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

Received 21 May 2019

Accepted 28 November 2019

Введение

Бешенство – это острая вирусная инфекция, вызываемая вирусом семейства *Rhabdoviridae* рода *Lyssavirus* и характеризующаяся симптомами поражения центральной нервной системы и абсолютной летальностью.

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), бешенство занимает одно из первых мест среди инфекционных болезней, наносящих значительный экономический ущерб¹. Несмотря на меры, предпринимаемые для ограничения распространения бешенства и усиления мер профилактики, повсеместно ликвидировать заболевание не удаётся.

Среди зооантропонозных заболеваний, регистрируемых в Российской Федерации, бешенство животных занимает лидирующие позиции по числу ежегодно выявляемых неблагополучных пунктов. За последние 25 лет заболеваемость животных бешенством остаётся на стабильно высоком уровне и охватывает значительную часть территории РФ [1]. Учитывая ареал заболевания, охватывающий большую часть регионов страны, можно констатировать отсутствие реальной возможности добиться полного искоренения эпизоотии в ближайшей и среднеотдалённой перспективе [2].

Эпидемиологическая значимость бешенства для практического здравоохранения определяется в том числе отсутствием эффективных способов его лечения в случае появления клинических признаков болезни и, как следствие, абсолютной летальностью.

В Российской Федерации за многолетний период эпидемиологического наблюдения бешенство среди людей можно охарактеризовать как инфекцию с циклическими колебаниями с промежутками в 2–3 года. С начала 1970-х годов в стране ежегодно регистрируются от 2 до 22 случаев заболевания, с 2005 по 2017 г. от бешенства умерли 113 чело-

век. Следует отметить, что на протяжении последних 5 лет наблюдается тенденция к снижению показателей заболеваемости людей².

На сегодняшний день единственной возможностью предотвратить случаи заболевания бешенством у людей является своевременно назначенная и проведённая в соответствии с инструкцией по применению антирабических препаратов вакцинопрофилактика.

Ежегодно в Российской Федерации от нападения животных страдают порядка 400–450 тыс. человек, из них более половины нуждаются в назначении антирабического лечения [3, 4]. Вакцины для профилактики бешенства, зарегистрированные в Российской Федерации, и схемы их применения приведены в табл. 1.

Различают профилактическую (плановую, предэкспозиционную) и лечебно-профилактическую (экстренную, постэкспозиционную) вакцинацию против бешенства.

Профилактическую вакцинацию против бешенства назначают лицам, относящимся по роду профессиональной деятельности к группам риска в плане возможного контакта с вирусом бешенства (сотрудники лабораторий, работающие с уличным вирусом, ветеринарные работники, егеря, охотники, лесники, лица, выполняющие работы по отлову и содержанию животных, и иные профессиональные группы).

Лечебно-профилактическую вакцинацию назначают в максимально короткие сроки в случае контакта и укусов больными бешенством или с подозрением на бешенство теплокровными животными. Учитывая вариабельность инкубационного периода при бешенстве (от 7 сут до 1 года, в редких случаях – до 2–3 лет), особенностью экстренной вакцинопрофилактики бешенства является комбинированное назначение антирабической вакцины и антирабического иммуноглобулина в случае тяжёлых повреж-

¹ WHO Expert Consultation on Rabies. Third report. WHO Technical Report Series, N 1012. WHO; 2018.

² Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2017 году». <http://15.rospotrebnadzor.ru>

Вакцины для профилактики бешенства, зарегистрированные в Российской Федерации

Торговое наименование	Производитель	Краткая характеристика	Схема применения		Данные о дополнительном введении вакцины в случае отсутствия защитного уровня антител
			профилактическая	лечебно-профилактическая	
КОКАВ Вакцина антирабическая культуральная концентрированная очищенная инактивированная	АО «НПО «Микроген» (Россия)	Содержит вакцинный штамм «Внуково-32» вируса бешенства, выращенный в первичной культуре клеток почек сирийских хомячков, инактивированный ультрафиолетовыми лучами, концентрированный и очищенный методом ультрафильтрации	Назначают 3 дозы: по одной в 0-е, 7-е, 30-е сутки. Первая ревакцинация – 1 доза через 1 год. Последующие ревакцинации – 1 доза каждые 3 года	Назначают 6 доз: по одной в 0-е, 3-и, 7-е, 14-е, 30-е и 90-е сутки (при III категории укусов – первую дозу вводят в комбинации с антирабическим иммуноглобулином)	Назначают 3 дозы: по одной в 0-е, 7-е и 30-е сутки
Вакцина антирабическая культуральная концентрированная очищенная инактивированная сухая	ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Россия)	Содержит вакцинный штамм «Внуково-32» вируса бешенства, выращенный в первичной культуре клеток почек сирийских хомячков, инактивированный ультрафиолетовыми лучами и формалином, концентрированный методом ультрафильтрации с последующей очисткой методом гель-хроматографии	Назначают 3 дозы: по одной в 0-е, 7-е, 30-е сутки. Первая ревакцинация – 1 доза через 1 год. Последующие ревакцинации – 1 доза каждые 3 года	Назначают 6 доз: по одной в 0-е, 3-и, 7-е, 14-е, 30-е и 90-е сутки (при III категории укусов – первую дозу вводят в комбинации с антирабическим иммуноглобулином)	Назначают 3 дозы: по одной в 0-е, 7-е и 30-е сутки
Рабипур® (вакцина антирабическая культуральная очищенная инактивированная)	Кайрон Беринг Вакцинс Приват Лтд (Индия)	Содержит вакцинный штамм «Flury LEP» вируса бешенства, выращенный в первичной культуре клеток фибробластов куриных эмбрионов, инактивированный β-пропиолактоном, концентрированный и очищенный методом ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы	Назначают 3 дозы: по одной в 0-е, 7-е, 21-е или 28-е сутки. Первая ревакцинация – 1 доза через 1 год. Последующие ревакцинации – 1 доза каждые 5 лет. Если возможно, определяют уровень ВНА у пациентов для решения вопроса о назначении бустерной инъекции	Назначают 6 доз: по одной в 0-е, 3-и, 7-е, 14-е, 30-е и 90-е сутки (при III категории укусов – первую дозу вводят в комбинации с антирабическим иммуноглобулином)	В случае снижения защитного уровня ВНА после профилактической вакцинации назначают 1 дозу вакцины однократно. В случае отсутствия защитного уровня ВНА после лечебно-профилактической вакцинации назначают 3 дозы вакцины: по одной в 0-е, 7-е, 21-е или 28 суток

Примечание. ВНА – вируснейтрализующие антитела.

дений (III категория)³: любые ослюнения слизистых оболочек, любые укусы в области головы, пальцев конечностей, гениталий, одиночные или множественные глубокие, кровоточащие рваные раны, нанесённые домашними или сельскохозяйственными животными; любые повреждения, нанесённые дикими плотоядными животными, грызунами и летучими мышами. Назначение антирабического иммуноглобулина должно способствовать удлинению инкубационного периода до момента выработки организмом собственных антител в ответ на введение антирабической вакцины.

Несмотря на значительные достижения в изучении бешенства в последние десятилетия до сих пор не установлены закономерности в развитии и длительности поствакцинального антирабического иммунитета.

Материалы клинических исследований культуральных концентрированных инактивированных антирабических вакцин, приготовленных с использованием разных технологий, демонстрируют единую динамику антителообразования в ответ на введение вакцины [5]: первые антитела класса IgM появляются к 4-м суткам, к 7-м суткам в крови вакцинированных обнаруживаются антитела класса IgG, после чего их уровень постепенно нарастает, достигая максимальных значений к 28–42-м суткам, затем отмечается незначительное снижение антител. ВОЗ расценивает уровень вируснейтрализующих антител (ВНА) $\geq 0,5$ МЕ/мл (разведение 1 : 64 при постановке реакции нейтрализации на белых мышах) как защитный, свидетельствующий об эффективности проведённой вакцинации. В ряде исследований [6–9] было показано, что при назначении культуральных концентрированных антирабических вакцин к 14-м суткам наблюдается сероконверсия у 100% привитых, при этом уровень антител колеблется от 6,9 до 10,3 МЕ/мл в зависимо-

³Инструкция по медицинскому применению лекарственного препарата «КОКАВ Вакцина антирабическая культуральная концентрированная очищенная инактивированная».

сти от применяемой вакцины. Незначительное снижение уровня сероконверсии у 98,3–99,2% привитых исследователи регистрировали к 180-му дню после начала вакцинации.

В последние десятилетия проводятся исследования, направленные на установление факторов, влияющих на динамику антителообразования и длительность персистенции антирабических антител в организме привитых.

С.Е. Rupprecht и соавт. в своих исследованиях подтвердили роль генетического фактора в формировании поствакцинального антирабического иммунитета [10]. В частности, было установлено, что у лиц, имеющих группы В7 и DR2 антигенов гистосовместимости, иммунный ответ развивается быстрее и характеризуется более высоким уровнем ВНА, в то время как у пациентов, имеющих группу DR3 антигенов гистосовместимости, выработка антител начинается позднее, а сам уровень ВНА ниже, чем в группе сравнения.

В исследованиях роли возрастного фактора на уровень поствакцинального антирабического иммунитета было показано, что, несмотря на 100% уровень сероконверсии в опытных группах, уровень ВНА у лиц старше 50 лет несколько ниже, чем в группе пациентов от 11 до 25 лет [11, 12].

