

**РОССИЙСКАЯ
АКАДЕМИЯ
НАУК**

Журнал "Вопросы вирусологии" представлен в следующих международных информационно-справочных изданиях: Abstract Journals, AIDS & Cancer Research, Biocontrol News and Information, Biological Sciences, Chemical Abstracts, EBSCOhost Biological Abstracts, EBSCOhost Wildlife & Ecology Studies Worldwide, Elsevier BV Scopus, Elsevier BV EMBASE, Index Medicus, Excerpta Medica, Index Veterinarius, MEDLINE, National Library of Medicine PubMed, Parasitology Database, Poultry Abstracts, Review of Medical and Veterinary Entomology, Thomson Reuters Biological Abstracts, Thomson Reuters BIOSIS Previews, Thomson Reuters Science Citation Index Expanded, Thomson Reuters Web of Science, Tropical Diseases Bulletin, Veterinary Science Database, Virology and AIDS Abstracts, Russian Science Citation Index (Web of Science)

ЛР № 010215 от 29.04.97

Почтовый адрес:

115088, Москва,
ул. Новоостاپовская, д. 5, стр. 14,
ОАО «Издательство "Медицина"»

Адрес редакции: 109029, Москва,
ул. Скотопрогонная, дом 29/1,
подъезд 15

Зав. редакцией **Т. М. Курушина**
Тел. +7-495-678-63-95

E-mail: vopr.virusol@idm.msk.ru
www.medlit.ru

ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ

Тел./факс +7-495-678-64-84

E-mail: info@idm.msk.ru
www.medlit.ru

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

Редактор **Е.П. Мороз**

Художественный редактор
А. В. Минаичев

Технический редактор
Л. В. Зюкина

Корректор **Т. Д. Малышева**

Переводчик **С. К. Чаморовский**

Верстка **Е. М. Архипова**

Сдано в набор 05.11.2015.

Подписано в печать 07.12.2015.

Формат 60 × 88%.

Печать офсетная.

Печ. л. 6,00.

Усл. печ. л. 5,88.

Уч.-изд. л. 6,36.

Заказ 11.

Отпечатано в типографии ООО

"Подольская Периодика",

142110, г. Подольск, ул. Кирова, 15

ISSN 0507-4088. *Вопр. вирусологии.* 2016.

Т. 61. №1 1-48

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

Свидетельство о регистрации № 1170

от 11 декабря 1990 г.



**МОСКВА
«ИЗДАТЕЛЬСТВО
"МЕДИЦИНА"»**

ВОПРОСЫ ВИРУСОЛОГИИ

PROBLEMS OF VIROLOGY

ДВУХМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Основан в 1956 г.

1

Том 61 • 2016

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.)**

Научный редактор: **Забережный А.Д. (д.б.н., проф.)**

Члены редколлегии:

Баринский И.Ф. (д.м.н., проф.)

Белоусова Р.В. (д.в.н., проф.)

Галегов Г.А. (д.б.н., проф.)

Гулюкин М.И. (д.в.н., проф., акад. РАН)

Гурцевич В.Э. (д.м.н., проф.)

Ершов Ф.И. (д.м.н., проф., акад. РАН)

Зверев В.В. (д.б.н., проф., акад. РАН)

Зуев В.А. (д.м.н., проф.)

Иванова О.Е. (д.м.н., доцент)

Карганова Г.Г. (д.б.н., доцент)

Киселев Ф.Л. (д.б.н., проф., член-корр. РАН)

Клименко С.М. (д.м.н., проф., акад. РАН)

Лашкевич В.А. (д.м.н., проф., акад. РАН)

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

Урываев Л.В. (д.м.н., проф., член-корр. РАН)

Щелканов М.Ю. (д.б.н.)

Юминова Н.В. (д.м.н., доцент)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Акимкин В.Г. (д.м.н., проф., чл.-кор. РАН; Москва, Россия)

Алипер Т.И. (д.б.н., проф.; Москва, Россия)

Ананьев В.Ю. (к.м.н., рук. ФБУЗ "ЦГЭ в Приморском крае"; Владивосток, Россия)

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

Баранов А.А. (д.м.н., проф., академик РАН; Москва, Россия)

Борисевич С.В. (д.м.н., проф.; Сергиев Посад, Россия)

Брико Н.И. (д.м.н., проф., академик РАН; Москва, Россия)

Бутаев Т.М. (д.м.н., рук. Упр. Роспотребнадзора по Республике Сев. Осетия-Алания; Владикавказ, Россия)

Гарбуз Ю.А. (рук. ФБУЗ "ЦГЭ в Хабаровском крае"; Хабаровск, Россия)

Глинских Н.П. (д.м.н., проф.; Екатеринбург, Россия)

Григорьев С.Н. (рук. ФБУЗ "ЦГЭ в Магаданской обл."; Магадан, Россия)

Дроздов С.Г. (д.м.н., проф., академик РАН; Москва, Россия)

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

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

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

Киселёв О.И. (д.м.н., проф., академик РАН; СПб, Россия)

Кутырев В.В. (д.м.н., проф., академик РАН; Саратов, Россия)

Лебедев Г.Б. (зам. рук. ФБУЗ "ЦГЭ в Чукотском АО"; Анадырь, Россия)

Леонова Г.Н. (д.м.н., проф.; Владивосток, Россия)

Лисицин Е.А. (к.м.н., рук. Упр. Роспотребнадзора по Владимирской обл.; Владимир, Россия)

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

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

Михайлов М.И. (д.м.н., проф., чл.-кор. РАН; Москва, Россия)

Мукомолов С.Л. (д.м.н., проф.; СПб, Россия)

Нетесов С.В. (д.б.н., проф., чл.-кор. РАН; Новосибирск, Россия)

Никифоров В.В. (д.м.н., проф.; Москва, Россия)

Огарков П.И. (д.м.н., проф.; СПб, Россия)

Покровский В.И. (д.м.н., проф., академик 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)

Сергеев А.Н. (д.м.н., проф.; Новосибирск, Россия)

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

Тутельян А.В. (д.м.н.; Москва, Россия)

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

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

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

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

ИНОСТРАННЫЕ ЧЛЕНЫ РЕДАКЦИОННОГО СОВЕТА

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

Владыко А.С. (д.м.н., проф.; Минск, Республика Беларусь)

Горбунов В.А. (к.м.н.; Минск, Республика Беларусь)

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

Петкевич А.С. (к.м.н.; Минск, Республика Беларусь)

Титов А.П. (д.м.н., проф., чл.-кор. НАН Беларуси, академик РАН; Минск, Республика Беларусь)

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

Berencsi G. (PhD, MD, Prof.; Budapest, Hungary)

Ciampor F. (PhD, MD, DrSc; Bratislava, Slovak Republic)

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

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

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

Golovljova I. (PhD; Tallinn, Estonia)

Goujgoulova G. (PhD; Sofia, Bulgaria)

Hoenen T. (PhD; Hamilton, USA)

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

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

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

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

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

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

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

Oxford J. (DSc; London, UK)

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

Roggendorf M. (MD, Essen, Germany)

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

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

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

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

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

Vainionpää R. (Docent; Turku, Finland)

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

Webby R. (PhD, Memphis, USA)

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

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

RUSSIAN ACADEMY OF SCIENCES
VOPROSY VIROLOGII
(PROBLEMS OF VIROLOGY)

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

Volume 61 • 1 • 2016

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

Scientific editor: **Zaberezhnyy A.D.**, Doctor of Biological Sciences, Professor

Members of editorial board:

Barinskiy I.F. – MD, PhD, DSc, Prof.; **Belousova R.V.** – Doctor of Veterinary Sciences, Prof.; **Galegov G.A.** – Doctor of Biological Sciences, Prof.; **Gulyukin M.I.** – Doctor of Veterinary Sciences, Prof., Academician of RAS; **Gurtsevich V.E.** – MD, PhD, DSc, Prof.; **Ershov F.I.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS; **Zverev V.V.** – Doctor of Biological Sciences, Prof., Academician of RAS; **Zuev V.A.** – MD, PhD, DSc, Prof.; **Ivanova O.E.** – MD, PhD, DSc, docent; **Karganova G.G.** – Doctor of Biological Sciences, docent; **Kiselev F.L.** – Doctor of Biological Sciences, Prof., corresponding member RAS; **Klimenko S.M.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS; **Lashkevich V.A.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS; **Onishchenco G.G.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS; **Uryvaev L.B.** – MD, PhD, DSc, Prof., corresponding member of RAS; **Shchelkanov M.Yu.** – Sc.D.; **Yuminova N.V.** – MD, PhD, DSc, docent

Editorial council

Akimkin V.G. – MD, PhD, DSc, Prof., corr. member of RAS (Moscow)

Aliper T.I. – Sc.D., Prof. (Moscow)

Anan'ev V.Yu. – MD, PhD (Vladivostok)

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

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

Borisevich S.V. – MD, PhD, DSc, Prof. (Sergiev Posad)

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

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

Garbuz Yu.A. – MD (Khabarovsk)

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

Grigor'ev S.N. – MD (Magadan)

Drozdov S.G. – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS (Moscow)

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

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

Ivanov L.I. – MD (Khabarovsk)

Kiselev O.I. – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS (Saint-Petersburg)

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

Lebedev G.B. – MD (Anadyr')

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

Lisitsin E.A. – MD, PhD (Vladimir)

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

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

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

Mukomolov S.L. – MD, PhD, DSc, Prof. (Saint-Petersburg)

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

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

Ogarkov P.I. – MD, PhD, DSc, Prof. (Saint-Petersburg)

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

Reznik V.I. – MD, PhD (Khabarovsk)

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

Sergeev A.N. – MD, PhD, DSc, Prof. (Novosibirsk)

Stepanova T.F. – MD, PhD, DSc, Prof. (Tyumen')

Tutel'yan A.V. – MD, PhD, DSc (Moscow)

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

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

Yanovich V.A. – MD, PhD (Birobidzhan)

Yashkulov K.B. – MD, PhD (Elista)

Advisory Board

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

Vladyko A.S. – MD, PhD, DSc, Prof. (Minsk, Republic of Belarus)

Gorbunov V.A. – MD, PhD (Minsk, Republic of Belarus)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Golovljova I. – PhD (Tallinn, Estonia)

Goujgoulova G. – PhD (Sofia, Bulgaria)

Hoenen T. – PhD (Hamilton, USA)

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

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

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

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

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

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

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

Oxford J. – DSc (London, UK)

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

Roggendorf M. – MD (Essen, Germany)

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

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

Tashiro M. – PhD, MD (Tokyo, Japan)

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

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

Vainionpää R. – Docent (Turku, Finland)

Webster R. – PhD, DSc. (Memphis, USA)

Webby R. – PhD (Memphis, USA)

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

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



Izdatel'stvo Meditsina

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРЫ

- Сергеев О.В., Баринский И.Ф.** Синтетические пептидные вакцины. 5

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Иванова О.Е., Еремеева Т.П., Морозова Н.С., Шакарян А.К., Гмыль А.П., Яковенко М.Л., Короткова Е.А., Чернявская О.П., Байкова О.Ю., Силенова О.В., Красота А.Ю., Краснопрошина Л.И., Мустафина А.Н., Козловская Л.И.** Вакциноассоциированный паралитический полиомиелит в Российской Федерации в период изменения схемы вакцинации (2006–2013 гг.) 9
- Дешева Ю.А., Смолоногина Т.А., Дорошенко Е.М., Руденко Л.Г.** Разработка квадριвалентной живой гриппозной вакцины, включающей реассортантные вирусы гриппа В антигенных линий Виктория и Ямагата 16
- Соколова Т.М., Полосков В.В., Шувалов А.Н., Руднева И.А., Ершов Ф.И.** Рекомбинантный птичий вирус гриппа H5N1(A/Vietnam/1203/04) и его эскейп-мутант m13(13) индуцируют ранние сигнальные реакции иммунитета в лимфоцитах человека 21
- Галочкина А.В., Зарубаев В.В., Киселев О.И., Бабкин В.А., Остроухова Л.А.** Исследование противовирусной активности дигидрохверцетина в процессе репликации вируса Коксаки В4 *in vitro* 27
- Иунихина О.В., Компанец Г.Г.** Экспериментальное изучение сохранения хантавируса в комплексах с субстратами внешней среды 31
- Мошкovich Г.Ф., Минаева С.В., Варлова Л.В., Горяева М.П., Гуляева С.С., Тихонова Е.В.** Сравнительное исследование применения нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы в схемах антиретровирусной терапии у больных, получающих лечение хронического гепатита С 34
- Селимова Л.М., Калнина Л.Б., Серебровская Л.В., Иванова Л.А., Гуляева А.Н., Носик Д.Н.** Цитокины при инфекции, вызванной вирусом иммунодефицита человека 1-го типа (ВИЧ-1) 39
- Завьялова Е.А., Гулюкин М.И., Карпова М.А., Богданова П.Д., Дрошнев А.Е.** Выявление вируса инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых рыб (IPNV) методом иммуноферментного анализа 42
- Гулий О.И., Караваяева О.А., Великов В.А., Соколов О.И., Павлий С.А., Ларионова О.С., Буров А.М., Игнатов О.В.** Исследование адсорбции бактериофага ΦAb-Sp7 на клеточной поверхности *Azospirillum brasilense* Sp7 46

CONTENTS

REVIEW

- Sergeyev O.V., Barinsky I.F.** Synthetic peptide vaccines 5

ORIGINAL RESEARCH

- Ivanova O.E., Eremeeva T.P., Morozova N.S., Shakaryan A.K., Gmyl A.P., Yakovenko M.L., Korotkova E.A., Chernjavskaja O.P., Baykova O.Yu., Silenova O.V., Krasota A.Yu., Krasnoproshina L.I., Mustafina A.N., Kozlovskaja L.I.** Vaccine-associated paralytic poliomyelitis in Russian Federation during the period of changes in vaccination schedule (2006-2013 y.y.) 9
- Desheva Yu.A., Smolonogina T.A., Doroshenko E.M., Rudenko L.G.** Development of the quadrivalent live attenuated influenza vaccine including two influenza B lineages – Victoria and Yamagata 16
- Sokolova T.M., Poloskov V.V., Shuvalov A.N., Rudneva I.A., Ershov F.I.** Avian recombinant virus H5N1 influenza (A/Vietnam/1203/04) and its escape-mutant m13(13) induce early signaling reactions of the immunity in human lymphocytes 21
- Galochkina A.V., Zarubaev V.V., Kiselev O.I., Babkin V.A., Ostroukhova L.A.** Antiviral activity of the dihydroquercetin during the Cocksackievirus B4 replication *in vitro* 27
- Iunikhina O.V., Kompanets G.G.** Experimental research of the hantavirus survival in complexes with environmental substrates 31
- Moshkovich G.F., Minaeva S.V., Varlova L.V., Goryaeva M.P., Gulyaeva S.S., Tichonova E.V.** Clinical and Pharmacoeconomic Results of the Usage of Various HIV Reverse Transcriptase Inhibitors in the Schemes of Antiretroviral Therapy of Patients Receiving Therapy for the Chronic Hepatitis C Virus 34
- Selimova L.M., Kalnina L.B., Serebrovskaya L.V., Ivanova L.A., Gulyaeva A.N., Nosik D.N.** Cytokines during the human immunodeficiency virus infection type 1(HIV-1) 39
- Zavyalova E.A., Gulyukin M.I., Carpova M.A., Bogdanova P.D., Droshnev A.E.** Identification of the infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) using the enzyme mmunoassay 42
- Guliy O.I., Karavaeva O.A., Velikov V.A., Sokolov O.I., Pavliy S.A., Larionova O.S., Burov A.M., Ignatov O.V.** A Study of the isolated bacteriophage Φab-Sp7 adsorption on the cell surface of the *Azospirillum brasilense* Sp7 46

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

Сергеев О. В., Баринский И. Ф.

СИНТЕТИЧЕСКИЕ ПЕПТИДНЫЕ ВАКЦИНЫ

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

В обзоре обобщены современные сведения о разработке и испытанию синтетических пептидных вакцин. Рассмотрены успешные примеры создания специфической защиты в результате иммунизации синтетическими пептидами по разным схемам. Отмечена значимость конформации пептидов для их иммуногенности. Предложена альтернативная стратегия защиты организма от инфекции с применением синтетических пептидов.

Ключевые слова: *вакцины; синтетические пептиды; иммуногенность; специфическая защита.*

Для цитирования: Вопросы вирусологии. 2016; 61(1): 5–8. DOI 10.18821/0507-4088-2016-61-1-5-8

Sergeyev O.V., Barinsky I.F.

SYNTHETIC PEPTIDE VACCINES

D.I. Ivanovsky Institute of Virology "Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya", 123098, Moscow, Russia

An update on the development and trials of synthetic peptide vaccines is reviewed. The review considers the successful examples of specific protection as a result of immunization with synthetic peptides using various protocols. The importance of conformation for the immunogenicity of the peptide is pointed out. An alternative strategy of the protection of the organism against the infection using synthetic peptides is suggested.

Key words: *vaccines; synthetic peptides; immunogenicity; specific protection.*

Citation: Voprosy virusologii. 2016; 61(1): 5–8. (in Russian). DOI 10.18821/0507-4088-2016-61-1-5-8

For correspondence: Oleg Sergeev, Candidate of biological Sciences; e-mail: osergeyev123@gmail.com

Received 25.01.15

Введение

Вакцинопрофилактика по праву считается одним из выдающихся достижений биологической науки, характерной чертой развития которой является быстрое использование достижений в других областях. Благодаря этому достигнуты большие успехи в борьбе со многими опасными инфекционными заболеваниями человека и животных. Однако существует ряд болезней, против которых вакцины пока не созданы: ВИЧ-инфекция, малярия, туберкулез, лихорадка Эбола, африканская чума свиней и др. Кроме того, имеются и другие нерешенные проблемы современной вакцинопрофилактики [1].

Несмотря на очевидный прогресс в разработке современных вакцин и огромный практический результат их применения, они, как правило, основываются на старом принципе – введении в организм целых, хотя и достаточно обезвреженных, инфекционных агентов или их структурных компонентов. Парадокс состоит в том, что современные традиционные вакцины представляют собой малоконтролируемую сверхкомплексную смесь с большим количеством балластных компонентов, тогда как для создания специфической невосприимчивости (адаптивного иммунитета) необходимы 1–2 антигенные детерминанты возбудителя [2, 3].

Идея использования синтетических пептидов в качестве иммуногенов и вакцин родилась в результате изу-

чения молекулярных механизмов развития адаптивного иммунитета. Она исходила из логического представления, что экзогенные антигены путем эндоцитоза поступают в клетки организма, где расщепляются до пептидов, которые активируют клетки иммунной системы [3, 4]. Большинство природных антигенов представляют собой серию антигенных детерминант, каждая из которых способна вызывать иммунный ответ.

Изучение иммунизирующей активности коротких пептидных антигенов началось во второй половине прошлого века [5–7]. Они оказались удобными аналогами для изучения природных антигенов, так как их введение в организм вызывало сходные иммунологические реакции. R. Arnon и M. Sela в 1969 г. впервые описали получение синтетического фрагмента лизоцима, иммунизация которым привела к образованию антител, идентичных антителам, полученным при введении аналогичного природного фрагмента лизоцима [5]. В 1976 г. H. Langbeheim и соавт. показали, что синтетические пептиды, соответствующие по аминокислотной последовательности фрагментам белка оболочки колифага MS-2, ковалентно связанные с носителем и эмульгированные с масляным адьювантом, вызывали образование нейтрализующих антител [6]. В 1982 г. R. Lerner установил, что искусственно синтезированные короткие пептиды, имитирующие небольшие участки протективных антигенов вируса ящура, способны вызывать специфический

иммунный ответ у лабораторных животных и защищать их от гомологичного инфекционного заболевания при экспериментальном заражении [7].

Привлекательность данного направления исследований состоит в том, что создание синтетических пептидных вакцин решает многие проблемы, связанные с безопасностью, эффективностью, производством и применением вакцинных препаратов. Идентификация антигенных детерминант, ответственных за иммуногенность многих патогенов, позволила синтезировать идентичные пептиды. Благодаря этому в дальнейшем на ряде примеров была показана способность различных искусственных конструкций, созданных на основе синтетических пептидов, вызывать образование специфических антител и защиту животных от инфекционных заболеваний.

На начальном этапе исследования по созданию синтетических пептидных вакцин проведены на удобной модели *вируса ящура*. Синтетические пептиды, соответствующие фрагменту белка VP1 вируса ящура трех типов, вызывали у кроликов и морских свинок образование вируснейтрализующих антител (ВНА) и специфическую защиту [8]. Создание иммунитета у естественно восприимчивых животных стало возможным после того, как было установлено, что за индукцию антител, нейтрализующих вирус ящура, ответствен доминантный нейтрализующий иммуногенный сайт белка VP1 (аминокислоты 141—160) и 1 дополнительный сайт вблизи С-концевого участка этого полипептида. Экспериментальная вакцина на основе синтетического пептида, содержащего аминокислотные последовательности 141—160 VP1, дополненного гемоцианином и адьювантом Фрейнда, вызывала образование ВНА у морских свинок, свиней и крупного рогатого скота и защищала значительную их часть от заболевания при контрольном заражении. Однако антительный ответ после иммунизации пептидным препаратом был примерно в 10 раз менее выраженным, чем после иммунизации цельными вирионами. Иммунный ответ был наибольшим, когда пептид являлся линейным димером или тримером либо частью корового белка вируса гепатита В или вводился присоединенным к Т-клеточному эпитопу. Для иммунизации свиней требовалось 40 мкг синтетического пептида [9]. Пептиды с аминокислотной последовательностью VP1 всех 7 типов вируса ящура вызывали образование ВНА у морских свинок. Кроме того, пептиды (141—160 VP1), обладающие специфичностью вируса ящура типов А и О, индуцировали протективный иммунитет. Менее активным оказался пептид, гомологичный вирусу типа С. Двухвалентные пептидные вакцины вызывали синтез ВНА к 3 серотипам вируса [10].

Синтетический пептид, соответствующий аминокислотному участку 142—158 VP1 вируса ящура типа А и введенный морским свинкам (20 мкг), овцам (1 мг) и крупному рогатому скоту (1,5 мг) вместе с адьювантом Фрейнда, индуцировал формирование высокого уровня ВНА и устойчивости к экспериментальному заражению гомологичным вирусом [11].

Крупномасштабный эксперимент по оценке иммуногенности 4 пептидных вакцин против ящура проведен на многочисленном поголовье естественно восприимчивых животных (138 голов крупного рогатого скота). Антигенной основой всех 4 вакцин служила синтетическая копия аминокислотной последовательности G - Н-петли VP1. Три варианта синтетических вакцин из четырех в качестве усилителей иммуногенности содержали или Т-клеточный эпитоп, или С-концевой фрагмент VP1, или то и другое. Однако ни один из этих вариантов не обеспечил защиту более 40% вакцинированных животных при контрольном заражении вирусом ящура. Анализ полученных результатов привел авторов к заключе-

нию, что использованные ими синтетические вакцины не обладали достаточно выраженной иммунизирующей активностью и нуждались в структурных изменениях синтетических пептидов [12].

Синтетический пептид, содержащий домен G - Н capsidного белка VP1 серотипа О и сайт, ответственный за стимуляцию Т-хелперов, соединенный с двумя циклическими олигопептидами, использовали для иммунизации свиней. Данная конструкция в дозе 12,5 мкг в смеси с адьювантом обеспечила защиту 20 из 21 вакцинированных свиней при экспериментальном заражении. Титр ВНА у животных, привитых синтетической и коммерческой вакцинами, был сходным [13]. Однако та же синтетическая вакцина, введенная крупному рогатому скоту одно- или двукратно, не обеспечила аналогичную защиту, хотя индуцировала антитела в том же титре, что и коммерческая вакцина [14].

Другой синтетический пептид, соответствующий аминокислотам 21—40 и 141—160 белка VP1, ковалентно связанный с С-концом тяжелой цепи иммуноглобулина свиней, вызывал протективный иммунитет у свиней и морских свинок после двукратного введения [15].

Полученные результаты дали основание заключить, что синтетические пептиды могут быть использованы в качестве основы при создании принципиально новых вакцинных препаратов.

Серия аналогичных исследований была проведена с вирусом *grunna tina A*. Иммунизация мышей синтетическими линейными пептидами, соответствующими гемоагглютиниину (ГА) вируса, вызывала образование специфических антител, но не защищала мышей от инфекции [16]. Однако циклические синтетические пептиды, соответствующие аминокислотным остаткам 139—147 ГА, конъюгированные с овальбумином, обеспечили защиту 70—80% мышей после подкожного введения [17]. Аналогичные результаты получены при введении синтетических пептидов в составе липосом [18].

Синтетический пептид, соответствующий последовательности белка нуклеопротеина (NP) вируса гриппа А, введенный мышам интраназально в составе липосом совместно со стимулятором Т-клеточного иммунного ответа, индуцировал протективный иммунитет слизистых оболочек [19].

Пептид, состоящий из 4 копий 20-аминокислотной последовательности матриксного белка М2 вируса гриппа А, ковалентно соединенных с Т-хелпериндуцирующей последовательностью, при внутримышечном введении с неполным адьювантом Фрейнда вызывал у мышей выраженный протективный иммунитет против нескольких серотипов вируса при летальном экспериментальном заражении. Авторы полагают, что данный подход к созданию группоспецифических вакцин применим ко многим вариабельным вирусам [20].

Пептид, соответствующий аминокислотным остаткам 1—23 или 9—21 гликопротеина D *вируса простого герпеса*, в комплексе с яичным альбумином и адьювантом Фрейнда [21] или конъюгированный с пальмитиновой кислотой и включенный в липосому [22], защищал мышей при заражении гомологичным вирусом.

Синтетический пептид, гомологичный N-концевой области белка VP2 *парвовируса собак*, обогащенный Т-клеточными эпитопами в составе белкового носителя, обладал выраженной протективной активностью. Собаки, вакцинированные пептидной вакциной, оказались устойчивыми к заражению вирулентным парвовирусом, тогда как все невакцинированные собаки погибли. Аналогичные результаты получены при иммунизации норок тем же пептидом с последующим заражением вирулентным *вирусом энтерита норок*. Препарат на основе синтетического пептида авторы рассматривают в качестве

эффективной безопасной вакцины для применения у естественно восприимчивых видов животных [23].

Кошек иммунизировали против коронавирусного *инфекционного перитонита* синтетическим пептидом из 20 аминокислот, гомологичным последовательности белка NP вируса. Данная последовательность представляет собой домен, индуцирующий пролиферацию Т-хелперов типа 1. В качестве адьюванта использовали CrG-олигодезоксинуклеотиды. Синтетический полипептид с адьювантом при внутримышечном введении вызывал у кошек выраженный типоспецифический иммунитет, однако гетерологичный (группоспецифический) иммунитет оказался слабовыраженным [24].

Декапептид, гомологичный аминокислотным остаткам 993—1002 пепломерного гликопротеина E2 *вируса гепатита мышей*, в дозе 50 мкг, конъюгированный с гемоцианином и в смеси с адьювантом Фрейнда, индуцировал устойчивость у мышей к экспериментальному заражению [25].

Иммунологическую характеристику линейного вируснейтрализующего эпитопа 6-15C4 G белка *вируса бешенства* изучали на примере его структурного и антигенного аналога – синтетического пептида G5-24. Тандем пептида G5-24 и доминантного Т-хелперного эпитопа белка N вируса бешенства защищал мышей от летальной инфекции гомологичным вирусом [26].

14-Членный синтетический пептид, гомологичный рецепторсвязывающему домену ворсинок *синегнойной палочки*, конъюгированный с гемоцианином, вызывал образование антител у иммунизированных мышей в более высоком титре по сравнению с мышами, иммунизированными цельным белком ворсинок (пилином). Антитела к синтетическому пептиду более эффективно препятствовали специфическому взаимодействию возбудителя с чувствительными клетками мышей. По этой причине авторы отдали предпочтение вакцине на основе синтетических пептидов по сравнению с традиционными субъединичными белковыми вакцинами [27].

Синтетическая вакцина против трипаносомоза (болезни Чагаса) представляла собой двадцатимерный пептид – аналог муцинассоциированного поверхностного белка трипаномы, содержащего В- и Т-лимфоцитстимулирующие эпитопы. Пептид, конъюгированный с гемоцианином, защищал 86% иммунизированных мышей при экспериментальном летальном заражении. Вакцинация сопровождалась образованием специфических антител и цитокинов в высокой концентрации, а также значительно снижала деструктивную активность патогена во внутренних органах по сравнению с неиммунизированными животными. Примечательно, что наилучший результат достигнут при иммунизации без гидроксида алюминия в качестве адьюванта [28].

Для защиты против *малярии* детей в возрасте 1 - 2 лет иммунизировали синтетическим пептидом из 40–45 аминокислот, гомологичным поверхностному белку 3 малярийного плазмодия, адсорбированным на гидроксида алюминия. Препарат был предварительно испытан на взрослых добровольцах. Его вводили троекратно в дозе 15 или 30 мкг. В результате отмечен высокий уровень специфических антител, прежде всего участвующих в макрофагопосредованном уничтожении паразита, при низкой реактогенности препарата (легкое воспаление в месте введения) [29]. В 2001–2009 гг. проводили клинические испытания синтетических пептидных вакцин против малярии, предназначенных для профилактики доэритроцитарной и эритроцитарной стадий развития малярийного плазмодия. Главными задачами испытаний являлись оптимизация структуры синтетического пептида и выбор эффективного безопасного адьюванта. Вакцинация тестируемыми

пептидами вызывала образование нейтрализующих антител и стимуляцию Т-лимфоцитов, что приводило к подавлению инфекции на эритроцитарной стадии развития. Профилактика доэритроцитарной стадии, по мнению авторов, должна быть функцией эффективных адьювантов [30].

Обсуждение

Анализ результатов лабораторных испытаний синтетических пептидов в качестве вакцин против различных инфекционных заболеваний показал, что многие из них обладают иммуногенными свойствами и вызывают образование специфических антител и защиту от заболеваний при экспериментальном заражении. Однако по выраженности они, как правило, значительно уступают существующим вакцинам. Основная причина их недостаточной антигенной активности, вероятно, состоит в том, что короткие синтетические пептиды в отличие от трехмерных эпитопов природных белков не имеют соответственной конформационной организации. Считается, что для иммунного ответа конформация более важна, чем линейная последовательность аминокислот и даже последовательность антигенных детерминант. Этим, по-видимому, объясняется известный факт, заключающийся в том, что циклизированные пептиды обладают большей иммуногенностью, чем их линейные аналоги [17, 18].

Иммуногенность синтетических пептидов может быть существенно повышена путем натурализации структуры пептидов. Хотя многие эпитопы нативных белков являются не линейными, а конформационными, в белковых молекулах существуют последовательности, играющие главную роль в формировании эпитопа. Оптимизация структуры синтетических пептидов может быть осуществлена с помощью компьютерных программ, которые позволяют полностью расшифровать структуру нативных белковых молекул [31]. Оптимизированная структура синтетического пептида дала бы возможность обойтись без дополнительных усилителей его антигенности и иммуногенности. В идеале получение синтетических пептидов, структурно соответствующих природным аналогам в достаточном количестве, является центральным звеном решения проблемы синтетических вакцин.

Синтетические пептиды в будущем несомненно станут основой нового поколения безопасных высокоэффективных вакцин. Они обладают постоянством состава и высокой стабильностью. В отличие от традиционных вакцин синтетические пептиды свободны от балластных компонентов: белков и нуклеиновых кислот, которые могут вызывать нежелательные реакции в привитом организме [1], в том числе хромосомные aberrации [32–34].

Использование синтетических пептидных вакцин исключает риск реверсии вирулентности, который потенциально свойствен живым вакцинам. Примером может служить реверсия вирулентности вакцинных штаммов вируса полиомиелита при использовании живой вакцины в полевых условиях [35]. Применение синтетических вакцин устраняет возможность латентной контаминации традиционных живых вакцин посторонними агентами [23].

Массовое изготовление синтетических вакцин обеспечит высокую безопасность, стандартность и низкую себестоимость готовой продукции. Технология изготовления безопасных эффективных синтетических пептидных вакцин может явиться основой для создания антирецепторных вакцин при реализации новой стратегии вакцинопрофилактики – обеспечения быстрой неиммунной защиты от инфекционных заболеваний [36].

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 4-31, 33-36 см. REFERENCES)

1. Зверев В.В., Семенов Б.Ф., Хайтов Р.М. *Вакцины и вакцинация: национальное руководство*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2011.
 2. Медуницын Н.В. *Вакцинология*. М.: Триада-Х; 1999.
 3. Петров Р.В., Хайтов Р.М. *Иммуногены и вакцины нового поколения*. Москва: ГЭОТАР-Медиа; 2011.
 32. Волгарева Г.М., Сафронова Л.Д. Контроль генетических последствий вакцинаций: электронно-микроскопический анализ синаптомемных комплексов мыши. *Генетика*. 1991; 27: 1410-22.
- ### REFERENCES
1. Zverev V.V., Semenov B.F., Khaitov R.M. *Vaccines and Vaccination: National Guide [Vaktsiny i vaksinatziya: natsional'noe rukovodstvo]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2011. (in Russian)
 2. Medunitsyn N.V. *Vaccinology [Vaktsinologiya]*. Moscow: Triada-X; 1999. (in Russian)
 3. Petrov R.V., Khaitov R.M. *Immunogens and New Generation Vaccines [Immunogeny i vaktsiny novogo pokoleniya]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2011. (in Russian)
 4. Roitt I., Brostoff J., Male D. *Immunology*. 5th ed. Mosby; 2000.
 5. Arnon R., Sela M. Antibodies to a unique region in lysozyme provoked by a synthetic antigen conjugate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1969; 62(1): 163-71.
 6. Langbeheim H., Arnon R., Sela M. Antiviral effect on MS-2 coliphage obtained with a synthetic antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1976; 73: 4636-40.
 7. Lerner R.A. Tapping the immunological repertoire to produce antibodies of predetermined specificity. *Nature*. 1982; 299: 593-6.
 8. Bittle J.L., Houghten R.A., Alexander H., Shinnick T.M., Sutcliffe J.G., Lerner R.A. et al. Protection against foot-and-mouth disease immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence. *Nature*. 1982; 298(5869): 30-3.
 9. Brown F. Use of peptides for immunization against foot-and-mouth disease. *Vaccine*. 1988; 6: 180-2.
 10. Doel T.R., Gale C., Do Amaral C.M., Mulcahy G., Dimarchi R. Heterotypic protection induced by synthetic peptides corresponding to three serotypes of foot-and-mouth disease vims. *J. Virol*. 1990; 64(5): 2260-4.
 11. Steward M.W., Stanley C.M., Dimarchi R. High-affinity antibody induced by immunization with a synthetic peptide is associated with protection of cattle against foot-and-mouth disease. *Immunology*. 1991; 72: 99-103.
 12. Taboga O., Tami C., Carillo E., Núñez J.I., Rodríguez A., Saiz J.C. et al. A large-scale evaluation of peptide vaccines against foot-and-mouth disease: lack of solid protection in cattle and isolation of escape. *J. Virol*. 1997; 71(4): 2606-14.
 13. Wang C.Y., Chang T.Y., Walfield A.M., Ye J., Shen M., Chen S.P. et al. Effective synthetic peptide vaccine for foot-and-mouth disease in swine. *Vaccine*. 2002; 20(19-20): 2603-10.
 14. Rodriguez L.L., Barrera J., Kramer E., Lubroth J., Brown F., Golde W.T. A synthetic peptide containing the consensus sequence of the G-H loop region of foot-and-mouth disease virus type-O VP1 and a promiscuous T-helper epitope induces peptide-specific antibodies but fails to protect cattle against viral challenge. *Vaccine*. 2003; 21(25-26): 3751-6.
 15. Li G., Chen W., Yan W. Comparison of immune responses against foot-and-mouth disease virus induced by fusion proteins using the swine IgG heavy chain constant region or beta-galactosidase as a carrier of immunogenic epitopes. *Virology*. 2004; 328: 274-81.
 16. Green N., Alexander H., Olson A., Alexander S., Shinnick T.M., Sutcliffe J.G. et al. Immunogenic structure of the influenza haemagglutinin. *Cell*. 1982; 28(3): 477-87.
 17. Muller S., Plau S., Samama J.P., Valette M., Briand J.P., Van Regenmortel M.H. Antigenic property and protective capacity of a cyclic peptide corresponding to site A of influenza vims haemagglutinin. *Vaccine*. 1990; 8(4): 308-14.
 18. Friede M., Muller S., Briand J.P., Plau S., Fernandes I., Frisch B. et al. Selective induction of protection against influenza virus infection in mice by a lipid-peptide conjugate delivered in liposomes. *Vaccine*. 1994; 12(9): 791-7.
 19. Ninomiya A., Ogasawara K., Kajino K., Takada A., Kida H. Intranasal administration of a synthetic peptide vaccine encapsulated in liposome together with an anti-CD40 antibody induces protective immunity against influenza A virus in mice. *Vaccine*. 2002; 20(25-26): 3123-9.
 20. Ma J.H., Yang F.R., Yu H., Zhou Y.J., Li G.X., Huang M. et al. An M2e-based synthetic peptide vaccine for influenza A virus confers heterosubtypic protection from lethal virus challenge. *Virol. J*. 2013; 10: 227.
 21. Geerligs H.J., Weijer W.J., Welling G.W., Welling-Wester S. The influence of different adjuvants on the immune response to a synthetic peptide comprising amino acid residues 9-12 of herpes simplex virus type 1 glycoprotein D. *J. Immunol. Methods*. 1989; 124(1): 95-102.
 22. Brynestad K., Babbit B., Huang L., Rouse B.T. Influence of peptide acylation, liposome incorporation, and synthetic immunomodulators on the immunogenicity of a 1-23 peptide of glycoprotein D of herpes simplex virus: implications for subunit vaccines. *J. Virol*. 1990; 64(2): 680-5.
 23. Langeveld J.P., Casal J.I., Osterhaus A.D., Cortés E., de Swart R., Vela C. et al. First peptide vaccine providing protection against viral infection in the target animal: studies of canine parvovirus in dogs. *J. Virol*. 1994; 68(7): 4506-13.
 24. Takano T., Tomizawa K., Morioka H., Doki T., Hohdatsu T. Evaluation of protective efficacy of the synthetic peptide vaccine containing the T-helper 1 epitope with CpG oligodeoxynucleotide against feline infectious peritonitis virus infection in cats. *Antivir. Ther*. 2014; 19(7): 645-50.
 25. Talbot P.J., Dionne J., Lacroix M. Vaccination against lethal coronavirus-induced encephalitis with a synthetic decapeptide homologous to a domain in the predicted peplomer stalk. *J. Virol*. 1988; 62: 3032-6.
 26. Ditzschold B., Gore M., Marchadier D., Niu H.S., Bunschoten H.M., Otvos L.Jr. et al. Structural and immunological characterization of linear virus-neutralizing epitope of the rabies virus glycoprotein and its possible use in a synthetic vaccine. *J. Virol*. 1990; 64(8): 3804-9.
 27. Kao D.J., Hodges R.S. Advantages of a synthetic peptide immunogen over a protein immunogen in the development of an anti-pilus vaccine for *Pseudomonas aeruginosa*. *Chem. Biol. Drug Des*. 2009; 74(1): 33-42.
 28. Serna C., Lara J.A., Rodrigues S.P., Marques A.F., Almeida I.C., Maldonado R.A. A synthetic peptide from *Trypanosoma cruzi* mucin-like associated surface protein as candidate for a vaccine against Chagas disease. *Vaccine*. 2014; 32(28): 3525-32.
 29. Sirima S.B., Tiono A.B., Ouedraogo A., Diarra A., Ouédraogo A.L., Yaro J.B. et al. Safety and immunogenicity of the malaria vaccine candidate MSP3 long synthetic peptide in 12-24 months-old Burkinabe children. *PLoS One*. 2009; 4(10): e7549.
 30. Nardin E. The past decade in malaria synthetic peptide vaccine clinical trials. *Hum. Vaccin*. 2010; 6(1): 27-38.
 31. Hansen M.R., Villar H.O., Feyfant E. Development of an informatics platform for therapeutic protein and peptide analytics. *J. Chem. Inf. Model*. 2013; 53(10): 2774-9.
 32. Volgareva G.M., Safronova L.D. Control of genetic consequences of vaccinations: electron microscopic analysis of murine synaptonemal complexes. *Генетика*. 1991; 27(8): 1410-22. (in Russian)
 33. Genghini R., Tiranti I., Segade G., Amado J., Wittouck P., Mian L. In vivo effect on pig 9 chromosomes of high dosage vaccine against classic swine fever. *Mutat. Res*. 1998; 422(2): 357-65.
 34. Genghini R., Tiranti I., Bressan E., Zamorano-Ponce E., Fernández J., Dulout F. Determination of genotoxicity of classical swine fever vaccine in vitro by cytogenetic and comet tests. *Mutagenesis*. 2006; 21(3): 213-7.
 35. Sutter R.W. Poliomyelitis vaccines. In: Plotkin S., Orenstein W., Offit P., eds. *Vaccines*. 5th ed. Saunders Elsevier; 2008: 62-101.
 36. Sergeev V.A., Sergeev O.V. Hypervaccination as prompt non-immune protection. *Procedia in Vaccinology*. 2014; 8: 77 - 88.

Поступила 25.01.15

*Иванова О. Е.^{1,2}, Еремеева Т. П.¹, Морозова Н. С.³, Шакарян А. К.¹, Гмыль А. П.¹, Яковенко М. Л.^{1,4},
Короткова Е. А.^{1,4}, Чернявская О. П.⁵, Байкова О. Ю.¹, Силенова О. В.¹, Красота А. Ю.^{1,4},
Краснопрошина Л. И.⁶, Мустафина А. Н.¹, Козловская Л. И.¹*

ВАКЦИНОАССОЦИИРОВАННЫЙ ПАРАЛИТИЧЕСКИЙ ПОЛИОМИЕЛИТ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В ПЕРИОД ИЗМЕНЕНИЯ СХЕМЫ ВАКЦИНАЦИИ (2006–2013 гг.)

¹ФГБНУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова», 142782, г. Москва; ²ФГУП «Предприятие по производству бактериальных и вирусных препаратов Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова», 142782, г. Москва; ³ФБУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Роспотребнадзора, 117105, г. Москва; ⁴Институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского МГУ им. М. В. Ломоносова, 119991, г. Москва; ⁵ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова», 119991, г. Москва; ⁶ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова», 105064, г. Москва

Представлены результаты вирусологического исследования клинических материалов и эпидемиологический анализ случаев вакциноассоциированного паралитического полиомиелита (ВАПП), выявленных в рамках надзора за острым вялым параличом (ОВП) в 2006–2013 гг. Из 2976 зарегистрированных случаев ОВП у 30 больных выявлен ВАПП: 15 случаев у реципиентов оральной полиовирусной вакцины (ОПВ), 15 у непривитых контактных лиц. Возраст больных – от 4 мес до 5,5 года ($13,6 \pm 12,4$ мес), дети до 1 года составили 63,3%; преобладали мальчики (73,3%); 53,3% детей были вакцинированы ОПВ; период между получением ОПВ и началом паралича – от 2 до 32 дней ($18,7 \pm 8,2$). Нижний парапарез зафиксировали у 48,3% больных, нижний монопарез – у 37,9%, верхний монопарез – у 6,9%, тетрапарез с бульбарным синдромом – у 6,9%. Большинство заболевших (85,7%) имели неблагоприятный преморбидный статус. У 73,9% заболевших выявлены нарушения гуморального звена иммунитета: общая переменная иммунная недостаточность (52,9%), гипогаммаглобулинемия (41,2%), селективный дефицит IgA (5,9%). У 70,6% больных нарушения гуморального иммунитета сочетались с неблагоприятным преморбидным статусом. Наиболее часто (76%; $p < 0,05$) выделяли полиовирус одного типа – типа 2 (44%) или 3 (32%). Все штаммы имели вакцинное происхождение, дивергенция от гомотипичных штаммов Сзбина на участке генома, кодирующего белок VP1, не превышала 0,5% нуклеотидных замен за исключением вакцинородственного полиовируса типа 2 – множественного рекомбинанта (тип 2/тип 3/тип 2/тип 1) со степенью дивергенции 1,44 %, выделенного от 6-месячного невакцинированного ребенка (RUS-08063034001). Частота случаев ВАПП в целом в 2006–2013 гг. составила 1 на 3,4 млн распределенных доз ОПВ, 2,2 случая на 1 млн новорожденных; после внедрения последовательной схемы вакцинации (инактивированная полиовирусная вакцина затем ОПВ) в 2008–2013 гг. частота снизилась по сравнению с периодом исключительного применения ОПВ в 2006–2007 гг. – 1 случай на 4,9 млн доз, 1,4 случая на 1 млн новорожденных и 1 случай на 1,9 млн доз, 4,9 случая на 1 млн новорожденных соответственно.

Ключевые слова: полиомиелит; вакциноассоциированный паралитический полиомиелит; оральная полиовирусная вакцина; инактивированная полиовирусная вакцина.

Для цитирования: Вопросы вирусологии. 2016; 61(1): 9–15. DOI 10.18821/0507-4088-2016-61-1-9-15

*Ivanova O.E.^{1,2}, Eremeeva T.P.¹, Morozova N.S.³, Shakaryan A.K.¹, Gmyl A.P.¹, Yakovenko M.L.^{1,4},
Korotkova E.A.^{1,4}, Chernjavskaia O.P.⁵, Baykova O.Yu.¹, Silenova O.V.¹, Krasota A.Yu.^{1,4},
Krasnoproshina L.I.⁶, Mustafina A.N.¹, Kozlovskaja L.I.¹*

VACCINE-ASSOCIATED PARALYTIC POLIOMYELITIS IN RUSSIAN FEDERATION DURING THE PERIOD OF CHANGES IN VACCINATION SCHEDULE (2006-2013 yy.)

¹M.P. Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalites, 142782, Moscow, Russia; ²Federal State Unitary Enterprise for Manufacture of Bacterial and Viral Preparations, M.P. Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalites, 142782, Moscow, Russia; ³Federal Center of Hygiene and Epidemiology, Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 117105, Moscow, Russia; ⁴A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991, Moscow, Russia; ⁵I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, 119991, Moscow, Russia; ⁶I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, 105064, Moscow, Russia

The results of virologic testing of clinical materials and epidemiological analysis of vaccine-associated paralytic poliomyelitis (VAPP) cases obtained in 2006-2013 during AFP surveillance are presented. Among the 2976 cases of AFP 30 cases were VAPP. 15 cases were observed in OPV recipients, whereas 15 cases were observed in non-vaccinated contacts. The age of the patients varied from 4 months to 5.5 years (13.6 ± 12.4 months old). Children younger than 1 year constituted 63.3% of the group; boys were dominant (73.3%); 53.3% of children were vaccinated with OPV; the time period between receipt of OPV and onset of palsy was from 2 to 32 days (18.7 ± 8.2). Lower paraparesis was documented in 48.3% of patients; lower monoparesis, in 37.9%; upper

monoparesis, in 6.9%; tetraparesis with bulbar syndrome, in 6%. The majority of the patients (85.7%) had an unfavorable premorbid status. The violations of the humoral immunity were found in 73.9% cases: CVID (52.9%), hypogammaglobulinemia (41.2%), selective IgA deficiency (5.9%). In 70.6% cases damage to humoral immunity was combined with poor premorbid status. The most frequently observed (76%, $p < 0.05$) represented the single type of poliovirus – type 2 (44%) and type 3 (32%). All strains were of the vaccine origin, the divergence from the homotypic Sabin strains fell within the region of the gene encoding VP1 protein, which did not exceed 0.5% of nucleotide substitutions except vaccine derived poliovirus type 2 – multiple recombinant (type 2 / type 3 / type 2 / type 1) with the degree of the divergence of 1.44% isolated from 6-month old unvaccinated child (RUS-08063034001). The frequency of the VAPP cases was a total of 1 case per 3.4 million doses of distributed OPV in 2006-2013; 2.2 cases per 1 million of newborns were observed. This frequency decreased after the introduction of the sequential scheme of vaccination (IPV, OPV) in 2008-2013 as compared with the period of exclusive use of OPV in 2006-2007: 1 case per 4.9 million doses, 1.4 cases per 1 million newborns and 1 case per 1.9 million doses, 4.9 cases per 1 million newborns, respectively.

The study has been financed from Russian Federation budget within the framework of the Program for eradication of poliomyelitis in the Russian Federation, WHO Polio eradication initiative, WHO's European Regional Bureau, Russian Foundation for Basic Research (project No. 15-15-00147).

Key words: *poliomyelitis; vaccine-associated paralytic poliomyelitis; oral poliovirus vaccine; inactivated poliovirus vaccine.*

Citation: Voprosy virusologii. 2016; 61(1): 9–15. (in Russian). DOI 10.18821/0507-4088-2016-61-1-9-15

For correspondence: Olga Ivanova, MD, PhD, DSc; e-mail: poliom@aha.ru

Received 20.05.15

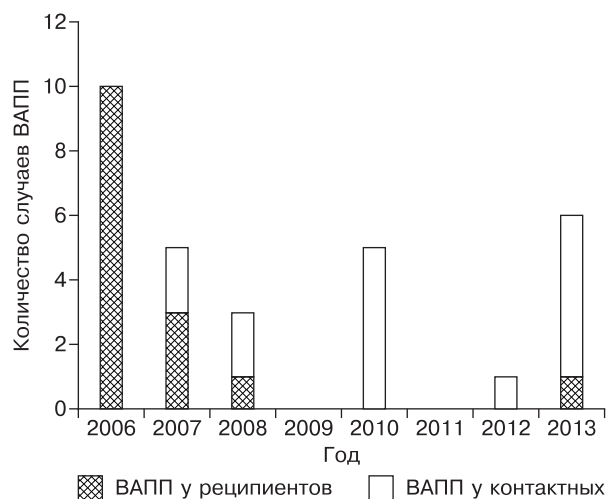
В 1996 г. началась реализация Национальной программы ликвидации полиомиелита в Российской Федерации [1]. В 2002 г. ВОЗ присвоила РФ, входящей в состав Европейского региона, статус страны, «свободной от полиомиелита» [2]. Этот успех был достигнут прежде всего в результате высокого (более 99%) охвата детского населения вакцинацией против полиомиелита в ходе рутинной иммунизации и дополнительных мероприятий. Однако в течение всего периода выполнения Программы в РФ регистрировали случаи полиомиелита. В 2010 г. были выявлены случаи заболевания, связанные с диким полиовирусом типа 1, занесенным на территорию России из Таджикистана и Узбекистана [3]. Остальные случаи были классифицированы как вакциноассоциированный паралитический полиомиелит (ВАПП). До 2008 г. Национальный календарь профилактических прививок РФ предусматривал вакцинацию только оральной полиовирусной вакциной (ОПВ) [4]. В 2006–2007 гг. в рамках реализации приоритетного Национального проекта в сфере здравоохранения [5] была предусмотрена иммунизация против полиомиелита детей определенных контингентов инактивированной полиовирусной вакциной (ИПВ), поэтому этот период можно рассматривать как переходный. С 2008 г. в РФ принята последовательная схема иммунизации против полиомиелита: первичный вакцинальный комплекс включает 2 дозы ИПВ и 1 дозу ОПВ ((в 2008–2011 гг. – 3 дозы ИПВ [6]), последующие 3 ревакцинации проводят ОПВ [7]. В предыдущем сообщении [8] нами дана характеристика случаев ВАПП в период исключительного применения ОПВ (1998 – 2005 гг.), в настоящей работе мы представляем результаты вирусологического исследования клинических материалов и эпидемиологический анализ случаев ВАПП в РФ в период изменения схемы вакцинации против полиомиелита.

Материал и методы

Выявление и классификация случаев ВАПП. Случаи ВАПП были выявлены и лабораторно исследованы в соответствии с алгоритмом обследования случая острого вялого паралича (ОВП), принятым в РФ [9], и рекомендациями ВОЗ [10]. У пациентов с ОВП брали 2 образца фекалий, образцы парных сывороток крови и в случае выделения вируса образцы фекалий на 60-й и 90-й дни от начала паралича и далее с интервалом 1 мес до получения отрицательного результата. Окончательную классификацию случая ОВП как «ВАПП» проводила Национальная комиссия экспертов по диагностике по-

лиомиелита, учитывая клиническую картину, результаты вирусологического исследования, наличие остаточных явлений в виде парезов и параличей через 60 дней после начала заболевания, вакцинальный статус заболевшего и эпидемиологические сведения [10, 11]. При возникновении у пациента типичной клинической картины в виде острого инфекционного начала с развитием вялых параличей без признаков спастичности в период от 6 до 30 дней после вакцинации ОПВ, выделения вируса вакцинного происхождения, сохранения остаточных параличей через 60 дней после заболевания случай ОВП классифицировали как «ВАПП у реципиента». При наличии тех же критериев у пациента, не получавшего ОПВ, случай классифицировали как «ВАПП у контактного», даже если прямой контакт с реципиентом вакцины не установлен. Если заболевание с типичной клинической картиной паралитического полиомиелита возникало в период от 6 до 30 дней после получения ОПВ, но полиовирусы не были выделены, несмотря на адекватные сроки отбора материалов (в течение 14 дней от начала заболевания), случай классифицировали как «полиомиелит неясной этиологии, возможно, ВАПП у реципиента ОПВ». Если же полиовирус (как у реципиента ОПВ, так и у не реципиента) не был выделен вследствие позднего (после 14-го дня от начала заболевания) забора образцов стула для исследования, случай классифицировали как «случай, совместимый с полиомиелитом». Если из истории больного было достоверно известно, что паралич развился в период от 6 до 30 дней после получения ОПВ, его считали случаем ВАПП у реципиента.

Вирусологические исследования проводили в соответствии с рекомендациями ВОЗ [12]. Для выделения вирусов из проб фекалий использовали культуры клеток RD, L20B, Herp-2, предоставленные ВОЗ. Идентификацию вирусов выполняли в реакции микронейтрализации с помощью одобренных ВОЗ типоспецифических анти-полиосывороток кролика, любезно предоставленных д-ром Н. G. A. M. van der Avoort (RIVM, Билтховен, Нидерланды). Внутритиповую дифференциацию проводили с помощью прямого варианта иммуноферментного анализа с перекрестно-адсорбированными поликлональными антисыворотками, предоставленными ВОЗ [12, 13], обратнотранскриптной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) [14] и ОТ-ПЦР с детекцией в режиме реального времени [14]. Выделение тотальной РНК из культуральной жидкости зараженных клеток, обратную транскрипцию, амплификацию с помощью ПЦР фрагментов полиовирусного генома, кодирующего белок



Случаи ВАПП в РФ в 2006–2013 гг.

VP1, их очистку и секвенирование проводили, как описано в работе [3].

Серологические исследования. Уровень нейтрализующих антител в сыворотках крови определяли в реакции микронейтрализации с вакцинными штаммами вируса полиомиелита (штаммы Сэбина) 3 типов на культуре клеток НЕР-2 [15].

Частоту возникновения случаев ВАПП в РФ выражали как количество доз ОПВ, распределенных за определенный период времени, на 1 случай ВАПП; количество случаев ВАПП, возникших за определенный период времени, на 1 млн новорожденных детей. Оценивали частоту возникновения случаев ВАПП в целом, для реципиентов ОПВ, реципиентов первой дозы ОПВ, контактных. Данные о количестве новорожденных детей были получены на сайте Федеральной службы государственной статистики (www.gsk.ru). Сведения о количестве распределенных доз ОПВ были предоставлены ФГУП «ПИПВЭ им. М. П. Чумакова». Учитывали количество доз ОПВ, использованных как для плановой иммунизации, так и в ходе дополнительных мероприятий по иммунизации (субнациональные дни иммунизации).

Статистическую обработку данных проводили с использованием критериев, описанных в работе [16], и программы Microcal Origin 8.0.

Результаты и обсуждение

В течение 2006–2013 гг. в России было зарегистрировано 2976 случаев ОПВ (<https://extranet.who.int/polis/public/CaseCount.aspx>), из которых 30 определены как ВАПП (см. рисунок). В 15 случаях ВАПП у реципиентов Национальная комиссия экспертов включила 12 случаев ВАПП, полностью отвечающих этому определению, 1 случай, «совместимый с полиомиелитом», и 2 случая полиомиелита неясной этиологии. К 15 случаям ВАПП у контактных были отнесены 14 случаев ВАПП, соответствующих этому критерию, и 1 случай, «совместимый с полиомиелитом».

Возраст больных (табл. 1) колебался от 4 мес до 5 лет 6 мес, дети в возрасте до 1 года составили 63,3% (19 из 30). Среди больных ВАПП-реципиентов дети до 1 года составили 80% (12 из 15), среди контактных случаев ВАПП – 46,7% (7 из 15). Средний возраст всех больных составил $13,6 \pm 12,4$ мес, больных ВАПП-реципиентов – $10,3 \pm 9,3$ мес, для случаев ВАПП у контактных – $17,1 \pm 14,4$ мес.

Среди пациентов с диагнозом ВАПП преобладали мальчики (см. табл. 1) – 73,3% (22 из 30), как для случаев

ВАПП у реципиентов вакцины (80%, 12 из 15), так и для случаев ВАПП у контактных (66,7%, 10 из 15).

Из 30 заболевших ВАПП 16 (53,3%) были вакцинированы против полиомиелита. Одну дозу ОПВ получили 14 (46,7%) детей, по одному ребенку (3,3%) – 2 и 3 дозы. Не были вакцинированы против полиомиелита 14 (46,7%) детей. Большая часть заболеваний ВАПП у реципиентов (86,7%, 13 из 15) зарегистрирована у детей, получивших первую дозу ОПВ, по одному ребенку (6,7%) заболели после получения 2-й и 3-й дозы ОПВ. Подавляющее большинство пациентов с диагнозом «ВАПП у контактного» не были вакцинированы – 14 из 15 (93,3%). У 1 (6,7%) ребенка в истории болезни зафиксирована однократная вакцинация ОПВ. Вирус полиомиелита у этого ребенка не был выделен. С учетом длительного срока от получения ОПВ до возникновения паралича (52 дня), установленных контактов с недавно привитым ребенком, результата исследования сыворотки (отсутствие нейтрализующих антител к полиовирусу типов 1 и 3 и наличие антител в титре 1:256 к полиовирусу типа 2) этот случай был классифицирован как «ВАПП у контактного».

Среди реципиентных случаев ВАПП период между получением ОПВ и началом паралича колебался от 2 до 32 и составил в среднем 19 дней ($18,7 \pm 8,2$ дня).

Случаи полиомиелита были зарегистрированы в 20 различных регионах РФ. Географических и сезонных закономерностей распределения случаев заболевания не наблюдали. Большинство детей (23) проживали в семьях, среди детей с диагнозом «ВАПП у контактного» 5 были воспитанниками домов ребенка, 2 принадлежали к мигрирующим группам населения (цыгане).

Подробное клиническое описание было доступно у 29 пациентов. Во всех случаях наблюдали низкий тонус и отсутствие сухожильных рефлексов в вовлеченных конечностях. Локализация поражений распределилась следующим образом: у 11 (37,9%) человек – нижний монопарез, у 14 (48,3%) – нижний парапарез, у 2 (6,9%) – верхний монопарез, у 2 (6,9%) – тетрапарез с бульбарным синдромом. Все парапарезы были асимметричны. Летальные исходы среди всех 30 больных ВАПП отсутствовали.

Таблица 1

Характеристика случаев ВАПП в России в период 2006–2013 гг.

Характеристика	ВАПП у реципиентов	ВАПП у контактных	Всего ВАПП
Количество случаев	15	15	30
Пол:			
мужской	12	10	22
женский	3	5	8
Возраст, годы			
≤ 1	12	7	19
> 1	3	8	11
Количество полученных доз ОПВ			
1	13	1	14
2	1	–	1
3	1	–	1
Не вакцинирован	–	14	14
Тип полиовируса			
1	–	–	–
2	3	8	11
3	3	5	8
1+3	1	–	1
2+3	3	–	3
1+2+3	2	–	2

Результаты наблюдения за длительностью выделения вирусов больными ВАПП

№ больного	Диагноз	Иммунологический статус	Выделенный вирус			
			первичный отбор	60-й день	90-й день	120-й день
1	М., рВАПП	Гипогамаглобулинемия	ПВ 3 (0,48%)*	0	ПВ 1 (0%)	0
2	Р., рВАПП	То же	ПВ 3 (0,21%)	ПВ 2 (0%)	0	0
3	Ш., кВАПП, «совместимый»	"	0	Аденовирус	–	–
4	П., кВАПП	ОВИН	ПВ 2 (0,33%)	ПВ 2 (0,44%)	CVB-5	0
5	А., кВАПП	ОВИН	ПВ 2 (0,33%)	CVB-3	–	0
6	Ко.,кВАПП	ОВИН	ПВ 2 (0,33%)	CVB-3	CVB-3	0
7	Ки., кВАПП	ОВИН	ПВ 2 (0,33%)	CVB-3	CVB-3	0

Примечание. * – % дивергенции от гомотипичного штамма Сэбина на участке генома, кодирующего белок VP1; ПВ – полиовирус; кВАПП – ВАПП у контактного; рВАПП – ВАПП у реципиента; CVB-3, CVB-5 – вирус Коксаки В3, Коксаки В5.

Состояние здоровья, на фоне которого возник полиомиелит, было известно для 21 больного ВАПП, 18 (85,7%) имели отягощенный преморбидный фон. Наиболее частыми диагнозами были перинатальное поражение ЦНС (8), частые респираторные заболевания, болезни органов дыхания (7), врожденные патологии развития органов (5), кандидоз полости рта (3), по 1 ребенку имели диагнозы «болезнь Дауна», «атопический дерматит», «аллергия на пищевые продукты». У 14 детей зафиксировано сочетание различных диагнозов.

Сведения об иммунологическом статусе пациентов были известны для 23 больных. У 17 (73,9%) из них выявлены нарушения гуморального звена иммунитета: у 9 (52,9%) общая вариабельная иммунная недостаточность (ОВИН), у 7 (41,2%) – гипогамаглобулинемия, у 1 (5,9%) – селективный дефицит IgA. У 12 (70,6%) больных нарушения гуморального иммунитета сочетались с неблагоприятным преморбидным статусом.

Вирусы полиомиелита были выделены у 25 (12 реципиентов и 13 контактных) заболевших ВАПП (см. табл. 1). В целом у пациентов с диагнозом ВАПП чаще ($p < 0,05$) выделяли вирус одного типа (76%, 19 из 25), реже – смесь полиовирусов (24%, 6 из 25). Среди больных ВАПП реципиентов количество случаев, в которых выделяли 1 тип или смесь вирусов, распределялось одинаково – по 6 случаев. У больных ВАПП-контактных лиц смеси полиовирусов не выделяли.

В целом от заболевших наиболее часто выделяли полиовирусы типов 2 (44%) и 3 (32%). Среди детей с диагнозом «ВАПП у реципиента» вирусы типов 2, 3, а также смесь вирусов типов 2 и 3 выделяли в равном количестве (по 3). Полиовирус типа 1 выделяли только в составе смесей. От детей с диагнозом «ВАПП у контактного» в основном выделяли полиовирус типа 2 (61,5%).

Все выделенные штаммы полиовирусов имели вакцинное происхождение, а степень дивергенции от соответствующих по типу штаммов Сэбина на участке генома, кодирующего белок VP1, не превышала 0,5% нуклеотидных замен. Исключение составил полиовирус типа 2, выделенный от контактного случая ВАПП (RUS 08063034001) у 6-месячного невакцинированного ребенка, который находился в детском дошкольном учреждении закрытого типа – дом ребенка [17]. Этот штамм оказался множественным (тип 2/тип 3/тип 2/тип 1) рекомбинантом. Степень дивергенции вируса от вакцинного штамма Сэбина типа 2 на участке генома, кодирующего белок VP1, составила 1,44% (13 мутаций), что соответствует времени его циркуляции в популяции больше 1 года. Таким образом, заболевший ребенок получил уже измененный полиовирус, дивергировавший от вакцинного предка в организме предыдущего «хозя-

ина» или «хозяев», – вакцинородственный полиовирус, происхождение которого не определено (aVDPV).

Чтобы выявить возможное продолжительное выделение полиовируса больными ВАПП, повторно были обследованы 27 детей. Семь детей выделяли различные вирусы на 60-й и 90-й дни (табл. 2), все они имели нарушения гуморального иммунитета. Вирусы полиомиелита, выделенные у 2 детей на 60-й день и у 1 ребенка на 90-й день, имели вакцинное происхождение, нуклеотидных отличий в районе генома, кодирующего белок VP1, от соответствующих вакцинных штаммов Сэбина не выявили, или они были незначительными. Ни один ребенок не выделял вирусы более 3 мес от начала заболевания.

Для серологического исследования были получены сыворотки крови 20 заболевших; парные сыворотки получены от 10 пациентов с диагнозом «ВАПП у реципиента» и от 7 из 10 детей, имеющих диагноз «ВАПП у контактного».

Подавляющее большинство (8 из 10) реципиентов ОПВ имели нейтрализующие антитела к 3 типам полиовируса. Один реципиент с диагнозом «гипогамаглобулинемия», получивший 3 дозы ОПВ, не имел антител к полиовирусу типа 3. Один пациент с таким же диагнозом, получивший 1 дозу ОПВ, не имел антител к полиовирусу типов 1 и 2. У 3 из 4 пациентов, от которых был выделен полиовирус одного типа, наблюдали 4-кратное и большее нарастание титра антител к выделенному типу полиовируса. В сыворотках крови 3 пациентов (от одного выделена смесь полиовирусов типов 2 и 3, от двух – типов 1, 2 и 3) выявлено 4-кратное и большее нарастание титра антител к полиовирусу типов 2 и 3.

Два ребенка с диагнозом «ВАПП у контактного», от которых не был выделен вирус, имели антитела в высоком титре только к полиовирусу типа 2, что послужило дополнительным подтверждением диагноза «ВАПП». Два ребенка имели антитела в высоком титре к типу выделенного полиовируса и в низком титре – еще к одному или двум типам, что может указывать на недавний контакт с реципиентом трехвалентной вакцины. У 6 детей выявлен высокий уровень антител только к полиовирусу того типа, который был от них выделен.

Частота случаев ВАПП в РФ приведена в табл. 3. В течение 2006–2013 гг. в РФ было распределено 100,8 млн доз ОПВ, зарегистрировано 30 случаев ВАПП. Частота возникновения ВАПП в РФ в целом составила 1 случай на 3,4 млн распределенных доз ОПВ. В период исключительного применения ОПВ (2006–2007) было распределено 28 млн доз ОПВ, зарегистрировано 15 случаев ВАПП. Частота возникновения ВАПП составила 1 случай на 1,9 млн доз. В период после внедрения в схему иммунизации ИПВ (2008–2013) было распределено 72,8

Таблица 3

Частота возникновения случаев ВАПП в РФ

Период наблюдения, годы	Количество доз ОПВ на 1 случай ВАПП, млн	Количество случаев ВАПП на 1 млн новорожденных			
		всего	реципиенты ОПВ	реципиенты первой дозы ОПВ	контактные
2006–2013	3,4	2,2	1,1	0,8	1,1
2006–2007	1,9	4,9	4,2	0,7	0,7
2008–2013	4,9	1,4	0,2	0,2	1,2

млн доз ОПВ, зарегистрировано 15 случаев ВАПП. Частота составила 1 случай на 4,9 млн доз.

В период 2006–2013 гг. в РФ родились 13 948 876 детей. В это время было зарегистрировано 30 случаев ВАПП: 15 случаев у реципиентов ОПВ (в том числе 11 случаев у реципиентов первой дозы ОПВ), 15 случаев у контактных лиц. Частота возникновения ВАПП на 1 млн новорожденных составила в целом 2,2 случая, среди реципиентов ОПВ – 1,1 случая, реципиентов первой дозы ОПВ – 0,8 случая, контактных – 2,2 случая.

В 2006–2007 гг. в РФ родились 3 089 759 детей, зарегистрировано 15 случаев ВАПП: 13 случаев у реципиентов ОПВ (в том числе 2 случая у реципиентов первой дозы ОПВ), 2 случая у контактных лиц. Частота возникновения ВАПП на 1 млн новорожденных составила в целом 4,9 случая, реципиентов ОПВ – 4,2 случая, реципиентов первой дозы ОПВ – 0,7 случая, контактных – 0,7 случая.

В 2008–2013 гг. в РФ родились 10 859 117 детей, зарегистрировано 15 случаев ВАПП: 2 случая у реципиентов ОПВ (у реципиентов первой дозы ОПВ), 13 случаев у контактных лиц. Частота возникновения ВАПП на 1 млн новорожденных составила в целом 1,4 случая, среди реципиентов ОПВ – 0,2 случая, реципиентов первой дозы ОПВ – 0,2 случая, контактных – 1,2 случая.

Настоящее исследование охватывает период перехода (2006–2007) РФ на последовательную схему вакцинации против полиомиелита с использованием 2 вакцин (ИПВ и ОПВ) и период использования этой схемы в Календаре прививок (2008–2013). Частота возникновения ВАПП при последовательной схеме снизилась по сравнению с периодом применения только ОПВ (1998 - 2005) [8].

В 1998–2005 гг. 1 случай ВАПП приходился на 1,6 млн распределенных доз ОПВ, в 2006–2013 гг. – на 3,4 млн доз. При этом в период применения последовательной схемы, когда ИПВ была внедрена в Национальный календарь прививок, частота возникновения ВАПП снизилась в 3 раза. В переходный период, когда ИПВ использовали для вакцинации отдельных контингентов детей или в отдельных регионах (см. табл. 3), частота практически не изменилась.

В 2006–2013 гг. количество случаев ВАПП на 1 млн новорожденных достоверно снизилось ($p < 0,05$) по сравнению с периодом 1998–2005 гг. и составило в целом 2,2 случая (9,3 случая в 1998–2005 гг.), среди реципиентов ОПВ – 1,1 случая (6,7 в 1998–2005 гг.), реципиентов первой дозы – 0,8 случая (5,4 в 1998–2005 гг.), контактных – 1,1 случая (2,6 в 1998–2005 гг.). Сравнение периода использования ИПВ в Национальном календаре и переходного периода показало тенденцию к снижению частоты возникновения заболевания ($p < 0,05$): в 2008–2013 гг. количество случаев ВАПП на 1 млн новорожденных составляло в целом 1,4 случая (4,9 случая в 2006–2007 гг.), среди реципиентов ОПВ – 0,2 случая (4,2 в 2006–2007 гг.), реципиентов первой дозы – 0,2

случая (0,7 в 2006–2007 гг.). Частота случаев ВАПП среди контактных несколько увеличилась в 2008–2013 гг. по сравнению с переходным периодом (1,2 и 0,7 случая соответственно).

Таким образом, оба подхода, использованные в нашем исследовании для расчета частоты возникновения ВАПП, показывают, что применение последовательной схемы вакцинации против полиомиелита позволило снизить частоту ВАПП в РФ в целом не менее чем в 2 раза (количество доз на 1 случай ВАПП), среди реципиентов ОПВ и контактных – в 6 и 2 раза соответственно (количество случаев ВАПП на 1 млн новорожденных). С момента внедрения ИПВ в Национальный календарь (2008) было зарегистрировано только 2 случая ВАПП у реципиентов, при этом они возникали у детей, вакцинация которых была проведена с нарушениями действующей схемы (первая доза полиовирусной вакцины в виде ОПВ). Следовательно, соблюдение Национального календаря сводит риск ВАПП для реципиентов к нулю. Однако непривитые дети остаются в зоне риска по этому заболеванию. Полный охват вакцинацией и соблюдение Национального календаря исключают риски ВАПП и для реципиентов, и для контактных. Одним из препятствий к снижению рисков ВАПП являются отказы родителей и необоснованные отводы от вакцинации медицинскими работниками. В нашем исследовании ни один ребенок не имел оправданного по медицинским показаниям отвода от вакцинации. Исследование показало, что значительное количество (33%) случаев ВАПП у контактных возникло в детских дошкольных учреждениях закрытого типа. Несоблюдение в ряде из них порядка вакцинации и мер разобщения вакцинированных и невакцинированных детей позволяет продолжать рассматривать их как учреждения риска [18, 19].