Вызывает интерес возможное влияние пола пациента на уровень иммунного ответа на вакцинацию против бешенства. Нам не удалось обнаружить в научной литературе ссылки на исследование этого вопроса для человеческой популяции. Однако в опытах на животных было показано, что иммунный ответ самок на вакцинацию против бешенства был достоверно выше, чем у самцов, получивших вакцинацию против бешенства по такой же схеме [13].

Исследования зарубежных авторов подтверждают, что при оценке эффективности антирабической вакцинации пристальное внимание надо обращать на пациентов, принимающих лекарственные препараты с выраженным иммуносупрессивным действием (глюкокортикостероиды, цитостатики и др.) и страдающих заболеваниями, которые сопровождаются угнетением функций иммунной системы [14, 15]. В работе D.J. Briggs и J.R. Schwenke [16] было показано, что у 88% добровольцев Корпуса мира, получивших антирабическую вакцину внутримышечно на фоне приёма хлорохина, спустя 1,5 года после профилактической вакцинации защитный уровень антител не определялся. При изучении поствакцинального иммунитета к вирусу бешенства у ВИЧ-инфицированных пациентов был продемонстрирован недостаточный уровень иммунного ответа на антирабическую вакцинацию у лиц с содержанием в сыворотке крови CD4⁺ в количестве менее 300/мм³ [17]. В исследовании также была показана целесообразность оценки напряжённости антирабического иммунитета у лиц, страдающих осложнёнными формами сахарного диабета [18].

Следует отметить, что результаты двух исследований [19, 20] свидетельствовали об адекватном иммунном ответе беременных женщин на вакцинацию при отсутствии нежелательных явлений на течение беременности.

До настоящего времени дискутируется вопрос о длительности эффективного иммунного ответа на вакцинацию. Изучение уровня ВНА в сыворотках крови лиц, получивших профилактическую вакцинацию, включающую три прививки, показало, что среднегеометрическое значение уровня антител спустя 1 год варьировало от 1,0 до 3,5 МЕ/мл, однако через 2 года отмечалось снижение защитного уровня у 15–20% привитых. В зарубежной литературе имеются сообщения об обнаружении ВНА в 80% сывороток крови, исследованных спустя 9 лет после первичной вакцинации [21]. Эти данные могут свидетельствовать о формировании механизмов иммунной памяти в ответ на введение антирабической вакцины.

Цель настоящей работы – охарактеризовать уровень иммунного ответа у лиц, получивших курс лечебно-профилактической вакцинации против бешенства, и рассмотреть роль факторов, которые могут влиять на формирование поствакцинального антирабического иммунитета.

Материал и методы

С целью исследования уровня антител к вирусу бешенства использовали 48 сывороток крови пациентов, получивших курс лечебно-профилактической вакцинации против бешенства отечественными вакцинами для профилактики бешенства. Сыворотки поступали на исследование в лабораторию вирусных вакцин ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России в 2016–2018 гг. Исследовали напряжённость антирабического иммунитета после окончания полного курса вакцинации (28 сывороток), сыворотки крови 17 пациентов исследовали после проведения пяти инъекций, сыворотки крови двух пациентов – после четырёх инъекций и сыворотку крови одного пациента – после одной инъекции. Сыворотки крови привитых доставляли на исследование не ранее, чем через 10 сут с момента получения последней дозы вакцины. При необходимости хранения до момента постановки анализа сыворотки однократно замораживали. В день исследования сыворотки крови прогревали при температуре 56 °С в течение 30 мин с целью исключения факторов, ингибирующих ход реакции биологической нейтрализации.

Для проведения реакции биологической нейтрализации использовали фиксированный вирус бешенства штамм CVS-24, хранящийся в рабочей коллекции лаборатории вирусных вакцин ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. Фиксированный вирус бешенства, применяемый для работы, соответствовал следующим требованиям: был типоспецифичен, стерилен (не содержал бактерий и грибов), имел инфекционную активность не менее 10^{-6,0} ЛД₅₀/0,03 мл при внутрицеребральном заражении беспородных белых мышей.

Исследование сывороток привитых против бешенства проводили методом биологической нейтрализации в соответствии с методикой, рекомендованной ВОЗ⁴. Для испытания использовали мышей с массой

⁴ Laboratory techniques in rabies. 4th edition. WHO; 1996.

Таблица 2

Результаты исследования уровня вируснейтрализующих антител в сыворотке крови привитых от бешенства, получивших полный курс лечебно-профилактической вакцинации

Сыворотка, №	Пациент	Пол	Возраст, годы	Титр сыворотки
1	С-а	Ж	29	1 : 91
2	Д-в	М	20	1 : 141
3	Л-в	М	48	1 : 182
4	Т-в	М	41	1 : 363
5	Т-а	Ж	39	1 : 512
6	Т-а	Ж	7	1 : 512
7	С-я	Ж	46	1 : 413
8	П-а	Ж	42	1 : 363
9	С-в*	М	54	1 : 166
10	О-а	Ж	26	1 : 355
11	Ш-о**	Ж	52	1 : 158
12	Л-н	М	41	1 : 162
13	Т-в	М	39	1 : 200
14	Л-а	Ж	9	1 : 105
15	К-а	Ж	27	1 : 512
16	Ш-о**	Ж	53	1 : 219
17	С-в*	М	55	1 : 275
18	Ш-о**	Ж	54	1 : 603
19	Н-о	Ж	37	1 : 912
20	С-в*	М	56	1 : 282
21	П-в	М	6	1 : 1024
22	Л-м	Ж	58	1 : 97
23	К-в	М	31	1 : 90
24	К-а	Ж	8	1 : 71
25	К-а	Ж	6	1 : 32
26	Х-а	Ж	23	1 : 232
27	Г-а	Ж	61	1 : 170
28	Ш-а	Ж	49	1 : 256

Примечание. */** – исследование сыворотки у одного и того пациента в разные сроки.

тела 11 ± 1 г (возраст 4 нед) без различия пола. Содержали животных и проводили манипуляции с ними в соответствии с требованиями ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур».

Разведения сывороток готовили в диапазоне 1 : 16 – 1 : 1024, используя двукратный шаг разведения. Фиксированный вирус бешенства использовали в рабочем разведении, содержащем 20–50 ЛД₅₀/0,03 мл. За животными наблюдали в течение 14 сут, ежедневно регистрируя гибель мышей с клиническими симптомами бешенства: взъерошенная шерсть, замедленные и/или круговые движения, дрожание, парез, параличи.

Выбор биологического метода исследования с использованием лабораторных животных обусловлен следующими особенностями:

- характеризуется высокой чувствительностью и специфичностью. Методика позволяет определять наличие антител к определённому антигену вируса бешенства – гликопротеину (белок G, содержит 505 ами-

Таблица 3

Результаты исследования уровня вируснейтрализующих антител в сыворотке крови привитых от бешенства, получивших незавершённый курс лечебно-профилактической вакцинации

Сыворотка, №	Пациент	Пол	Возраст, годы	Количество прививок на момент исследования	Титр сыворотки
29	В-а	Ж	37	5	1 : 256
30	Т-в	М	36	5	1 : 324
31	З-в	М	32	5	1 : 118
32	Б-н	М	41	5	1 : 363
33	А-а	Ж	45	5	1 : 1024
34	П-а	Ж	28	5	1 : 234
35	О-а	Ж	11	5	1 : 16
36	С-н	М	34	4	1 : 512
37	А-н	М	12	5	1 : 90
38	А-а	М	16	5	1 : 97
39	А-а	Ж	18	5	1 : 140
40	А-а	Ж	37	5	1 : 72
41	С-а	Ж	69	5	1 : 25
42	С-в	М	45	1	1 : 16
43	Г-а	М	43	5	1 : 107
44	Л-я	Ж	60	4	1 : 84
45	Ф-а	Ж	11	5	1 : 178
46	Б-а	Ж	81	5	1 : 45
47	З-й	М	7	5	1 : 92
48	К-н	М	3	5	1 : 72

нокислот), отвечающему за индукцию гуморального иммунного ответа;

- не требует использования дорогостоящего оборудования и специфических реактивов;

- отличается простотой учёта результатов и даёт возможность точной количественной оценки уровня антителообразования в ответ на специфическую вакцинацию.

Статистическую обработку результатов исследований проводили с использованием программы Statistica (version 10). Нормальность распределения оценивали по критерию Шапиро–Уилка, статистическую значимость различий определяли по критерию Манна–Уитни при уровне значимости $p < 0,05$.

Титр сыворотки (ВНА) рассчитывали методом Рида и Менча⁵.

Результаты

Результаты исследования выражали в виде величины разведения исследуемой сыворотки (титр), которая в смеси с фиксированным вирусом бешенства в рабочем разведении защищала 50% экспериментальных животных в опытной группе. Гибель мышей в первые 4 сут после заражения расценивали как неспецифическую и в расчётах не учитывали. В качестве нормативного (референс) значения использовали защитное разведение сыворотки 1 : 64 [22]. Результаты ис-

⁵ Методы лабораторных исследований по бешенству. 3-е изд. ВОЗ, 1975.

Таблица 4

Влияние гендерной принадлежности пациентов и полноты курса вакцинации на уровень вируснейтрализующих антител ($p < 0,05$)

Исследуемый фактор	Значение медианы (25–75%)	Критерий Шапиро–Уилка (W)	Гипотеза о нормальности распределения	Критерий Манна–Уитни (U)	Гипотеза о статистической значимости различий в сравниваемых группах
Пол	Ж – 1 : 170 (1 : 84 – 1 : 363) М – 1 : 164 (1 : 102 – 1 : 344)	0,80275 ($p = 0,00015$) 0,69889 ($p = 0,00016$)	Отклонена	203,0000 ($p = 0,753465$)	Отсутствует
Полнота курса вакцинации	п – 1 : 191 (1 : 123 – 1 : 388) н – 1 : 107 (1 : 72 – 1 : 256)	0,81323 ($p = 0,00049$) 0,69195 ($p = 0,0004$)	Отклонена	151,5000 ($p = 0,063079$)	Отсутствует

Примечание. Ж – женщины; М – мужчины; п – полный курс лечебно-профилактической вакцинации (6 прививок); н – незавершенный на момент исследования курс вакцинации (4 или 5 прививок).

следования учитывали в случае соответствия условий опыта критериям достоверности испытания:

1. При титровании вируса бешенства в рабочем разведении гибель животных в опытной группе, получившей рабочее разведение вируса, составила 100%.

2. Неспецифическая гибель животных в опытной группе при исследовании каждой сыворотки не превышала 1 мыши.

3. В рабочем разведении вируса, по результатам титрования, содержалось от 20 до 50 ЛД₅₀/0,03 мл. Если количество вируса превышало 50 ЛД₅₀/0,03 мл, но защитное разведение сыворотки равнялось референс-значению или превышало его, то результаты исследования считали валидными; если при превышении дозы вируса защитное разведение сыворотки было менее референс-значения, проводили повторное испытание сыворотки.

Результаты исследования приведены в табл. 2, 3.

Всего было исследовано 48 сывороток, полученных от 44 пациентов, из них 26 (59%) были привиты вакциной производства ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН», 4 (9%) человека – вакциной производства АО «НПО «Микроген», у 5 (11%) человек курс проводился вакцинами разных производителей, в 9 (21%) случаях данные о производителе отсутствуют. При анализе медицинской документации установлено: 17 (39%) пациентов получили повреждение от животных с лабораторно установленным диагнозом бешенства, 7 (16%) – от диких животных с подозрением на бешенство, 20 (45%) – от домашних животных с подозрением на бешенство.

Как следует из данных табл. 2 (при анализе не учитывали сыворотки № 16, 17, 18, 20, которые проверяли у двух пациентов повторно с интервалами 1 год на протяжении 2 лет), защитный уровень антител определялся у 23 (95,8%) пациентов, а уровень антител ниже защитного (1 : 64) зарегистрирован у 1 (4,2%) человека. Среднее арифметическое значение уровня ВНА составило 1 : 297 (95% доверительный интервал 1 : 190 – 1 : 404), при этом минимальное значение было 1 : 32, а максимальное 1 : 1024. Уровень антител менее 1 : 190 условно расценивался как низкий, в пределах 1 : 191 – 1 : 404 – как средний, более 1 : 404 – как высокий. Таким образом, у 50% привитых определялся средний уровень антител, у 25% – низкий и у остальных 25% – высокий.

По результатам исследования 20 сывороток крови привитых, не закончивших предписанный курс вакцинации по тем или иным причинам, защитный уровень антител определялся у 16 (80%) пациентов, а уровень антител ниже защитного (1 : 64) зарегистрирован у 4 (20%) человек. При дальнейшей статистической обработке полученных данных результат по сыворотке крови № 42 (пациент получил одну инъекцию) не учитывали.

Среднее арифметическое значение уровня ВНА составило 1 : 203 (95% доверительный интервал 1 : 88 – 1 : 317), при этом минимальное значение было 1 : 16, а максимальное 1 : 1024. Уровень антител менее 1 : 88 условно расценивали как низкий, в пределах 1 : 89 – 1 : 317 – как средний, более 1 : 317 – как высокий. Таким образом, у 58% привитых определялся средний уровень антител, у 31% – низкий, у 11% – высокий.

У двух пациентов (1-й пациент – сыворотки № 9, 17, 20; 2-й пациент – сыворотки № 11, 16, 18) сыворотки исследовали трёхкратно с интервалом между получением сывороток 10–12 мес. У 1-го пациента защитный уровень антирабических антител составлял соответственно 1 : 166, 1 : 275, 1 : 282, при этом дополнительных введений вакцины в интервалы между исследованиями не было. Фактически, можно говорить о том, что уровень антител с момента вакцинации находился на одном уровне (в диапазоне разведения сыворотки 1 : 128 – 1 : 256). У 2-го пациента защитный уровень специфических антител определялся в разведениях 1 : 158; 1 : 219; 1 : 603, при этом за 1 мес до 3-го предоставления сыворотки пациенту была введена 1 доза вакцины.

Полученные результаты определения уровня ВНА были обработаны статистически для оценки возможного влияния гендерной принадлежности пациентов и полноты курса лечебно-профилактической вакцинации на величину уровня ВНА.

Данные, представленные в табл. 4, свидетельствуют о том, что статистически значимые различия в уровне ВНА у женщин и мужчин отсутствуют, а величина ВНА у лиц, получивших курс из 5 инъекций антирабической вакцины, и лиц с завершённым курсом вакцинации статистически не различается.

Обсуждение

Результаты исследования сывороток крови свидетельствуют о том, что у 89% привитых определяется защитный уровень ВНА после проведённого курса лечебно-профилактической вакцинации. Установлено, что у 58,5% лиц, получивших 5 или 6 прививок, уровни антител можно расценивать как средние и высокие.

У 11% привитых уровень ВНА был ниже рекомендованного. В одном случае (сыворотка крови № 25) пациентка 6 лет обратилась за медицинской помощью спустя 2 сут после укуса собаки с установленным диагнозом бешенства, получила полный курс вакцинации в соответствии с инструкцией по применению. При анализе медицинской документации нарушений в оказании антирабической помощи не установлено. Однако следует отметить, что сыворотка на исследование поступила спустя 3 мес после окончания курса вакцинопрофилактики. По результатам исследования было назначено дополнительное введение вакцины.

Среди лиц, не имеющих защитного уровня антител, один пациент (сыворотка № 42) получил одну прививку антирабической вакцины, после чего отказался от дальнейшего курса вакцинации. При анализе медицинской документации установлено, что пациенту была начата антирабическая вакцинация в связи с проведением противоэпидемических мероприятий в очаге бешенства, при этом повреждения (ослушивание, укусы, царапины), нанесённые больным животным, отсутствовали. Предполагаемый контакт был отнесён нами к I категории повреждений, предусмотренной инструкцией по применению, что не требовало назначения полного курса вакцинопрофилактики против бешенства.

В одном случае (сыворотка № 35) пациентка 11 лет обратилась в медицинское учреждение в день получения повреждения – укушенной раны II пальца правой руки, нанесённой хомяком, павшим на следующий день. Пациентке был назначен курс комбинированной вакцинопрофилактики бешенства. При анализе медицинской документации установлено, что в момент оказания антирабической помощи нарушена последовательность введения антирабических препаратов: сначала была введена вакцина и спустя некоторое время антирабический иммуноглобулин. Указанная ситуация была оценена нами как нарушение инструкции по применению препаратов для профилактики бешенства, что могло повлечь неэффективность проведённого курса вакцинопрофилактики. По результатам исследования было назначено дополнительное введение вакцины.

Ещё в одном случае (сыворотка № 41) на исследование поступила сыворотка крови от пациентки 69 лет, привитой в связи с проведением противоэпидемических мероприятий в очаге бешенства. Нарушений при оказании антирабической помощи на этапе обращения в медицинское учреждение не установлено, однако факт незавершения полного курса вакцинации на момент обращения был расценен нами как нарушение инструкции, и пациентке было рекомендовано повторное исследование после введения 6-й дозы

вакцины. Повторно сыворотка крови на исследование не поступала.

Анализ медицинской документации, поступившей с образцами сыворотки крови № 46, показал, что лечебно-профилактическая вакцинация была назначена пациентке 81 года в связи с обширными укушенными ранами обеих кистей, нанесённых собакой с установленным диагнозом бешенства. Первые пять прививок курса были проведены в сроки, регламентированные инструкцией по применению. После 5-й прививки сыворотка поступила на исследование, по результатам которого уровень ВНА был ниже регламентированного уровня. Факт незавершения полного курса вакцинации на момент обращения был расценен как нарушение инструкции по применению, и пациентке было рекомендовано повторное исследование после введения 6-й дозы вакцины. Повторно сыворотка крови на исследование не поступала.

Обращает на себя внимание тот факт, что в двух случаях отсутствие защитного уровня антител зарегистрировано у лиц детского возраста и в одном случае у лица старческого возраста, по классификации ВОЗ. Однако установление окончательного вывода невозможно в связи с небольшим количеством пациентов указанных возрастов в нашей выборке. В дальнейшем целесообразно продолжить изучение влияния возраста пациента на уровень антителобразования после курса вакцинопрофилактики против бешенства.

При оценке причин отсутствия защитного уровня ВНА необходимо учитывать условия оказания антирабической помощи. Необходимым условием выработки поствакцинального иммунитета является точное соблюдение требований инструкции по применению антирабических препаратов. Проведённый нами анализ карт пациентов, обратившихся за антирабической помощью (форма № 045/у), свидетельствует о том, что в 15% случаев были нарушения при оказании антирабической помощи: со стороны медицинских работников – неправильная оценка категории полученных повреждений, нарушение последовательности введения антирабических препаратов, несоблюдение интервалов введения доз вакцины, неправильный выбор места инъекции; со стороны пациентов – несвоевременное начало вакцинации, преждевременное прекращение курса вакцинации и др.