Изменение схемы вакцинации определило отличие некоторых эпидемиологических характеристик случаев ВАПП от установленных в период преимущественного применения ОПВ в 1998–2005 гг. [8]. В 1998–2005 гг. количество случаев среди реципиентов ОПВ превышало количество случаев среди контактных лиц, в период настоящего наблюдения оно было одинаковым. Как и в предыдущий период, в 2006–2013 гг. случаи ВАПП в целом и у реципиентов ОПВ возникали преимущественно в возрасте до 1 года, однако среди контактных случаев возрастное соотношение изменилось – 53,3% случаев приходилось на детей старше 1 года по сравнению с 20% в период 1998–2005 гг. В период 2006–2013 гг. больные ВАПП «повзрослели»: возраст больных колебался от 4 мес до 5,5 года (в 1998–2005 гг. от 1 до 24 мес), средний возраст больных ($13,6 \pm 12,4$ мес) был больше ($p < 0,05$), чем в 1998–2005 гг. ($6,4 \pm 4,4$ мес). В 2006–2013 гг. возраст больных ВАПП-реципиентов ($10,3 \pm 9,3$ мес) был больше ($p > 0,05$), чем в 1998–2005 гг. ($5,7 \pm 3,6$ мес), как и возраст контактных ($17,1 \pm 14,4$ и $7,9 \pm 5,2$ мес соответственно; $p < 0,05$).

Мы установили изменение типового распределения полиовирусов, выделенных от больных ВАПП, по сравнению с исследованием 1998–2005 гг. [8]. Если в этот период случаи ВАПП среди реципиентов и контактных лиц были преимущественно связаны с полиовирусом типа 3 (53, 56 и 43% соответственно, в настоящем наблюдении среди больных ВАПП в целом и среди контактных преобладали случаи, связанные с полиовирусом типа 2 (44 и 62% соответственно; $p < 0,05$), а среди реципиентов в равной степени доминировали случаи, связанные с полиовирусом типа 2 или 3, и случаи, в которых выделяли смесь вирусов типов 2 и 3. В отличие от наблюдения 1998–2005 гг. полиовирус типа 1 выделяли только у реципиентов в составе смесей полиовирусов.

В то же время эпидемиологические характеристики ВАПП, не зависящие от схемы вакцинации, не изменились в период 2006–2013 гг. по сравнению с 1998–2005 гг. и совпадали с результатами исследований в других странах [20]. Наиболее часто случаи ВАПП возникали у мальчиков, среди реципиентов ОПВ – у получивших первую дозу, среди контактных – у невакцинированных лиц. Период времени между получением дозы ОПВ и возникновением паралича практически не изменился – 19 дней в 2006–2013 гг. и 21 день в 1998–2005 гг. Для случаев ВАПП характерно отсутствие географических и сезонных закономерностей. Наше наблюдение подтвердило подверженность детей с дефектами иммунной системы, особенно с патологией В-клеточного звена, риску возникновения ВАПП: 74% детей были иммунологически компрометированы. На недостаточность иммунной системы косвенно указывает и большое количество детей с отягощенным преморбидным статусом (86%). Эти результаты совпадают с наблюдениями состояния иммунитета у детей с ВАПП в РФ, выполненными в 2002–2005 гг. [21]. Аналогичные цифры были получены в Беларуси – 75% [22]. Доля детей с дефектами иммунитета среди больных ВАПП в США была ниже – 22% [23] и 27% [24], что скорее всего связано с неполным выявлением иммунокомпрометированных лиц в период исследования.

Больные ВАПП с дефектами иммунитета могут длительно выделять полиовирус и быть источником значительно дивергировавших вакцинородственных вирусов. В нашем исследовании случаи продолжительной экскреции не выявлены, что совпадает с результатами, полученными при исследовании специальной группы больных с первичными иммунодефицитами в РФ [25, 26]. Очевидно, риск длительного выделения вакцинородственных полиовирусов больными ВАПП в РФ очень низок, однако он существует. Это подтверждается фактами выделения вакцинородственных полиовирусов с неизвестным источником происхождения (aVDPV) [17, 27], которым могли быть больные с первичным иммунодефицитом, в том числе заболевшие ВАПП [28]. В нашем наблюдении заболевание у непривитого ребенка из группы кочующего населения (RUS-13053401008, ВАПП у контактного) было вызвано полиовирусом типа 3 вакцинного происхождения. Экскреция этого вируса прекратилась между 30-м и 60-м днем от начала заболевания. Этот же ребенок в период до 30-го дня был инфицирован полиовирусом типа 1 вакцинного происхождения после вакцинации ОПВ детей и ближайших родственников, находившихся с ним в контакте. Выделение полиовируса типа 1 продолжалось не менее 60 последующих дней. За этот период вирус накопил на участке генома, кодирующего белок VP1, значительное количество мутаций (1,1%), что позволило отнести его к вакцинородственному (VDPV). Созданный благодаря плановым и дополнительным мероприятиям по вакцинации высокий уровень коллективного иммунитета к вирусу полиомиелита сдерживает возможность формирования и активной циркуляции среди населения измененных вакцинородственных вирусов, однако такие вирусы представляют реальную угрозу для непривитых детей, особенно в детских учреждениях закрытого типа и группах риска (мигранты, вынужденные переселенцы, кочующее население).

Одной из задач Программы глобального искоренения полиомиелита является элиминация случаев ВАПП [29]. Последовательная схема вакцинации против полиомиелита с использованием ИПВ для первичной вакцинации позволяет решить эту задачу. Сохранение ОПВ в Национальном календаре прививок РФ в на-

стоящее время эпидемиологически оправдано, так как по-прежнему существует риск импорта дикого полиовируса, способного вызывать как спорадические случаи, так и вспышки заболевания. Вспышка полиомиелита в РФ в 2010 г., связанная с заносом дикого вируса типа 1 из Таджикистана, подтвердила существование реальной опасности такого развития событий [3]. Поэтому в настоящее время последовательная схема вакцинации против полиомиелита является оптимальной для РФ.

Исследования выполнены благодаря средствам Федерального бюджета Российской Федерации, выделяемым на проведение Программы ликвидации полиомиелита в РФ, Программы ликвидации полиомиелита ВОЗ, Европейского регионального бюро ВОЗ, гранту Российского научного фонда (проект №15-15-00147).

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 2, 3, 10, 12–15, 17, 20, 23–25, 27–29 см. REFERENCES)

1. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации №336/142. Об утверждении Программы ликвидации полиомиелита на территории Российской Федерации к 2000 году. М.; 1996.
4. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 229. О национальном календаре профилактических прививок и календаре профилактических прививок по эпидемическим показаниям. М.; 2001.
5. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации № 25. О дополнительной иммунизации населения Российской Федерации. М.; 2005.
6. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 673. О внесении изменений в приказ Минздрава России от 27 июня 2001 г. № 229 «О национальном календаре профилактических прививок и календаре профилактических прививок по эпидемическим показаниям». М.; 2007.
7. Приказ Минздравсоцразвития России № 51н. Об утверждении национального календаря профилактических прививок и календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям. М.; 2011
8. Иванова О.Е., Еремеева Т.П., Лещинская Е.В., Короткова Е.А., Яковенко М.Л., Чернявская О.П. и др. Паралитический полиомиелит в Российской Федерации в 1998–2005 гг. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2007; 5: 37–44.
9. Санитарные правила 3.1.2951-11. Профилактика полиомиелита. М.; 2011.
10. Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН. *Клиника, диагностика и лечение острого полиомиелита. Методические рекомендации*. М.; 1998.
11. Гублер Е.В. *Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов*. Ленинград: Медицина; 1978.
16. Иванова О.Е., Романенкова Н.И., Еремеева Т.П., Розаева Н.Р., Бичурина М.А., Чернявская О.П. и др. Риск развития случаев острого вялого паралича и вакциноассоциированного полиомиелита в закрытых детских коллективах – домах ребенка и детских лечебных стационарах. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2005; 1 (20): 14–8.
18. Романенкова Н.И., Бичурина М.А., Розаева Н.Р., Канаева О.И. Риск заноса и распространения полиовирусов в детских учреждениях закрытого типа. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2014; 6: 90–5.
19. Краснопрошина Л.И., Иванова О.Е., Еремеева Т.П., Сходова С.А., Чернявская О.П. Дефицит клеточного и гуморального иммунитета у детей с вакциноассоциированным паралитическим полиомиелитом. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2006; 7: 47–54.
21. Самойлович Е.О., Ермолович М.А., Котова И.Ф., Свирчевская Е.Ю., Шиманович В.П., Кожемякин А.К. и др. Опыт надзора за острыми вялыми параличами в Беларуси. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2007; 2: 24–31.
22. Иванова О.Е., Силенова О.В., Сетдикова Н.Х., Латышева Т.В., Кондратенко И.В., Еремеева Т.П. и др. Поиск лиц, длительно выделяющих вирус полиомиелита, среди больных с первичными иммунодефицитами в Российской Федерации. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2014; 6 (79): 16–23.

REFERENCES

1. Order of Ministry of Health of Russian Federation № 336/142. On approval of the polio eradication program in the Russian Federation by 2000. Moscow; 1996. (in Russian)
2. CDC. Certification of poliomyelitis eradication – European Region, June 2002. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 2002; 51(26): 572–4.
3. Yakovenko M.L., Gmyl A.P., Ivanova O.E., Ereemeeva T.P., Ivanov A.P., Prostova M.A. et al. The 2010 outbreak of poliomyelitis in Tajikistan: epidemiology and lessons learnt. *Euro Surveill.* 2014; 19(7): 20706. Available at: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20706>.
4. Order of Ministry of Health of Russian Federation № 229. On the National schedule of prophylactic vaccinations and schedule of prophylactic vaccinations on epidemic indications. Moscow; 2001. (in Russian)
5. Resolution of the Chief State Sanitary Doctor of the Russian Federation № 25. On the supplementary immunization in the Russian Federation. Moscow; 2005. (in Russian)
6. Order of Ministry of Health of Russian Federation № 673. On Amendments to the Order of the Russian Ministry of Health on June 27, 2001 № 229 “On the National schedule of prophylactic vaccinations and schedule of prophylactic vaccinations on epidemic indications”. Moscow; 2007. (in Russian)
7. Order of the Health Ministry of Russian Federation № 51n. On approval of the National Immunization Schedule and Calendar preventive vaccination on epidemic indications. Moscow; 2011. (in Russian)
8. Ivanova O.E., Ereemeeva T.P., Leshchinskaya E.V., Korotkova E.A., Yakovenko M.L., Chernyavskaya O.P. et al. Paralytic poliomyelitis in the Russian Federation in 1998–2005. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2007; 5: 37–44. (in Russian)
9. Sanitary Regulations 3.1.2951-11. Prevention of poliomyelitis. Moscow; 2011. (in Russian)
10. World Health Organization (WHO). *Report of the Second Meeting of the Technical Consultation Group for Global Eradication of Poliomyelitis.* WHO/EPI/GEN/98/04. Geneva: WHO; 1998.
11. Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis them. M.P. Chumakov Russian Academy of Medical Sciences. *The Clinic, Diagnosis and Treatment of Acute Poliomyelitis. Guidelines [Klinika, diagnostika i lechenie ostrogo poliomielitita. Metodicheskie rekomendatsii].* Moscow; 1998. (in Russian)
12. World Health Organization (WHO). *Manual for the virological investigation of polio*, 4th ed. Geneva: WHO; 2004. Available at: http://whqlibdoc.who.int/hq/2004/WHO_IVB_04.10.pdf.
13. van der Avoort H.G.A.M., Hull B.P., Hovi T., Pallansch M.A., Kew O.M., Crainic R. et al. A comparative study of five methods of intratypic differentiation of polioviruses. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33(10): 2562–6.
14. Kilpatrick D.R., Yang C.F., Ching K., Vincent A., Iber J., Campagnoli R. et al. Rapid group-, serotype-, and vaccine strain-specific identification of poliovirus isolates by real-time reverse transcription-PCR using degenerate primers and probes containing deoxyinosine residues. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47 (6): 1939–41.
15. World Health Organization (WHO). *Manual for virological investigation of poliomyelitis.* WHO/EPI/GEN/97.1. Geneva; 1997.
16. Available at: http://whqlibdoc.who.int/hq/1997/WHO_EPI_GEN_97.01.pdf.
17. Gubler E.V. *Computational Methods of Analysis and Recognition of Pathological Processes [Vychislitel'nye metody analiza i raspoznavaniya patologicheskikh protsessov].* Leningrad: Meditsina; 1978. (in Russian)
18. Yakovenko M.L., Korotkova E.A., Ivanova O.E., Ereemeeva T.P., Samoilovich E., Uhova I. et al. Evolution of the Sabin vaccine into pathogenic derivatives without appreciable changes in antigenic properties: need for improvement of current poliovirus surveillance. *J. Virol.* 2009; 83 (7): 3402–6.
19. Ivanova O.E., Romanenkova N.I., Ereemeeva T.P., Rozaeva N.R., Bichurina M.A., Chernyavskaya O.P. et al. The risk of acute flaccid paralysis and vaccine-associated poliomyelitis in closed groups of children – orphanage and child hospitals. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika.* 2005; 1 (20): 14–8. (in Russian)
20. Romanenkova N.I., Bichurina M.A., Rozaeva N.R., Kanaeva O.I. Risk of introduction and spread of polioviruses in closed-type child-care facilities. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2014; 6: 90–5. (in Russian)
21. Platt L.R., Estivariz C.F., Sutter R.W. Vaccine-associated paralytic poliomyelitis: a review of the epidemiology and estimation of the global burden. *J. Infect. Dis.* 2014; 210 (S1): 380–9.
22. Krasnoproschina L.I., Ivanova O.E., Ereemeeva T.P., Skhodova S.A., Chernyavskaya O.P. Cellular and humoral immunodeficiency in children with vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2006; 7: 47–54. (in Russian)
23. Samoylovich E.O., Ermolovich M.A., Kotova I.F., Svirchevskaya E.Yu., Shimanovich V.P., Kozhemyakin A.K. et al. The experience of surveillance for acute flaccid paralysis in Belarus. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2007; 2: 24–31. (in Russian)
24. Sutter R.W., Prevots D.R. Vaccine-associated paralytic poliomyelitis among immunodeficient persons. *Infect. Med.* 1994; 11: 426–37.
25. Alexander L.N., Seward J.F., Santibanzas T.A., Pallansch M.A., Kew O.M., Prevots D.R. et al. Vaccine policy changes and epidemiology of poliomyelitis in the United States. *JAMA.* 2004; 292(14): 1696–701.
26. Li L., Ivanova O., Driss N., Tiongco-Recto M., da Silva R., Shahmahmoodi S. et al. Poliovirus excretion among persons with primary immune deficiency disorders: summary of a seven-country study series. *J. Infect. Dis.* 2014; 210 (S1): 368–72.
27. Ivanova O.E., Silenova O.V., Setdikova N.Kh., Latysheva T.V., Kondratenko I.V., Ereemeeva T.P. et al. Search for the persons with prolonged excretion of poliovirus among patients with primary immune deficiency disorders in the Russian Federation. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika.* 2014; 6 (79): 16–23. (in Russian)
28. Cherkasova E.A., Korotkova E.A., Yakovenko M.L., Ivanova O.E., Ereemeeva T.P., Chumakov K.M. et al. Long-term circulation of vaccine-derived poliovirus that causes paralytic disease. *J. Virol.* 2002; 76 (13): 6791–9.
29. Cherkasova E.A., Yakovenko M.L., Rezapkin G.V., Korotkova E.A., Ivanova O.E., Ereemeeva T.P. et al. Spread of vaccine-derived poliovirus from a paralytic case in an immunodeficient child: an insight into the natural evolution of oral polio vaccine. *J. Virol.* 2005; 79 (2): 1062–70.
30. World Health Organization (WHO). *Polio Eradication and Endgame Strategic Plan 2013-2018.* Available at:
31. http://www.polioeradication.org/Portals/0/Document/Resources/StrategyWork/PEESP_EN_A4.pdf.

Поступила 20.05.15

Дешева Ю. А.^{1,2}, Смолоногина Т. А.¹, Дорошенко Е. М.¹, Руденко Л. Г.¹

РАЗРАБОТКА КВАДРИВАЛЕНТНОЙ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ, ВКЛЮЧАЮЩЕЙ РЕАССОРТАНТНЫЕ ВИРУСЫ ГРИППА В АНТИГЕННЫХ ЛИНИЙ ВИКТОРИЯ И ЯМАГАТА

¹ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», 197376, г. Санкт-Петербург; ²Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, г. Санкт-Петербург

В настоящем исследовании изучали прививочные свойства живой гриппозной вакцины (ЖГВ), включающей 2 реассортантных вируса гриппа В антигенных линий Виктория и Ямагата, полученных на основе донора аттенуации В/СССР/60/69. На мышах линии СВА показана 100% защита от реинфекции эпидемическими вирусами гриппа В Виктория и Ямагата после сочетанной иммунизации двумя вакцинными вирусами гриппа В. На взрослых добровольцах продемонстрирована ареактогенность квадринальной ЖГВ, включающей 2 вакцинных вируса типа В. После однократной иммунизации квадринальной вакциной наблюдалось образование антител к двум антигенным линиям гриппа В.

Ключевые слова: живая гриппозная вакцина; вирусы гриппа В; иммуногенность.

Для цитирования: Вопросы вирусологии. 2016; 61(1): 16–20. DOI 10.18821/0507-4088-2016-61-1-16-20

Desheva Yu.A.^{1,2}, Smolonogina T.A.¹, Doroshenko E.M.¹, Rudenko L.G.¹

DEVELOPMENT OF THE QUADRIVALENT LIVE ATTENUATED INFLUENZA VACCINE INCLUDING TWO INFLUENZA B LINEAGES – VICTORIA AND YAMAGATA

¹ Institute of Experimental Medicine, 197376, St. Petersburg, Russia;

² St. Petersburg State University, 199034, St. Petersburg, Russia

This work is devoted to the research of the live attenuated influenza vaccine (LAIV) comprising two reassortant B/USSR/60/69-based vaccine influenza viruses Victoria and Yamagata. The intranasal immunization of the CBA mice with both Victoria and Yamagata strains induced 100% lung protection against the subsequent infection with the wild-type influenza B viruses of any antigen lineage. The quadrivalent LAIV (qLAIV) comprising both reassortant influenza B viruses Victoria and Yamagata were safe and areactogenic in adult volunteers. Following qLAIV administration the immune response was achieved to both Victoria and Yamagata lineages.

This work has been supported by the grant of the St. Petersburg City Government for Scientific and Scientific-and-Technological Activities (project No. 444/12; November 23, 2012).

Key words: live influenza vaccine; influenza B; immunogenicity.

Citation: Voprosy virusologii. 2016; 61(1): 16–20. (in Russian). DOI 10.18821/0507-4088-2016-61-1-16-20

For correspondence: Yuliya Desheva, MD, PhD, DS; e-mail: desheva@mail.ru

Received 24.03.14

Вирусы гриппа В ежегодно вызывают до 23–24% подтвержденных случаев заболевания гриппом, при этом повышенному риску заболевания подвергаются дети [1]. Для активной иммунопрофилактики сезонного гриппа долгое время применяли тривалентные гриппозные вакцины, включающие актуальные вакцинные штаммы: 2 вируса гриппа типа А – А(Н1N1), А(Н3N2) и 1 вирус типа В. Однако в последнее время участились случаи одновременного появления в циркуляции вирусов гриппа В двух антигенных разновидностей, подобных эталонным штаммам В/Виктория/2/1987 или В/Ямагата/16/1988. С 2001 по 2011 г. в США и Европе в 5 из 10 эпидемических сезонов наблюдалось несовпадение вакцинного и эпидемического вирусов гриппа В [2]. В таких условиях иммунизация гриппозными вакцинами против одного антигенного варианта не создавала защиту против другого, особенно в случае применения инактивированных вакцин. Чтобы обеспечить более полную защиту населения от всех возможных антигенных вариантов циркулирующих вирусов гриппа, рекомендации ВОЗ на эпидемический сезон 2013–2014 гг. включают 2 вируса гриппа В. Квадринальные гриппозные вакцины, включающие 2 компонента В (Fluarix, Fluzone), рекомендованы для применения наряду с тривалентными препаратами [2].

В США зарегистрирована также квадринальная ЖГВ Flumist [3].

Настоящее исследование посвящено разработке отечественной квадринальной ЖГВ, включающей вакцинные штаммы, полученные на основе донора аттенуации В/СССР/60/69 [4]. Для этих целей были изучены прививочные свойства вакцинных штаммов вирусов гриппа В антигенных линий Виктория и Ямагата при сочетанном введении в эксперименте на мышах, а также в составе квадринальной ЖГВ в ограниченном клиническом исследовании на добровольцах.

Материал и методы

Вирусы. В работе были использованы штаммы вируса гриппа В из коллекции отдела вирусологии ФБГУ НИИЭМ СЗО РАМН: реассортантные вакцинные вирусы В/60/Флорида/04/181 и В/60/Висконсин/2010/125 (антигенная линия Ямагата); вакцинные штаммы В/60/Малайзия/04/898 и В/60/Брисбен/2008/83 (антигенная линия Виктория); эпидемические вирусы дикого типа В/Флорида/07/04 и В/Малайзия/2506/04 [5–7]. В исследовании также использовали реассортантные вакцинные вирусы гриппа А: А/17/Калифорния/2009/38 (Н1N1) и А/17/Виктория/2011/89 (Н3N2), подготовленные со-

Для корреспонденции: Дешева Юлия Андреевна, д-р мед. наук, ведущий научный сотрудник; e-mail: desheva@mail.ru

гласно рекомендациям ВОЗ для профилактики гриппа во время эпидемического сезона 2012–2013 гг. Вирусы гриппа культивировали в 10-дневных развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ) при 33°C 48 ч для вирусов гриппа А и 72 ч для вирусов гриппа В. Инфекционную активность вирусов определяли в РКЭ при 33°C, эмбриональную инфекционную дозу (ЭИД₅₀) рассчитывали по методу Рида и Менчф (1938).

Изучение репродукции вирусов в дыхательных путях мышей. Мышам линии СВА в возрасте 10–12 нед (питомник Рапполово, Ленинградская область) под легкой анестезией вводили интраназально 0,05 мл аллантоисной жидкости с содержанием вакцинного или эпидемического вируса 10¹-10⁷ ЭИД₅₀. Животным в контрольной группе в те же сроки вводили интраназально 0,05 мл фосфатно-солевого буферного раствора. Эвтаназию выполняли согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 266 МЗ РФ от 19.06.03). Концентрацию вируса определяли в легких и носовых ходах на 3-и сутки по показателям титрования суспензии органов в РКЭ начиная с разведения 1:10 для легких и 1:2 для носовых ходов. 50% мышиную инфекционную дозу (МИД₅₀) рассчитывали по методу Рида и Менча.

Иммунизация и реинфекция на мышах. Подопытным животным (по 25 в группе) вводили интраназально 300 МИД₅₀ одного из вакцинных штаммов В/60/Флорида/04/181 или В/60/Малайзия/04/898 либо смесь указанных вакцинных штаммов по 300 МИД₅₀ каждого. Образцы крови (по 10 из каждой группы) были отобраны на 21-й день после иммунизации. Полученные сыворотки крови хранили при -20°C до проведения серологических тестов.

Реакцию торможения гемагглютинации (РТГА) с сыворотками крови проводили в 96-луночных панелях для серологических реакций с использованием 0,75% взвеси эритроцитов кур по описанным методикам [8]. Для удаления термолabile ингибиторов сыворотки прогревали при 56°C в течение 30 мин. Для удаления термостабильных ингибиторов гемагглютинации исследуемые сыворотки обрабатывали экстрактом нейраминидазы (NA) холерных вибрионов («Denka Seiken Co., Ltd.», Япония). Титры антигемагглютинирующих антител выражали как величину, обратную наибольшему разведению сыворотки, при котором наблюдалось торможение гемагглютинации. Реакцию микронейтрализации (МН) выполняли в клеточной культуре MDCK, как описано ранее [8]. Титры нейтрализующих антител выражали как величину, обратную наибольшему разведению образца, дающего 50% нейтрализации 100 50% культуральных инфекционных доз (КИД₅₀) вируса.

Иммунных мышей на 21-й день после вакцинации инфицировали эпидемическими вирусами гриппа В – В/Флорида/07/04 или В/Малайзия/2506/04 в заражающей дозе 100 МИД₅₀. Уровень репродукции заражающего вируса в дыхательных путях мышей на 3-и сутки после инфицирования определяли по результатам титрования суспензии легких в РКЭ начиная с разведения 1:10, ЭИД₅₀ и рассчитывали по методу Рида и Менча.

Изучение прививочных свойств квадριвалентной ЖГВ на добровольцах. Клиническое изучение проводили в октябре 2012 г. В исследовании в качестве добровольцев приняли участие здоровые лица мужского (14) и женского (18) пола в возрасте от 18 до 56 лет, давшие письменное добровольное информированное согласие на участие в клинических испытаниях. Живую гриппозную аллантоисную три- или квадριвалентную вакцину вводили интраназально однократно по 0,25 мл в каждый носовой ход с помощью распылителя-дозатора. У привитых в поствакцинальный период брали клинические

материалы (кровь, мазки из полости носа) для вирусологических и серологических исследований. Иммуногенность оценивали в РТГА на 28-й день после иммунизации с тестовыми антигенами, входившими в состав вакцин.

Обратнотранскриптазную полимеразную цепную реакцию (ОТ-ПЦР) с клиническими пробами (мазками из носовых ходов), полученными на 3-и и 5-е сутки после иммунизации, проводили в соответствии с протоколами, рекомендованными ВОЗ (2009). Выделение РНК выполняли при помощи наборов QIAamp® Viral RNA Mini Kit («Qiagen», Нидерланды). Качественный ПЦР-анализ проводили в режиме реального времени методом TaqMan с использованием амплификатора CFX384tm («BioRad», США). Обратную транскрипцию и амплификацию М-гена вирусов гриппа А и В выполняли согласно рекомендациям ВОЗ (2009). Для выявления М-гена вируса гриппа В компанией «Бигль» (Санкт-Петербург) были синтезированы следующие праймеры: MB-F 5'-AGAGCCCATAGCAGAGCAGC-3', MB-R 5'-TTTCCCATTCATTCATTCATG-3', MB-Pr 5'-(TAMRA)-AGTGCCTGGAGTGAGGCGAGAATG-(BHQ)-3'.

Статистическая обработка данных. Для описания результатов использовали такие показатели, как среднее, среднеквадратическое отклонение (СКО), среднегеометрические титры (СГТ). Обработку данных осуществляли с использованием статистического пакета Statistica 6.0. Для оценки различий между группами по количественным показателям титры антител выражали в log₂ и использовали параметрический (критерий Стьюдента) и непараметрический (U-критерий Манна-Уитни) критерии: первый при условии нормально распределенных внутри групп переменных, а также с последующей проверкой гипотезы о равенстве дисперсий двух выборок с помощью F-критерия Фишера; второй при отсутствии имплементации предположения о нормальности.

Результаты и обсуждение

Прививочные свойства вакцинных штаммов Виктория и Ямагата при изучении на мышах. Результаты изучения иммуногенности на мышах после однократного интраназального введения вакцинных вирусов В/60/Флорида/04/181 и В/60/Малайзия/04/898 в дозе 300 МИД₅₀ представлены в табл. 1. После однократной иммунизации подопытных животных смесью двух вирусов было достигнуто формирование сывороточных антигемагглютинирующих антител к двум штаммам в титрах 1:40 и более. В то же время после иммунизации вакцинным штаммом только одной линии показано полное отсутствие перекрестно-реагирующих антигемагглютинирующих антител к другой антигенной линии. В реакции МН обнаружен незначительный прирост перекрестно-реагирующих антител к вирусу В/60/Флорида/04/181 после иммунизации штаммом В/60/Малайзия/04/898 (см. табл. 1).

Согласно результатам двух тестов, сочетанное введение двух вирусов вызывало прирост антител через 21 день после иммунизации в титрах не ниже, чем после раздельного введения каждого вакцинного штамма ($p > 0,05$).

Однократная интраназальная иммунизация вакцинными штаммами В/60/Флорида/04/181 или В/60/Малайзия/04/898 защищала мышей от легочной инфекции, вызванной гомологичными эпидемическими вирусами гриппа В дикого типа в заражающей дозе 100 МИД₅₀ (табл. 2). При этом иммунизация вакцинным штаммом В/60/Малайзия/04/898 (Виктория) на 100% защищала от реинфекции другим антигенным вариантом В/Флорида/07/04 (Ямагата), по данным выделения заражающего вируса из легких. В случае иммунизации

Иммуногенность вакцинных вирусов В/60/Флорида/04/181 и В/60/Малайзия/04/898 при интраназальном введении мышам

Вакцинные группы	Число мышей в группе	Иммуногенность на 21-е сутки после иммунизации к антигенам:					
		В/60/Малайзия			В/60/Флорида		
		РТГА		МН (СГТ)	РТГА		МН (СГТ)
		СГТ	титры $\geq 1:40$, всего (в %)		СГТ	титры $\geq 1:40$, всего (в %)	
В/60/Малайзия	10	24,6	5 (50)	121,3*	5,0	0 (0)	5,4***
В/60/Флорида	9	5,0	0 (0)	5,0	46,7	7 (78)	217,7**
В/60/Флорида + В/60/Малайзия	10	26,4	6 (60)	65,0*	65,0	10 (100)	160,0**,***
Контроль (ФБ)	10	5,0	0 (0)	5,0	5,0	0 (0)	5,0

Примечание. *,** – $p > 0,05$; *** – $p = 0,0029$. Здесь и в табл. 2: ФБ – фосфатный буфер.

вакцинным штаммом В/60/Флорида/04/181 перекрестная защита выражалась в снижении среднего титра выделения заражающего вируса В/60/Малайзия/04/898 из легких в 5000 раз, при этом вирус был выделен у двух животных из пяти (см. табл. 2).

Сочетанная иммунизация смесью вакцинных штаммов В/60/Флорида/04/181 и В/60/Малайзия/04/898 в эквивалентных дозах полностью защищала животных от реинфекции эпидемическими штаммами В/Флорида/07/04 и В/Малайзия/2506/04.

Изучение прививочных свойств квадριвалентной ЖГВ на добровольцах. На протяжении всего периода наблюдения во всех группах привитых добровольцев после вакцинации не зарегистрировано как местных, так и общих клинических реакций (табл. 3). Таким образом, применение двух реассортантных штаммов вируса гриппа В антигенных линий В/Виктория и В/Ямагата в составе квадριвалентной ЖГВ не приводило к повышению реактогенности по сравнению с тривалентными препаратами.

Через 4 нед после иммунизации у вакцинированных лиц, которые были серонегативными до прививки (титры антигемагглютинирующих антител к соответствующим антигенам 1:20 и менее), наблюдалось увеличение СГТ-антител к антигенам А(Н3N2), В/Брисбен и В/Висконсин (табл. 4). Достоверные приросты СГТ после иммунизации наблюдались как в группах, получивших тривалентные препараты, так и у реципиентов квадριвакцины. При этом СГТ к вирусам гриппа типа А и В после однократного введения квадριвакцины были не ниже, чем в двух других группах ($p > 0,05$). Двукратный прирост СГТ к антигену А(Н3N2) в 1-й группе, получившей тривалентную вакцину, оказался статистически незначим по причине малого числа оснований ($n = 3$), так

как до прививки в этой группе большинство участников оказались серопозитивными к вирусу А(Н3N2) в отличие от 3-й группы, получившей квадριвакцину.

Таким образом, введение двух вирусов гриппа типа В антигенных линий В/Виктория и В/Ямагата в состав поливалентной ЖГВ не приводило к снижению продукции антител к компонентам вакцины А и В по сравнению с тривалентными препаратами, содержащими только 1 вакцинный штамм гриппа В.

Положительные результаты ОТ-ПЦР в реальном времени с праймерами, специфичными к гриппу В, получены как у волонтеров с последующим 4-кратным приростом антител к вирусу гриппа В, так и без прироста. Тем не менее результаты обнаружения вакцинных вирусов гриппа В методом ОТ-ПЦР в реальном времени согласуются с результатами определения иммуногенности. Так, вирус гриппа В выявлен в группе привитых тривалентной, содержащей вакцинный вирус В/60/Висконсин, и в группе привитых квадριвакциной (табл. 5), т. е. в тех группах, где впоследствии наблюдались достоверные приросты антител к вирусам гриппа В.

Включение в состав сезонной гриппозной вакцины двух антигенных вариантов вируса гриппа В должно устранить антигенное несоответствие между вакцинными и эпидемическими вирусами гриппа В и повысить эффективность вакцинопрофилактики этого заболевания. По прогнозам Центра по контролю и предупреждению заболеваний США, замена тривалентной на квадριвалентную гриппозную вакцину позволит предотвратить дополнительно 2,74 млн случаев заболевания гриппом В [9].

Включение в состав ЖГВ нескольких разновидностей вирусов гриппа всегда было связано с изучением возможного интерферирующего влияния вакцинных вирусов друг на друга, а также поиском путей

преодоления как гомологичной, так и гетерологичной вирусной интерференции. Так, при конструировании дивалентной ЖГВ, включающей вакцинные штаммы вируса гриппа А(Н1N1) и А(Н3N2), было показано отсутствие взаимного интерферирующего действия вакцинных вирусов при условии равенства инфекционных доз и использовании единого донора аттенуации для подготовки вакцинных штаммов [10]. В процессе изучения прививочных свойств тривакцины, объединяющей реассортантные штаммы А(Н1N1), А(Н3N2) и В, было показано сохранение высокой иммуногенности вакцинных штаммов А(Н1N1) и А(Н3N2) в составе поливалентного препарата: 63,3 и 69,8% сероконверсий среди серонегативных детей (аналогичные показатели для моновакцин

Защитное действие вакцинных вирусов В/60/Флорида/04/181 и В/60/Малайзия/04/898 против реинфекции эпидемическими вирусами В/Малайзия/2506/04 и В/Флорида/07/04 на мышах

Вакцинные группы	Число мышей в группе	Выделение из легких на 3-и сутки после инфекции заражающих вирусов:			
		В/Малайзия/2506/04		В/Флорида/07/04	
		средние титры, Ig ЭИД ₅₀ /мл	с выделением вируса/ всего	средние титры, Ig ЭИД ₅₀ /мл	с выделением вируса/ всего
В/60/Малайзия	5	$\leq 1,5^*$	0/5	$\leq 1,5$	0/5
В/60/Флорида	5	$2,4 \pm 1,3^{***}$	2/5	$\leq 1,5$	0/5
В/60/Флорида + В/60/Малайзия	5	$\leq 1,5^{**}$	0/5	$\leq 1,5$	0/5
Контроль (ФБ)	5	$6,1 \pm 0,3^{*,***}$	5/5	$5,9 \pm 0,6^\#$	5/5

Примечание. **,*** – $p = 0,032$; *** – $p = 0,28$; # – титр вируса в группе контроля выше, чем во всех трех вакцинированных группах ($p > 0,05$).

Отсутствие клинических реакций у добровольцев, привитых ЖГВ

Вакцинные группы	Валентность-вакцины	Состав вакцинных штаммов	Всего	Температурная реакция, °С								Катаральные явления		
				37,0		37,1–37,5		37,6–38,5		≥ 38,6		абс.	%	
				абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%			
1-я	3	A/17/Калифорния/2009/38 (H1N1) A/17/Виктория/2011/89 (H3N2) В/60/Брисбен/2008/83	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-я	3	A/17/Калифорния/2009/38 (H1N1) A/17/Виктория/2011/89 (H3N2) В/60/Висконсин/2010/125	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3-я	4	A/17/Калифорния/2009/38 (H1N1) A/17/Виктория/2011/89 (H3N2) В/60/Брисбен/2008/83 В/60/Висконсин/2010/125	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Таблица 4

Иммуногенность тривалентной и квадριвалентной ЖГВ при введении добровольцам (группа серонегативных)

Антиген	РТГА с сыворотками крови привитых ЖГВ:								
	A(H1N1)+A(H3N2)+B/Брисбен			A(H1N1)+A(H3N2)+B/Висконсин			A(H1N1)+A(H3N2)+B/Брисбен+B/Висконсин		
	СГТ		кратность прироста	СГТ		кратность прироста	СГТ		кратность прироста
	до прививки	после прививки		до прививки	после прививки		до прививки	после прививки	
A(H1N1)	16,8	20,0	1,2	12,6	17,8	1,4	16,8	21,8	1,3
A(H3N2)	12,6	25,2	2,0	17,4	26,4	1,5	14,1	32,5	2,3*
В/Брисбен	12,3	15,2	1,2	11,7	13,6	1,2	9,4	14,6	1,6**
В/Висконсин	14,1	17,4	1,2	11,9	25,9	2,2***	8,7	16,3	1,9#

Примечание. ** – $p = 0,012$; * – $p = 0,043$; *** – $p = 0,028$; # – $p = 0,012$.