Результаты зарубежных исследований⁶, свидетельствуют, что базовый уровень поствакцинальных ВНА формируется на 28–42-е сутки, а назначение 6-й инъекции не вызывает статистически значимого подъёма уровня специфических антител. Полученные нами данные не противоречат данным зарубежных учёных: нам не удалось обнаружить статистически значимых различий в группах привитых, получивших полный и незавершённый курс лечебно-профилактической вакцинации против бешенства. Однако окончательно

⁶Immunological basis for immunization series. Module 17: Rabies. WHO, 2017

ные выводы делать преждевременно, необходимо изучение большего количества сывороток крови.

Заключение

Оценка уровня напряжённости поствакцинального антирабического иммунитета имеет важное диагностическое значение.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что неукоснительное соблюдение требований инструкции по применению антирабических препаратов в большинстве случаев является гарантией эффективности проведённого курса вакцинации. Даже условно низкий рекомендованный уровень ВНА предупреждал развитие клинической картины бешенства у пациентов, получивших повреждения от животных с установленным диагнозом бешенства.

Единичные случаи отсутствия защитного уровня антител должны быть предметом анализа для лечащего врача с целью установления возможных причин, влияющих на иммунный ответ, и их исключения на период вакцинации против бешенства.

Определение уровня ВНА к вирусу бешенства в первую очередь показано для оценки эффективности лечебно-профилактической вакцинации у привитых с нарушениями инструкции по применению антирабических препаратов; у лиц с заболеваниями иммунной системы (первичные иммунодефициты, ВИЧ-инфекция, онкологические заболевания) или получивших курс вакцинации на фоне приёма лекарственных препаратов с иммуносупрессивным действием (глюкокортикостероиды, цитостатики и т.п.).

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00154-19-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учёта НИР АААА-А18-118021590046-9).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 5-21 см. REFERENCES)

1. Шабейкин А.А., Зайкова О.Н., Гулюкин А.М. Обзор эпизоотической ситуации по бешенству в Российской Федерации за период с 1991 по 2015 годы. *Ветеринария Кубани*. 2016; (4): 4-6.
2. Шабейкин А.А., Гулюкин А.М., Хисматуллина Н.А., Цареградский П.Ю., Паршикова А.В., Роб ван Герwijen. Обзор эпизоотической ситуации бешенства, сложившейся в Российской Федерации в 2014 году. *Ветеринария и кормление*. 2015; (2): 19-23.
3. Мовсесянц А.А., Олефир Ю.В. Современные проблемы вакцинопрофилактики бешенства. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2019; 19(1): 10-6. Doi: <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-1-10-16>
4. Никифоров В.В., Авдеева М.Г. Бешенство. Актуальные вопросы. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2017; 22(6): 295-305. Doi: <https://doi.org/10.18821/1560-9529-2017-22-6-295-305>
22. Селимов М.А. *Бешенство*. М.: Медицина; 1978.

REFERENCES

1. Shabaykin A.A., Zaykova O.N., Gulyukin A.M. Overview of the epizootic situation in the Russian Federation from 1991 to 2015. *Veterinariya Kubani*. 2016; (4): 4-6. (in Russian)
2. Shabaykin A.A., Gulyukin A.M., Khismatullina N.A., Tsaregradskiy P.Yu., Parshikova A.V., Rob van Herwijen. Overview of the epizootic situation of rabies in the Russian Federation in 2014. *Veterinariya i kormlenie*. 2015; (2): 19-23. (in Russian)
3. Movsesyants A.A., Olefir Yu.V. Current challenges of preventive vaccination against rabies. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie*. 2019; 19(1): 10-6. Doi: <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-1-10-16> (in Russian)

4. Nikiforov V.V., Avdeeva M.G. Rabies. Actual issues. *Epidemiologiya i infektionnye bolezni*. 2017; 22(6): 295-305. Doi: <https://doi.org/10.18821/1560-9529-2017-22-6-295-305> (in Russian)
5. Johnson N., Cunningham A.F., Fooks A.R. The immune response to rabies virus infection and vaccination. *Vaccine*. 2010; 28(23): 3896-901. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.03.039>
6. Jones R.L., Froeschle J.E., Atmar R.L., Matthews J.S., Sanders R., Pardalos J., et al. Imminogenicity, safety and lot consistency in adults of a chromatographically purified Vero-cell rabies vaccine: a randomized, double-blind trial with diploid cell rabies vaccine. *Vaccine*. 2001; 19(32):4635-43. Doi: [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(01\)00238-9](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(01)00238-9)
7. Briggs D.J., Dreesen D.W., Nicolay U., Chin J.E., Davis R., Gordon C., et al. Purified chick embryocell culture rabies vaccine: interchangeability with human diploid cell culture rabies vaccine and comparison of one- versus two-dose post-exposure booster regimen for previously immunized persons. *Vaccine*. 2000; 19(9-10): 1055-60. Doi: [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(00\)00342-x](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(00)00342-x)
8. Wiktor T.J., Plotkin S.A., Grella D.W. Human cell culture rabies vaccine: antibody response in man. *JAMA*. 1973; 224(8): 1170-1.
9. Bernard K.W., Roberts M.A., Sumner J., Winkler W.G., Mallonee J., Baer G.M., et al. Human diploid cell rabies vaccine: effectiveness of immunization with small intradermal or subcutaneous doses. *JAMA*. 1982; 247(8): 1138-42. Doi: <https://doi.org/10.1001/jama.247.8.1138>
10. Rupprecht C.E., Nagarajan T., Ertl H. Rabies vaccines. In: Plotkin S.A., Orenstein W., Offit P.A., Edwards K.M., eds. *Vaccines*. Philadelphia: Elsevier; 2017.
11. Mastroeni L., Vescia N., Pompa M.G., Cattaruzza M.S., Marini G.P., Fara G.M. Immune response of the elderly to rabies vaccines. *Vaccine*. 1994; 12(6): 518-20. Doi: [https://doi.org/10.1016/0264-410x\(94\)90310-7](https://doi.org/10.1016/0264-410x(94)90310-7)
12. Leder K., Weller P.F., Wilson M.E. Travel vaccines and elderly persons: review of vaccines available in the United States. *Clin. Infect. Dis*. 2001; 33(9): 1553-66. Doi: <https://doi.org/10.1086/322968>
13. Mansfield K.L., Burr P.D., Snodgrass D.R., Sayers R., Fooks A.R. Factors affecting the serological response of dogs and cats to rabies vaccination. *Vet. Rec*. 2004; 154(14): 423-6. Doi: <https://doi.org/10.1136/vr.154.14.423>
14. Rotivel Y., Weber P., Goudal M. Post-exposure treatment of patients with impaired or suboptimal immunity. In: Dodet B., Meslin F.X., eds. *Rabies Control in Asia. Proceedings of the Fourth International Symposium, Hanoi, Viet Nam*. Paris: John Libbey Eurotext; 2001: 61-5.
15. Thisyakorn U., Pancharoen C., Wilde H. Immunologic and virologic evaluation of HIV-1-infected children after rabies vaccination. *Vaccine*. 2001; 19(11-12): 1534-7. Doi: [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(00\)00322-4](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(00)00322-4)
16. Briggs D.J., Schwenke J.R. Longevity of rabies antibody titre in recipients of human diploid cell rabies vaccine. *Vaccine*. 1992; 10(2): 125-9. Doi: [https://doi.org/10.1016/0264-410x\(92\)90029-j](https://doi.org/10.1016/0264-410x(92)90029-j)
17. Jaijaroensup W., Tantawichien T., Khawplod P., Tepsumethanon S., Wilde H. Postexposure rabies vaccination in patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin. Infect. Dis*. 1999; 28(4): 913-4. Doi: <https://doi.org/10.1086/517241>
18. Deshmukh R.A., Yemul V.L. Fatal rabies encephalitis despite post-exposure vaccination in a diabetic patient: a need for use of rabies immune globulin in all post-exposure cases. *J. Assoc. Physicians India*. 1999; 47(5): 546-7.
19. Abazeed M.E., Cinti S. Rabies prophylaxis for pregnant women [letter]. *Emerg. Infect. Dis*. 2007; 13(12): 1966-7. Doi: <https://doi.org/10.3201/eid1312.070157>
20. Sudarshan M.K., Madhusudana S.N., Mahendra B.J. Post-exposure prophylaxis with purified Vero cell rabies vaccine during pregnancy: safety and immunogenicity. *J. Commun. Dis*. 1999; 31(4): 229-36.
21. Mansfield K.L., Andrews N., Goharriz H., Goddard T., McElhinney L.M., Brown K.E., et al. Rabies pre-exposure prophylaxis elicits long-lasting immunity in humans. *Vaccine*. 2016; 34(48): 5959-67. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.09.058>
22. Selimov M.A. *Rabies [Beshenstvo]*. Moscow: Meditsina; 1978. (in Russian)

Поступила 21.05.19

Принята в печать 28.11.19

Савиных Н.А.¹, Дехтерева Н.В.², Савиных М.В.¹, Калужских Т.И.¹

Эпизоотическая характеристика бешенства и антирабическая помощь на территории Кировской области в 2010–2018 гг.