составили 61 и 73,3%). Достоверные приросты титров антител к компоненту В тривакцины составили 43,7%. Показатели снижения заболеваемости гриппом и ОРЗ в группах детей, привитых тривалентной ЖГВ, были не ниже, чем среди привитых моновалентными препаратами [11].

В нашем исследовании был решен ряд задач, поставленных в связи с необходимостью разработки и апробации отечественной квадριвалентной ЖГВ. На модели мышей показано низкое перекрестное реагирование

антител к вирусам гриппа В линий Виктория и Ямагата. Только при одновременном введении двух вакцинных вирусов гриппа типа В наблюдались приросты антигеммагглютинирующих антител как к Викторианской линии, так и к линии Ямагата.

В случае применения ЖГВ защита обеспечивается не только штаммоспецифическими антителами, но и факторами местного иммунитета, цитокинового и клеточного ответа на введение вакцины. В эксперименте на мышах показано, что применение каждого вакцинного штамма

обеспечивало защиту от последующего заражения как гомологичным вирусом дикого типа, так и антигенно отличающимся вариантом. Полученные экспериментальные данные позволили разработать программу клинического изучения квадριвалентной ЖГВ.

В ограниченном клиническом исследовании установлено, что введение в состав ЖГВ наряду с двумя вакцинными штаммами типа А – A(H1N1), A(H3N2), двух вирусов типа В – Виктория и Ямагата – не оказывало негативного влияния на реактогенность квадριвакцины по сравнению с тривалентными препаратами, содержащими только 1 из антигенных вариантов вирусов гриппа В. В то же время в отличие от тривалентных препаратов введение добровольцам квадριва-

Таблица 5

Результаты качественной ОТ-ПЦР в реальном времени с клиническими пробами

Группа привитых	Число в группе	Состав вакцины	Количество положительных проб в разные сроки после вакцинации			
			А, n (%)		В, n (%)	
			3-и сутки	5-е сутки	3-и сутки	5-е сутки
1-я	10	A/17/Калифорния/2009/38 (H1N1) A/17/Виктория/2011/89 (H3N2) В/60/Брисбен/2008/83	1 (10)	0(0)	0 (0)	0 (0)
2-я	10	A/17/Калифорния/2009/38 (H1N1) A/17/Виктория/2011/89 (H3N2) В/60/Висконсин/2010/125	0 (0)	0 (0)	1 (8)	2 (16)
3-я	12	A/17/Калифорния/2009/38 (H1N1) A/17/Виктория/2011/89 (H3N2) В/60/Брисбен/2008/83 В/60/Висконсин/2010/125	1 (8,3)	0(0)	2 (16)	2 (16,7)

лентной ЖГВ позволило стимулировать выработку сывороточных антигемагглютинирующих антител к вирусам гриппа В двух антигенных линий.

Ранее при изучении на мышах субъединичной тривалентной инактивированной гриппозной вакцины (ИГВ) было показано, что после парентерального введения ИГВ, содержащей гемагглютинин (НА) вируса Ямагата, СГТ антигемагглютинирующих антител к вакцинному вирусу был в 8 раз выше, чем после введения аналогичной вакцины, содержащей НА штамма линии Виктория [12]. Однако при бустировании иммунных мышей ИГВ с компонентом В из другой антигенной линии (Ямагата) оказалось, что в группе Виктория – Ямагата наблюдался напряженный иммунный ответ сразу к двум антигенным линиям, в то время как в группе Ямагата – Виктория иммунный ответ наблюдался только к вирусам Ямагата. Авторы делают вывод об антигенном доминировании вирусов линии Ямагата, при этом отмечая более развернутое праймирующее свойство Викторианской линии [12]. Наши результаты до некоторой степени согласуются с этими данными, так как в текущем исследовании вирусы линии Ямагата в целом вызывали образование поствакцинальных антител более высоких уровней. В то же время даже при отсутствии перекрестно-реагирующих антител после иммунизации мышей Викторианским вирусом защита от легочной инфекции эпидемическим штаммом Ямагата была полной. Поскольку в составе вакцинных вирусов присутствует НА, в этом случае могут быть задействованы иные механизмы антигенной конкуренции, которая для вирусов гриппа типа В остается еще недостаточно изученной. В качестве одного из объяснений подобного эффекта можно привести данные молекулярно-генетического анализа двух антигенных линий вирусов гриппа В, которые свидетельствуют, что в 2002 г. между двумя антигенными вариантами вирусов гриппа В произошла реассортация, в результате которой вирусы, содержащие НА Викторианской ветви, приобрели ген НА, происходящий от вирусов Ямагата [13].

Недавние исследования американской квадριвалентной ЖГВ Flumist, проведенные с участием 1800 взрослых и 2312 детей от 2 лет, показали, что введение в состав вакцины двух компонентов В было безвредным для всех возрастных контингентов, включая детей 2–8 лет. Среди серонегативных детей, получивших квадριвалентную ЖГВ, 4-кратные и большие сероконверсии к вирусам гриппа В составили 69–83%. Авторы делают заключение, что применение квадριвалентной ЖГВ не только безвредно для детей, но и будет иметь особое преимущество при применении в этой возрастной категории, поскольку дети раннего возраста наиболее чувствительны к гриппу В [14].

Полученные в нашем исследовании данные свидетельствуют, что включение в состав ЖГВ двух антигенных вариантов вакцинных вирусов гриппа В на основе отечественного донора аттенуации В/СССР/60/69 не только является безвредным, но и оказывает положительное влияние на иммуногенность.

Работа поддержана грантом Правительства Санкт-Петербурга в сфере научной и научно-технической деятельности за 2012 г., № 444/12 от 23.11.2012.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1–4, 8, 9, 12–14 см. REFERENCES)

1. Ларионова Н.В., Киселева И.В., Руденко Л.Г., Александрова Г.И. Вакцинный штамм вируса гриппа В/60/Малайзия/04/898 для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых и для детей. Патент РФ № 2416639, 2009.
2. Ларионова Н.В., Руденко Л.Г., Александрова Г.И. Вакцинный штамм вируса гриппа В/60/Флорида/04/181 для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых и для детей. Патент РФ № 2422519, 2010.
3. Ларионова Н.В., Руденко Л.Г., Александрова Г.И. Вакцинный штамм вируса гриппа В/60/Брисбен/08/83 для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых и для детей. Патент РФ № 2422517, 2010.
4. Романова Ю.Р., Александрова Г.И. Интерференция и ее преодоление при репродукции двух штаммов вируса гриппа А в эксперименте. *Вопросы вирусологии.* 1993; 38(4): 149–52.
5. Руденко Л.Г., Рамирес А., Барро М., Гушчина М.И., Арманда Р.Е., Ермаченко Т.А. и др. Прививочные свойства живой гриппозной рекомбинантной вакцины типов А и В при раздельном и совместном применении детям 3–14 лет. *Вопросы вирусологии.* 1991; 36(6): 472–4.
6. Belshe R.B. The need for quadrivalent vaccine against seasonal influenza. *Vaccine.* 2010; 28 (Suppl. 4): D45–53.
7. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevention and control of seasonal influenza with vaccines. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices—United States, 2013–2014. *MMWR Recomm. Rep.* 2013; 62 (RR-07): 1–43.
8. Toback S.L., Levin M.J., Block S.L., Belshe R.B., Ambrose C.S., Falloon J. Quadrivalent Ann Arbor strain live attenuated influenza vaccine. *Expert Rev. Vaccines.* 2012; 11(11): 1293–303.
9. Alexandrova G.I., Maassab H.F., Kendal A.P., Medvedeva T.E., Egorov A.Y., Klimov A.I. et al. Laboratory properties of cold-adapted influenza B live vaccine strains developed in the US and USSR, and their B/Ann Arbor/1/86 cold-adapted reassortant vaccine candidates. *Vaccine.* 1990; 8: 61–4.
10. Larionova N.V., Kiseleva I.V., Rudenko L.G., Aleksandrova G.I. Vaccine strain of B/60/Malaysia/04/898 influenza virus for preparing live influenza intranasal vaccine for adults and children. Patent RF № 2416639, 2009. (in Russian)
11. Larionova N.V., Rudenko L.G., Aleksandrova G.I. Vaccine strain of B/60/Florida/04/181 Influenza virus for preparing live influenza intranasal vaccine for adults and children. Patent RF № 2422519, 2010. (in Russian)
12. Larionova N.V., Rudenko L.G., Aleksandrova G.I. Vaccine strain of B/60/Brisbane/08/83 influenza virus for preparing live influenza intranasal vaccine for adults and children. Patent RF № 2422517, 2010. (in Russian)
13. World Health Organization Global Influenza Surveillance Network. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. WHO; 2011. Available at: http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241548090_eng.pdf
14. Ambrose C.S., Levin M.J. The rationale for quadrivalent influenza vaccines. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2012; 8(1): 81–8.
15. Romanova Yu.R., Aleksandrova G.I. Interference and its overcoming in the reproduction of two strains of influenza A virus in the experiment. *Voprosy virusologii.* 1993; 38(4): 149–52. (in Russian)
16. Rudenko L.G., Ramirez A., Barro M., Gushchina M.I., Armanda R.E., Ermachenko T.A. et al. The inoculation properties of live recombinant influenza vaccine types A and B used separately and jointly in children 3 to 14. *Voprosy virusologii.* 1991; 36(6): 472–4. (in Russian)
17. Skowronski D.M., Hamelin M.E., Janjua N.Z., De Serres G., Gardy J.L., Rhéaume C. et al. Cross-Lineage Influenza B and Heterologous Influenza A Antibody Responses in Vaccinated Mice: Immunologic Interactions and B/Yamagata Dominance. *PLoS One.* 2012; 7(6): e38929.
18. Xu X., Lindstrom S.E., Shaw M.W., Smith C.B., Hall H.E., Mungall B.A. et al. Reassortment and evolution of current human influenza A and B viruses. *Virus Res.* 2004; 103(1–2): 55–60.
19. Block S.L., Falloon J., Hirschfield J.A., Krilov L.R., Dubovsky F., Yi T. et al. Immunogenicity and safety of a quadrivalent live attenuated influenza vaccine in children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2012; 31(7): 745–51.

Поступила 24.03.14

Соколова Т. М., Полосков В. В., Шувалов А. Н., Руднева И. А., Ершов Ф. И.

РЕКОМБИНАНТНЫЙ ПТИЧИЙ ВИРУС ГРИППА H5N1(A/VIETNAM/1203/04) И ЕГО ЭСКЕЙП-МУТАНТ m13(13) ИНДУЦИРУЮТ РАННИЕ СИГНАЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ ИММУНИТЕТА В ЛИМФОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА

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

Иммунные рецепторы врожденного иммунитета TLR4, TLR7, TLR8 и RIG1 узнавали структурные компоненты вирусов гриппа в лимфоцитах человека и были активированы рекомбинантным птичьим вирусом гриппа A/Vietnam/1203/04 и его эскейп-мутантом m13(13) в ранние сроки взаимодействия. Уровни активации не были связаны с вирусной репродукцией и были выше у донора с низкими конститутивными уровнями. Воспалительная реакция лимфоцитов проявлялась ростом активности фактора некроза опухоли альфа (ФНО- α) и интерферона гамма (ИФН- γ). Сигнальные реакции эндосомальных и цитоплазматических рецепторов на родительский и мутантный вирусы были во многом подобны. Эффект мутации в гене гемагглютинина (S145F) вируса A/Vietnam/1203/04 проявлялся ростом уровня транскрипции гена мембранного рецептора TLR4 и снижением уровня активации гена ФНО- α . Необходимы дальнейшие исследования с природными изолятами вирусов гриппа для понимания роли антигенной изменчивости в вызываемых ими иммунных реакциях у человека.

Ключевые слова: вирус гриппа; врожденный иммунитет; сигнальные рецепторы; лимфоциты человека; цитокины.

Для цитирования: Вопросы вирусологии. 2016; 61(1): 21–26. DOI 10.18821/0507-4088-2016-61-1-21-26

Sokolova T.M., Poloskov V.V., Shuvalov A.N., Rudneva I.A., Ershov F.I.

AVIAN RECOMBINANT VIRUS H5N1 INFLUENZA (A/VIETNAM/1203/04) AND ITS ESCAPE-MUTANT m13(13) INDUCE EARLY SIGNALING REACTIONS OF THE IMMUNITY IN HUMAN LYMPHOCYTES

D.I. Ivanovsky Institute of Virology "Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya", 123098, Moscow, Russia

The innate immune receptors TLR4, TLR7, TLR8, and RIG1 recognized the structures of the influenza viruses in human lymphocytes and were activated by the recombinant avian influenza virus A/Vietnam/1203/04 and its escape-mutant m13(13) during early period of interaction. The stimulated levels are not connected with viral reproduction. Donor cells with the low constitutive immune receptors gene expression levels showed higher stimulation. Inflammation virus effects resulted in increasing production of TNF-alpha and IFN-gamma by lymphocytes. Signaling gene reactions of the parent and mutant viruses endosomal as well as cytoplasmic receptors are very similar. The mutant virus A/Vietnam/1203/04 (HA S145F) stimulated an increase in the transcription level of the membrane receptor gene TLR4 and a decrease in the level of activation of TNF-alpha gene. Further studies of natural influenza virus isolates are necessary to estimate the role of HA antigenic changes on immune reactions in humans.

Key words: influenza virus; innate immunity; signaling receptors; human lymphocytes; cytokines.

Citation: Voprosy virusologii. 2016; 61(1): 21–26. (in Russian). DOI 10.18821/0507-4088-2016-61-1-21-26

For correspondence: Tatyana Sokolova, Doctor of Biological Sciences, Academician of the Russian Academy of Natural Sciences; e-mail: tmsokolovavir@mail.ru

Received 22.09.14

Птичий вирус гриппа H5N1 способен преодолевать видовые барьеры и инфицировать человека, вызывая тяжелые формы заболевания с возможным смертельным исходом [1]. Причина опасности заключается в отсутствии у людей иммунитета к вирусам гриппа птиц. Высокий эволюционный потенциал молекулы гена гемагглютинина (ГА) вирусов гриппа обусловлен мутациями в антигенных участках [2]. Трехмерная структура ГА высокопатогенного штамма A/Vietnam/1203/04 имеет некоторое сходство с человеческим вирусом H1N1 пандемии 1918 г. [3]. Исследованный вирус является рекомбинантом, созданным методом обратной генетики из высокопродуктивного штамма A/Puerto Rico/34 (H1N1) (VCH5N1-PR8/CDC-RG, предоставленный R. Donis из Центра по контролю и борьбе с болезнями, Атланта, США). Гены ГА и нейраминида-

зы заменены на птичий H5N1 A/Vietnam/1203/04. Эскейп-мутант m13(13) A/Vietnam/1203/04 имеет аминокислотную замену S145F, локализованную на поверхности ГА в антигенном сайте 1 [4]. Эта мутация позволяет вирусу ускользать от действия моноклональных антител (МКА) и может оказаться существенной для патогенеза. Мутации в ГА и нейраминидазе вируса A/Vietnam/1203/04 влияют на рецепторную специфичность (S α 2,6 или S α 2,3), которая во многом обуславливает патогенность для человека и животных [5]. В настоящей работе мы впервые исследовали свойства рекомбинантного вируса H5N1(A/Vietnam/1203/04) и одного из его эскейп-мутантов m13(13), связанные с индукцией генов врожденного и адаптивного иммунитета и синтеза воспалительных цитокинов в лимфоцитах человека.

Для корреспонденции: Соколова Татьяна Михайловна, д-р биол. наук, акад. РАЕН, ведущий научный сотрудник; e-mail: tmsokolovavir@mail.ru

Структура олигонуклеотидных ПЦР-праймеров

Ген/мРНК	Последовательность нуклеотидов 5'—————3'	Размер ПЦР- продукта, н. п.
H5N1 A/Vietnam/1203/04	П – AAG TAA ACG GGC AAA GTG GAA	314
	О – TTG AGG GCT ATT TCT GAG CCC	
TLR4	П – GTC AGA CGG TGA TAG CGA GC	270
	О – TTA GGA ACC ACC TCC ACG CA	
RIG1	П – CCA GAG AAC CAG TTG GGC TT	163
	О – TCT CCA CCA TCT CTG GAC ACC	
TLR7	П – AGA TGC CTT CCA GTT GCG AT	150
	О – AAC CAC ACA GCA TCA CAG GT	
TLR8	П – CCT CGT CTC GAG TTG CTT GA	133
	О – GAA AGC CAG AGG GTA GGT GG	

Примечание. н. п. – нуклеотидные пары.

Известно, что инфицирование человека высокопатогенными птичьими вирусами H5N1 вызывает сильный воспалительный цитокиновый ответ в организме («цитокиновый шторм»). Вирусная активация иммунных реакций происходит в макрофагах и эпителиальных клетках человека, моноцитах, вызывая их дифференциацию в дендритные клетки [6]. Показано, что иммунокомпетентные клетки могут являться своеобразным депо для доставки вирусов гриппа в клетки дыхательных путей человека [7]. Вызываемые в них воспалительные реакции способствуют попаданию вируса в легкие и не связаны с уровнями вирусной репликации [5].

Клеточное узнавание РНК-содержащих вирусов, в том числе вирусов гриппа и их компонентов, осуществляется группой рецепторов врожденного иммунитета, мембранным TLR4, эндосомальными TLR7/8 и цитоплазматическим RIG1 [8–10]. Активация этих рецепторных путей в иммунокомпетентных клетках, по-видимому, является важной составляющей уровня распространения инфекции и проникновения вирусов в чувствительные клетки. Среди иммунорегуляторных цитокинов важную роль играет интерферон-гамма (ИФН- γ) – активатор адаптивных иммунных реакций популяций Т-лимфоцитов (Тх1), естественных киллеров (ЕК) и макрофагов [11], а также фактор некроза опухоли (ФНО- α) и сигнальный интерлейкин 1-бета (ИЛ-1 β), ассоциированные с вирусным патогенезом. Таких исследований с птичьими вирусами гриппа на уровне транскрипции генов – рецепторов врожденного иммунитета в клетках крови человека крайне мало, и пока не получено однозначных ответов о связи разных сигналов между собой. Для количественной оценки экспрессии генов-рецепторов (TLR4, TLR7/8, RIG1) и цитокинов (ИФН- γ и ФНО- α) применили метод обратной транскрипции -полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) в режиме реального времени, обладающий высокой чувствительностью и специфичностью. Продукция цитокинов измерена с помощью иммуноферментного анализа (ИФА).

Материал и методы

Вирусы гриппа. Использовали рекомбинантный вирус, утративший высокую патогенность. Вирус создан методом обратной генетики из высокопродуктивного штамма A/Puerto Rico/34 (H1N1) (VCH5N1-PR8/CDC-RG, предоставленный R. Donis из Центра по контролю и профилактике болезней, Атланта, США), в котором гены ГА и нейраминидазы заменены на птичьи H5N1 A/Vietnam/1203/04. Эскейп-мутант m13(13) этого вируса получен селекцией с МКА в Лаборатории физиологии Института вирусологии им. Д. И. Ивановского [4]. Ген ГА модифицирован специфическим мутагенезом, и в белке отсутствует сайт расщепления молекулы. Вирусы хорошо размножаются в аллантоисной полости 10-дневных куриных эмбрионов. Образцы аллантоисных вирусов хранили при -80°C.

Постановка опытов в лимфоцитах. Лимфоциты изолированы из периферической крови двух доноров в градиенте фикола с применением стандартной процедуры. Для проведения опытов очищенные лимфоциты приготовлены в виде суспензии с концентрацией 10 млн/мл в питательной среде RPMI-1640 с 10% сыворотки эмбрионов коров и антибиотиком гентамицином. Рекомбинантный вирус A/Vietnam/1203/04 и его мутант m13(13) добавлены к суспензионным культурам лимфоцитов донора 1 и донора 2 в коли-

честве 0,1 мл (16–32 ГА). Контрольные культуры лимфоцитов двух доноров приготовлены параллельно без вирусов. После адсорбции вирусов лимфоциты дважды отмыты средой и разведены до концентрации 2 млн в питательной среде с сывороткой для продолжения инкубации при 37°C в культуральных пробирках с крышками. В сроки исследования 2, 24, 48 и 72 ч из опытных и контрольных проб отбирали образцы 0,5 мл, которые центрифугировали при 1000 об/мин для получения осадков клеток и супернатантов культуральной жидкости. Клетки лизированы в реагенте TRIZOL («Invitrogen», США) и использованы для выделения РНК. В супернатантах измеряли уровень цитокинов методом ИФА, определяли инфекционность вирусов в чувствительной культуре клеток CaCo-2 и количество вирусных ГА в реакции с куриными эритроцитами. Пробы хранили при -80°C.

Процедуры выделения РНК и проведение ОТ-ПЦР в реальном времени подробно описаны в работах [12, 13]. Количественную ПЦР в реальном времени ставили на приборе CFX-96 («Bio-Rad», США) с готовой двукратной смесью SsoFast EvaGreen Supermix. К разведенной 1/3 или 1/9 кДНК добавляли пары прямого и обратного специфических праймеров. Праймеры к вирионной РНК (ген ГА) A/Vietnam/1203/04 (HM006759) и эскейп-мутанту m13(13) (EU122399) и мРНК клеточных рецепторов TLR4, TLR7, TLR8 и RIG1 рассчитаны в программе Primer 3 Blast NCBI GenBank и приведены в табл. 1. ПЦР-праймеры к рибосомальной 18S РНК, мРНК бета-2-микроглобулин (B2M), мРНК ФНО- α и мРНК ИФН- γ опубликованы ранее [12–14]. Все праймеры были синтезированы фирмой «Синтол» (Россия). Полученный ПЦР-продукт соответствовал расчетному по температуре плавления и подвижности в агарозном геле. Относительная оценка экспрессии генов (дельта Сq) сделана в программе CFX Manager «Gene expression analysis» в автоматическом режиме.

Определение цитокинов ИЛ-1 β , ИФН- γ , ФНО- α в культуральной жидкости выполнено с помощью ИФА-наборов фирмы «Вектор-Бест» согласно прилагаемой инструкции. Количественное измерение оптической плотности и расчет средних концентраций двух повторных образцов (в пг/мл) выполнен на микропланшетном фотометре модели «Anthos 2010» в программе ADAP+ («Biochrom», Великобритания). Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Statistica 6. Оценку статистической значимости

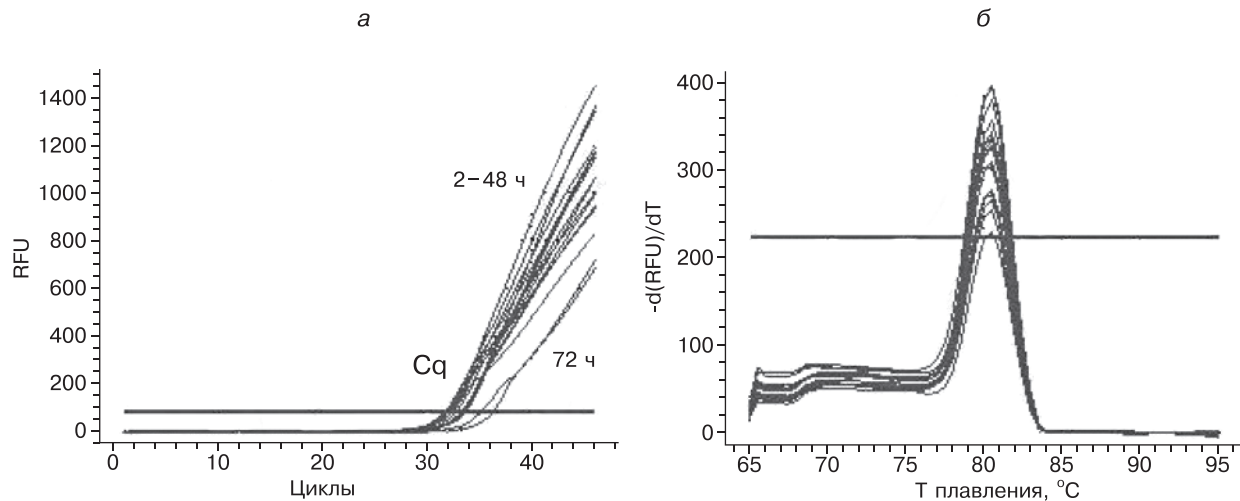


Рис. 1. Взаимодействие вируса A/Vietnam/1203/04 и эскейп-мутанта m13(13) с лимфоцитами человека.

a - амплификация вирионной РНК в лимфоцитах. По оси абсцисс – циклы, по оси ординат – уровни флюоресценции синтезированных ДНК-продуктов в разные сроки исследования; *б* - пики плавления специфических ПЦР-продуктов. По оси абсцисс – температура плавления, по оси ординат – производная флюоресценции.

Т а б л и ц а 2

Показатели инфекционности и ГА-активности культуральных вирусов

Вирусы	Фоноры	Сроки исследования \log_2 ЦПД ₅₀ /ед. ГА, ч			
		2	24	48	72
H5N1	1	5/<2	4/2	4/2	н.и*/2
	2	5/<2	2/4	3/4	4/4
m13-мутант	1	4/<2	5/<2	5/<2	<2/2
	2	4/<2	5/4	5/4	4/4

выполняли с применением *t*-критерия Стьюдента при $p < 0,05$.

Титрование инфекционности вирусов A/Vietnam/1203/04 и мутанта m13(13) в культуральной жидкости лимфоцитов проводили на чувствительных клетках CaCo-2 (РОНЦ им Н. Н.Блохина) микрометодом в 96-луночных плато. Под световым микроскопом появление ЦПД₅₀ вирусов определяли в двукратных разведениях. Величины обратного разведения считали титром и выражали в \log_2 . Реакцию ГА куриных эритроцитов (0,75 % взвесь в физиологическом растворе NaCl, pH 7,0) с культуральными вирусами выполняли в круглодонных микроплатах стандартным методом.

Результаты и обсуждение

Возможность размножения птичьего вируса H5N1(A/Vietnam/1203/04) и его эскейп-мутанта m13(13) в клетках крови человека была неизвестной. Поэтому нам предстояло выяснить, происходит ли накопление вирионной РНК в инфицированных лимфоцитах и освобождение инфекционных вирионов и их ГА в среду культивирования в динамике наблюдения (сроки исследования 2, 24, 48 и 72 ч). На рис. 1 представлены данные амплификации вирионной РНК в ПЦР в лимфоцитах 2-х доноров и показатели инфекционности и ГА-активности в культуральной жидкости в динамике (табл. 2). Видно, что во все сроки (с 2 до 48 ч) в лимфоцитах присутствовала вирионная РНК, и ее количество менялось незначительно (у донора 1 пороговые циклы $C_q = 32-33$, у донора 2 $C_q = 28-30$), снижаясь к 72 ч (см. рис. 1, *a*). Рассчи-

танные праймеры к гену ГА (фрагмент S4) вируса A/Vietnam/1203/04 и его эскейп-мутанту m13(13) давали 1 специфический ПЦР-продукт 314 н. п. с характерной температурой плавления 80°C (см. рис. 1, *б*). Показатели инфекционности и ГА-активности были на низком уровне (порядка 4–5 \log_2 ЦПД₅₀/ 2–4 ед. ГА) и также мало изменялись в динамике наблюдения (см. рис. 1; табл. 2). Согласно данным, приведенным ниже, этого оказалось вполне достаточно для выраженных эффектов птичьего вируса H5N1(A/Vietnam/1203/04) и его эскейп-мутанта m13(13) на сигнальные реакции иммунитета в лимфоцитах человека.

Нами определена экспрессия 4 генов–рецепторов врожденного иммунитета, которые участвуют в узнавании вируса гриппа: вирионной РНК – внутриклеточные рецепторы RIG1, TLR7, TLR8 и гликолипопротеидов ГА оболочки — мембранный рецептор TLR4. На рис. 2, *a–e* показаны изменения экспрессии этих рецепторных генов в лимфоцитах двух доноров в разные сроки исследования. Кратность изменений генной активности рассчитана относительно соответствующих временных контролей без вирусов, принятых равными 1. Для генов «узнающих» рецепторов наблюдается очень ранняя (2 ч) стимуляция вирусами (эскейп-мутантом m13 (черные столбики) и исходным вирусом H5N1 (белые столбики)). В обоих случаях за активацией следует падение генной активности (исключением являются гены TLR7 и RIG1 у донора 2, которые продолжают быть активированы вирусами в срок 24 ч). Следует отметить, что мутантный вирус в ряде случаев опережает исходный вирус по уровню и времени генной активации, что особенно заметно в случае мембранного рецептора TLR4. У донора 1 стимулирующее действие обоих вирусов на экспрессию генов TLR4 и RIG1 достигает высоких 100-кратных уровней, тогда как у донора 2 не превышает 10 раз. Оба вируса стимулируют экспрессию генов TLR7 и TLR8 в лимфоцитах донора 2.

Мы сопоставили конститутивные уровни экспрессии рецепторных генов TLR4, TLR7 и RIG1 в лимфоцитах доноров 1 и 2 и нашли, что они в срок 2 ч существенно различаются (рис. 3, *a–z*). Пороговые циклы C_q амплификации ДНК у донора 1 очень низкие (TLR4 40, TLR7 42, RIG1 $C_q > 45$). Напротив, у донора 2 генные уровни TLR4 30, TLR7 и RIG1 37 намного выше (см. рис. 3, *a–z*). Нами обнаружен важный, на наш взгляд, факт

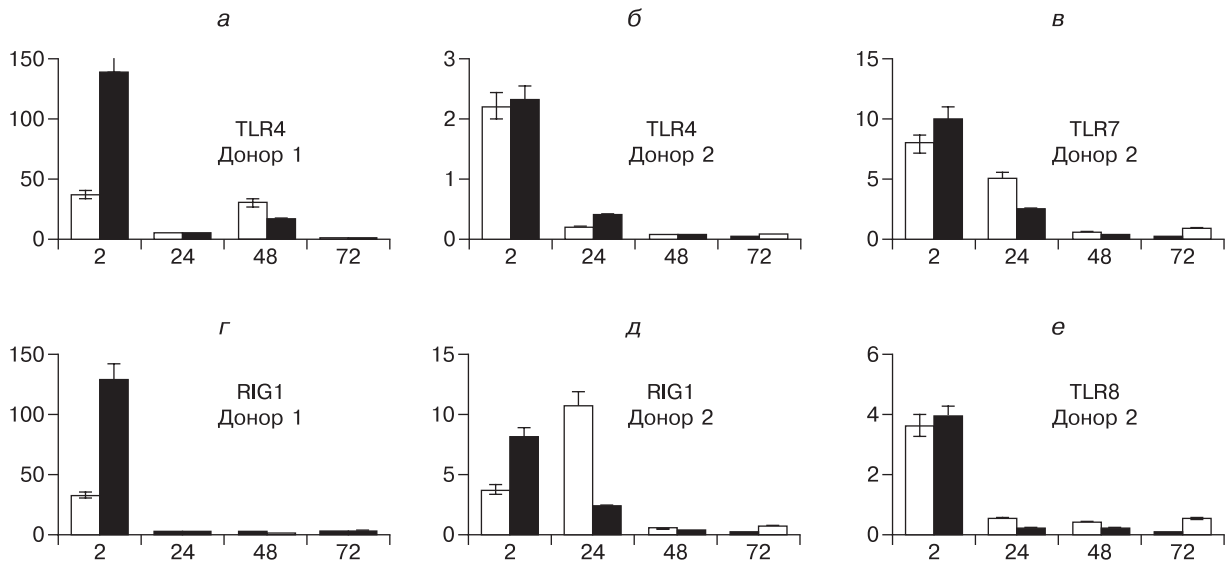


Рис. 2. Стимуляция вирусами A/Vietnam/1203/04 и эскейп-мутантом m13(13) транскрипции генов TLR4 (а, б), TLR7 (в), TLR8 (е) и RIG1 (г, д) в лимфоцитах двух доноров.

Здесь и на рис. 4: по оси абсцисс – сроки исследования в часах, по оси ординат – кратность стимуляции транскрипции относительно контролей, принятых равными 1.

– значительный рост уровней экспрессии рецепторов врожденного иммунитета в процессе культивирования лимфоцитов двух доноров в питательной среде (RPMI-1640 с 10% сыворотки эмбрионов коров) в контролях в отсутствие вирусов (см. рис. 3, а-г). Это указывает на активацию защитных реакций лимфоцитов в условиях культивирования *ex vivo*.

Экспрессия гена ФНО- α в присутствии вирусов была у 2-х доноров повышенной, но постепенно ослабевающей (рис. 4, а, б). У донора 1 наблюдалось более длительное цитотоксическое действие исходного вируса H5N1 по сравнению с мутантным, который показывал

более выраженный ФНО-эффект преимущественно в ранний срок 2 ч.

Считается, что экспрессия рибосомальной РНК (рРНК) мало меняется при разного рода воздействиях на клетки, поэтому ее используют как референс-РНК для нормализации данных генной экспрессии. Однако этот ген «домашнего хозяйства», по нашим данным, меняется при действии интерферонов, дсРНК и иммуномодулятора на клетки человека [13, 14]. Сравнительный анализ транскрипционной активности 18S рРНК в лимфоцитах с вирусами гриппа подтвердил, что активность рибосомального гена возрастает через 2 и 24 ч, подобно

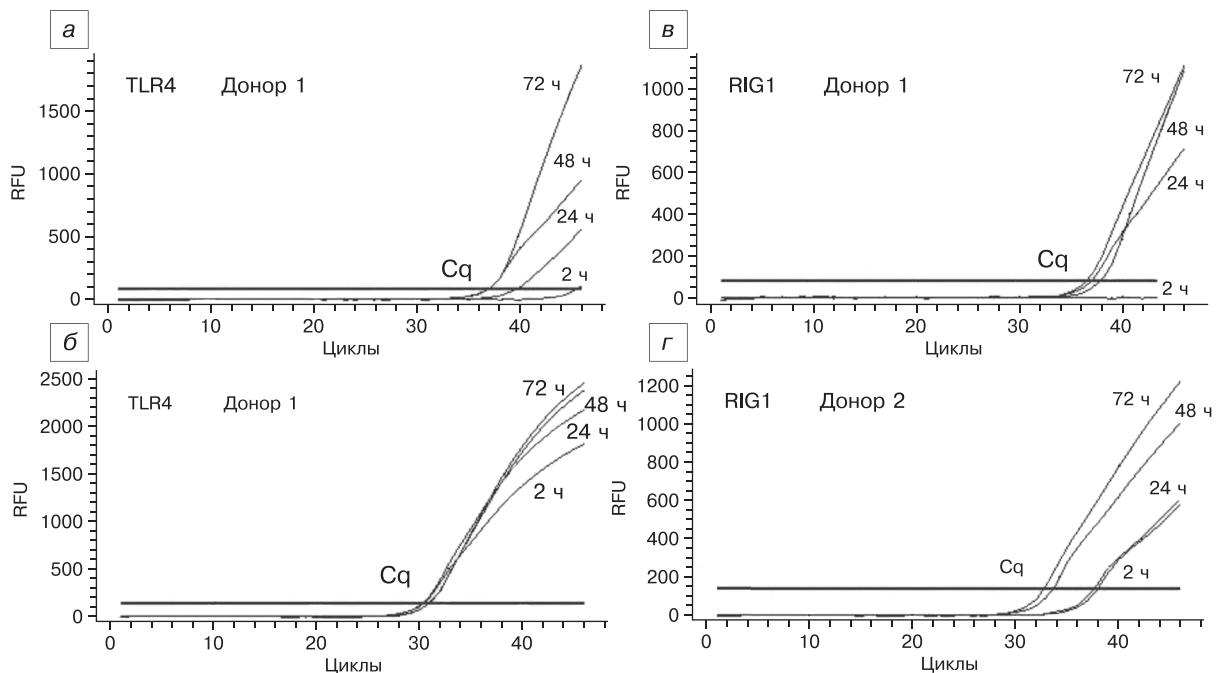


Рис. 3. Сравнение конститутивных уровней экспрессии генов рецепторов TLR4 (а, б) и RIG1 (в, г) в лимфоцитах двух доноров. По оси абсцисс – циклы амплификации, по оси ординат – флюоресценция ДНК-ампликатов. Кривые накопления в разные сроки исследования. Cq – пороговые циклы.