¹ ФГБОУ ВО «Кировский государственный медицинский университет» Минздрава России, 610998, г. Киров, Россия;² ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Кировской области» Роспотребнадзора, 610000, г. Киров, Россия

Введение. Одним из негативных последствий роста заболеваемости животных бешенством является увеличение риска заражения людей.

Цель исследования – изучение основных проявлений эпизоотии бешенства и состояния антирабической помощи в Кировской области в 2010–2018 гг.

Материал и методы. Изучены отчётные формы мониторинга ситуации по бешенству ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Кировской области» за 2010–2018 гг. Анализ данных проводили с использованием общепринятых методов медицинской статистики.

Результаты. С 2014 г. выявлены рост заболеваемости животных бешенством, расширение границ ареала. Бешенство преимущественно регистрируется у лис (67%), увеличивается доля енотовидных собак (до 40%), домашних и сельскохозяйственных животных. Ежегодно в Кировской области свыше 4 тыс. человек получают повреждения от животных. Укусы и ослюнения кожных покровов и слизистых чаще наносят собаки (76%) и кошки (20%). Частыми локализациями повреждений остаются нижние конечности (34%). Укусы наиболее опасной локализации – в голову, шею, лицо, кисти рук – составляют 29%, множественные укусы – 7%. В среднем 3,5 тыс. пострадавших направляются на иммунопрофилактику.

Обсуждение. Выявлена корреляционная зависимость снижения до минимума в 2015 г. объёма профилактической оральной иммунизации диких животных и роста контактов людей с больными бешенством животными. Высокая частота отказов от вакцинации или самостоятельного прекращения профилактики (до 31%) связана с низкой санитарной грамотностью населения.

Заключение. Проблема бешенства актуальна для Кировской области. С 2014 г. наблюдается активизация эпизоотии с расширением границ очага и вовлечением центральных районов. Увеличивается доля заражённых домашних и сельскохозяйственных животных, что повышает риск заболевания человека. Для стабилизации эпизоотии бешенства необходимо выполнение всего комплекса профилактических мер, включающих адекватную по объёму оральную иммунизацию диких животных, мероприятия по повышению санитарной грамотности населения и усиление просветительской работы.

Ключевые слова: бешенство у животных; Кировская область; антирабическая помощь.

Для цитирования: Савиных Н.А., Дехтерева Н.В., Савиных М.В., Калужских Т.И. Эпизоотическая характеристика бешенства и антирабическая помощь на территории Кировской области в 2010–2018 гг. *Вопросы вирусологии.* 2019; 64(6): 306–310. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-6-306-310>

Информация об авторах:

Савиных Н.А., <http://orcid.org/0000-0002-1669-7661>Дехтерева Н.В., <http://orcid.org/0000-0001-9324-7456>Савиных М.В., <http://orcid.org/0000-0003-4205-0463>Калужских Т.И., <http://orcid.org/0000-0002-2897-0733>

Для корреспонденции: Савиных Наталия Анатольевна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры инфекционных болезней ФГБОУ ВО «Кировский государственный медицинский университет» Минздрава России, 610998, г. Киров; <http://orcid.org/0000-0002-1669-7661>. E-mail: nat.savinih@yandex.ru

Savinykh N.A.¹, Dehtereva N.V.², Savinykh M.V.¹, Kaluzhskich T.I.¹

Epizootic characteristics of rabies and rabies assistance in the territory of the Kirov region in the years 2010-2018

¹ Kirov State Medical University, Kirov, 610998, Russia;² Center for Hygiene and Epidemiology in the Kirov Region, Kirov, 610000, Russia

Introduction. One of the negative consequences of an increase in the incidence of animal rabies is the increased risk of human infection.

Goals and objectives: study of the main manifestations of rabies epizootic and the status of anti-rabies care in the Kirov region in 2010-2018.

Material and methods. Reporting forms of monitoring the situation of rabies FBHI "Center for Hygiene and Epidemiology in the Kirov Region" for 2010-2018 were statistically processed and studied.

Results. Since 2014, increase in the incidence of rabies among animals and expansion of the boundaries of the range have been revealed. Rabies is recorded among foxes (67%), raccoon dogs (up to 40%), domestic and farm animals. Every year in Kirov region over 4 thousand people get injured from animals: dogs (76%) and cats (20%). Damage is often localized on the lower extremities (34%) and was the most dangerous on the head, neck, face, hands (29%). In average of 3,500 victims are sent to immunization.

Discussion. An inverse correlation dependence between preventive oral immunization of wild animals and contacts of people with rabid animals was revealed. A high percentage of refusals from vaccination (up to 31%) is associated with low sanitary literacy of the population.

Conclusion. The problem of rabies is relevant for the Kirov region. An increase of the proportion of infected domestic and farm animals leads to an increase the risk of human disease. In order to stabilize rabies epizootic, it is necessary to carry out the whole complex of prophylactic measures.

Keywords: rabies in animals; Kirov region; help against rabies.

For citation: Savinykh N.A., Dehtereva N.V., Savinykh M.V., Kaluzhskich T.I. Epizootic characteristics of rabies and rabies assistance in the territory of the Kirov region in the years 2010-2018. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2019; 64(6): 306-310. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-6-306-310>

For correspondence: Nataliia A. Savinykh, Candidate of Sciences in Medicine, Assistant Professor Department of Infectious Diseases Kirov State Medical University, Kirov, 610998, Russia; <http://orcid.org/0000-002-1669-7661>. E-mail: nat.savinh@yandex.ru

Information about authors:

Savinykh N.A., <http://orcid.org/0000-002-1669-7661>

Dehtereva N.V., <http://orcid.org/0000-0001-9324-7456>

Savinykh M.V., <http://orcid.org/0000-0003-4205-0463>

Kaluzhskich T.I., <http://orcid.org/0000-0002-2897-0733>

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

Received 30 September 2019

Accepted 28 November 2019

Введение

Бешенство – острая инфекция, характеризующаяся прогрессирующим поражением центральной нервной системы с развитием энцефалита. Заболевание является одним из старейших известных зоонозов [1–3]. В структуре инфекций данной группы бешенству отводится особое место. Это обусловлено почти повсеместным распространением, ростом заболеваемости [4] и практически 100% летальностью, несмотря на наличие в литературе публикаций о выживших [5–11], инфицированных преимущественно вирусами летучих мышей, которые, по-видимому, менее вирулентны для человека, чем штаммы, ассоциированные с другими источниками [12].

Ежегодно во всём мире от бешенства погибают более 50 тыс. человек [13–15], главным образом (99%) в развивающихся странах [16]. В России гидрофобия регистрируется с частотой от 3 до 20–25 случаев в год, за медицинской помощью в связи с нападением животных обращаются до полумиллиона пострадавших. В Кировской области последний случай бешенства у ребёнка 4 лет зарегистрирован в 1996 г. [17]. В 2014–2018 гг. эпизоотическая обстановка в регионе оставалась неблагоприятной, с высокой регистрацией случаев заболевания как среди диких, так и домашних плотоядных и сельскохозяйственных животных.

Цель исследования – изучение эпизоотической ситуации по бешенству и состояния антирабической помощи на территории Кировской области в 2010–2018 гг.

Материал и методы

Материалом для эпидемиологического исследования послужили данные за 2010–2018 гг., полученные из ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Кировской области» Роспотребнадзора. Обработка полученных материалов проведена с использованием приёмов эпидемиологической диагностики, общепринятых методов статистики и с помощью прикладной компьютерной программы Microsoft Excel 2010. Оце-

нивая данные с нормальным распределением, использовали среднее значение, стандартную ошибку среднего и *t*-критерий Стьюдента. Различия между выборками считали достоверными при значении $p < 0,05$.

Результаты

В 2010–2013 гг. эпизоотическая обстановка по бешенству в Кировской области была относительно благоприятной (22, 6, 11 и 5 случаев соответственно). В последующие 2 года наблюдался существенный рост выявления инфицированных животных на территории региона. Так, в 2014 г. зарегистрирован 61 случай болезни, а в 2015 г. – уже 105. В 2016 и 2017 гг. было обнаружено 68 и 64 заразившихся животных соответственно. В 2018 г. ситуация с бешенством на территории Кировской области несколько стабилизировалась (15 случаев).

Кроме того, было выявлено, что в 2010–2018 гг. произошла не только активизация природных очагов бешенства среди животных, но и их стремительное распространение с юго-восточных районов области в центральные. Так, в 2017 г. наиболее «горячими» очагами бешенства стали территория муниципального образования «Город Киров» и ряд соседних с областным центром районов.

Расширение ареала бешенства в 2010–2018 гг. затронуло многие районы Кировской области: Вятско-полянский, Малмыжский, Кильмезский, Уржумский, Зуевский, Котельничский, Пижанский, Свечинский, Советский, Фаленский. В частности, в 2018 г. заболевание было лабораторно подтверждено у 15 животных на территории 11 районов, ранее свободных от бешенства. В Кировской области главным носителем рабического вируса (2010–2018 гг., $n = 357$) остаётся рыжая лисица ($67,2 \pm 2,5\%$, $p < 0,001$). На 2-м месте по частоте выявления инфекции находится енотовидная собака ($13,2 \pm 1,8\%$). Собаки, кошки, сельскохозяйственные животные составили $9,5 \pm 1,6$, $5,9 \pm 1,2$ и $3,6 \pm 1,0\%$ соответственно. Другие дикие животные –

0,6 ± 0,4% случаев. В нашем регионе в относительно благоприятные годы доминировало бешенство среди диких плотоядных. В 2015–2017 гг. существенно возросла доля домашних и сельскохозяйственных животных. Другой особенностью второй половины периода наблюдения является увеличение инфицированности енотовидных собак, составившее в 2018 г. 40,0% всех случаев.

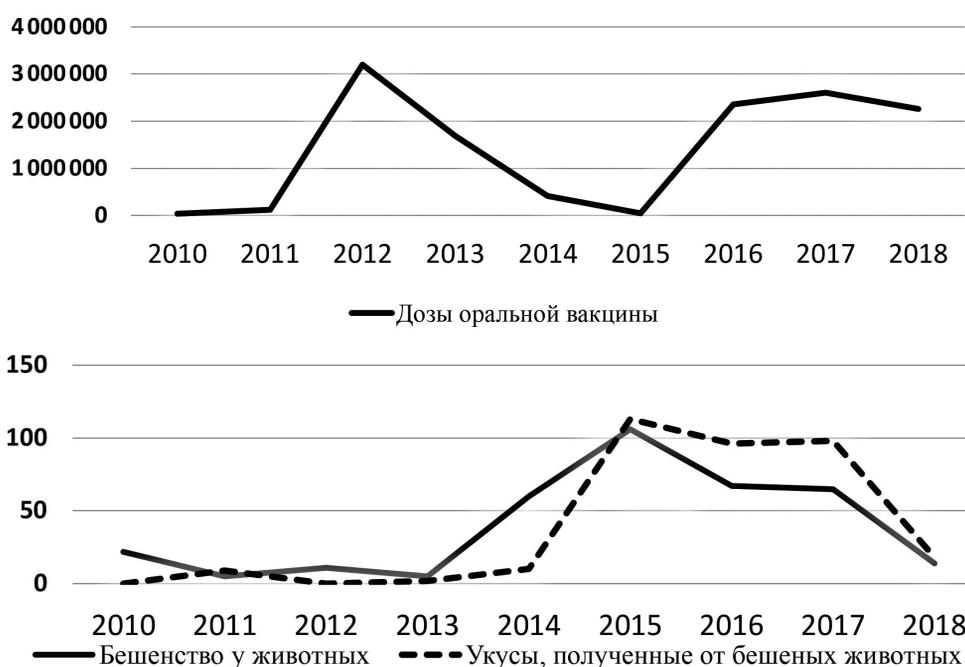
Анализ многолетней динамики повреждений, наносимых животными, выявил следующее. Общее количество укусов людей за изученный период изменялось в незначительных пределах. Так, в 2010–2018 гг. число лиц, получивших различные повреждения от животных в Кировской области, составило в среднем 4395 ± 129 человек в год, среди них 1104 ± 39 детей ($p < 0,001$). Максимальное количество пострадавших было зарегистрировано в 2015 г. – 4687 (из них 1213 детей). Особого внимания заслуживает тот факт, что на фоне незначительного увеличения числа обратившихся с укусами в 2015 г. резко возросла доля повреждений от животных с клинически или лабораторно подтвержденным диагнозом бешенства. Так, в 2015 г. по сравнению с предыдущим отмечен более чем 11-кратный прирост данного показателя (в 2014 г. – 10 укусов бешеными животными, в 2015 г. – 113).

К 2015 г. проведение оральной иммунизации животных в Кировской области снизилось до минимума. Так, по официальным данным, в этом году было использовано в 71 раз меньше доз вакцины, чем в 2012 г. И, как уже было сказано выше, в этот период наблюдались максимальные показатели эпизоотии. Тогда на территории региона было выявлено 105 случаев бешенства и 113 опасных контактов населения с больными животными. Мы оценили корреляцию между

количеством использованных доз оральной вакцины и интенсивностью эпизоотии. С 2012 по 2018 г. между указанными показателями была сильная обратная корреляционная зависимость (см. рисунок).

Структура пострадавших в зависимости от места проживания показала достоверное преобладание городских жителей над сельскими (в среднем за год 3449 ± 35 и 989 ± 26 соответственно, $p < 0,001$). Несмотря на то что носителями вируса являются чаще всего рыжие лисы, укусы в основном причиняли собаки – 75,8 ± 0,2% ($p < 0,001$). На кошек приходилась 1/5 всех укусов (20,4 ± 0,2%), на диких и сельскохозяйственных животных – всего лишь 2,8 ± 0,1 и 1,0 ± 0,1% соответственно. Особенностью последних лет стало увеличение доли повреждений, наносимых дикими животными: 2010 г. – 1,7 ± 0,2 и 2018 г. – 3,4 ± 0,3%; $p < 0,001$. Локализация укусов достаточно разнообразна. Наиболее частыми местами повреждений остаются нижние (34,3 ± 0,3%) и верхние (18,3 ± 0,2%) конечности; нередко укусы особенно опасной локализации – в голову, шею, лицо, кисти рук (28,8 ± 0,3%), пальцы рук (7,3 ± 0,1%) и множественные укусы (6,9 ± 0,2%). Доля повреждений III категории (головы, шеи, кистей и пальцев рук, множественные укусы) достигает в отдельные годы 47,2%. Самые редкие укусы в туловище – 4,4 ± 0,1% всех случаев.

Ежегодно в Кировской области более 3,5 тыс. человек подвергаются высокому риску заражения бешенством, нуждаются в проведении специфической профилактики с использованием антирабической вакцины. Направление на активно-пассивную профилактику в связи с III категорией повреждения получают до 200–260 пострадавших. Так, из числа обратившихся за медицинской помощью, в течение 9 последних



Эпизоотическая обстановка и профилактика бешенства диких животных в Кировской области.

лет консультацию рабиолога получали ежегодно в среднем 4033 ± 113 человек, что составило 99,5% от общего количества пострадавших. Курс вакцинации назначался ежегодно в среднем 3488 ± 247 людям (86,5% от числа получивших консультацию). За исходный период наибольшая доля отказов от вакцинации или самостоятельного прекращения профилактики зарегистрирована в 2012 и 2018 гг. (30,9 и 27,0% соответственно). В 2015–2018 гг. по сравнению с 2010–2014 гг. введение КОКАВ и антирабического иммуноглобулина выросло на 20 и 57% соответственно. Профилактическая иммунизация лиц, входящих в группу риска, также возросла. Планово были привиты сотрудники ветеринарных лабораторий, лица, работающие с уличным вирусом бешенства, а также охотники.

Обсуждение

Бешенство как одна из важнейших проблем здравоохранения в мировом масштабе актуально и для Кировской области. В 2014–2015 гг. на территории региона значительно выросла заболеваемость бешенством животных, что прежде всего связано с дефектами в осуществлении профилактических мероприятий. Ареал эпизоотии, ранее затрагивающий преимущественно юго-восток области, был существенно расширен с включением 11 ранее свободных от бешенства районов и смещён к областному центру. В России при сравнении локализаций активных очагов бешенства в 1998 и 2015 гг. также отмечено их значительное расширение за счёт вовлечения новых, преимущественно северных областей [18]. Две трети всех случаев бешенства в Кировской области выявлены у обыкновенной лисы. В целом на территории России лисы составляют более 90% всех зарегистрированных случаев бешенства в дикой природе [18]. Напротив, в южных районах России с развитым животноводством данная инфекция чаще регистрируется у сельскохозяйственных животных. Так, в Республике Дагестан преобладает заболеваемость среди крупного рогатого скота (56,9%) [13]. Для сравнения: в Северной Америке основными резервуарами вируса являются еноты (34,8%), летучие мыши (24,3%), скунсы (24,0%), а заражённых лис выявляют лишь в 7,5% случаев [19].

В последнее время в нашем регионе увеличивается доля больных бешенством енотовидных собак. Аналогичная тенденция прослеживается и по результатам исследований, проведённых в других регионах России [20]. Кроме того, в Кировской области в 2015–2017 гг. выросла инфицированность домашних и сельскохозяйственных животных, что значительно увеличило риски заражения человека.

Ежегодно в регионе регистрируют около 4,4 тыс. пострадавших от укусов, среди них 1,1 тыс. детей. Изучая отчёты Кировского и Санкт-Петербургского антирабических центров за 2015 г., когда в нашей области был выявлен максимальный уровень потенциально опасных контактов с животными, установлено, что доля обратившихся за медицинской помощью в Кировской

области была почти в 3 раза выше и составила 0,36% против 0,13% от общей численности населения [21]. Особую обеспокоенность вызвал также тот факт, что в этом году по сравнению с 2014 г. на порядок возросло число контактов с животными с клинически или лабораторно подтверждённым диагнозом бешенства. Данную неблагоприятную эпидемиологическую статистику объясняют прежде всего дефекты в проведении профилактических мер, когда оральная иммунизация животных на территории области была снижена до минимальных значений, что способствовало увеличению прослойки неиммунных животных. На примере Японии, где в течение последних 50 лет не регистрируются случаи бешенства, продемонстрирована эффективность строгих мер профилактики и контроля, таких как регистрация и вакцинация домашних собак, обязательный карантин восприимчивых импортированных животных и национальные планы действий, основанные на научных исследованиях [22].