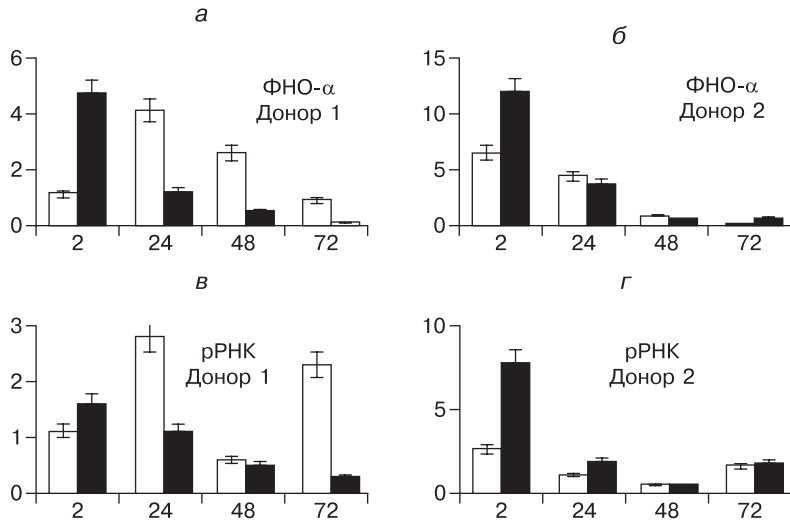


Рис. 4. Влияние вирусов A/Vietnam/1203/04 и эскейп-мутанта m13(13) на транскрипцию гена ФНО- α (а, б) и 18S рРНК (в, г) в лимфоцитах.

генам рецепторов, и затем к 48–72 ч снижается у обоих доноров (рис. 4, в, г). Кратность изменений рибосомального гена у донора 1 меньше, чем у донора 2, но это не позволяет рассматривать рРНК как стабильный референсный ген в наших опытах.

Транскрипционная активность гена ИФН- γ у 2-х доноров в контрольных лимфоцитах человека была не выявляемой во все сроки исследования (45 циклов амплификации). Исходный вирус H5N1 стимулировал экспрессию этого гена на 41 цикле и эскейп-мутант на 43–45 циклах только у донора 2 (данные не приводятся). Продукция лимфоцитами цитокинов ИФН- γ , ФНО- α и ИЛ-1 β в ответ на мутантный и исходный H5N1-вирусы гриппа была определена методом ИФА (табл. 3). На фоне низкой спонтанной секреции ИФН- γ и ФНО- α в контролях (до 10 пг/мл) добавление вирусов вызывало мощный цитокиновый взрыв (> 500 пг/мл). Более сильным индуктором ИФН- γ был мутантный вирус гриппа m13(13). Исходный вирус H5N1 вызывал в большей степени секрецию ФНО- α . Индукция вирусами гриппа ИЛ-1 β была незначительной (3–4 пг/мл, лишь в 1,5–2 раза выше контрольных показателей; данные не приводятся).

Представленные нами данные подтверждают участие рецепторов врожденного иммунитета TLR4, TLR7, TLR8 и RIG1 в «узнавании» вирусов гриппа [7, 15] и открывают новые закономерности этого процесса. Поиск на рецепторных уровнях чувствительных мишеней позволит найти более эффективные анти-вирусные препараты. Сигнальные иммунные реакции на рекомбинантный вирус гриппа А с птичьим ГА

(Vietnam/1203/04) являются очень быстрыми и преходящими, не зависят от его репликации и происходят на этапах адсорбции и проникновения вируса. Вместе с тем степень проявления и скорость реакций, возможно, зависят от конститутивных уровней активности генов рецепторов врожденного иммунитета. В наших опытах вирусная стимуляция рецепторных генов была сильнее выражена в лимфоцитах донора с низкими уровнями. Кроме того, у этого донора при культивировании лимфоцитов без вирусов наблюдался рост активности генов иммунных рецепторов, но в меньшей степени, чем с вирусами. Такие индивидуальные различия могут быть связаны с количеством лимфоцитов в образцах крови доноров, хотя в условиях параллельно проводимых нами экспериментов первоначальные концентрации очищенных лимфоцитов в образцах были приблизительно равными (2 млн/мл). Поэтому более вероятно, что лимфоциты разных доноров отличаются конститутивными уровнями экспрессии рецепторных генов. Однако насколько такие индивидуальные характеристики генной экспрессии стабильны, предстоит выяснить в дальнейшем при повторных анализах. В данном случае мы имеем лишь наблюдение, демонстрирующее разные уровни стимуляции генов – иммунных рецепторов вирусами гриппа птиц у доноров. Подобный эффект уже был отмечен нами ранее в клетках цельной крови разных людей при действии ИФН и его индукторов на рецепторы врожденного иммунитета.

На основании вирусологических данных с рекомбинантными вирусами птиц и результатов ПЦР с вирионными РНК мы пришли к выводу, что на лимфоцитах происходила адсорбция вируса и внутриклеточное проникновение РНК, но за этим не следовало вирусной репликации или ее уровень был минимальным. Тем не менее, вирионные РНК сохранялись в клетках по крайней мере на протяжении 72 ч. Поэтому наблюдаемая ранняя активация иммунных рецепторов не связана с вирусной репликацией. К такому же выводу пришли и другие исследователи в опытах с вирусом гриппа, инактивированным УФ, который утратил инфекционность, но сохранял цитокиноиндуцирующие свойства [7].

Изменения в антигенной структуре ГА, позволяющие вирусу m13(13) A/Vietnam/1203/04 H5N1 ускользать от иммунного ответа, приводят к некоторым отличиям от исходного вируса H5N1. Так, при взаимодействии мутантного вируса с лимфоцитами повышается скорость индукции гена мембранного рецептора TLR4 и снижается уровень продукции цитотоксического гена ФНО- α . Тем не менее между исходным и мутантными вирусами много общего в регуляции генов – иммунных рецепторов и секретируемых лимфоцитами цитокинов. Поэтому замена в антигенном сайте 1 (S145F) птичьего ГА не является критической для проявления вирусами иммуномодулирующих свойств, хотя и вносит в их свойства некоторые модификации. Длительность сохранения вируса в лимфоцитах, о чем можно судить по содержанию в них вирионной РНК, подтверждает мнение о возможности использования лимфоцитов в качестве депо для доставки в чувствительные клетки-мишени дыхательных путей. Процессам вирусной целевой доставки во многом способствует иммунная активация лимфоцитов, продукция ими воспалительных цитокинов и ИФН типа 1 [15]. Показанные в нашей работе высокие уровни

Таблица 3

Продукция цитокинов лимфоцитами человека

Цитокины, пг/мл	Вирусы	Сроки исследования, ч		
		2	24	48
ИФН- γ	Контроль	10,4	4,2	9,2
	Мутант m13	5,6	135	152
	H5N1	10,4	99	102
ФНО- α	Контроль	9,3	8,2	10,1
	Мутант m13	107	462	> 500
	H5N1	140	> 500	> 500

продукции ИФН- γ в лимфоцитах, по-видимому, не позволяют вирусам гриппа размножаться в этих клетках. Наши модельные исследования с рекомбинантным вирусом гриппа H5N1 (Vietnam/1203/04) не исключают, что белки эталонного вируса высокопродуктивного штамма A/Puerto Rico/34 (H1N1) также могли влиять на иммунные реакции лимфоцитов. Поэтому необходимы дальнейшие исследования на природных изолятах вирусов гриппа, чтобы понять, как антигенная изменчивость ГА вирусов связана с рецепторной специфичностью и как это влияет на иммунные реакции лимфоцитов.

**ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1–7, 9–11, 15, 16
с.м. REFERENCES)**

8. Соколова Т.М. Иммунное узнавание вирусных нуклеиновых кислот приводит к индукции интерферонов и воспалительных цитокинов. В кн.: Ершов Ф.И., ред. *Сборник научных трудов «Интерферон-2011»*. М.: НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ; 2012: 52–62.
12. Соколова Т.М., Шувалов А.Н. Подавление рекомбинантным альфа-2-интерфероном репродукции вируса Карельской лихорадки в клетках крови человека. *Вопросы вирусологии*. 2011; 57(2): 27–31.
13. Соколова Т.М., Шувалов А.Н., Телков М.В., Колодяжная Л.В., Ершов Ф.И. Препарат «Ридостин» индуцирует транскрипцию широкого спектра генов системы интерферона в клетках человека. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2013; 156(8): 179–82.
14. Шувалов А.Н., Соколова Т.М., Шаповал И.М., Ершов Ф.И. Модуляция клеточных генов препаратом Иммуномакс: активация генов интерферонов и интерлейкинов. *Иммунология*. 2014; 35(1): 16–20.

REFERENCES

1. Webster R.G., Govorkova E.A. H5N1 influenza-containing evolution and spread. *N. Engl. J. Med.* 2006; 355: 2174–7.
2. Kaverin N.V., Rudneva I.A., Ilyushina N.A., Varich N.L., Lipatov A.S., Smirnov Y.A. et al. Structure of antigenic sites on the hemagglutinin molecule of H5 influenza virus and phenotypic variation of escape mutants. *J. Gen. Virol.* 2002; 83(Pt. 10): 2497–505.
3. Stevens J., Blixt O., Tumpey T.M., Taubenberger J.K., Paulson J.C., Wilson I.A. Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus. *Science*. 2006; 312(5772): 404–10.
4. Kaverin N.V., Rudneva I.A., Govorkova E.A., Timofeeva T.A., Shilov A.A., Kochergin-Nikitsky K.S. et al. Epitope mapping of

the hemagglutinin molecule of highly pathogenic H5N1 influenza virus by using monoclonal antibodies. *J. Virol.* 2007; 81(23): 12911–7.

5. Ramos I., Bernal-Rubio D., Durham N., Belicha-Villanueva A., Lowen A.C., Steel J. et al. Effects of receptor binding specificity of avian influenza virus on the human innate immune response. *J. Virol.* 2011; 85(9): 4421–31.
6. Hou W., Gibbs J.S., Lu X., Brooke C.B., Roy D., Modlin R.L. et al. Viral infection triggers rapid differentiation of human blood monocytes into dendritic cells. *Blood*. 2012; 119(13): 3128–31.
7. Pang I.K., Pillai P.S., Iwasaki A. Efficient influenza virus replication in respiratory tract requires signals from TLR3 and RIG1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2013; 110(34): 13910–5.
8. Sokolova T. M. Immune recognition viral nucleic acids result in interferon and inflammatory cytokines induction. In: Ershov F.I., ed. *Collection of Scientific Works “Interferon-2011.” [Sbornik nauchnykh trudov «Interferon-2011»]*. Moscow: NIIEM im. N.F. Gamalei MZ RF; 2012: 52–62. (in Russian)
9. Kawai T., Akira S. Toll-like receptor and RIG1-like receptor signaling. *Ann. NY Acad. Sci.* 2008; 1143: 1–20.
10. Lester S.N., Li K. Toll-like receptors in antiviral innate immunity. *J. Mol. Biol.* Available at: [http:// dx.dos.org/10.1016.jmb.2013.11.024](http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2013.11.024).
11. Saha B., Prasanna S.J., Chandrasekar B., Nandi D. Gene modulation and immunoregulatory roles of interferon gamma. *Cytokine*. 2010; 50(1): 1–14.
12. Sokolova T. M., Shuvalov A. N. Recombinant interferon- α suppression of Karelian fever virus replication in human blood cells. *Voprosy virusologii*. 2011; 57(2): 27–31. (in Russian)
13. Sokolova T.M., Shuvalov A.N., Telkov M.V., Kolodyazhnaya L.V., Ershov F.I. Preparation “Ridostin” induces transcription wide genes spectrum of interferon system in human cells. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2013; 156(8): 179–82. (in Russian)
14. Shuvalov A.N., Sokolova T.M., Shapoval I.M., Ershov F.I. Modulation of cellular gene transcription by drug «Immunomax»: activation of Interferon and Interleukine genes. *Immunologiya*. 2014; 35(1): 16–20. (in Russian)
15. Cao W., Taylor A.K., Biber R.E., Davis W.G., Kim J.H., Reber A.J. et al. Rapid differentiation of monocytes into type I IFN-producing myeloid dendritic cells as an antiviral strategy against influenza virus infection. *J. Immunol.* 2012; 189(5): 2757–65.
16. Cheng X., Xu Q., Song E., Yang C.F., Kemble G., Jin H. The hemagglutinin protein of influenza A/Vietnam/1203/2004(H5N1) control to hyperinduction of proinflammatory cytokines in human epithelial cells. *Virology*. 2010; 406(1): 28–36.

Поступила 22.09.14

Галочкина А. В.¹, Зарубаев В. В.¹, Киселев О. И.¹, Бабкин В. А.², Остроухова Л. А.²

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНА В ПРОЦЕССЕ РЕПЛИКАЦИИ ВИРУСА КОКСАКИ В4 *IN VITRO*

¹ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, 197376, г. Санкт-Петербург; ²Иркутский институт химии им. А. Е. Фаворского СО РАН, 664033, г. Иркутск

На сегодняшний день изучение противовирусной активности антиоксидантов в отношении вирусных инфекций является необходимым условием для создания комплексных противовирусных препаратов. Одним из наиболее активных природных антиоксидантов считается дигидрокверцетин (ДКВ), экстрагируемый из лиственницы Гмелина. В статье представлены результаты исследований противовирусных свойств ДКВ в отношении представителя семейства пикорнавирусов – вируса Коксаки В4 *in vitro*. В ходе экспериментов выявлено снижение вирусных титров в присутствии ДКВ в концентрации 100 мкг/мл по сравнению с контролем. Также на основе метода бляшек подтверждено уменьшение цитопатогенного действия вируса в присутствии препарата в концентрации 100 мкг/мл. В исследовании по определению стадии вирусного жизненного цикла, на которую действует ДКВ, установлено, что наибольшая эффективность противовирусной терапии проявляется в ранних стадиях репродукции вируса (в первые 3 ч после инфицирования). Полученные данные свидетельствуют о потенциале ДКВ как противовирусного агента в отношении вируса Коксаки В4 и перспективности дальнейших исследований антиоксидантов как ингибиторов вирусной репликации.

Ключевые слова: *энтеровирусы; вирусы Коксаки; дигидрокверцетин; антиоксиданты; противовирусные препараты.*

Для цитирования: Вопросы вирусологии. 2016; 61(1): 27–31. DOI 10.18821/0507-4088-2016-61-1-27-31

Galochkina A.V.¹, Zarubaev V.V.¹, Kiselev O.I.¹, Babkin V.A.², Ostroukhova L.A.²

ANTIVIRAL ACTIVITY OF THE DIHYDROQUERCETIN DURING THE COXSACKIEVIRUS B4 REPLICATION *IN VITRO*

¹Research Institute of Influenza, 197376, St. Petersburg, Russia; ²A.E. Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, 664033, Irkutsk, Russia

A study of the antiviral activity of antioxidants against viral infections is believed to be essential for creating complex antiviral agents. Dihydroquercetin is considered as the most active antioxidant extracted from *Larix gmelinii*. In this work, we present results of experiments of the antiviral properties of dihydroquercetin against a member of the family Picornaviridae – Coxsackievirus B4 *in vitro*. We have estimated that dihydroquercetin reduces viral titers at 100 µg/ml concentration as compared with control of virus. We have shown using the plaque assay that CPE of virus is reduced in the presence of dihydroquercetin at 100 µg/ml. Study of the phase of viral life cycle, in which dihydroquercetin acted, demonstrated that the highest efficacy of the antiviral therapy was reached at early stages of virus reproduction (1-3 hours post infection). These results show that dihydroquercetin has antiviral property against Coxsackievirus B4. This drug and other antioxidants can be tested as inhibitors of viral replication.

Key words: *enteroviruses; Coxsackieviruses B4; dihydroquercetin; antioxidants; antiviral agents.*

Citation: *Voprosy virusologii*. 2016; 61(1): 27–31. (in Russian). DOI 10.18821/0507-4088-2016-61-1-27-31

For correspondence: Anastasiya Galochkina, research assistant; e-mail: nastyalochkina@yandex.ru

Received 05.05.15

Введение

Энтеровирусные инфекции – группа острых инфекционных заболеваний, возбудителями которых являются энтеровирусы (ЕСНО-вирусы, полиовирусы, Коксаки-вирусы). Наиболее подвержены данной инфекции дети и подростки, а также лица с ослабленным иммунитетом. Энтеровирусные инфекции являются причиной многочисленных эпидемий: энтеровирусного (асептического) менингита во Франции (2002 г., 559 случаев; вирусы ЕСНО 6, 13, 20), в Японии (2000 г., заболело несколько сотен человек; были смертельные исходы; энтеровирус 71-го типа). На постсоветском пространстве наиболее крупные вспышки в последние годы наблюдались в России в Приморском крае (Хабаровск, 1997 г.; преобладали вирусы Коксаки В3, В4, В5, ЕСНО 6, 17, энтеровирус 70-го типа) и Калмыкии (2002 г., 507 случаев; вирус ЕСНО

30) [1]. Вирусы Коксаки типа В – это безоболочечные вирусы, принадлежащие к роду *Enterovirus*, семейству Picornaviridae и содержащие одноцепочечный положительный РНК-геном.

Жизненный цикл энтеровирусов проходит в цитоплазме клетки-хозяина. Начало жизненного цикла связано с прикреплением вируса к специфическим рецепторам клетки-мишени (Коксаки-аденовирусный рецептор (CAR), который распознается вирусами Коксаки В1–В6, CD55 – вирусами Коксаки В1, В3, В5). Затем после конформационных изменений капсида вируса, необходимых для его входа в клетку, вирусная РНК проникает в цитоплазму, и начинается процесс трансляции. Вслед за трансляцией запускается процесс транскрипции, происходящий по схеме (+)РНК – (–)РНК – (+)РНК [2].

Вирус проникает в организм через дыхательные пути и/или ротовую полость, реплицируется в верхних дыхательных путях или тонкой кишке, после чего поступает в кровяное русло, приводя к незначительной вирусемии и диссеминации в органы-мишени (ЦНС, печень, сердце, поджелудочная железа и др.). После этого наступает стадия вторичной вирусемии с потенциальной возможностью распространения инфекции в ЦНС [3]. Широкая пантропность энтеровирусов лежит в основе широкого разнообразия вызываемых ими клинических форм инфекции, затрагивающих практически все органы и ткани организма человека.

Вирус Коксаки В4 (СVB4) является одной из основных причин возникновения инсулинзависимого диабета 1-го типа [4]. Эта патология характеризуется Т-клеточной деструкцией β -клеток поджелудочной железы. Наиболее вероятный механизм, запускающим и/или усиливающий апоптоз β -клеток, – окислительный стресс. После активации фагоциты выделяют реактивные формы кислорода (ROS) и воспалительные цитокины (ФНО- α , ИЛ-1 β), которые в дальнейшем усиливают окислительные и другие вирусиндуцированные повреждения (например, ухудшение митохондриальной функции). Воспалительные цитокины стимулируют продукцию ROS, в частности NO, внутри островков Лангерганса, в макрофагах и чувствительных к окислительному стрессу β -клетках [3].

Специфическая терапия энтеровирусных инфекций на сегодняшний день представлена сравнительно небольшим числом препаратов, причем многие из них еще находятся в стадии клинических испытаний. Принцип их действия преимущественно основывается на подавлении жизненного цикла вируса в стадии его входа в клетку за счет специфических элементов в химической структуре. Самыми известными являются препараты плеконарил и пиродавир. Кроме того, существует группа препаратов, направленных на ингибирование других специфических вирусных белков. К этой группе относятся и широко известный рибавирин (синтетический аналог гуанозина). При внедрении рибавирина в вирусную РНК он стимулирует мутации в геноме вируса, что приводит к его гибели. Рибавирин снижает вирусные титры, уменьшает воспаление и вирусиндуцированный некроз тканей [5].

В дополнение к препаратам специфического действия в терапии энтеровирусных инфекций применяются интерфероны. При лечении применяют ИФН- β и ИФН- γ , под воздействием которых происходит элиминация РНК вирусного генома [6].

В качестве фактора патогенетической терапии используются антиоксиданты, в частности флавоноиды. Наиболее важным их свойством является способность уменьшать образование свободных радикалов [7]. Одним из самых известных и эффективных антиоксидантов является дигидрокверцетин (ДКВ). ДКВ (DHQ, таксифолин, 3,3',4',5,7-пентагидроксифлаванон) – это флавоноид, экстрагируемый из ксилемы лиственни-

цы Гмелина. Данный флавоноид предотвращает аккумуляцию свободных радикалов, обладает противорадиационной, противоопухолевой, противовирусной активностью, влияет на физические свойства липидов в биологических мембранах, активизирует формирование коллагеновых волокон [8].

Целью исследования явилась характеристика противовирусной активности ДКВ при терапии Коксаки В4-вирусной инфекции на модели *in vitro*.

Материал и методы

Препараты. В работе использовались ДКВ с чистой 99,8% (Иркутск) и в качестве препарата сравнения – рибавирин (ЗАО «Канонфарма продакшн», Московская область) (рис. 1).

Клеточные линии. Линия клеток Vero была получена из музея клеточных культур ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России. 96-Луночные микропланшеты засеивали по 100 мкл на лунку с посевной концентрацией $2 \cdot 10^5$ кл/мл в ростовой среде (α -MEM («Биолот», СПб) с добавлением 5% сыворотки крупного рогатого скота (КРС) («Биолот», СПб)). После этого микропланшеты инкубировали в течение 1 сут в CO_2 -инкубаторе при 37°C до формирования монослоя. После инкубации микропланшеты промывали 1 раз поддерживающей средой по 100 мкл (α -MEM с добавлением 1% сыворотки КРС) и использовали для культивирования вируса.

Вирус. Вирус Коксаки В4/Powers был взят из Государственной коллекции вирусов НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского».

Оценка активности химиопрепаратов. При определении титра вируса использовали культуру клеток Vero, выращенных на 96-луночных панелях на среде α -MEM. Из исследуемых препаратов готовили серию 3-кратных разведений (300–10 мкг/мл для ДКВ и 500–30 мкг/мл для рибавирина), вносили в лунки планшета и инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO_2 в течение 1 ч. Все контрольные и опытные образцы были изучены в трех повторностях. По истечении этого времени клетки заражали серийными 10-кратными разведениями вируса Коксаки В4 по 100 мкл на лунку от 10^{-1} до 10^{-6} и инкубировали в термостате в течение 5 сут. На 5-е сутки визуально оценивали цитопатический эффект. За титр вируса принимали величину, противоположную десятичному логарифму наибольшего разведения вируса, способного вызвать специфические цитопатические изменения в клетках.

Токсические концентрации ДКВ и рибавирина определяли с помощью микротетразолиевого теста (МТТ) [9]. Вирус культивировали в присутствии препаратов, как описано выше, клетки промывали 1 раз физиологическим раствором, и количество живых клеток оценивали при помощи МТТ, характеризующего интенсивность митохондриального дыхания живых клеток. С этой целью в лунки планшетов добавляли по 100 мкл раствора (5 мг/мл) 3-(4,5-диметилтиазолил-2)2,5-дифенилтетразолия бромид («ICN Biochemicals Inc.», Аурора, Огайо) на физиологическом растворе. Клетки инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO_2 в течение 2 ч и промывали в физиологическом растворе. Осадок растворяли в 100 мкл на лунку этилового спирта, после чего оптическую плотность в лунках планшетов измеряли на многофункциональном ридере Victor 1420 («Perkin Elmer», Финляндия) при длине волны 535 нм. Тест на токсичность считали положительным, если оптическая плотность в лунках с образцами препаратов не была меньше в 2 раза по сравнению с лунками клеточного контроля [10].

Для более точной количественной оценки противовирусных свойств препаратов вирус титровали при помощи метода бляшек. Для этого клетки Vero рассеивали

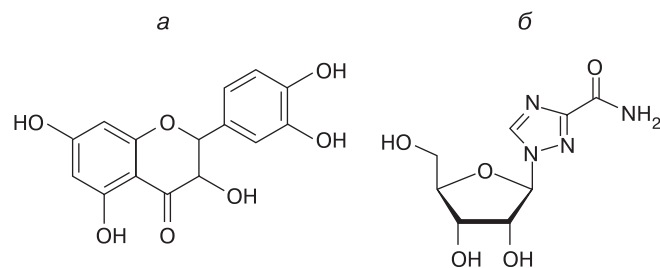


Рис. 1. Структуры ДКВ (а) и рибавирина (б).

Репродукция CVB4 в присутствии химиопрепаратов

Препарат	Титр вируса (в lg EID ₅₀ /0,2 мл) при концентрации препарата, мкг/мл:					
	10	30	100	300	500	0 (контроль вируса)
Рибавирин	-	5,5 ± 0,0	5,5 ± 0,5	5,0 ± 0,0	Токсичность	6,0 ± 0,5
ДКВ	5,0 ± 0,0	4,5 ± 0,0	3,5 ± 0,0	3,5 ± 0,0	-	5,5 ± 0,5

на 6-луночных панелях. После формирования конфлюэнтного монослоя клетки заражали 10-кратными разведениями вируса (2–4 lg EID₅₀/2 мл) и инкубировали при комнатной температуре 30 мин. По истечении указанного времени клетки промывали и заливали раствором, состоящим из среды DMEM с растворенным в ней ДКВ в концентрации 100 мкг/мл и жидким авицелом («Sigma-Aldrich», США) в соотношении 1:1. Контрольные лунки заливали по той же схеме в отсутствие препарата. После этого панели инкубировали в термостате в течение 5 сут. На 5-е сутки лунки окрашивали кристаллическим фиолетовым и подсчитывали число вирусных бляшек в каждой из них.

Для выявления вирулицидных свойств препарата вирус инкубировали с ДКВ в концентрации 100 мкг/мл в течение 1 ч при 37°C в атмосфере 5% CO₂. После этого определяли инфекционный титр вируса в контрольных и опытных образцах, как описано выше.

Для определения стадии вирусного жизненного цикла, на которую действует ДКВ, проводили опыты по срокам добавления препарата. Для этого ДКВ в концентрации 100 мкг/мл добавляли в лунки 24-луночного планшета при различных сроках после инфицирования и инкубировали в термостате до окончания жизненного цикла вируса (6 ч). После этого супернатант каждой концентрации препарата раститровывали на 96-луночной панели и визуально оценивали титр вируса по цитопатическому действию (ЦПД).

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку результатов (расчет средних значений и стандартных отклонений, а также 50% эффективных доз при помощи линейной регрессии) проводили при помощи программы Microsoft Excel. Достоверность различий оценивали по U-критерию Манна–Уитни [11]

Результаты и обсуждение

ДКВ снижал вирусные титры Коксаки В4 *in vitro*. Токсические концентрации препаратов ДКВ и рибавирина составляли более 300 и 500 мкг/мл соответственно. Противовирусная активность изучаемых препаратов

была оценена по ЦПД клеток Vero и результатам МТТ. Результаты титрования вируса представлены в табл. 1. Как видно из приведенных данных, вирус Коксаки В4 эффективно размножался в клетках Vero, достигая титров 5,5 – 6,0 lg EID₅₀/0,2 мл, препарат сравнения рибавирин снижал вирусные титры на 1 lg EID₅₀/0,2 мл в концентрации 300 мкг/мл, ДКВ снижал вирусные титры на 2 lg EID₅₀/0,2 мл в концентрации 100 мкг/мл.

На основе полученных результатов был рассчитан химиотерапевтический индекс (ХТИ) препаратов – отношение 50% цитотоксической дозы (ЦТД₅₀, мкг/мл) к 50% ингибирующей дозы (ИД₅₀, мкг/мл) (табл. 2).

Противовирусную активность ДКВ также оценивали количественно посредством подсчета вирусных бляшек в лунках с контролем вируса и препарата. Результаты представлены на рис. 2 и количественно суммированы в табл. 3.

В отдельной серии экспериментов *in vitro* оценивали вирулицидные свойства ДКВ в концентрации 100 мкг/мл. Как в присутствии ДКВ, так и без него титр вируса составил 5,5 ± 0,0, что свидетельствует об отсутствии у ДКВ вирулицидной активности.

В следующей стадии экспериментов изучали эффективность ДКВ в зависимости от срока его добавления в инфицированную культуру. Результаты суммированы на рис. 3. Наибольшая противовирусная активность ДКВ соответствует ранним стадиям репродукции вируса Коксаки В4 (1–3-й час после заражения). Наименьшие вирусные титры отмечены при добавлении ДКВ в ранние сроки.

В проведенных исследованиях продемонстрирована вирусингибирующая активность ДКВ в отношении вируса Коксаки В4. ДКВ, являясь представителем класса биофлавоноидов, эффективно подавлял репликацию вируса Коксаки В4, снижая вирусные титры на 2 lg EID₅₀/0,2 мл *in vitro* по сравнению с контролем, а также препятствовал образованию вирусных бляшек и деструкции клеточного монослоя. Максимальное снижение вирусных титров при добавлении ДКВ наблюдалось на ранних этапах жизненного цикла (1–3-й час после ин-

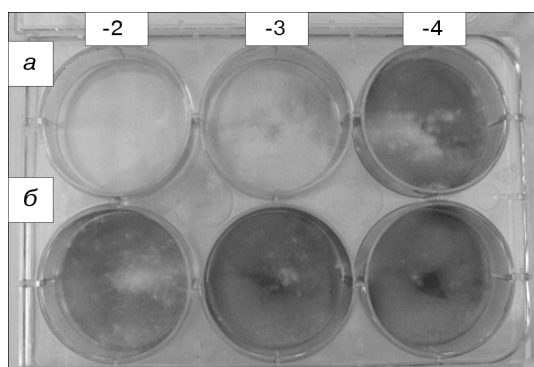


Рис. 2. Патогенное действие CVB4 в присутствии ДКВ. а – ряд контроля вируса; б – ряд ДКВ; -2-3-4 – доза вируса 4, 3 и 2 lg EID₅₀/0,2 мл соответственно.

Таблица 2

Показатели токсичности и противовирусной активности химиопрепаратов

Препарат	ЦТД ₅₀ , мкг/мл	ИД ₅₀ , мкг/мл	ХТИ
ДКВ	> 300,0	7,8	> 38,4
Рибавирин	199,3	17,4	11,4

Таблица 3

Вирусингибирующие свойства ДКВ на модели энтеровирусной инфекции в культуре клеток Vero

Препарат	Количество бляшек при разведении вируса		
	-2	-3	-4
Контроль вируса	Полная деструкция монослоя	> 100	90 ± 10
ДКВ	> 80	40 ± 5	4 ± 1

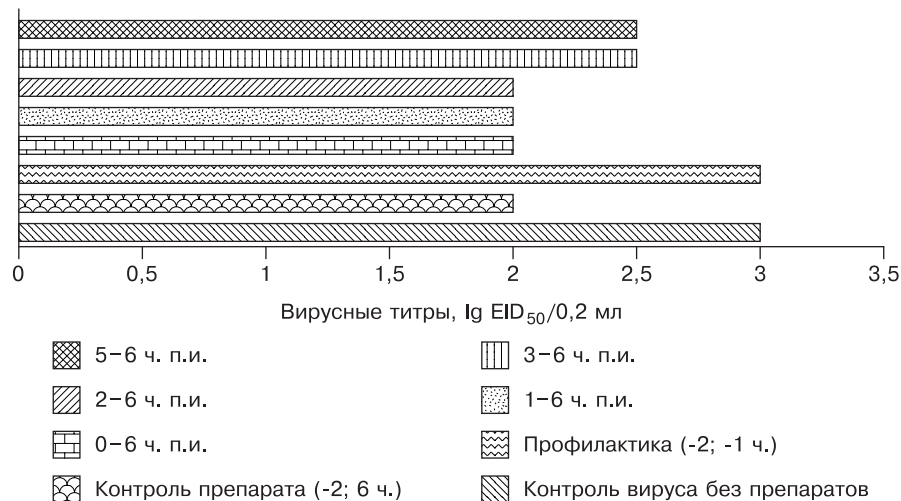


Рис. 3. Репродукция вируса Коксаки В4 в присутствии ДКВ в зависимости от времени добавления. ч. п. и. – час после инфицирования.

фицирования). Кроме того, исследования показали, что данный препарат не обладает вирулицидной активностью в отношении данного вируса.

На сегодняшний день установлено, что ROS играют важную роль в патогенезе многих вирусных инфекций. Например, при Коксаки-вирусной инфекции свободные радикалы приводят к деструктивным процессам в β -клетках поджелудочной железы [12]; при гриппозной инфекции они вызывают повреждения тканей легких [13] и т. д. Главными источниками ROS считаются митохондрии, поскольку они являются энергетическими клеточными центрами и мишенями для вирусных белков, что делает их важным участником иммунной защиты при вирусной атаке на клетки хозяина. Митохондриальная дыхательная цепь (МДЦ), система антиоксидантной защиты и члены семейства Bcl-2 существенно влияют на митохондриальную целостность. МДЦ является конечным этапом продукции аденозинтрифосфата, она обеспечивает перенос электронов от молекул-доноров к акцептору O_2 . Дисбаланс в этой системе приводит к неправильной транспортировке электронов и как следствие к увеличению продукции ROS. Данное явление называется окислительным стрессом. Для предотвращения окислительного стресса в организме существуют защитные механизмы, представленные различными антиоксидантными системами. Антиоксидантные механизмы включают компоненты, представленные энзимными и неэнзимными сквенджерами. Наиболее распространенной системой является глутатионовая (GSH). Данная система помогает обезвреживать ксенобиотики в реакциях конъюгации. К другим важным защитным механизмам можно отнести еще 2 системы: систему каталазы (CAT) и супероксиддисмутазы (SOD). SOD метаболизирует 2 молекулы O_2^- , превращая их в O_2 и H_2O_2 , затем CAT восстанавливает H_2O_2 до O_2 и $2H_2O$. Кроме того, CAT детоксифицирует фенолы и спирты. К неэнзимным механизмам относятся вещества с низкомолекулярной массой, такие как витамин E, C, Se-содержащие компоненты, липоевая кислота и убихиноны [14].

При Коксаки-вирусной инфекции окислительный стресс запускает механизмы клеточного апоптоза, что способствует вирусной репродукции [14]. Антиоксиданты в терапии могут быть использованы в качестве патогенетического средства, направленного против свободных радикалов, образующихся в ходе вирусного патогенеза.

Многие представители класса полифенолов оказывают противовирусное действие на энтеровирусы. Например, эпигаллокатехина галлат эффективно подавляет вирусную репликацию энтеровируса 71-го типа [15]. Эффективно подавляют полиовирусную репликацию флавоноиды, экстрагируемые из растения *Psiadia dentate*, – 3-метилкемпферол, 3,4-диметилкемпферол [16].

С другой стороны, растительные полифенолы и другие антиоксиданты могут снижать вирусные титры вне зависимости от антиоксидантной активности. Например, известный антиоксидант PDTC (пирролидина дитиокарбамат) подавляет репликацию вируса Коксаки В3 посредством угнетения убиквитин-протеасомного пути (UPS) [17]. UPS играет ключевую роль в регуляции фундаментальных клеточных процессов, таких как регуляция клеточного цикла, апоптоз, восстановление ДНК и др.

Исходя из полученных результатов, можно говорить о потенциале ДКВ в качестве противовирусного агента в отношении энтеровирусов, в том числе вируса Коксаки В4. Дополнительные исследования необходимы для выяснения конкретной мишени и механизма его противовирусной активности, а также возможной замены структуры молекулы для повышения ее эффективности.