В структуре пострадавших от укусов достоверно преобладают городские жители, что, скорее всего, связано с высоким риском контактов горожан с бездомными животными, мигрирующими в крупные населённые пункты, где легче отыскать пропитание. Укусы и повреждения в основном причиняются собаками (3/4) и кошками (1/5), что вполне объяснимо, учитывая тесный контакт человека с этими животными. Аналогичные результаты получены исследователями и в других регионах РФ [23]. В последние годы растёт доля повреждений, наносимых дикими животными. Укусы чаще наносятся в нижние конечности, что объясняется наибольшей досягаемостью для животных данной части тела человека. Им лишь немного уступают повреждения наиболее опасной локализации (голова, шея, лицо, кисти рук) и множественные укусы, при которых повышается риск неудачи проведения экстренной иммунизации.

Ежегодно в Кировской области постконтактную профилактику бешенства получают в среднем более 3,5 тыс. человек. Особую озабоченность вызывает высокая частота отказов от вакцинации или самостоятельного прекращения профилактики (до 31%). Выявленное обстоятельство, возможно, свидетельствует о низкой санитарной грамотности населения и дефектах в просветительской работе, что объясняется недостаточным информированием граждан о смертельных рисках, которым они подвергают себя в случае отказа от вакцинации.

Выводы

1. Обстановка по бешенству на территории Кировской области остаётся непростой. С 2014 г. отмечается активизация эпизоотического процесса с расширением границ очага и вовлечением новых административных территорий (преимущественно центральных районов области), что можно связать с недостаточностью активной иммунизации животных.

2. В последние годы регистрируется рост числа больных дикими животными, в эпизоотии чаще вовлекаются домашние и сельскохозяйственные животные,

что значительно увеличивает риск заболевания человека.

3. Среди пострадавших от укусов преобладает городское взрослое население. В большинстве случаев повреждения наносят собаки и кошки.

4. С учётом того, что доля повреждений опасной локализации и множественных укусов весьма велика (до 47,2%), а четверть пострадавших отказываются или самостоятельно прекращают постконтактную профилактику, необходимы мероприятия по повышению санитарной грамотности населения и усилению просветительской работы по проблеме бешенства.

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Н.А. Савиных, Т.И. Калужских; сбор и обработка материала – Н.В. Дехтерева; статистическая обработка – М.В. Савиных; написание текста – М.В. Савиных, Н.А. Савиных; редактирование – Т.И. Калужских, Н.В. Дехтерева.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1-3, 6-12, 15, 16, 19, 22 см. REFERENCES)

4. Фазылов В.Х., Муртазина Г.Х., Урманчеева Ю.Р., Мингажева Р.И. Диагностика бешенства (клинический случай). *Практическая медицина*. 2014; (7): 121-3.
5. Метин А.Е., Ботвинкин А.Д., Елаков А.Л., Груздев К.Н. Случаи выздоровления людей от бешенства и прижизненная диагностика лиссавирусных энцефалитов. *Вопросы вирусологии*. 2019; 64(1): 42-8. DOI: <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-1-42-48>
13. Нурагинов Р.А. Краткая характеристика нозоареала бешенства. *Юг России: экология, развитие*. 2011; 6(4): 176-80.
14. Симонова Е.Г., Хадарцев О.С. Современные тенденции и особенности контроля за ситуацией по бешенству в Российской Федерации. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2014; (2): 65-8.
17. Бондаренко А.Л., Утенкова Е.О., Жуйкова В.И., Шестакова В.П. Случай бешенства в Кировской области. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2000; (3): 53-4.
18. Шабейкин А.А., Зайкова О.Н., Гулюкин А.М. Обзор эпизоотической ситуации по бешенству в Российской Федерации за период с 1991 по 2015 годы. *Ветеринария Кубани*. 2016; (4): 4-6.
20. Апалькин В.А., Ведерников В.А., Балдина И.В., Яременко Н.А., Гулюкин А.М., Харкевич А.А. и др. Бешенство животных в России. Особенности современной эпизоотической обстановки. *Ветеринария*. 2004; (12): 3-7.
21. Щербак Н.Я., Улюкин И.М., Орлова Е.С. Оказание антирабической помощи детям в условиях мегаполиса. *Журнал инфектологии*. 2018; 10(4 Прил. 1): 144-5.
23. Ляпина Е.П., Эдиев М.С., Красильникова Н.К., Кожевникова Г.М., Воробьева Е.В., Помякшева А.В. и др. Клинико-эпидемиологические особенности бешенства на территории Саратовской области. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2012; (1): 14-7.

REFERENCES

1. Kebkiba B., Ouagal M., Kourdina M.M., Kemdongarti N., Mindekem R., Assandi O. Situation of Rabies in the Republic of Chad. *Anim. Vet. Sci.* 2017; 5(4): 52-6.
2. Jackson A.C. Therapy of Human Rabies. In: Jackson A.C., ed. *Rabies. Chapter 16*. Boston: Academic Press; 2013: 575-89.

3. Rupprecht C.E., Barrett J., Briggs D., Cliquet F., Fooks A.R., Lumlertdacha B., et al. Can rabies be eradicated? *Dev. Biol. (Basel)*. 2008; 131: 95-121.
4. Fazylov V.Kh., Murtazina G.Kh., Urmanceeva Yu.R., Mingazheva R.I. Diagnosis of rabies (clinical case). *Prakticheskaya meditsina*. 2014; (7): 121-3. (in Russian)
5. Metin A.E., Botvinkin A.D., Elakov A.L., Gruzdev K.N. Cases of people recovering from rabies and intravital diagnosis of lissavirus encephalitis. *Voprosy virusologii*. 2019; 64(1): 42-8. DOI: <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-1-42-48> (in Russian)
6. Caicedo Y., Paez A., Kuzmin I., Niezgodina M., Orciari L.A., Yager P.A., et al. Virology, immunology and pathology of human rabies during treatment. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2015; 34(5): 520-8. DOI: <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000000624>
7. Karahocagil M.K., Akdeniz H., Aylan O., Sunnetcioglu M., Un H., Yapici K., et al. Complete recovery from clinical rabies: case report. *Turkiye Klinikleri J. Med. Sci.* 2013; 33(2): 547-52.
8. Rubin J., David D., Willoughby R.E., Rupprecht C.E., Garcia C., Guarda D.C., et al. Applying the Milwaukee protocol to treat canine rabies in Equatorial Guinea. *Scand. J. Infect. Dis.* 2009; 41(5): 372-5. DOI: <https://doi.org/10.1080/00365540902798333>
9. Weyer J., Msimang-Dermaux V., Paweska J.T., le Roux K., Govennder P., Coertse J., et al. A case of human survival of rabies, South Africa. *S. Afr. J. Infect. Dis.* 2015; 1(1): 1-3.
10. Wiedeman J., Plant J., Glaser C., Messenger S., Wadford D., Sheriff H., et al. Recovery of a patient from clinical rabies - California, 2011. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 2012; 61(4): 61-5.
11. Willoughby R.E. Are we getting closer to the treatment of rabies? *Future Virol.* 2009; 4(6): 563-70.
12. Jackson A.C. Current and future approaches to the therapy of human rabies. *Antiviral Res.* 2013; 99(1): 61-7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.01.003>
13. Nuratinov R.A. Brief description of the nosoarea of rabies. *Yug Rossii: ekologiya, razvitie*. 2011; 6(4): 176-80. (in Russian)
14. Simonova E.G., Khadartsev O.S. Current trends and features of monitoring the situation of rabies in the Russian Federation. *Epidemiologiya i infektionnye bolezni. Aktual'nye voprosy*. 2014; (2): 65-8. (in Russian)
15. Souza A., Madhusudana S.N. Survival from rabies encephalitis. *J. Neurol. Sci.* 2014; 339(1-2): 8-14. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jns.2014.02.013>
16. WHO. WHO expert consultation on rabies. *World Health Organ. Tech. Rep. Ser.* 2005; 931: 1-88.
17. Bondarenko A.L., Utenkova E.O., Zhuykova V.I., Shestakova V.P. The case of rabies in the Kirov region. *Epidemiologiya i infektionnye bolezni*. 2000; (3): 53-4. (in Russian)
18. Shabeykin A.A., Zaykova O.N., Gulyukin A.M. Overview of the epizootic situation of rabies in the Russian Federation for the period from 1991 to 2015. *Veterinariya Kubani*. 2016; (4): 4-6. (in Russian)
19. Blanton J.D., Palmer D., Rupprecht C.E. Rabies surveillance in the United States during 2009. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2010; 237(6): 646-57. DOI: <https://doi.org/10.2460/javma.237.6.646>
20. Apal'kin V.A., Vedernikov V.A., Baldina I.V., Yaremenko N.A., Gulyukin A.M., Kharkevich A.A., et al. Rabies of animals in Russia. Features of the modern epizootic setting. *Veterinariya*. 2004; (12): 3-7. (in Russian)
21. Shcherbak N.Ya., Ulyukin I.M., Orlova E.S. The provision of anti-rabies assistance to children in a metropolis. *Zhurnal infektologii*. 2018; 10(4 Suppl. 1): 144-5. (in Russian)
22. Takahashi-Omoe H., Omoe K., Okabe N. Regulatory systems for prevention and control of rabies, Japan. *Emerg. Infect. Dis.* 2008; 14(9): 1368-74. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid1409.070845>
23. Lyapina E.P., Ediev M.S., Krasil'nikova N.K., Kozhevnikova G.M., Vorob'eva E.V., Pomyaksheva A.V., et al. Clinical and epidemiological features of rabies in the Saratov region. *Epidemiologiya i infektionnye bolezni. Aktual'nye voprosy*. 2012; (1): 14-7. (in Russian)

Поступила 30.09.19

Принята в печать 28.11.19

Указатель статей, опубликованных в журнале «Вопросы вирусологии» в 2019 г.