ЛИТЕРАТУРА (п. п. 2–10, 12–19 с. м. REFERENCES)

1. Энтеровирусная инфекция, лечение, причины, симптомы, профилактика. Available at: <http://www.pitermed.com/simptombolezn/?cat=6&word=55036>
11. U-критерий Манна–Уитни. Available at: <http://medstatistic.ru/theory/mann.html>

REFERENCES

1. Enterovirus infection, treatment, causes, symptoms, prevention. Available at: <http://www.pitermed.com/simptombolezn/?cat=6&word=55036> (in Russian)
2. Suvi Rasilainen. *Coxsackie Virus Infections and Oxidative Stress as Mediators of Beta Cell Damage*: Diss. Helsinki; 2004.
3. Zaoutis T., Klein J.D. Enterovirus Infections. *Pediatr. Rev.* 1998; 19(6): 183–91.
4. Varela-Calvino R., Peakman M. Enteroviruses and type 1 diabetes. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 2003; 19(6): 431–41.
5. Kuo R.L., Shih S.R. Strategies to develop antivirals against enterovirus 71. *Virol. J.* 2013; 10: 28.
6. Piconi L., Quagliari L., Ceriello A. Oxidative stress in diabetes. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2003, 41(9): 1144–9.
7. Kuo R.L., Shih S.R. Strategies to develop antivirals against enterovirus 71. *Virol. J.* 2013; 10: 28.

8. Feng Q., Langereis M.A., Lork M., Nguyen M., Hato S.V., Lanke K. et al. Enterovirus 2Apro targets MDA5 and MAVS in infected cells. *J. Virol.* 2014; 88(6): 3369–78.
9. Pietta P.G. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* 2000; 63(7): 1035–42.
11. Gibellini L., Pinti M., Nasi M., Montagna J.P., De Biasi S., Roat E. et al. Quercetin and cancer chemoprevention. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2011; 2011: 591356.
12. U-Mann–Whitney. Available at: <http://medstatistic.ru/theory/mann.html> (in Russian)
13. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 1983; 65(1–2): 55–63.
14. West I.C. Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabet.Med.* 2000; 17(3): 171–80.
15. Piconi L., Quagliario L., Ceriello A. Oxidative stress in diabetes. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2003, 41(9): 1144–9.
16. Han S.N., Meydani S.N. Antioxidants, cytokines and influenza infection in aged mice and elderly humans. *J. Infect. Dis.* 2000; 182(Suppl. 1): S74–80.
17. Nathan C., Cunningham-Bussell A. Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen. *Nat. Rev. Immunol.* 2013; 13(5): 349–61.
18. Ho H.Y., Cheng M.L., Weng S.F., Leu Y.L., Chiu D.T. Antiviral effect of epigallocatechin gallate on enterovirus 71. *J. Agric. Food Chem.* 2009; 57(14): 6140–7.
19. Robin V., Irurzun A., Amoros M., Boustie J., Carrasco L. Antipoliiovirus flavonoids from *Psidium dentate*. *Antivir. Chem. Chemother.* 2001; 12(5): 283–91.
20. De Palma A.M., Vlieghe I., De Clercq E., Neyts J. Selective inhibitors of picornavirus replication. *Med. Res. Rev.* 2008; 28(6): 823–84. Available at: www.interscience.wiley.com

Поступила 05.05.15

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016
УДК 578.833.29.083.2

Иунихина О. В., Компанец Г. Г.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ СОХРАНЕНИЯ ХАНТАВИРУСА В КОМПЛЕКСАХ С СУБСТРАТАМИ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ

ФГБУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова» СО РАМН, 690087, г. Владивосток

Длительность сохранения вирусов во внешней среде, особенно вирусов инфекций с непрямой передачей, является актуальной проблемой в эпидемиологии. В данной работе представлены результаты экспериментального изучения возможности адсорбции и сохранения хантавируса на различных субстратах внешней среды (природные органические и неорганические сорбенты). Установлена эффективность белоксодержащего раствора для элюции инфекционного хантавируса (5–10% бычий сывороточный альбумин) и фосфатно-солевого буфера с pH 7,2 при обнаружении специфической РНК. Показана возможность сохранения хантавируса в комплексе с субстратами внешней среды до 14 дней при 4°C.

Ключевые слова: хантавирус; адсорбция; сохранение во внешней среде; полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией.

Для цитирования: Вопросы вирусологии. 2016; 61(1): 31–33. DOI 10.18821/0507-4088-2016-61-1-31-33

Iunikhina O.V., Kompanets G.G.

EXPERIMENTAL RESEARCH OF THE HANTAVIRUS SURVIVAL IN COMPLEXES WITH ENVIRONMENTAL SUBSTRATES

G.P. Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 690087, Vladivostok, Russia

Survival of viruses in the environment is a very important problem in epidemiology, especially for infections with indirect transmission. This work describes the results of the experimental study of adsorption and survival of the hantavirus on different environmental substrates (natural organic and inorganic sorbents). Bovine serum albumin (BSA) solution (5–10%) was effective in the hantavirus elution and phosphate-buffer saline (PBS) pH 7.2 was optimal for elution of specific RNA. Potential survival of the infectious hantavirus on environmental substrates was observed within up to 14 days at +4°C.

Key words: hantavirus; adsorption; survival in environment; reverse transcription polymerase chain reaction.

Citation: Voprosy virusologii. 2016; 61(1): 31–33. (In Russ.). DOI 10.18821/0507-4088-2016-61-1-31-33

For correspondence: Olga Iunikhina, MD, PhD; e-mail: olga_iun@inbox.ru

Received 04.08.14

Введение

Хантавирусы, представители рода *Hantavirus* семейства Bunyviridae, как и их основные природные хозяева мелкие грызуны, широко распространены по всему миру и вызывают на территории Евразийского континента геморрагическую лихорадку с почечным синдромом (ГЛПС), а в Северной и Южной Америке – хантавирусный кардиолегочный синдром (ХКЛС). Инфицирование грызунов – природных носителей

вируса, а также людей происходит преимущественно при вдыхании выделений грызунов, контаминированных хантавирусом [1]. Таким образом, для реализации аэрогенного механизма передачи хантавирусы должны обладать определенной стабильностью вне организма хозяина. Длительность сохранения вирусов в окружающей среде является актуальной проблемой для эпидемиологии тех заболеваний, при которых передача возбудителя происходит при прямом контакте с ис-

Для корреспонденции: Иунихина Ольга Викторовна, канд. мед. наук, научный сотрудник лаб. хантавирусных инфекций; e-mail: olga_iun@inbox.ru

точником инфекции. До настоящего времени в литературе появились лишь единичные экспериментальные данные о возможности сохранения инфекционного хантавируса во внешней среде [2, 3].

Ранее нами было показано, что хантавирус способен адсорбироваться на цеолите и бентоните [4]. В то же время не изучалась возможность адсорбции и длительность выживания хантавируса на субстратах, входящих в состав почвы, куда он может попасть с экскретами мышевидных грызунов. Выяснение этих вопросов явилось целью нашей работы.

Материал и методы

В исследованиях использовали супернатант клеток Vero E6, инфицированных штаммом Аа 60343 геновариант Far East вируса Хантаан. Титр инфекционного вируса определяли в образцах вирусосодержащей жидкости до и после контакта вируса с сорбентом с помощью метода выявления инфекционных фокусов [5] и выражали в Ig ФОЕ/мл.

После определения исходного титра (5,0–5,6 Ig ФОЕ/мл) вирусосодержащую жидкость распределяли на аликвоты и хранили при -80°C до соединения с адсорбентами.

В качестве сорбентов использовали частицы цеолита Чугуевского месторождения размером 0,05 мм, бентонита, образцы лесной, садово-огородной, луговой почв из разных районов Приморского края. Адсорбцию проводили согласно описанной ранее методике [4].

Для изучения сохранения жизнеспособности хантавируса образцы вирусосодержащей жидкости, хранившиеся при комнатной температуре (22°C), отбирали каждый час в течение 8 ч, а при хранении в условиях холодильника (4°C) ежедневно в течение 3 нед.

Для оценки эффективности элюции и сохранения вируса в комплексе с сорбентом через определенные промежутки времени супернатант удаляли центрифугированием при 1000 об/мин в течение 10 мин, а осадок однократно промывали стерильной дистиллированной водой и повторно центрифугировали при указанных выше условиях. К полученному осадку сорбента добавляли элюирующий раствор, тщательно встряхивали, оставляли на контакт в течение 30 мин и отбирали пробы элюата. В качестве элюирующих растворов использовали стерильные фосфатно-солевой буфер (ФСБ) pH 7,2, боратно-буферный раствор (ББР) pH 9,0 и 5–10% раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА), приготовленный на ФСБ pH 7,2 и ББР pH 9,0.

Для выделения вирусной РНК использовали набор реагентов производства «АмплиСенс» (РИБО-сорб и РИБО-золь-С, АмплиСенс Hantavirus-EPh, Реверта-L, ЭФ) для полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле согласно инструкции производителя.

Результаты и обсуждение

Экспериментально показано, что при комнатной температуре (22°C) защищенный от прямого воздействия солнечного света в жидкой среде хантавирус сохраняет инфекционность только в течение ограниченного времени, о чем свидетельствовало резкое снижение титра вируса в течение суток до уровня, не определяемого с помощью использованного метода. При хранении вирусосодержащей жидкости при 4°C выявлено постепенное снижение титра вируса до 1,8 ФОЕ/мл к 21-му дню опыта.

Все исследуемые образцы субстратов полностью адсорбировали хантавирус из вирусосодержащей жидкости

Элюция хантавируса из комплексов вирус + сорбент

Субстрат	Эффективность элюции (исходный титр вируса 5,0–5,6 Ig/мл), Ig			
	ФСБ pH 7,2	ББР pH 9,0	5–10% БСА на ББР pH 9,0	5–10% БСА на ФСБ pH 7,2
Цеолит 0,05 мм	РНК	н. о.	2,8	3,0–3,5
Лесная почва	РНК	н. о.	2,5–4,0	2,5–3,2
Луговая почва	РНК	н. о.	н. и.	2,5 Ig
Садово-огородная почва	РНК	н. о.	н. и.	РНК
Солома	РНК	н. о.	н. и.	РНК

Примечание. н. и. – не исследовали; РНК – обнаружена только специфическая РНК в ОТ-ПЦР; н. о. – не обнаружен хантавирус при титровании на культуре клеток.

в течение 1–3 сут при 4°C , что подтверждалось отсутствием вируса в надосадочной жидкости.

Элюция хантавируса из комплекса с сорбентом происходила только при использовании растворов, содержащих белок: 5–10% БСА на ФСБ pH 7,2 и ББР pH 9,0 (см. таблицу). Эффективность элюции также зависела от типа сорбента. При адсорбции на цеолит восстановление составило в среднем 3,5 Ig ФОЕ/мл при использовании в качестве основы буфера с нейтральной pH (щелочной буфер восстанавливал до 2,8 Ig ФОЕ/мл). При элюции хантавируса с образцом лесной почвы наиболее эффективным оказался щелочной буфер (до 4,0 Ig ФОЕ/мл) по сравнению с ФСБ pH 7,2 (до 3,2 Ig ФОЕ/мл). Использование разной концентрации белка (5 или 10%) не показало существенных различий в показателях титра восстановленного вируса ($\pm 0,2$ Ig ФОЕ/мл).

Образцы элюирующих растворов независимо от результатов титрования на культуре клеток Vero E6 были исследованы с помощью ОТ-ПЦР на наличие специфической РНК. В результате получены данные о присутствии РНК хантавируса в элюатах не только при десорбции белоксодержащим раствором, но и при использовании раствора ФСБ (pH 7,2). Так, в элюатах с садово-огородной почвы титр хантавируса на культуре клеток не определялся, однако в пробах была обнаружена специфическая РНК. Отмечено наличие специфической РНК после хранения элюатов (ФСБ pH 7,2 и 5% БСА) с цеолита (фракция 0,05 мм) и лесной почвы после хранения при 4°C до 14-го дня.

Несмотря на то что после хранения комплексов сорбент – хантавирус в течение 7–14 дней при 4°C титр вируса не определялся, после 2 пассажей элюата на культуре клеток Vero E6 антиген хантавируса обнаружен в 80% клеток с помощью непрямого метода флюоресцирующих антител.

Вирусы, являясь внутриклеточными паразитами, не способны размножаться вне организма чувствительного хозяина, однако возможность сохранения инфекционности в разных условиях внешней среды играет важную роль в поддержании инфекционного процесса. Наиболее хорошо изучена способность некоторых вирусов сохраняться в водной среде, что может приводить к возникновению крупных вспышек заболевания среди людей [6]. Также доказано выживание некоторых вирусов в окружающей среде. Например, энтеровирусы и реовирусы не просто эффективно адсорбируются на частицы неорганических веществ, но такая связь способствует их выживанию и персистенции в различных экосистемах [7].

Таким образом, для реализации непрямого механизма передачи хантавируса должны обладать определенной

стабильностью вне организма хозяина. Аэрогенный механизм заражения при хантавирусной инфекции признан на основании многочисленных эпидемиологических данных, в том числе результатах анализа лабораторных вспышек ГЛПС [1], а также данных о периодичности выделения хантавируса грызунами во внешнюю среду с мочой, калом и слюной на фоне длительной персистентной инфекции [8–10].

Полученные нами данные свидетельствуют не только о возможности обратимой адсорбции хантавируса с различных природных субстратов, но и о сохранении в них инфекционного вируса в течение 14 дней при благоприятных условиях (пониженная температура, отсутствие солнечного света, влажность), которые наблюдаются в норах и других природных убежищах мышевидных грызунов. Эти данные согласуются с результатами, полученными ранее другими авторами, но выявленные различия в сроках сохранения инфекционного вируса (до 18 [3] и 96 [2] дней при 4°C) по всей видимости отражают различную чувствительность применяемых методик анализа, что подтверждается обнаружением специфической РНК и выделением вируса после нескольких пассажей на культуре клеток.

Эффективность использования белоксодержащего раствора для десорбции вируса по всей вероятности связана с феноменом конкуренции за специфические участки адсорбции на поверхности между молекулами белка и вирусными частицами, а также со снижением силы гидрофобных связей между вирусом и поверхностью сорбента, например почвы [11, 12]. Можно предположить, что данный механизм реализуется и при попадании частиц пыли с адсорбированным вирусом в дыхательные пути, когда наряду с процессом фагоцитоза контакт с биологическими жидкостями, богатыми белком, способствует проникновению хантавируса в чувствительные клетки хозяина.

Заключение

Таким образом, несмотря на то что аэрогенный путь заражения хантавирусом является основным путем инфицирования, сроки выживания патогена вне организма природного хозяина и соответственно его инфекционный потенциал существенно ограничены даже при благоприятных условиях, что подтверждается преимущественной регистрацией спорадических случаев заболевания ГЛПС и ХКЛС. В то же время такие благоприятные условия могут сохраняться в норах грызунов, что наряду с прямым путем заражения обеспечивает поддержание инфекционного процесса даже при низких показателях численности и инфицированности популяций природных хозяев хантавируса.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1–3, 5–12 с.м. REFERENCES)

4. Иунихина О.В., Компанец Г.Г., Слонова Р.А. Способность хантавируса адсорбироваться на почвообразующих минеральных частицах. *Дальневосточный журнал инфекционной патологии*. 2008; 13: 134–8.

REFERENCES

1. Schmaljohn C., Hjelle B. Hantaviruses: a global disease problem. *Emerg. Infect. Dis.* 1997; 3 (2): 95–104.
2. Hardestam J., Simon M., Hedlund K.O., Vaheri A., Klingstrom J., Lundkvist A. Ex vivo stability of the rodent-borne Hantaan virus in comparison to that of arthropod-borne members of the Bunyaviridae family. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007; 73 (8): 2547–51.
3. Kallio E.R., Klingstrom J., Gustafsson E., Manni T., Vaheri A., Henttonen H. et al. Prolonged survival of Puumala hantavirus outside the host: evidence for indirect transmission via the environment. *J. Gen. Virol.* 2006; 87 (8): 2127–34.
4. Iunikhina O.V., Kompanets G.G., Slonova R.A. Ability of hantavirus adsorbs on soil forms mineral particle. *Dal'nevostochnyy zhurnal infektsionnoy patologii*. 2008; 13: 134–8. (in Russian)
5. Lee P.W., Gibbs C.J., Gajdusek D.C., Yanagihara R.T. Serotypic classification of hantavirus by indirect immunofluorescent antibody and plaque reduction neutralization tests. *J. Clin. Microbiol.* 1985; 22 (6): 940–4.
6. Sinclair R.G., Jones E.L., Gerba C.P. Viruses in recreational waterborne disease outbreaks: a review. *J. Appl. Microbiol.* 2009; 107 (6): 1769–80.
7. Sobsey M.D., Meschke J.S. Virus survival in the environment with special attention to survival in sewage droplets and other environmental media of fecal or respiratory origin. World Health Organization. 2003. Available at: http://www.unc.edu/courses/2008spring/envr/421/001/WHO_VirusSurvivalReport_21Aug2003.pdf. (Accessed 29 May 2014).
8. Bernshtein A.D., Apekina N.S., Mikhailova T.V., Myasnikov Y.A., Khlyap L.A., Korotkov Y.S. et al. Dynamics of Puumala hantavirus infection in naturally infected bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *Arch. Virol.* 1999; 144 (12): 2415–28.
9. Calisher C.H., Peters C.J., Douglass R.J., Kuenzi, A.J. Hantaviral infections of rodents: Possible scenarios. *Arch. Virol.* 2009; 154 (8): 1195–7.
10. Yanagihara R., Amyx H.L., Gajdusek D.C. Experimental infection with Puumala virus, the etiologic agent of nephropathia epidemica, in bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *J. Virol.* 1985; 55 (1): 34–8.
11. Monpoeho S., Maul A., Mignotte-Cadiergues B., Schwartzbrod L., Billaudel S., Ferre V. Best viral elution method available for quantification of enteroviruses in sludge by both cell culture and reverse transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001; 67 (6): 2484–8.
12. Quignon F., Thomas F., Gantzer C., Huyard A., Schwartzbrod L. Virus adsorption in a complex system: an experimentally designed study. *Wat. Res.* 1998; 32 (4): 1222–30.

Поступила 04.08.14

Мошковиц Г. Ф.¹, Минаева С. В.^{1,2}, Варлова Л. В.¹, Горяева М. П.¹, Гуляева С. С.¹, Тихонова Е. В.¹

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ НУКЛЕОЗИДНЫХ ИНГИБИТОРОВ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПТАЗЫ В СХЕМАХ АНТИРЕТРОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ У БОЛЬНЫХ, ПОЛУЧАЮЩИХ ЛЕЧЕНИЕ ХРОНИЧЕСКОГО ГЕПАТИТА С

¹ГБУЗ НО «Нижегородский областной центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями», 603005, г. Нижний Новгород; ²ГОУ ВПО «Нижегородская медицинская академия» Минздрава России, 603005, г. Нижний Новгород

Проведено исследование эффективности, безопасности и экономической составляющей использования абакавира, зидовудина, ставудина и фосфазида в схемах антиретровирусной терапии (АРВТ) у больных ВИЧ-инфекцией, получающих противовирусное лечение хронического гепатита С (ХГС). Оценивали клиническую, иммунологическую и вирусологическую эффективность лечения и динамику показателей гемоглобина, тромбоцитов и аланинаминотрансферазы как маркеров наиболее часто регистрируемых нежелательных побочных явлений на момент начала противовирусной терапии ХГС, через 4, 8, 12, 24 и 48 нед лечения. Применение в схемах АРВТ указанных препаратов показало эффективность, хорошую переносимость и безопасность всех исследуемых нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы.

Ключевые слова: коинфекция ВИЧ и хронического гепатита С; анемия; тромбоцитоз; тромбоцитопения; полинейропатия; липодистрофия; иммунологическая и вирусологическая эффективность; фосфазад.

Для цитирования: Вопросы вирусологии. 2016; 61(1): 34–39. DOI 10.18821/0507-4088-2016-61-1-34-39

Moshkovich G.F.¹, Minaeva S.V.^{1,2}, Varlova L.V.¹, Goryaeva M.P.¹, Gulyaeva S.S.¹, Tichonova E.V.¹

CLINICAL AND PHARMACOECONOMIC RESULTS OF THE USAGE OF VARIOUS HIV REVERSE TRANSCRIPTASE INHIBITORS IN THE SCHEMES OF ANTIRETROVIRAL THERAPY OF PATIENTS RECEIVING THERAPY FOR THE CHRONIC HEPATITIS C VIRUS

¹ Nizhny Novgorod Regional Center for Control and Prevention of AIDS and Infectious Diseases, 603005, Nizhny Novgorod, Russia; ² Nizhny Novgorod Medical Academy, 603005, Nizhny Novgorod, Russia

Efficacy, safety, and economical aspects of treatment with abacavir, zidovudine, stavudine, and phosphazide in the schemes of antiretroviral therapy of the HIV-infected patients receiving therapy for hepatitis C virus were tested. Clinical, immunological, and virologic efficacy of treatment and dynamics of hemoglobin, thrombocytes, and alanine aminotransferase as markers of common adverse events recorded at the start of the antiviral therapy of chronic hepatitis C and after 4, 8, 12, 24, 48 weeks of the treatment were evaluated. The usage of these drugs in the schemes of antiretroviral therapy exhibited efficacy, high tolerability and safety for all HIV reverse transcriptase inhibitors.

Key words: HIV/hepatitis C virus coinfection; anemia; thrombocytosis; thrombocytopenia; polyneuropathy; lipodystrophy; immunological and virologic efficacy; phosphazide.

Citation: Voprosy virusologii. 2016; 61(1): 34–39. (in Russian). DOI 10.18821/0507-4088-2016-61-1-34-39

For correspondence: Stella Minaeva, MD, PhD; e-mail: mistella@yandex.ru

Received 25.09.14

Введение

Наличие хронического гепатита С (ХГС) является отягчающим фактором при ВИЧ-инфекции. Известно неблагоприятное влияние сопутствующей вирусной патологии печени на течение ВИЧ-инфекции, поэтому при определении активности ХГС у больного ВИЧ-инфекцией необходима противовирусная терапия даже при одновременном применении антиретровирусной терапии (АРВТ) ВИЧ-инфекции. АРВТ может улучшать состояние печени и замедлять прогрессирование печеночной недостаточности [1]. В связи с этим важно подобрать такое сочетание антиретровирусных препаратов, которое максимально способствовало бы противовирусному воздействию на вирус гепатита С и сохранило противовирусное влияние на ВИЧ.

Протоколами лечения больных ВИЧ-инфекцией [2] пациентам с сочетанной патологией в схемах АРВТ при одновременном лечении ВИЧ-инфекции и противовирусной терапии ХГС рекомендуется использовать пре-

параты из класса нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы (НИОТ) – тенофовир и эмтрицитабин, абакавир и фосфазад.

В 2011 г., когда начинали проводить противовирусную терапию ХГС в исследуемой группе больных, НИОТ тенофовир и эмтрицитабин (или комбинированный препарат трувада) были недоступны большинству пациентов в России, так как до 2015 г. они не входили в Перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов. Зидовудин и ставудин не рекомендовались для применения в схемах АРВТ при одновременном лечении ХГС. Однако и ставудин (риск развития стеатоза печени), и зидовудин (увеличивает частоту случаев развития анемии) использовались в схемах АРВТ и применяются до настоящего времени по разным причинам, в том числе экономическим.

Препараты для лечения ХГС вызывают присущие им нежелательные явления. Пегилированные интерфероны оказывают иммуносупрессивное действие, что может

способствовать развитию у больных ВИЧ-инфекцией новых и рецидивированию имеющихся оппортунистических заболеваний, а, следовательно, прогрессированию ВИЧ-инфекции. Рибавирин, как и некоторые НИОТ, оказывает токсическое действие на кроветворение: появляется риск развития гемолитической анемии, требующей снижения дозы рибавирина или отмены препарата.

В ряде наблюдений отмечено, что после начала АРВТ у некоторых больных с сопутствующим гепатитом С регистрировались повышенные показатели печеночных трансаминаз [1]. Это связывают с вызываемой антиретровирусными препаратами митохондриальной токсичностью [3], которая, однако, не приводит к жировой дистрофии печени, гиперлактатемии и лактоацидозу [4]. Следовательно, АРВТ не должна быть причиной задержки противовирусной терапии ХГС.

Другими исследованиями было показано, что риск гепатотоксичности выше у больных, инфицированных генотипом 3 ХГС, чем при других генотипах, и составляет от 2 до 18% [5]. Повышение уровня печеночных ферментов может быть следствием реакции гиперчувствительности на фоне приема эфавиренза, абакавира и прямого повреждения печени ритонавиром. Несмотря на риск гепатотоксичности антиретровирусных препаратов при терапии ХГС, польза от лечения перевешивает риск [6].

Как свидетельствуют результаты отечественных исследований, в схемах АРВТ рекомендуется применять принадлежащий к группе НИОТ фосфазад в сочетании с ламивудином как наиболее эффективную комбинацию, имеющую лучшие показатели безопасности у больных, получающих терапию ХГС [7, 8].

Целью исследования было изучение эффективности и безопасности различных НИОТ в схемах АРВТ и экономической составляющей при проведении противовирусной терапии ХГС.

Материал и методы

В исследование включены больные ВИЧ-инфекцией, получавшие лечение ХГС на фоне эффективной АРВТ (неопределяемая вирусная нагрузка в течение 12 мес лечения) в 2011–2012 гг. Диагноз ВИЧ-инфекции был установлен на основании клинических, эпидемиологических данных и подтвержден положительным результатом на антитела к ВИЧ методом иммунного блоттинга. Диагноз ХГС подтвержден положительным результатом исследования маркеров гепатита С.

Пациенты распределены на 4 группы в зависимости от принимаемого НИОТ в составе комбинации антиретровирусных препаратов: 26 больных получали зидовудин 600 мг в сутки (в составе комбинированного препарата комбивир – зидовудин 300 мг + ламивудин 150 мг) («Ви-иВ Хелскер», Великобритания), 26 больных – абакавир 600 мг в сутки (в составе комбинированного препарата кивекса – абакавир 300 мг + ламивудин 150 мг) («Ви-иВ Хелскер», Великобритания), 28 больных – ставудин 60 мг в сутки («Эмкюр Фармасьютикалз Инк.», США) + ламивудин 300 мг в сутки («Ви-иВ Хелскер», Великобритания) и 29 больных – фосфазад 800 мг в сутки (ООО «АЗТ Фарма К.Б.», Россия) + ламивудин 300 мг в сутки. Третьим препаратом был нуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы (ННИОТ) эфавиренз 600 мг в сутки («Мерк Шарп и Доум Б. В.», Нидерланды), который получали 49 (44,9%) больных, или бустированный ритонавиром 100 мг в сутки («Хетеро Драгс Лимитед», Индия) ингибитор протеазы (ИП) атазанавир 300 мг в сутки («Бристол-Майерс Сквипбб Компани», США), дарунавир 800 мг в сутки («Янссен-Орто ЛЛС», Пуэрто-Рико), лопинавир 800 мг в сутки («Эбботт ГмБХ и Ко. КГ», Германия) – 58 (53,3%) больных, 2 (1,8%) больных

получали ингибитор интегразы (ИИ) ралтегравир 800 мг в сутки («Мерк Шарп и Доум Б. В.», Нидерланды). Обоснованием для начала противовирусной терапии гепатита С был положительный результат исследования на наличие РНК гепатита С, повышение уровня печеночных ферментов.

Лечение гепатита С проводили в соответствии с рекомендациями по лечению хронических гепатитов у больных ВИЧ-инфекцией [9, 10]. Продолжительность терапии определялась генотипом вируса гепатита С.

Применяли пегилированный интерферон (α 2а-пегинтерферон (пегасис) («Хоффман-Ля Рош», Швейцария) в дозе 180 мкг/нед или α 2b-пегинтерферон (пегинтрон) в дозе 1,5 мг/кг/нед) («Шеринг Плау», Ирландия) и рибавирин (ООО «Озон», Россия), дозировке которого в целях исключения лекарственного взаимодействия рибавирина с НИОТ рассчитывались исходя из 13,5 мг на 1 кг массы тела больного в сутки.

Эффективность лечения ХГС оценивали по наличию РНК HCV в сыворотке крови на 4-й неделе лечения: быстрый вирусологический ответ (БВО), на 8-й и 12-й неделях: полный ранний вирусологический ответ (ПРВО), на 24-й, 48-й неделе (у больных с генотипом 1) и через 24 нед после окончания терапии: устойчивый вирусологический ответ (УВО).

Оценивали динамику показателей гемоглобина, тромбоцитов и аланинаминотрансферазы (АЛТ) как маркеров наиболее часто регистрируемых нежелательных побочных явлений, нежелательные побочные явления на дату начала терапии, на 4, 8, 12, 24 и 48-й неделях лечения ХГС. В те же сроки исследовали показатели иммунитета (количество CD4⁺-лимфоцитов в 1 мкл) методом проточной цитофлюорометрии на оборудовании FACSCount с использованием моноклональных антител фирмы «Becton Dickinson». Уровень РНК ВИЧ и РНК HCV в плазме как критерий вирусологической эффективности определялся методом ПЦР при помощи наборов Abbott и АмплиСенс ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора. Исследование показателей гемоглобина (в г/л) и тромбоцитов (в кл. · 10⁹/л) проведено с использованием гематологического анализатора AcT diff «Beckman Coulter». Показатели АЛТ (в Е/л) исследовали на биохимическом анализаторе А-15 «BioSystems». Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программ Microsoft Office Excel для Windows XP Professional, версия 2007 г. Определяли среднее значение, ошибку среднего, медиану. Для оценки различий показателей в процессе исследования применяли критерий Стьюдента.

Результаты и обсуждение

В исследование включены 109 больных ВИЧ-инфекцией, получавших противовирусную терапию ХГС на фоне АРВТ, из них 80 (73,4%) мужчин.

Характеристика групп больных представлена в табл. 1. Средний возраст больных во всех группах не различался, достоверно преобладали мужчины. В зависимости от состава АРВТ в группах, получавших абакавир и зидовудин, достоверно преобладали ННИОТ (61,5 и 53,8% соответственно), а в группах пациентов, получавших ставудин и фосфазад, – ИП (60,7 и 70% соответственно). Кроме того, в группах пациентов, получавших зидовудин и ставудин по одному пациенту в каждой, в схему АРВТ был включен ИИ ралтегравир.

Все больные получали АРВТ более 12 мес до начала противовирусной терапии гепатита С, АРВТ была эффективна (вирусная нагрузка менее 50 копий/мл).

В табл. 2 показано распределение пациентов в зависимости от выявленного генотипа вируса гепатита С.

Генотип 1b преобладал в группах, получавших абакавир и фосфазад (53,8 и 51,7% соответственно), а генотип

Характеристика групп пациентов, включенных в исследование

Препарат	Возраст, $M \pm m$	Пол – число больных, абс./отн.		ННИОТ – число больных, абс./отн.	ИП – число больных, абс./отн.	ИИ – число больных, абс./отн.
		м.	ж.			
Абакавир (26 больных)	33,7 ± 1,9	17/65,4	9/34,6	16/61,5	10/38,5	0
Зидовудин (26 больных)	32,7 ± 2,7	20/76,9	6/23,1	14/53,8	11/42,4	1/3,8
Ставудин (28 больных)	32,1 ± 1,6	22/78,6	6/21,4	10/35,7	17/60,7	1/3,6
Фосфазид (29 больных)	33,8 ± 2,2	21/72,4	8/37,6	9/30,0	20/70,0	0

Примечание. Здесь и в табл. 4–7: $M \pm m$ – среднее значение ± ошибка среднего.

Таблица 2

Распределение пациентов в зависимости от выявленного генотипа ХГС

Препарат	1b – число больных, абс./отн.	2 – число больных, абс./отн.	3a – число больных, абс./отн.	Неопределенный генотип – число больных, абс./отн.
Абакавир (26 больных)	14/53,8	2/7,7	8/30,8	2/7,7
Зидовудин (26 больных)	7/26,9	1/3,8	18/69,3	0
Ставудин (28 больных)	12/42,9	0	16/57,1	0
Фосфазид (29 больных)	15/51,7	1/3,4	11/38,0	2/6,9

3a – в группах, получавших зидовудин и ставудин (69,3 и 57,1% соответственно). В группах, получавших абакавир и фосфазид, было по 2 больных с неопределенным генотипом (7,7 и 6,9% соответственно). Согласно современным рекомендациям [2, 9], продолжительность терапии ХГС у больных с генотипами 1b, 2 и неопределенным генотипом составляла 48 нед, у больных с 3a-генотипом – 24 нед.

Уровень вирусной нагрузки HCV до начала лечения во всех группах составлял 6 log.

Результаты лечения – число пациентов (абсолютное и относительное) с неопределяемой вирусной нагрузкой - ПЦР HCV в разные сроки представлены в табл. 3.

Эффективность терапии оценивали по результатам качественного и количественного исследования РНК HCV на 4-й неделе, дополнительно на 8, 12 и 24-й недели лечения и через 24 нед после окончания терапии. В случае отсутствия снижения менее чем на 2 lg МЕ/мл

относительно исходных значений терапию прекращали. По значениям УВО противовирусная терапия достоверно была более эффективной у больных, получавших в составе АРВТ зидовудин, ставудин и фосфазид (соответственно 73,7, 71,4 и 65%), чем у больных, получавших абакавир (41,7%; $p < 0,05$). При этом достоверно наибольшая доля больных с БВО (33,3%) как наиболее ранним показателем эффективности лечения выявлена в группе больных, получавших фосфазид, наименьшая доля – 10% ($p < 0,05$) в группе получавших абакавир и ставудин. Можно предположить, что причиной низкой эффективности терапии в группе получавших абакавир является значительная доля больных с генотипом 1b (53,8%). Вместе с тем доля больных с этим генотипом была такой же (51,7%) в группе получавших фосфазид. Не исключено, что определенную роль сыграло лекарственное взаимодействие рибавирина и абакавира.

Таблица 3

Результаты лечения в группах пациентов

Срок лечения	Абакавир – 26 больных, абс./отн.	Зидовудин – 26 больных, абс./отн.	Ставудин – 28 больных, абс./отн.	Фосфазид – 29 больных, абс./отн.
4 нед (БВО)	1/10,0*	3/15,8*	2/10,0*	6/33,3*
8 нед	1/10,0*	9/47,4*	8/40,0*	6/33,3*
12 нед (ПРВО)	5/50,0*	6/31,6*	9/45,0*	5/27,8*
24 нед	3/30,0*	1/5,2*	1/5,0*	1/5,6*
Через 24 нед после окончания лечения (УВО)	10/41,7**	19/73,7**	20/71,4**	18/65,0**

Примечание. * – от числа больных с УВО; ** – от общего числа получавших противовирусную терапию ХГС.

Таблица 4

Динамика показателей гемоглобина

Препарат	Начало ПТВ, $M \pm m$, Ме (min–max)	4-я неделя ПТВ, $M \pm m$, Ме (min–max)	8-я неделя ПТВ, $M \pm m$, Ме (min–max)	12-я неделя ПТВ, $M \pm m$, Ме (min–max)	24-я неделя ПТВ, $M \pm m$, Ме (min–max)	48-я неделя ПТВ, $M \pm m$, Ме (min–max)
Абакавир (26 больных)	129,4 ± 9,5, 129,5 (96–168)	115,1 ± 9,4, 114 (89–150)	112,8 ± 8,1, 111 (92–140)	106,6 ± 8,0, 101 (80–137)	107,1 ± 7,8, 103 (82–141)	121,5 ± 9,6, 124 (102–141)
Зидовудин (26 больных)	131,6 ± 8,0, 133 (89–167)	102,4 ± 6,4, 98 (86–149)	106 ± 8,0, 103 (88–145)	106,1 ± 7,6, 107 (76–133)	108,2 ± 6,7, 104,5 (93–141)	110 ± 18,5, 111 (65–151)
Ставудин (28 больных)	134,7 ± 8,2, 143 (80–163)	115 ± 9,8, 113 (80–165)	115,9 ± 7,8, 115 (85–161)	117 ± 6,9, 113,5 (90–157)	119 ± 9,3, 121 (78–151)	126,1 ± 16,9, 131 (92–159)
Фосфазид (29 больных)	141,5 ± 7,8, 142 (116–164)	105,1 ± 8,5, 106 (79–139)	106,5 ± 9,5, 106,5 (65–146)	116,4 ± 11,7, 116 (55–157)	119,5 ± 7,9, 122 (90–144)	122,4 ± 20,9, 115 (103–149)

Примечание. Здесь и в табл. 5–7: ПТВ – противовирусная терапия; Ме – медиана.