ОБЗОРЫ

- Агеева М.Р., Яцышина С.Б.* Недооценённая инфекция – к вопросу о факторах патогенности аденовирусов человека 2,53-62
- Акимкин В.Г., Алимов А.В., Захарова Ю.А., Болгарова Е.В., Питерский М.В., Сисин Е.И.* Обзор актуальных вопросов диагностики и профилактики гемоконтактных нозокомиальных вирусных инфекций 6, 262-267
- Галегов Г.А., Андропова В.Л.* АнтиВИЧ/СПИД - препарат бНР: противовирусная активность, доклиническое изучение. Эффективность у взрослых ВИЧ-инфицированных больных 1, 12-15
- Замарина Т.В., Храпова Н.П., Пименова Е.В., Ханани Е.И., Викторов Д.В., Топорков А.В.* Иммунодиагностика лихорадки Зика: обзор производимых тест-систем 4,150-155
- Кузнецова Т.А., Персиянова Е.В., Запорожец Т.С., Беседнова Н.Н.* Адьюванты гриппозных вакцин: новые возможности применения сульфатированных полисахаридов из морских бурых водорослей 1, 5-11
- Онищенко Г.Г., Сизикова Т.Е., Лебедев В.Н., Борисевич С.В.* Трансгенные комары как средство против распространения арбовирусных инфекций 3,101-104
- Соломай Т.В., Семененко Т.А., Иванова М.Ю.* Роль Эпштейна–Барр вирусной инфекции и гепатитов В и С в патологии печени 5, 215-220
- Щелкунов С.Н., Щелкунова Г.А.* Нужно быть готовыми к возврату оспы 5, 206-214
- Агеева М.Р., Яцышина С.Б.* Недооценённая инфекция – к вопросу о факторах патогенности аденовирусов человека 2, 173-177
- Дерябин П.Г., Гараев Т.М., Финогенова М.П., Одноровов А.И.* Оценка противовирусной активности соединения 2НС1*Н-His-Rim в сравнении с противогриппозным препаратом «Арбидол» в отношении высоковирулентного штамма вируса гриппа A/duck/Novosibirsk/56/05 (H5N1) (*Influenza A virus, Alphainfluenzavirus, Orthomyxoviridae*) 6, 268-273
- Дзагурова Т.К., Бахтина В.А., Баловнева М.В., Морозов В.Г., Ишмухаметов А.А., Курашова С.С., Клемпа Б., Кругер Д., Ткаченко Е.А.* Анализ групповой вспышки геморрагической лихорадки с почечным синдромом, вызванной вирусом *Сочи* 1, 36-41
- Догадов Д.И., Корзая Л.И., Кюрегян К.К., Карлсен А.А., Михайлов М.И., Лапин Б.А.* Маркёры гепатита А у обезьян Адлерского приматологического центра 5, 246-249
- Иванова А.М., Имомалиева К.М., Наровлянский А.Н., Измestьева А.В., Сарымсаков А.А., Билалов Э.Н., Ершов Ф.И.* Глазные лекарственные плёнки в лечении экспериментального герпетического кератоконъюнктивита 5, 238-245
- Карамендин К.О., Саятов М.Х., Кыдырманов А.И., Касымбеков Е.Т., Асанова С.Е., Даулбаева К.Д., Хан Е.Я.* Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Avian avulavirus* 20, выделенных от диких птиц 4, 185-192
- Кирьянов С.А., Левина Т.А., Поляков А.П., Ребрикова И.В., Мурашко Д.А., Коноплева М.В., Семененко Т.А., Суслов А.П.* Выявление геномной ДНК вируса Эпштейна–Барр в тканях рака слизистой оболочки полости рта российских пациентов 3, 112-117
- Котова В.О., Троценко О.Е., Балахонцева Л.А., Базыкина Е.А.* Молекулярно-генетическая характеристика вариантов ВИЧ-1, выделенных в субъектах Дальневосточного федерального округа 2,79-89
- Куц А.А., Климова Р.Р., Федорова 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 2,90- 96
- Кюрегян К.К., Поляков А.Д., Потемкин И.А., Карлсен А.А., Исаева О.В., Лопатухина М.А., Муллин Е.В., Слукинова О.С., Малинникова Е.Ю., Щибрик Е.В., Оглезнева Е.Е., Михайлов М.И.* Белгородская область – эндемичный по гепатиту E регион 6, 274-280
- Латышев О.Е., Елисеева, О.В., Костина Л.В., Алексеев К.П., Хаметова К.М., Алтаева Е.Г., Верховский О.А.,*

- Алипер Т.И., Гребенникова Т.В.* Оценка иммуногенной активности клонированного штамма WA ротавируса А человека 4,156-164
- Леонова Г.Н., Беликов С.И.* Филогенетический анализ и распространение вируса клещевого энцефалита дальневосточного субтипа (*Flaviridae, Flavivirus*, TBEV-FE) на территории Азии 5, 250-256
- Львов Д.К., Богданова В.С., Кириллов И.М., Шелканов 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 гемагглютинина (HA1) 2, 63-72
- Мазлум Али, Жуков И.Ю., Аронова Е.В., Иголкин А.С., Власова Н.Н.* Особенности репликации вируса африканской чумы свиней в присутствии рекомбинантных белков CD2v, рХ69R и рЕ248R 4, 193-200
- Наровлянский А.Н., Мезенцева М.В., Сутина И.А., Руссу Л.И., Иванова А.М., Полосков В.В., Измestьева А.В., Оспельникова Т.П., Сарымсаков А.А., Ершов Ф.И.* Цитокин-регулирующая активность противовирусного препарата ЦелАгрип в перевиваемых В-клеточных линиях лимфомы Беркитта 4, 165-172
- Нефедченко А.В., Южаков А.Г., Котенева С.В., Глотова Т.И., Глотов А.Г., Забережный А.Д.* Выявление ДНК герпесвируса четвертого типа у крупного рогатого скота при помощи ПЦР в режиме реального времени 4, 178-184
- Останкова Ю.В., Семёнов А.В., Зуева Е.Б., Тотолян Арег А.* Выявление и молекулярно-генетическая характеристика вируса гепатита В среди ВИЧ-инфицированных пациентов в Архангельске 3, 105-111
- Полтавченко А.Г., Ериш А.В., Таранов О.С., Якубицкий С.Н., Филатов П.В.* Быстрый иммунохимический метод выявления ортопоксвирусов (*Orthopoxvirus, Chordopoxvirinae, Poxviridae*) 6, 291-297
- Ракитянская И. А., Рябова Т.С., Калашиникова А.А.* Влияние ингарона на динамику продукции интерферона-α и -γ и на проявление клинических симптомов у больных хронической вирусной Эпштейн–Барр инфекцией 1, 23-29
- Ракитянская И.А., Рябова Т.С., Тоджибаев У.А., Калашиникова А.А.* Аллокин-альфа – новые подходы к лечению хронической вирус Эпштейн–Барр инфекции 3, 118-124
- Савиных Н.А., Дехтерева Н.В., Савиных М.В., Калужских Т.И.* Эпизоотическая характеристика бешенства и антирабическая помощь на территории Кировской области в 2010–2018 гг. 6, 306-310
- Сашина Т.А., Морозова О.В., Епифанова Н.В., Новикова Н.А.* Идентификация I- и E- генотипов ротавируса А с использованием мультиплексной ПЦР 3, 140-144
- Сенюта Н.Б., Смирнова К.В., Кондратова В.Н., Игнатова А.В., Мудунов А.М., Душенькина Т.Е., Лихтенштейн А.В., Гурцевич В.Э.* Диагностика рака носоглотки с помощью серологических и молекулярных маркёров вируса Эпштейн–Барр (*Herpesviridae, Lymphocryptovirus*, HHV-4) в случаях невыявленного первичного очага опухоли 5, 229-237
- 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 А(H1N1) pdm09 под воздействием селекционированных мутаций в молекуле гемагглютинина 2,73-78
- Усольцева П.С., Алимов А.В., Резайкин А.В., Сергеев А.Г., Новосёлов А.В.* Роль неонатального FC рецептора в депротенинизации вирусов ЕСНО и Коксаки А9 3,132-139
- Федякина И.Т., Коноплева М.В., Прошина Е.С., Линник Е.В., Никитина Н.И.* Противовирусное действие субстанции «Кагоцел» *in vitro* в отношении вирусов гриппа H1N1, H1N1pdm09 и H3N2 3,125-131
- Хаметова К.М., Алексеев К.П., Южаков А.Г., Костина Л.В., Раев С.А., Мусиенко М.И., Мухин А.Н., Алипер Т.И., Воркунова Г.К., Гребенникова Т.В.* Молекулярно-биологические свойства клонированного штамма Wa ротавируса А человека 1, 16-22
- Ярославцева Н.Г., Тихомиров Д.С., Николаева Л.И., Дедова А.В., Овчинникова Е.Н., Мисько О.Н., Романова Т.Ю., Махновский П. И., Гришечкин А.Е., Туполева Т.А.* Низкие концентрации РНК вируса гепатита С при серологически слабо выраженной инфекции 1, 30-35

ДИСКУССИЯ

Метлин А.Е., Ботвинкин А. Д., Елаков А.Л., Груздев К.Н. Случаи выздоровления людей от бешенства и прижизненная диагностика лиссавирусных энцефалитов 1, 42-48