Динамика количества тромбоцитов во время лечения в группах пациентов

Препарат	Начало ПВТ, $M \pm m$, Ме (min–max)	4-я неделя ПВТ, $M \pm m$, Ме (min–max)	8-я неделя ПВТ, $M \pm m$, Ме (min–max)	12-я неделя ПВТ, $M \pm m$, Ме (min–max)	24-я неделя ПВТ, $M \pm m$, Ме (min–max)	48-я неделя ПВТ, $M \pm m$, Ме (min–max)
Абакавир (26 больных)	225,2 ± 23,8, 223 (142–306)	213,1 ± 25,2, 215 (121–330)	203,6 ± 23,3, 200 (76–268)	198,9 ± 25,4, 213,5 (98–288)	223,4 ± 24,2, 216 (110–304)	231,3 ± 18,5, 236 (205–264)
Зидовудин (26 больных)	260,7 ± 24,9, 258 (155–338)	254 ± 24,1, 267,5 (178–330)	180,4 ± 31,1, 170 (26–333)	194,6 ± 33,2, 195 (65–320)	193,9 ± 32,9, 213 (60–274)	252 ± 38,0, 240 (219–317)
Ставудин (28 больных)	225,8 ± 26,9, 235 (120–361)	213,3 ± 21,1, 223 (120–294)	224,8 ± 28,9, 220 (110–339)	205,2 ± 22,8, 200 (100–323)	205,1 ± 17,7, 202 (158–270)	211,4 ± 51,2, 205 (149–300)
Фосфазид (29 больных)	240,4 ± 40,3, 237 (145–396)	235,5 ± 31,2, 228,5 (135–357)	225,9 ± 41,0, 233 (74–350)	176,3 ± 24,1, 178 (98–247)	187,7 ± 32,3, 198,5 (89–355)	182,5 ± 89,7, 144,5 (92–437)

Таблица 6

Динамика количества CD4⁺-лимфоцитов в группах пациентов

Препарат	Начало ПВТ, $M \pm m$, Ме (min–max)	4-я неделя ПВТ, $M \pm m$, Ме (min–max)	8-я неделя ПВТ, $M \pm m$, Ме (min–max)	12-я неделя ПВТ, $M \pm m$, Ме (min–max)	24-я неделя ПВТ, $M \pm m$, Ме (min–max)	48-я неделя ПВТ, $M \pm m$, Ме (min–max)
Абакавир (26 больных)	333,8 ± 29,9, 320 (209–524)	348,4 ± 40,0, 338 (256–563)	316,4 ± 50,2, 342 (125–401)	346,6 ± 30,4, 362 (192–449)	347,3 ± 25,8, 355,5 (279–469)	300,1 ± 45,5, 301 (200–370)
Зидовудин (26 больных)	450,8 ± 73,2, 388 (299–849)	415,7 ± 69,1, 387 (203–615)	380,9 ± 74,4, 354 (174–697)	381,4 ± 59,1, 369 (225–610)	344,9 ± 80,9, 311 (111–800)	443 ± 122,1, 398 (378–598)
Ставудин 28 больных	350,5 ± 35,1, 334 (238–732)	368,5 ± 34,8, 351 (287–600)	375,5 ± 50, 352 (199–794)	384 ± 41,4, 378,5 (225–697)	383,4 ± 47,1, 372,5 (199–728)	377,8 ± 78,8, 348 (277–590)
Фосфазид 29 больных	523,1 ± 130,6, 400 (268–1293)	387,1 ± 55,3, 360 (163–763)	374,1 ± 69,8, 381 (134–638)	372,9 ± 53,8, 367,5 (198–607)	397,7 ± 70,5, 387 (97–910)	333,2 ± 36,0, 361 (241–400)

Нежелательные явления, связанные с применением пегилированных интерферонов и рибавирина, регистрировали во всех группах с одинаковой частотой – гриппоподобный синдром у 67–71% больных, слабость у 60–68%, тошноту у 29–30%, диарею у 20–26%, кашель и одышку у 5–7%, снижение массы тела у 10–14%.

Для оценки влияния НИОТ на систему кроветворения проанализирована динамика показателей гемоглобина и тромбоцитов. Результаты представлены в табл. 4 и 5.

Анализ динамики уровней гемоглобина показал, что во всех группах различия недостоверны; отмечено снижение показателей гемоглобина начиная с 4-й недели лечения, при этом наиболее выраженное наблюдалось на фоне применения зидовудина и фосфазиды – на 30–35 г/л. Восстановление показателей до нормальных произошло к 48-й неделе лечения во всех группах, кроме получавших зидовудин (110 ± 18,5). 7 (26,9%) больным из числа получавших зидовудин и 3 (10,3%) больным из группы фосфазиды понадобилось назначение эритропоэтина (40 000 ЕД в неделю) в течение 4–6 нед, а 3 (11,5%) больным, получавшим зидовудин, была уменьшена доза рибавирина. Отмены противовирусной терапии хронического гепатита не потребовалось.

Анализ динамики количества тромбоцитов показал его уменьшение у всех пациентов, однако не выявил значительных колебаний средних значений. У 1 паци-

ента, получавшего в схеме АРВТ зидовудин, на 8-й неделе лечения зарегистрирована выраженная тромбоцитопения до $26 \cdot 10^9$ /л. Отмены лечения не потребовалось. У пациентов, получавших в схеме АРВТ фосфазид, с 12-й по 48-ю неделю средние значения граничили с нормой.

Динамика иммунологических показателей (количества CD4⁺-лимфоцитов) показана в табл. 6.

При анализе динамики средних значений CD4⁺-лимфоцитов установлено, что во всех группах пациентов в течение всего времени лечения показатели были стабильны в пределах 350–415 кл/мкл. Несколько выше были средние значения в начале терапии в группе фосфазиды (523 кл/мкл), а самые низкие – в группе абакавира (333 кл/мкл). Отмечено снижение числа клеток до 97 на 24-й неделе лечения в группе фосфазиды, до 111 на 24-й неделе лечения в группе получавших зидовудин, до 125 – на 12-й неделе лечения у больного, получавшего абакавир (по одному больному в каждой группе). Коррекции схем АРВТ не потребовалось.

Принимая во внимание возможную гепатотоксичность антиретровирусных препаратов, проанализировали динамику одного из биохимических показателей функции печени – АЛТ (табл. 7).

На дату начала противовирусной терапии самые высокие средние значения АЛТ зарегистрированы в группах зидовудина, ставудина и фосфазиды (81,4, 76,7 и 81,6 Е/л соот-

Таблица 7

Динамика показателей АЛТ (в Е/л) в группах пациентов

Препарат	Начало ПВТ, $M \pm m$, Ме (min–max)	4-я неделя ПВТ, $M \pm m$, Ме (min–max)	8-я неделя ПВТ, $M \pm m$, Ме (min–max)	12-я неделя ПВТ, $M \pm m$, Ме (min–max)	24-я неделя ПВТ, $M \pm m$, Ме (min–max)	48-я неделя ПВТ, $M \pm m$, Ме (min–max)
Абакавир (26 больных)	55,1 ± 23,8, 40 (8–213)	31,7 ± 11,1, 26,5 (6–99)	26,5 ± 10,5, 18 (8–63)	18,8 ± 3,6, 19 (4–35)	21,6 ± 6,0, 18 (5–61)	20,1 ± 9,0, 14 (6–42)
Зидовудин (26 больных)	81,4 ± 24,7, 65,5 (24–189)	28,5 ± 9,6, 23 (4–75)	24,7 ± 7,1, 23 (10–70)	35,4 ± 11,2, 27 (12–80)	41,9 ± 18,2, 30 (13–161)	33,4 ± 16,6, 37 (8–48)
Ставудин (28 больных)	76,7 ± 28,0, 49 (16–3200)	46,5 ± 21,9, 27 (6–222)	29,7 ± 11,0, 21 (5–111)	30,0 ± 10,7, 20 (4–129)	33,0 ± 8,1, 32,5 (7–88)	35,7 ± 13,8, 36,5 (4–76)
Фосфазид (29 больных)	81,6 ± 21,0, 80,0 (38–217)	42,1 ± 15,2, 31,5 (11–125)	41,8 ± 12,2, 29,5 (12–93)	35,8 ± 16,6, 24 (8–145)	31,7 ± 8,6, 28,5 (11–81)	29,2 ± 13,3, 25 (4–69)

Таблица 8

Сравнительная таблица цен на лекарственные препараты

Препарат	Стоимость 1 упаковки препарата (с НДС), руб.	Затраты на лечение в течение 4 нед (с НДС), руб.
Кивекса (абакавир 600 мг + ламивудин 300 мг) N 30	8 049,56	8 049,56
Комбивир (зидовудин 300 мг + ламивудин 150 мг) N 60	3 927,89	3 927,89
Ставудин (30 мг) N 56 + ламивудин (150 мг) N 60	2 731,47 + 1 986,94	4 718,41
Фосфазид (400 мг) N 60 + ламивудин (150 мг) N 60	2 396,24 + 1 986,94	4 383,18
Эпоэтин альфа 40000 ЕД N 1	18 165,72	72 662,88

ветственно), что заметно превышает средние показатели у больных, получавших абакавир (55,1; $p < 0,05$). Во время терапии наиболее высокие показатели АЛТ отмечены у больных, получавших в схеме ставудин, – 320, 222, 111 Е/л. Динамика АЛТ характеризуется постепенной нормализацией и стабилизацией средних значений к 12-й неделе лечения. На 48-й неделе зарегистрированы самые низкие показатели у больных, получавших абакавир (20,1 Е/л), самые высокие показатели у больных, получавших зидовудин (33,4 Е/л) и ставудин (35,7 Е/л), что достоверно выше, чем при применении абакавира ($p < 0,05$). У больных, получавших фосфазид, среднее значение на 48-й неделе 29,2 Е/л.

Для оценки экономической составляющей сравнивали затраты на лечение в течение 4 нед терапии. Цены на антиретровирусные препараты и другие использованные лекарственные средства анализировали исходя из Перечня жизненно необходимых и важных лекарственных препаратов [11] (табл. 8).

Фармакоэкономический анализ затрат на лечение показал, что самым дорогостоящим был комбинированный препарат, имеющий в составе абакавир (кивекса). Комбинированный препарат, состоящий из зидовудина и ламивудина (комбивир), ожидаемая комбинированная форма фосфазид + ламивудин и другие НИОТ в сочетании с ламивудином значительно дешевле.

Выводы

1. Доля больных с УВО достоверно больше в группах, получавших в составе схем АРВТ зидовудин (73,7%), ставудин (71,4%), фосфазид (65,0%), по сравнению с пациентами, получавшими абакавир (41,7%; $p < 0,05$). Связать эти результаты с большей долей больных, имеющих генотип вируса 1b в этой группе (53,8%) нельзя, так как в группе получавших в схеме фосфазид (51,7%) доля больных с генотипом 1 сопоставима с группой получавших абакавир.

2. Удельный вес больных, достигших БВО, был достоверно выше в группе фосфазид – 33,3% от числа достигших УВО по сравнению с пациентами (от 10 до 15%), получавшими другие НИОТ.

3. Доля больных с ПРВО (из числа с УВО) достоверно больше в группах, получавших зидовудин (94,8%), ставудин (95,0%), фосфазид (94,6%) по сравнению с пациентами, получавшими абакавир (70,0%; $p < 0,05$).

4. Нежелательные явления, связанные с противовирусными препаратами для лечения гепатита, наблюдались с одинаковой частотой среди всех пациентов.

5. Одно из наиболее частных нежелательных явлений – анемия отмечено у всех пациентов, наиболее выраженные изменения – у больных, получавших в схемах лечения зидовудин. Восстановления до нормальных значений не достигнуто. Для коррекции гематологиче-

ских изменений потребовалось назначение препаратов эритропозитина.

6. Существенного влияния на число тромбоцитов не выявлено.

7. Средние значения CD4⁺-лимфоцитов во всех группах пациентов в течение всего периода лечения были стабильны в пределах 350–415 кл/мкл.

8. Выраженная гепатотоксичность по средним значениям не выявлена ни в одной группе. На дату окончания лечения у больных, получавших ставудин и зидовудин, показатели АЛТ приближались к верхней границе нормы (35,7 и 33,4 Е/л соответственно). У больных, получавших фосфазид, промежуточные средние значения 29,2 Е/л. Наиболее благоприятные показатели отмечены у больных, получавших абакавир.

9. Комбинированный препарат кивекса, имеющий в составе абакавир, является самым дорогостоящим. В то же время зарегистрирована самая низкая эффективность противовирусной терапии ХГС при использовании в схеме АРВТ абакавира. Это в свою очередь требует либо повторного курса лечения пегилированными интерферонами и противовирусными препаратами, либо тройную терапию, стоимость которой значительно превышает стоимость двойной.

Другие НИОТ, в том числе и комбинированные, в сочетании с ламивудином значительно дешевле, однако при применении зидовудина и фосфазид могут потребоваться существенные дополнительные расходы для коррекции гематологических показателей, а ставудин неблагоприятен в плане гепатотоксичности.

Одним из факторов, способствующих более широкому использованию фосфазид, может стать комбинированный препарат, содержащий фосфазид и ламивудин. Такая комбинированная форма повысит compliance пациентов и сделает предпочтительным ее использование при лечении ХГС на фоне АРВТ ВИЧ-инфекции.

Таким образом, все применяемые в настоящее время НИОТ имеют преимущества и недостатки как с клинической, так и с фармакоэкономической стороны при их использовании в схемах АРВТ в ходе противовирусной терапии гепатита С.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 5. 6 см. REFERENCES)

1. Рокштро Ю., Хоффман К. *Лечение ВИЧ-инфекции*. М.: Р. Валент; 2010.
2. Покровский В.В., Юрин О.Г., Кравченко А.В., Беляева В.В., Канестри В.Г., Ермак Т.Н. и др. Протоколы лечения больных ВИЧ-инфекцией. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2011; 3(прил.).
3. Шахгильдян В.И. Современные подходы к лечению HCV-инфекции у ВИЧ-инфицированных. *Гепатологический форум*. 2008; (4): 16–27.
4. Matsukura M., Chu F., Au M., Lu H., Chen J., Rietkerk S. et al. Ультраструктура печени и уровень митохондриальной ДНК при сочетании ВИЧ-инфекции и гепатита С: отсутствие признаков повреждения митохондрий на фоне высокоактивной антиретровирусной терапии. *AIDS, русское издание*. 2008; 1 (4): 377–80.
5. Ганкина Н.Ю., Кравченко А.В., Куимова У.А., Канестри В.Г. Выбор нуклеозидных ингибиторов в схемах антиретровирусной терапии у больных ВИЧ-инфекцией, получающих лечение хронического гепатита С. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2010; 2: 42–6.
6. Кравченко А.В., Ганкина Н.Ю., Куимова У.А., Канестри В.Г. Нуклеозидные ингибиторы в схемах антиретровирусной терапии ко-инфекции ВИЧ и хронического гепатита С. *Инфекционные болезни*. 2010; 8 (1): 14–8.
7. Покровский В.В., Юрин О.Г., Кравченко А.В., Беляева В.В., Канестри В.Г., Афонина Л.Ю. и др. Протоколы диспансерного наблюдения и лечения больных ВИЧ-инфекцией. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2013; 6(прил.).
8. Бартлетт Дж., Галант Дж., Фам П. *Клинические аспекты ВИЧ-инфекции*. М.: Валент; 2012.

11. Распоряжение Правительства РФ №2199-р от 07.12.2011 г. «Об утверждении перечня жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов на 2012 год». Available at: <http://www.rosminzdrav.ru/documents/7008-rasporyazhenie-pravitelstva-rf-2199-r-ot-7-dekabrya-2011>

REFERENCES

1. Rokshtro Yu., Khoffman K. *The Treatment of HIV Infection. [Lechenie VICH-infektsii]*. Moscow: R. Valent; 2010. (in Russian)
2. Pokrovskiy V.V., Yurin O.G., Kravchenko A.V., Belyaeva V.V., Kanestri V.G., Ermak T.N. et al. Treatment protocols of HIV-infected patients. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni. Aktual'nye voprosy*. 2011; 3(Suppl.). (in Russian)
3. Shakhgil'dyan V.I. Current approaches to the care of HIV/HCV co-infected patients. *Gepatologicheskii forum*. 2008; 4: 16–27. (in Russian)
4. Matsukura M., Chu F., Au M., Lu H., Chen J., Rietkerk S. et al. Liver ultrastructural morphology and mitochondrial DNA levels in HIV/hepatitis C virus coinfection: no evidence of mitochondrial damage with highly active antiretroviral therapy. *AIDS, russkoe izdanie*. 2008; 1 (4): 377–80. (in Russian)
5. Soriano V., Puoti M., Garsia-Gasko P. Antiretroviral drugs and liver injury. *AIDS*. 2008; 22(1): 1–13.

6. Soriano V., Puoti M., Sulkovski M., Cargnel A., Benhamou Y, Peters M. et al. Care of patients coinfecting with HIV and hepatitis C virus: 2007 updated recommendations from the HCV-HIV International Panel. *AIDS*. 2007; 21(9): 1073–89.
7. Gankina N.Yu., Kravchenko A.V., Kuimova U.A., Kanestri V.G. The selection of nucleoside inhibitors for antiretroviral therapy of HIV-infected patients with therapies for hepatitis C virus. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni*. 2010; 2: 42–6. (in Russian)
8. Kravchenko A.V., Gankina N.Yu., Kuimova U.A., Kanestri V.G. The nucleoside inhibitors for antiretroviral therapy for HIV/hepatitis C virus coinfection. *Infeksionnye bolezni*. 2010; 8 (1): 14–8. (in Russian)
9. Pokrovskiy V.V., Yurin O.G., Kravchenko A.V., Belyaeva V.V., Kanestri V.G., Afonina L.Yu. et al. The protocols for dispensary observation and treatment of HIV-infected patients. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni. Aktual'nye voprosy*. 2013; 6(Suppl.). (in Russian)
10. Bartlett Dzh., Galant Dzh., Fam P. *Medical Management of HIV Infection [Klinicheskie aspekty VICH-infektsii]*. Moscow: Valent; 2012. (in Russian)
11. Order of the Government of the Russian Federation № 2199-р dated 07.12.2011 “On approval of the list of vital and essential medicines in 2012”. Available at: <http://www.rosminzdrav.ru/documents/7008-rasporyazhenie-pravitelstva-rf-2199-r-ot-7-dekabrya-2011> (in Russian).

Поступила 25.09.14

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.98:578.828.6]-092:612.017.1.064]-078.33

Селимова Л. М.¹, Калнина Л. Б.¹, Серебровская Л. В.², Иванова Л. А.², Гуляева А. Н.³, Носик Д. Н.¹

ЦИТОКИНЫ ПРИ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ ВИРУСОМ ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА 1-го ТИПА (ВИЧ-1)

¹Институт вирусологии им. Д. И. Иванова ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва; ²ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, 111123, г. Москва; ³ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, 125167, г. Москва

В работе изучен уровень провоспалительных (ИЛ-1 β , ИФН- γ , ФНО- α , ИЛ-2) и противовоспалительных (ИЛ-4 и ИЛ-10) цитокинов в плазме ВИЧ-инфицированных пациентов, не получающих и получающих высокоактивную антиретровирусную терапию (ВААРТ). ИФН- γ в двух группах пациентов обнаруживали в 94% образцов, ФНО- α – в 88% и ИЛ-2 – в 38% образцов без лечения и в 12 и 30% образцов с ВААРТ соответственно. Обнаружена положительная корреляция между уровнем вирусной нагрузки и количеством ИФН- γ ($r^s = 0,13$) и отрицательная корреляция ($r^s = -0,242$) – у пациентов с ВААРТ и без нее соответственно. У 31% пациентов без лечения наблюдалась косекреция 3 цитокинов (ИФН- γ , ФНО- α и ИЛ-2), у 35% – 2 цитокинов (ИФН- γ , ФНО- α). С ВААРТ у 20% пациентов обнаружена косекреция 3 цитокинов (ИФН- γ , ФНО- α и ИЛ-2) и у 10% – косекреция ИФН- γ и ИЛ-2. Более высокий процент косекреции провоспалительных цитокинов, обнаруженный в плазме пациентов без ВААРТ с продолжительностью инфекции от 6 лет, позволяет предположить, что благодаря этому их иммунная система может сдерживать быстрое прогрессирование болезни.

Ключевые слова: ВИЧ-1; цитокин.

Для цитирования: Вопросы вирусологии. 2016; 61(1): 39–41. DOI 10.18821/0507-4088-2016-61-1-39-41

Selimova L.M.¹, Kalnina L.B.¹, Serebrovskaya L.V.², Ivanova L.A.², Gulyaeva A.N.³, Nosik D.N.¹

CYTOKINES DURING THE HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS INFECTION TYPE 1(HIV-1)

¹D.I. Ivanovsky Institute of Virology “Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya”, 123098, Moscow, Russia; ²Central Research Institute of Epidemiology, Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 111123, Moscow, Russia; ³Hematology Research Center, Ministry of Health of the Russian Federation, 125167, Moscow, Russia

In this work the proinflammatory (IL-1 β , IFN- γ , TNF- α , IL-2) and anti-inflammatory (IL-4, IL-10) plasma cytokine levels were evaluated in HIV-infected patients with or without antiretroviral treatment (ART). IFN- γ was detected in 94% samples with and without ART, TNF- α in 88% and IL-2 in 38% samples without ART, as well as in 12% and 30% samples with ART, respectively. Positive correlation was detected between viral RNA and IFN- γ levels ($rs = 0.13$) and negative correlation ($rs = -0.242$) in the patients without or with ART. Cosecretion of three cytokines (IFN- γ , TNF- α , IL-2) was detected in 31% samples and two cytokines (IFN- γ , TNF- α) in 35% samples of persons without ART. Cosecretion of three cytokines (IFN- γ , TNF- α , IL-2) was detected in 20% samples with ART; cosecretion of IFN- γ and IL-2 was detected in 10% samples. The higher percentage of the proinflammatory cytokines with cosecretion was detected in plasma HIV-infected patients without ART in the course of 6 and more years, which suggests that their immune system is able to provide disease control.

Key words: HIV-1; cytokine.

Citation: Voprosy virusologii. 2016; 61(1): 39–41. (in Russian). DOI 10.18821/0507-4088-2016-61-1-39-41

For correspondence: Ludmila Selimova, MD, PhD, ScD; e-mail: lselim@mail.ru

Received 02.03.15

Для корреспонденции: Селимова Людмила Мидатовна, д-р биологических наук, ведущий научный сотрудник; e-mail: lselim@mail.ru

При ВИЧ-инфекции особенности развития иммунного ответа существенно влияют на характер течения болезни и время появления признаков СПИДа. Это во многом зависит от баланса между активностью Т-клеток, участвующих в организации иммунного ответа, и уровнем генерализации иммунной активации. Поэтому качественные и количественные показатели иммунной системы и их взаимосвязь у пациентов с ВИЧ-инфекцией во всех клинических стадиях и у различных категорий пациентов всесторонне и интенсивно изучаются. Важной составляющей этих исследований является поиск новых эффективных подходов к лечению заболевания. Среди различных направлений исследования ВИЧ-инфекции особое место занимает изучение таких важных природных биологически активных веществ, как цитокины, так как они играют важную роль в модулировании иммунного ответа. Исследования в этой области показывают, что репликация ВИЧ в организме может влиять на продукцию цитокинов путем изменения активности продуцирующих их клеток, главным образом Т-клеток. Это приводит к снижению эффективного функционирования всех звеньев иммунитета и созданию благоприятных условий для репликации вируса.

Первоначально среди CD4⁺-Т-клеток были выделены 2 типа клеток в соответствии с продукцией цитокинов Th1 и Th2 [1]. Впоследствии цитокины, синтезируемые ими, также стали делить на Th1- и Th2-типы. Th-клетки инициируют клеточный иммунный ответ, а Th2-клетки – гуморальный. Th1-клетки синтезируют ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИФН- γ и ФНО- α . Эти цитокины также выполняют ауторегуляторную функцию. Увеличение уровня ИФН- γ приводит к активации цитотоксической активности CD8⁺-Т-клеток и инициирует гибель инфицированных клеток. Продукция ИФН- γ ограничивает активность Th2-клеток и контролирует активность Th1-клеток [2]. Показано, что при ВИЧ-инфекции снижена продукция Th1-цитокинов и в большей степени ИЛ-2 [3] и увеличена продукция цитокинов Th2-типа [4]. Появление ИЛ-4 характеризует переключение синтеза цитокинов на Th2-тип и постепенное увеличение синтеза цитокинов этого типа по принципу положительной обратной связи [2]. Среди цитокинов Th2-типа можно также выделить ИЛ-10, так как он обладает иммуносупрессивной активностью [5]. ИЛ-4 и ИЛ-10 действуют кооперативно, ограничивая активность Th1-клеток [6]. Цитокины Th1-типа называют также провоспалительными, а Th2-типа – противовоспалительными. Характерной особенностью течения ВИЧ-инфекции является развитие хронического воспалительного процесса. Существенная роль в регуляции иммунного ответа и воспаления принадлежит ИЛ-1 β , являющемуся фактором врожденной цепи иммунитета [7].

Применение высокоактивной антиретровирусной терапии (ВААРТ) существенно повышает продолжительность жизни и улучшает основные клинические показатели, которые используются для контроля развития ВИЧ-инфекции [8]. Дополнительным критерием оценки течения болезни могут быть данные о накоплении цитокинов в плазме пациентов. В связи с этим нами был изучен уровень провоспалительных (ИЛ-1 β , ИФН- γ , ФНО- α , ИЛ-2) и противовоспалительных (ИЛ-4 и ИЛ-10) цитокинов в плазме ВИЧ-инфицированных пациентов, не получающих и получающих ВААРТ.

Материал и методы

В работе использовали 33 образца периферической крови пациентов, находящихся в стадии 3 ВИЧ-инфекции и проходящих диспансерное наблюдение в Специализированном научно-исследовательском отделе эпидемиологии и профилактики СПИД. Все пациенты

являются гражданами Российской Федерации. Из них 17 пациентов (9 женщин, 8 мужчин) не получали ВААРТ и 16 (9 женщин, 7 мужчин) ее получали. ВААРТ проводили в соответствии с рекомендациями, принятыми в Российской Федерации [9]. Основные сведения о пациентах представлены в табл. 1.

В качестве контроля использовали периферическую кровь, полученную от 20 доноров (9 женщин, 11 мужчин) в возрасте от 18 до 49 лет ($\mu = 30 \pm 9,1$), обратившихся в Гематологический научный центр МЗ РФ. Кровь отбирали в вакутейнеры (9 мл), содержащие К₂ЭДТА (BD Vacutainer, Великобритания), осаждали при 2000 об/мин в течение 20 мин при 20 $^{\circ}$ C, плазму крови отбирали и хранили при -20 $^{\circ}$ C до анализа на цитокины.

Уровень цитокинов в плазме определяли с использованием коммерческих иммуноферментных тест-систем (ЗАО «Вектор-Бест», Российская Федерация) в соответствии с инструкциями.

Количество CD4-клеток в крови определяли методом проточной цитометрии на цитофлюориметрах EPICS XL и FACS Calibur с использованием моноклональных антител CD45/CD3/CD4 («Beckman Coulter» и «Becton Dickinson»), частиц FlowCount и пробирок TruCOUNT для абсолютного счета.

Вирусную нагрузку (ВН) определяли с помощью коммерческой тест-системы ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ; Amplicor HIV Monitor Assay, «Roche Diagnostics», Натли, Нью-Джерси).

Статистический анализ данных описательной статистики и определение коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r^s) или Пирсона (R) проводили с помощью программы BioStat 2009 («AnalystSoft»). Уровень значимости (α) был равен 0,05.

Результаты и обсуждение

Среди цитокинов, участвующих в организации и регуляции иммунного ответа при ВИЧ-инфекции, наибольшее внимание уделяется трем из них. Это провоспалительные цитокины ИЛ-2, ИФН- γ и ФНО- α . ИЛ-2 относится к факторам роста Т-клеток и выполняет иммунорегуляторную функцию на всех звеньях и этапах развития иммунного ответа [10, 11]. ИФН- γ и ФНО- α играют важную роль в активации различных механизмов, участвующих в эрадикации вирусов [12, 13]. Показано, что вирусспецифическая стимуляция мононуклеарных клеток от ВИЧ-инфицированных пациентов, относящихся к непрогрессорам (у которых не развиваются клинические признаки болезни или они выражены слабо), приводит к секреции 3-х или 2-х из перечисленных цитокинов более чем в 50% об-

Таблица 1
Характеристика пациентов с ВИЧ-инфекцией

Показатель	Группа*	
	без ВААРТ	с ВААРТ
Возраст, годы	30,1 \pm 2,7 (24–35)	36,3 \pm 9,3 (27–57)
Длительность инфекции, годы	7,2 \pm 4 (1–13)	7 \pm 2,8 (2–11)
Продолжительность лечения, годы		4,25 \pm 2,8 (1–9)
CD4 ⁺ -Т-клетки, кл/мкл	455 \pm 130 (287–699)	410 \pm 150 (97–697)
ВН, копии вирусной РНК/мл, lg	4,7 \pm 2,6 (2,7–5,4)	1,9 \pm 1 (0–2,7)

Примечание. * – средние значения и стандартные отклонения, в скобках указаны минимальные и максимальные величины.

Таблица 2

Уровни цитокинов в плазме пациентов с ВИЧ-инфекцией

Цитокины*	Пациент		Доноры
	без ВААРТ	с ВААРТ	
ИФН- γ	11,6 \pm 4,7 (0–18)	6,7 \pm 5,3 (0–17)	6,3 \pm 3,5 (4–18)
ФНО- α	2,25 \pm 1,4 (0–4)	0,33 \pm 1 (0–3)	1 \pm 1,1 (0–3)
ИЛ-1 β	н. о.	0,44 \pm 1,3 (0–4)	0,25 \pm 1(0–5)
ИЛ-2	3,6 \pm 6,9 (0–20)	0,7 \pm 1,3 (0–3)	3,85 \pm 4,4 (0–10)
ИЛ-4	0,3 \pm 1,8 (0–2)	0,11 \pm 0,33 (0–1)	0,3 \pm 0,4 (0–1)
ИЛ-10	0,6 \pm 1,4 (0–4)	н. о.	0,1 \pm 0,4 (0–2)

Примечание.* – количество цитокинов (в пг/мл); н. о. – не обнаружено.

разгов. В случае с прогрессорами (пациенты с клиническими признаками болезни) приблизительно у 75% образцов наблюдается секреция только одного из цитокинов [14], причем CD4-клетки, продуцирующие 3 цитокина, были более активны, и у них наблюдалась обратная корреляция между уровнями синтеза цитокинов и продукцией вируса. Эти данные позволили авторам заключить, что секреция трех перечисленных цитокинов является благоприятным сочетанием, свидетельствующим об эффективном функционировании иммунной системы. С этой точки зрения мы проанализировали особенности распределения различных типов цитокинов в плазме ВИЧ-инфицированных пациентов. Результаты определения уровней провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в плазме пациентов с ВИЧ-инфекцией, не получающих и получающих ВААРТ, представлены в табл. 2. Из таблицы видно, что по средним показателям наибольший уровень ИФН- γ и ФНО- α обнаруживается в группе пациентов без лечения (группа 1), при этом у пациентов, находящихся на лечении (группа 2), уровень ИФН- γ близок к аналогичному показателю в группе доноров, а ФНО- α – существенно ниже. Обнаруженное количество ИЛ-2 у пациентов без лечения сходно с количеством этого цитокина у доноров, а в группе, получающей ВААРТ, оно ниже. По провоспалительному цитокину ИЛ-1 β и двум противовоспалительным цитокинам ИЛ-4 и ИЛ-10 сделать конкретные выводы сложно, так как они обнаруживались в небольшом количестве образцов и на низком уровне во всех изучаемых группах. При более детальном анализе следует отметить следующее. ИФН- γ в 2 группах пациентов обнаруживался в 94% образцов, в группе доноров – в 100% образцов. ФНО- α присутствовал в 88% образцов в группе 1, в группе 2 – в 12%, в группе доноров – в 50% образцов, ИЛ-2 – в 38 и 30% образцов для групп 1 и 2 соответственно, в группе доноров – в 50% образцов. Остальные изученные цитокины обнаруживались во всех 3-х группах пациентов в отдельных случаях либо не обнаруживались. В группе 1 (без лечения) у 31% пациентов наблюдалась косекреция 3-х цитокинов (ИФН- γ , ФНО- α и ИЛ-2) у 35% – 2-х цитокинов (ИФН- γ и ФНО- α). В последнем случае 15% пациентов имели в плазме противовоспалительные цитокины ИЛ-4 и ИЛ-10. Корреляции в коэкспрессии цитокинов с уровнем ВН мы не обнаружили. Незначительная положительная корреляция была обнаружена между уровнем ВН и количеством ИФН- γ ($r^s = 0,13$). В группе 2 (с ВААРТ) у 20% пациентов на-

блюдалась косекреция 3-х цитокинов (ИФН- γ , ФНО- α и ИЛ-2) и у 10% – косекреция ИФН- γ и ИЛ-2. Незначительная отрицательная корреляция была обнаружена между уровнем ВН и количеством ИФН- γ ($r^s = -0,242$). В целом можно отметить, что ВААРТ снижала уровень провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в плазме ВИЧ-инфицированных пациентов. Исследованные нами пациенты без лечения не относятся к непрогрессорам и имеют или высокую ВН, или низкий уровень CD4⁺-клеток. Однако тот факт, что у 50% из них инфекция присутствует 6 лет и более, указывает на то, что коэкспрессия 3-х или 2-х провоспалительных цитокинов может свидетельствовать о способности иммунной системы сдерживать быстрое прогрессирование болезни. Длительное комплексное изучение такой группы пациентов может дать дополнительные сведения об особенностях функционирования иммунной системы при ВИЧ-инфекции.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1–8, 10, 11, 13, 14
см. REFERENCES)

9. Покровский В.В., ред. *ВИЧ-инфекция и СПИД: Клинические рекомендации*. 2-е изд. М.: Медицина; 2009.
10. Носик Н.Н. Цитокины при вирусной инфекции. *Вопросы вирусологии*. 2000; 45(1): 4–10.

REFERENCES

1. Mosmann T.R., Coffman R.L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* 1989; 7: 145–73.
2. Reuter M.A., Pombo C., Betts M.R. Cytokine production and dysregulation in HIV pathogenesis: Lessons for development of therapeutics and vaccines. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2012; 23(4–5): 181–91.
3. Wherry E.J., Ha S.J., Kaech S.M., Haining W.N., Sarkar S., Kalia V. et al. Molecular signature of CD8⁺ T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity*. 2007; 27(4): 670–84.
4. Clerici M., Shearer G.M. A TH1 \rightarrow TH2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. *Immunol. Today*. 1993; 14(3): 107–11.
5. Wilson E.B., Brooks D.G. The role of IL-10 in regulating immunity to persistent viral infections. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2011; 350: 39–65.
6. Moore K.W., de Waal Malefyt R., Coffman R.L., O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 2001; 19: 683–765.
7. Dinarello C.A. The Interleukin-1 family: 10 years of discovery. *FASEB J.* 1994; 8(15): 1314–25.
8. Zhou J., Sirisanthana T., Kiertiburanakul S., Chen Y.M., Han N., Lim P.L. et al. Trends in CD4 counts in HIV-infected patients with HIV viral load monitoring while on combination antiretroviral treatment: results from The TREAT Asia HIV Observational Database. *BMC Infect. Dis.* 2010; 10: 361–70.
9. Pokrovskiy V.V., ed. *HIV Infection and AIDS: Clinical Guidelines [ВИЧ-инфекция и СПИД. Клинические рекомендации]*. 2nd ed. Moscow: Meditsina; 2009. (in Russian)
10. Shaw J., Kaplan B., Paetkau V., Pilarski L.M., Delovitch T.L., McKenzie I. F. Cellular origins of co-stimulator (IL-2) and its activity in cytotoxic T lymphocyte responses. *J. Immunol.* 1980; 124(5): 2231–9.
11. Farrar J.J., Mizel S.B., Fuller-Farrar J., Farrar W.L., Hilfiker M.L. Macrophage independent activation of helper T cells. I. Production of interleukin-2. *J. Immunol.* 1980; 125(2): 793–8.
12. Nosik N.N. Cytokines in viral infection. *Voprosy virusologii*. 2000; 45(1): 4–10. (in Russian)
13. Guidotti L. G., Chisari F.V. Cytokine-mediated control of viral infections. *Virology*. 2000; 273(2): 221–7.
14. Kannanganat S., Kapogiannis B.G., Ibegbu C., Chennareddi L., Goepfert P., Robinson H.L. et al. Human immunodeficiency virus type 1 controllers but not noncontrollers maintain CD4 T cells coexpressing three cytokines. *J. Virol.* 2007; 81(21): 12071–6.

Поступила 02.03.15

Завьялова Е. А., Гулюкин М. И., Карпова М. А., Богданова П. Д., Дрошнев А. Е.

ВЫЯВЛЕНИЕ ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОГО НЕКРОЗА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЛОСОСЕВЫХ РЫБ (IPNV) МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

ФГБНУ «Всероссийский НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я. П. Коваленко» ФАНО России, 109428, г. Москва

Инфекционный некроз поджелудочной железы лососевых рыб (IPN), вызываемый безоболочечным бирнавирусом, – одна из наиболее серьезных проблем лососеводства. В Российской Федерации утвержденным диагностическим методом является вирусыведение в чувствительных культурах клеток. В представленном исследовании показаны результаты разработки диагностического теста для выявления вируса IPN (IPNV) методом антигенсвязывающего иммуноферментного анализа (сэндвич-ИФА). Разработанный тест дополняет спектр диагностических методов и позволяет уточнять спорные результаты, полученные классическими методами.

Ключевые слова: *инфекционный некроз поджелудочной железы лососевых; иммуноферментный анализ; лабораторная диагностика.*

Для цитирования: Вопросы вирусологии. 2016; 61(1): 42–45. DOI 10.18821/0507-4088-2016-61-1-42-45

Zavyalova E.A., Gulyukin M.I., Carpova M.A., Bogdanova P.D., Droshnev A.E.

IDENTIFICATION OF THE INFECTIOUS PANCREATIC NECROSIS VIRUS (IPNV) USING THE ENZYME IMMUNOASSAY

Ya.R. Kovalenko All-Russian Institute of Experimental Veterinary Medicine, 109428, Moscow, Russia

The infectious pancreatic necrosis (IPN) caused by a non-enveloped virus of the Birnaviridae family is one of the most important loss factors in the salmonid aquaculture. Virus isolation in the sensitive cell cultures has been approved in the Russian Federation as the diagnostic method for determination of IPNV antigen. This work gives the results of the development of the diagnostic test to reveal IPNV using the antigen-bound ELISA (sandwich ELISA). The developed test supplements a new diagnostic method and verifies some disputable results obtained with classical methods.

Key words: *infectious pancreatic necrosis (IPN); enzyme immunoassay; laboratory diagnosis.*

Citation: Voprosy virusologii. 2016; 61(1): 42–45. (in Russian). DOI 10.18821/0507-4088-2016-61-1-42-45

For correspondence: Elena Zavyalova, Candidate of biological Sciences; e-mail: aquazeda@mail.ru

Received 13.03.14

Вирус инфекционного некроза поджелудочной железы (IPNV) – один из наиболее изученных патогенов рыб; он опасен для лососевых рыб, включая атлантического лосося (семгу), радужную, ручьевую и озерную форель. IPNV относится к роду *Aquabirnavirus* семейства Birnaviridae, группе вирусов, которые инфицируют рыбу и другие гидробионты [1]. Это достаточно мелкий безоболочечный вирус, имеющий икосаэдрический капсид диаметром около 60 нм, состоящий из 5 структурных полипептидов, внутри него заключен геном из двух сегментов двуцепочечной РНК (А и В). Капсид состоит из структурных белков разного размера: среднего полипептида VP2 (54 кДа) и маленького VP3 (31 кДа). Эти два протеина закодированы в сегмент А, который дополнительно кодирует неструктурные белки, а именно протеазу (VP4) и белок с невыясненной функцией VP5. Сегмент В – один большой полипептид VP1 (94 кДа) представляет собой РНК-зависимую РНК-полимеразу [2].

Традиционными методами диагностики IPN во всем мире являются вирусыведение в культуре клеток и последующая серологическая идентификация со специфической сывороткой в реакции нейтрализации (РН). Дополнительно в диагностических лабораториях вирус выявляют иммуногистохимически в гистологических препаратах, в реакции гемагглютинации или такими современными молекулярными методами, как полимеразная цепная реакция (ПЦР) [3]. В будущем, возможно, молекулярные методы приобретут еще большее значение, по крайней мере для изучения генетического профиля вирусов и определения вирулентности [4].

За рубежом проблема IPN носит комплексный многогранный характер, но пока остается много нерешенных вопросов, касающихся резервуаров патогена, вертикальной и горизонтальной передачи, патогенности и вирулентности вируса, защиты рыб и взаимоотношений возбудитель–хозяин и т. п. [5].

В нашей стране первоочередной задачей является организация мониторинга, который позволит получить объективные данные о распространении данной болезни. Лабораторная диагностика болезни путем вирусыведения в культурах клеток сама по себе занимает много времени (от 21 до 31 дня), затратно, субъективна, так как зависит от качества применяемых культур клеток, а также опыта и компетенции специалиста, проводящего работу. Поэтому к ней прибегают только в двух-трех крупных научно-исследовательских институтах Центрального федерального округа, в результате официальная статистика недополучает данные о возникновении болезни в других субъектах РФ [5].

В настоящее время на рынке ветеринарных препаратов отсутствуют диагностикумы, сочетающие невысокую стоимость анализа, простоту в использовании, а главное высокую чувствительность, – тест-системы для выявления возбудителя IPN иммуноферментным методом (ИФА), которые могут быть использованы более широко – в региональных лабораториях ветеринарной службы. Кроме того, данная реакция может быть стандартизована, что, принимая во внимание серьезность мер, которые следуют в результате положительного диагноза, позволит максимально исключить возможность ошибки.

Для корреспонденции: Завьялова Елена Александровна, канд. биол. наук, зав. лабораторией ихтиопатологии; e-mail: aquazeda@mail.ru

По этой причине целью настоящего исследования является разработка диагностической тест-системы на основе сэндвич-ИФА для выявления вируса-возбудителя IPNV, позволяющей в течение 3 ч определить наличие антигена в вирусосодержащих препаратах и биологическом материале, а также дифференцировать его от вирусов других видов.

Материал и методы

Вирусы и клетки. В работе использовали очищенный и концентрированный антиген IPNV из штамма N07-1, в качестве положительного контроля использовали культуральные вирусы IPNV, а также гетерологичные вирусы: VHSV – геморрагической септицемии лососевых, IHNV – инфекционного некроза гемопоэтической ткани лососевых из коллекции лаборатории ихтиопатологии ВИЭВ. Вирусы размножали в культурах клеток эпителиальной папилломы карпов EPC (ЕСАСС № 93120820) и гонады радужной форели OMG (патент РФ № 2495120).

Животные. Для получения гипериммунной сыворотки против IPNV использовали кроликов в возрасте 8–10 мес массой 3–3,5 кг. Иммунизацию проводили на опытной базе в Вышневолоцком филиале ВИЭВ (о. Лисий). По окончании опытов животных тотально обескровливали, предварительно наркотизировав эфиром, после чего умерщвляли согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 742 от 13.11.1984).

Антитела для сенсibilизации планшетов (антигенсвязывающие) и антигендетектирующие вирусспецифические кроличьи антитела к IPNV были получены в ходе настоящего исследования.

Неспецифические компоненты: субстрат – тетраметилбензидин (ТМБ), «стоп-раствор» – 2 М серная кислота, отмывочный фосфатно-солевой буфер с твином (ФСБ-Т), рН 7,4–7,6.

IgG выделяли из иммунных сывороток путем высаливания раствором сернокислого аммония с последующей гель-фильтрацией и ионообменной хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе с измерением концентрации белка [6, 7].

Конъюгат специфических антител. Конъюгирование фермента с иммуноглобулинами выполняли ковалент-

ным способом, для введения фермента в молекулы антител использовали периодат натрия по методике Wilson и Nakane [8]. В качестве ферментативной метки использовали пероксидазу хрена (ПХ) RZ > 3,1.

Позитивный и негативный порог (ПНП) реакции рассчитывали по методу Snyder [9]. Сумма среднего значения и 2 стандартных отклонений являлась верхней границей отрицательных значений, а сумма среднего значения и 3 стандартных отклонений – нижней границей положительных значений.

РН ставили микрометодом в 96-луночных панелях по стандартной методике с постоянной дозой вируса 100 ТЦД₅₀/0,1 см³. За титр вируснейтрализующих антител принимали конечное разведение сыворотки, которое полностью ингибировало цитопатическое действие (ЦПД) вируса. При исследовании патологического материала в РН брали деконтаминированную 10% суспензию, при этом идентификация вируса достигалась одновременно с его выделением на культуре клеток.

ПЦР. Суммарную РНК из вирусосодержащих образцов и биоматериала выделяли с помощью набора Рибо-преп («ИнтерЛабСервис», Москва). Подбор синтетических олигонуклеотидов проводили с использованием компьютерных программ Primer Select (Laser Gene 7.0) и Oligo 7.0 (США) на основе нуклеотидных последовательностей, представленных в международной базе данных GeneBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) и проанализированных с помощью пакета программ DNASTar Lasergene (США).

Результаты и обсуждение

Основная задача при разработке и производстве иммунобиологических препаратов – получение высокоактивных и специфичных иммунных сывороток. Это сложный многоэтапный процесс, который зависит от выбора рациональной схемы иммунизации, включающей дозы, способы, интервалы и кратность введения антигена, продолжительности иммунизации, которые находятся в тесном взаимодействии. Поэтому на первом этапе исследования определяли оптимальные соотношения этих факторов для получения сывороток с высоким титром за сравнительно короткий срок.

Таблица 1

Схемы опытов по получению антисыворотки против IPNV

Схема/количество белка	№ инъекции	Интервал между инъекциями, сутки	Объем антигена, см ³	Область введения	Способ введения	Присутствие адьюванта, адьювант: антиген	Титр антител (n = 5)
№ 1/1540 мкг/см ³	1	-	1	Бедро	в/м	ПАФ 1:1	1:256
	2	7	1,5	Ухо	в/в	-	
	3	7	1,5	"	в/в	-	
	4	7	1,5	"	в/в	-	1:512
	5	21	1,5	"	в/в	-	
	6	7	1,5	"	в/в	-	
	7	7	1,5	"	в/в	-	
№ 2/500 мкг/см ³	1	-	2,0	Спина	п/к	ПАФ 1:1	1:1400
	2	5	0,5	Ухо	в/в	-	
	3	5	1,0	"	в/в	-	1:1600
	4	5	2,0	Спина	п/к	ПАФ 1:2	
	5	5	1,5	Ухо	в/в	-	
	6	5	2,0	"	в/в	-	
№ 3/500 мкг/см ³	1	-	1,0	Спина	п/к	-	1:1400
	2	7	1,5	"	п/к	ПАФ 1:1	
	3	7	2,0	"	п/к	НАФ 1:1	1:2048
	4	7	1,0	Ухо	в/в	-	
	5	7	1,5	"	в/в	-	

Примечание. в/м – внутримышечно; в/в – внутривенно; п/к – подкожно.

Иммунизацию кроликов выполняли по 3 схемам (табл. 1), различающимся количеством вводимого белка и интервалами между инъекциями. Опыты проведены не одновременно, а последовательно, в середине каждого опыта делали пробный забор крови для определения титра антител в РН, тотально обескровливали животных через 7 дней после последней инъекции.

В результате по схеме № 1 через 56 дней была получена сыворотка с титром после 7 инъекций 1:512 в РН ($n = 5$). Сейчас данная сыворотка используется в лаборатории для диагностических работ, однако за счет небольшого титра ее не применяли как сырье для конструирования иммунобиологического препарата.

В последующих опытах схема введения антигена была изменена, поскольку известно, что уровень продукции вируснейтрализующих антител можно повысить постепенным увеличением белка в прививочной дозе и многократным введением адъювантов, а на качество сывороток влияет число инъекций и продолжительность иммунизации. Для стимуляции иммуногенеза применяли полный (ПАФ) и неполный адъювант Фрейнда (НАФ), а также комбинированное – внутривенное и подкожное введение антигена для активации разных звеньев иммунитета.

Доза белка была снижена до 500 мкг/см³ с постепенным увеличением объема вводимого антигена от 0,5 до 2,0 см³, дополнительно в схеме № 2 были сокращены интервалы между инъекциями до 5 дней, а в схеме № 3 уменьшено количество инъекций до 5. В результате получены сыворотки, в которых титр вируснейтрализующих антител значительно выше – 1:1600 и 1:2048 ($n = 5$) по схемам № 2 и 3 соответственно.

Таким образом, была разработана схема иммунизации кроликов, позволившая получить специфичные антисыворотки против IPNV с высоким титром антител, которые в последующем были использованы для получения

иммунологических реагентов: IgG для сорбции планшетов и конъюгата.

Очищенные антитела сорбировали на планшет в карбонат-бикарбонатном буфере и методом шахматного титрования подбирали концентрацию специфических IgG и рабочее разведение конъюгата. Для оптимизации реакции, увеличения точности и чувствительности метода определяли оптимальный диапазон оптической плотности (ОП), оптимальное рабочее разведение вирусспецифических антител, при котором наблюдалась максимальная разница между средними значениями ОП положительных и отрицательных контролей, а также диагностические характеристики метода.

Для поиска оптимального соотношения иммуноглобулинов к ПХ конъюгирование проводили в нескольких вариантах: на начальном этапе как 4 ПХ:1 IgG исходя из молекулярной массы биомолекул (ПХ- 40 кДа, IgG в пределах 160 кДа), 2 ПХ:1 IgG как в наиболее распространенных протоколах [10]. Однако в обоих случаях конъюгат вызывал развитие неспецифических фоновых реакций, а блокирование непрореагировавших альдегидных групп пероксидазы боргидритом натрия приводило к снижению чувствительности реакции. Впоследствии эмпирически была подобрана концентрация 1 ПХ:2 IgG, которая высокоэффективно взаимодействовала с антигеном IPNV с образованием минимального фона реакции в рабочем разведении 1:30 000.

Для определения концентрации антигенсвязывающих антител, сенсibilизированных на планшеты, их титровали с положительными и отрицательными контролями. Разведения антител начиная с концентрации 100 мкг/мл с шагом 10 адсорбировали в лунках планшет в течение 18 ч при 4°C. В 5-кратно отмытые ФСБ-Т и высушенные планшеты добавляли по 100 мкл положительных и отрицательных образцов, планшеты инкубировали 1 ч при комнатной температуре (20–22°C), после чего промывали. Добавляли конъюгат в объеме 100 мкл на лунку, инкубировали, промывали. Реакцию проявляли субстратным раствором ТМБ 25 мин и после остановки 2 М серной кислотой измеряли значения ОП при длине волны 450 нм.

Оптимальное разведение антител, обеспечивающее достаточное различие результатов с положительными и контрольными образцами, составило 20 мкг/мл.

Для определения ПНП реакции в ИФА титровали 120 заведомо отрицательных образцов. Значение стандартного отклонения не превышало 0,012 оптической единицы (о. е.), что свидетельствует о хорошей воспроизводимости результатов. Рассчитывали среднее значение ОП образцов, которое составило 0,230 о. е., и прибавляли удвоенное значение стандартного отклонения 0,012 о. е. ПНП, представленный в виде прямой, отражал верхнюю границу отрицательных величин 0,254 о. е., а ОП, соответствующая наименьшему положительному значению, равнялась 0,545 о. е.

Для определения чувствительности тест-системы проводили титрование 3 штаммов IPNV с инфекционной активностью $10^{8,20-8,50} \text{ТЦД}_{50/\text{см}^3}$. Минимальное значение ОП, при котором результат был положительным, составило 0,62 о. е., что соответствует титру вируса $10^{2,0} \text{ТЦД}_{50/\text{см}^3}$.

В тесте на воспроизводимость определяли статистические характеристики для положительных и отрицательных контрольных

Таблица 2

Выявление антигена IPNV методами ИФА, РН и ПЦР

Испытуемый материал	ИФА		Результат РН	Результат ОТ-ПЦР
	ОП, о. е.	результат		
1 IPNV штамм Ab (ATCC 13-19, референсный)	1,376	+	+	+
2 IPNV штамм GP01	1,079	+	+	+
3 IPNV штамм VT06	1,214	+	+	+
4 IPNV штамм SK07	1,406	+	+	+
5 IPNV штамм RKTV09	1,622	+	+	+
6 IPNV штамм G2/11	1,962	+	+	+
7 IHNV штамм KKK10	0,253	-	-	-
8 VHSV штамм S7/10	0,229	-	-	-
9 Гомогенат внутренних органов семги	0,205	-	-	-
10 Гомогенат внутренних органов карпа	0,207	-	-	-
11 Гомогенат внутренних органов форели, зараженной IPNV(естественная инфекция)	1,333	+	+	+
12 Гомогенат внутренних органов форели, зараженной IPNV(экспериментальное заражение)	1,412	+	+	+
13 <i>Yersinia ruckeri</i> штамм RMS10-7/3	0,230	-	-	-
14 Культура клеток EPC	0,209	-	-	-
15 Культура клеток OMG	0,205	-	-	-

Примечание. № 1–4 – гомологичные вирусы, разные штаммы, хранившиеся в лиофилизированном виде; № 5, 6 – гомологичные вирусы после пассажа в культуре клеток, нативные; № 7, 8 – гетерологичные вирусы после пассажа в культуре клеток, нативные; № 9–12 – пробы внутренних органов разных видов рыб; № 13 – суспензия бактериальных клеток; № 14, 15 – неинфицированные культуры клеток.

препаратов при исследовании их в 5 повторностях. Показано, что взаимодействие тест-системы с препаратами гетерологичных вирусов и неинфицированными клетками/тканями было на уровне фона. При этом коэффициент вариации между лунками на планшете составил 2–4%, между отдельными планшетами он не превышал 4%, что свидетельствует о высокой чувствительности и специфичности сэндвич-ИФА.

На следующем этапе оценивали возможность разработанной тест-системы выявлять искомый антиген в биологическом материале.

Сравнительная оценка обнаружения IPNV-антигена методами ИФА, РН и обратнотранскриптазной ПЦР (ОТ-ПЦР) представлена в табл. 2.

Полученные данные позволяют утверждать, что разработанная тест-система специфично выявляет IPNV в нативной и лиофилизированной культуральной жидкости зараженных клеток, а также в биологическом материале от естественно и искусственно инфицированных рыб.

При сравнительном исследовании материала тремя методами на наличие вируса IPN отмечена корреляция показателей. Однако при исследовании в РН биологического материала (гомогенизированных органов форели) результат был получен через 10 дней одновременно с выделением вируса в культуре клеток, что, несомненно, увеличивает время диагностики. При исследовании положительных образцов методом ПЦР во всех случаях был обнаружен IPNV, в пробах, отрицательных по результатам ИФА и РН, вирус не обнаруживали. Полученные данные подтверждают специфичность испытанных реакций.

Таким образом, нами разработана тест-система на основе сэндвич-ИФА, в которой в качестве антигенсвязывающих и антигендетектирующих антител были использованы кроличьи антитела к вирусу IPN. Диагностику позволяет специфично выявлять IPNV в титре $10^{2.0}$ ТЦД_{50/см³ и выше, при этом данные положительно коррелируют с результатами, полученными в РН и ОТ-ПЦР, следовательно, разработанная тест-система может быть применена для выявления IPNV при скрининговых исследованиях или в дополнение к другим диагностическим методам.}

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1–4, 8, 9 см. REFERENCES)

- Гулюкин М.И., Завьялова Е.А., Дрошнев А.Е., Коломьцев С.А. Анализ эпизоотической ситуации по болезням рыб в России (2001–2011 гг.). *Ветеринария*. 2011; 8: 3–7.
- Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. *Справочник биохимика*. М.: Издательство «Мир»; 1991.
- Северин С.Е., Соловьева Г.А., ред. *Практикум по биохимии*. М.: Издательство МГУ; 1989.
- Остерман Л.А. *Хроматография белков и нуклеиновых кислот*. М.: Издательство «Наука»; 1985.

REFERENCES

- Johansen L.H., Sommer A.I. Infectious pancreatic necrosis virus infection in Atlantic salmon *Salmo salar* post-smolt affects the outcome of secondary infections with infectious salmon anaemia virus or *Vibrio salmonicida*. *Dis. Aquat. Organ.* 2001; 47(2): 109–17.
- Pedersen T., Skjesol A., Jørgensen J.B. VP3, a structural protein of infectious pancreatic necrosis virus, interact with RNA-dependent RNA polymerase VP1 and with double-stranded RNA. *J. Virol.* 2007; 81(12): 6652–63.
- OIE Manual of diagnostic tests for aquatic animals. 5th edition. 2006.
- Evensen Ø., Skjelstad B., Rimstad E., Brun E., Johansen L.H., Stagg R. et al. *IPN in salmonids. A review*. The Fisheries and Aquaculture Industries Research Fund (FHIF); 2003.
- Gulyukin M.I., Zav'yalova E.A., Droshnev A.E., Kolomytsev S.A. The analysis of epizootic diseases of fish in Russia (2001–2011). *Veterinariya*. 2011; 8: 3–7. (in Russian)
- Doson R., Elliot D., Elliot U., Dzhons K. *Handbook of Biochemist [Spravochnik biokhimiya]*. Moscow: Izdatel'stvo «Mir»; 1991. (in Russian)
- Severin S.E., Solov'eva G.A., eds. *Workshop on Biochemistry [Praktikum po biokhimi]*. Moscow: Izdatel'stvo MGU; 1989. (in Russian)
- Wilson M.B., Nakane P.K. Recent development in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. In: Knapp W., Holubar K., Wick G., eds. *Immunofluorescence and Related Staining Techniques*. Vienna, Austria: Elsevier/North-Holland; 1978; 215–44.
- Van der Marel P., Snyder D.B., Luticken D. Antigenic characterization of IBDV field isolates by their reactivity with a panel of monoclonal antibodies. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 1990; 97(2): 81–3.
- Osterman L.A. *Chromatography of Proteins and Nucleic Acids [Khromatografiya belkov i nukleinovyykh kislot]*. Moscow: Izdatel'stvo «Наука»; 1985. (in Russian)

Поступила 13.03.14

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 578.81.083.2

Гулий О. И.¹⁻³, Караваева О.А.¹, Великов В. А.^{1,4}, Соколов О. И.¹, Павлий С.А.⁴, Ларионова О.С.², Буров А. М.¹, Игнатов О. В.¹

ИССЛЕДОВАНИЕ АДСОРБЦИИ БАКТЕРИОФАГА ФАВ-SP7 НА КЛЕТОЧНОЙ ПОВЕРХНОСТИ *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* SP7

¹ФГБУН «Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов» РАН, Саратов; ²ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный аграрный университет им. Н. И. Вавилова»; ³ФГБНУ «Саратовский научно-исследовательский ветеринарный институт»;

⁴ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный университет им. Н. Г. Чернышевского»

Из клеток *Azospirillum brasilense* Sp7 выделен бактериофаг ФАВ-Sp7. Описана его морфология, дана характеристика «негативных колоний» бактериального газона, определен диапазон литического действия в отношении других штаммов и видов азоспирилл. Выделена ДНК фага, проведен ее электрофоретический и рестрикционный анализ, определен размер генома, который составляет примерно 50 тыс. пар нуклеотидов. Проведено электронно-микроскопическое изучение адсорбции выделенного бактериофага ФАВ-Sp7 на поверхности бактерий *A. brasilense* Sp7.

Ключевые слова: *Azospirillum brasilense*; бактериофаг; электрофорез; ДНК; электронная микроскопия; адсорбция.

Для цитирования: Вопросы вирусологии. 2016; 61(1): 45–48. DOI 10.18821/0507-4088-2016-61-1-45-48

Для корреспонденции: Гулий Ольга Ивановна, д-р. биол. наук, ведущий научный сотрудник; e-mail: guliy_olga@mail.ru

A STUDY OF THE ISOLATED BACTERIOPHAGE Φ Ab-SP7 ADSORPTION ON THE CELL SURFACE OF THE AZOSPIRILLUM BRASILENSE SP7

¹ Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, 410049, Saratov, Russia; ² Saratov State Vavilov Agrarian University, 410012, Saratov, Russia; ³ Scientific Research Veterinary Institute, 410028, Saratov, Russia; ⁴ Saratov State University, 410005, Saratov, Russia

The bacteriophage Φ Ab-Sp7 was isolated from the cells of the *Azospirillum brasilense* Sp7. The morphology, size of the gram-negative colonies, and range of lytic activity against other strains and species of the genus *Azospirillum* was tested. The isolated phage DNA was examined using electrophoretic and restriction analysis, and the size of the genome were established. The electron microscopy results show that the phage (capsid) has a strand-like form. The electron microscopy study of the bacteriophage Φ Ab-Sp7 adsorption on the *A. brasilense* Sp7 bacterial surface was performed.

Key words: *Azospirillum brasilense*; bacteriophage; DNA electrophoresis; electron microscopy; adsorption.

Citation: Voprosy virusologii. 2016; 61(1): 45–48. (in Russian). DOI 10.18821/0507-4088-2016-61-1-45-48

For correspondence: Ol'ga Guliy, MD, PhD, DSc; e-mail: guliy_olga@mail.ru

Received 29.08.14

Чувствительность бактерий к бактериофагам является относительно стабильным признаком, связанным с наличием соответствующих рецепторов у фаговых частиц и комплементарных сайтов на поверхности бактериальной клетки. Поэтому изучение такого рода взаимодействий имеет большое значение для микробиологии и вирусологии в целом, а также существенное прикладное значение. Изучение взаимодействия бактериофагов с микробными клетками во многом основано на использовании световых, электронных, атомно-силовых и зондовых микроскопов. Например, для изучения взаимодействия фага сальмонеллы с гомологичными микроорганизмами была применена криоэлектронная микроскопия, в результате которой показаны структурные изменения бактериофага *Epsilon15* в процессе инфекции на всех ее этапах [1]. Методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) было изучено взаимодействие диагностических холерных бактериофагов со штаммами *V. cholerae* [2]. С. В. Краевским [3] показана возможность исследования процесса инфицирования фагом клеток бактерий и аффинных взаимодействий, в частности бактерий с гомологичными антителами с помощью АСМ. Для изучения взаимодействия бактериофагов и антифаговых антител с поверхностью клеток часто применяется электронная микроскопия [4].

Несмотря на то что история изучения взаимодействия бактериофагов с микробными клетками насчитывает несколько десятилетий, методов оценки адсорбции бактериофагов почвенных микроорганизмов с гомологичными клетками сравнительно мало [5]. К почвенным бактериям, способствующим росту растений, относятся и бактерии, принадлежащие к роду *Azospirillum*. К настоящему времени описаны умеренные бактериофаги, способные инфицировать бактерии рода *Azospirillum*. [6, 7]. Французскими исследователями [8] были выделены и описаны бактериофаги из 24 штаммов 4 видов бактерий, принадлежащих к роду *Azospirillum*. Важное место при выделении и изучении бактериофагов почвенных микроорганизмов занимают знания об особенностях их строения и адсорбции на поверхности микробной клетки. Поэтому целью данной работы был поиск и выделение бактериофага из культуры *Azospirillum brasilense* штамма Sp7 и изучение адсорбции выделенного бактериофага на клетке-хозяине с использованием электронной микроскопии.

Материал и методы

Микроорганизмы. В работе использовали клетки *Azospirillum brasilense* штаммов Sp7, Cd, Sp107, Br14, KR77, S27, SR55, Sr75, Sp245, Jm6B2, S17, *A. lipoferum* штаммов Sp59b, SR65, RG20a, *A. brasilense* Cd, *A. amazonense* Am14, *A. halopraeferans* Au4, *A. irakense* KBC1 и КА3, *Escherichia coli* XL-1, *Pseudomonas putida* C-11, *Acinetobacter calcoaceticum* A-122, полученные из коллекции культур ИБФРМ РАН.

Выделение бактериофагов. Суточную культуру клеток *A. brasilense* Sp7 охлаждали в течение 2 ч при 4°C. После

этого клетки осаждали центрифугированием при 2500g в течение 40 мин. Для флокуляции фаговых частиц к супернатанту добавляли полиэтиленгликоль (ПЭГ) 6000 (Pan-teac) – 2,5 М в количестве 1/5 объема супернатанта и NaCl до концентрации 1,6 М, затем колбу с супернатантом обкладывали льдом и помещали в холодильник при 4°C на 18–20 ч. По прошествии указанного времени суспензию центрифугировали при 12 000g в течение 30 мин. Полученный осадок ресуспендировали в 1 мл ТЕ-буфера (трис HCl, pH 8,0–10 mM, EDTA – 1 mM).

Морфологию негативных колоний бактерий, зараженных фагами, изучали при посевах методом агаровых слоев (метод Грация) [9].

Диапазон литической активности и специфичность селективированных фагов определяли методом нанесения фага на газон гомологичных или гетерологичных бактериальных культур [9].

Электронная микроскопия. Для электронно-микроскопической идентификации выделенных бактериофагов из клеток *A. brasilense* Sp7 готовили препараты бактериофагов с концентрацией $\sim 10^6$ частиц/мл, как описано в работе [10]. Анализ препаратов проводили на электронном микроскопе Carl Zeiss Libra-120 (Германия).

Выделение фаговой ДНК и гель-электрофорез ДНК проводили с использованием стандартных методов [11].

Результаты и обсуждение

Нами были опробованы различные методики выделения бактериофагов из клеток *A. brasilense* Sp7, при этом в результате предварительно проведенных экспериментов было показано, что максимальный выход бактериофагов наблюдается после предварительной обработки клеток азоспириллы низкой температурой (4°C) в течение 2 ч. После выделения бактериофагов проводили их титрование методом агаровых слоев. Было установлено, что бактериофаг, выделенный из клеток *A. brasilense* Sp7 (Φ Ab-Sp7), на газоне индикаторного штамма *A. brasilense* Sp7 образует округлые, с ровным четким краем, прозрачные негативные колонии диаметром от 0,1 до 0,2 мм. Анализ газонов после длительного культивирования (до 5 сут) показал, что пятна остаются прозрачными на протяжении всего культивирования.

На следующем этапе работы проводили электрофорез ДНК бактериофага в агарозном геле (рис. 1, а). В качестве контроля использовали ДНК бактериофага лямбда. По результатам электрофореза можно заключить, что бактериофаг Φ Ab-Sp7 является ДНК-содержащим (полоса четкая, продуктов деградации нет). Размер генома у выделенного бактериофага несколько меньше генома фага лямбда (48 тыс. пар нуклеотидов – тыс. п. н). Дополнительно проводили рестрикцию ДНК бактериофага, как описано [11], результаты которой показывают (рис. 1, б), что геном исследуемого бактериофага представлен дезоксирибонуклеиновой кислотой.

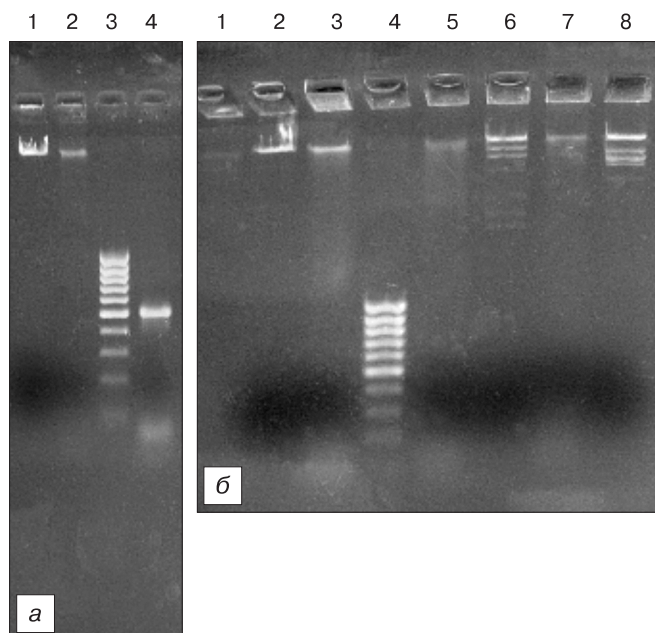


Рис. 1. Электрофореграмма фаговой ДНК из бактериофага *A. brasilense* Sp7 (а):

1 – ДНК фага лямбда (48 502 п. н.); 2 – ДНК фага Sp7; 3 – маркер молекулярной массы (м. м.) GeneRuler SM0383 («Fermentas»); размер фрагментов ДНК начиная сверху: 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 80 п. н.; 4 – маркер м. м. 500 п. н. (ПЦР-продукт гена неоминцинофосфотрансферазы *prtII*). Электрофореграмма рестрикции двумя рестриктазами бактериофага, выделенного из клеток *A. brasilense* Sp7 (б). 1 – ДНК фага лямбда (48 502 п. н.); 2 – ДНК фага Sp7; 3 – маркер м. м. GeneRuler SM0383 («Fermentas»); размер фрагментов ДНК начиная сверху: 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 80 п. н.; 4 – ДНК фага Sp7, гидролизованная рестриктазой *HindIII*; 5 – ДНК фага лямбда, гидролизованная рестриктазой *HindIII*; 6 – ДНК фага Sp7, гидролизованная рестриктазой *BamHI*; 7 – ДНК фага лямбда, гидролизованная рестриктазой *BamHI*.

Спектр литического действия бактериофагов, являющийся одним из важных биологических свойств вирусов, определяли для бактериофага ФАб-Sp7 по отношению к 18 штаммам бактерий рода *Azospirillum*. Показано, что бактериофаг ФАб-Sp7 вызывает лизис гомологичных фагу бактерий по серологической группе *A. brasilense* Sp7, Cd, Sp107, Br14, KR77, S27, SR55, *A. lipoferum* SR65, *A. amazonense* Am14, *A. halopraeferans* Au4, *A. irakense* штаммов KBC1 и KA3, но не проявляет активность в отношении клеток *A. brasilense* штаммов Sp245, Jm6B2, S17, SR75, *A. lipoferum* штаммов Sp59b и RG20a. Таким образом, бактериофаг ФАб-Sp7 является специфичным по отношению к некоторым видам бактерий рода *Azospirillum*. Анализ литической активности выделенного бактериофага по отношению к гетерологичным бактериям родов: *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* дал отрицательные результаты. Результаты представлены в таблице.

Электронно-микроскопическое изучение препаратов бактериофага, выделенного из клеток *A. brasilense* Sp7, показало, что исследуемый фаг имеет изометрическую головку размером около 27 нм и хвостовой отросток длиной около 16 нм. Представленные нами результаты согласуются с данными, полученными другими исследователями [12].

Процесс взаимодействия фага с клеткой довольно сложен и зависит от строения самого фага [13, 14] и наличия у бактерий F-пилей [15, 16] и других факторов. Понимание особенностей взаимодействия бактериофагов с микробными клетками является необходимым условием для их успешного применения в прикладной микробиологии. Поэтому на следующем этапе проводили исследование адсорбции бактериофага ФАб-Sp7 на клеточной поверхности специфического штамма Sp7 с применением электронной микроскопии. Для этого к суспензии клеток штамма Sp7 добавляли исследуемый бактериофаг (из расчета ~ 20 фагов на бактерию), затем инкубировали при 27°C в течение 3 мин. Затем суспензию наносили на покрытые нитроцеллюлозой электронно-микроскопические сеточки и контрастировали препараты 1% уранилацетатом. На рис. 2 представлены результаты электронно-микроскопического исследования специфической адсорбции бактериофага ФАб-Sp7 на поверхности клеток *A. brasilense* Sp7. Как видно, бактериофаги хорошо адсорбируются на поверхности клеток азоспирилл (рис. 2).

Для исключения неспецифического взаимодействия бактериофага ФАб-Sp7 было проведено электронно-микроскопическое исследование взаимодействия фага с клетками другого, не комплементарного, штамма. Поскольку было показано, что бактериофаг не проявляет активности в отношении клеток *A. brasilense* штамма Jm6B2 (см. таблицу), то

Спектр литической активности бактериофага ФАб-Sp7 на газоне индикаторных культур

Культура клеток	Действие ФАб-Sp7
<i>A. amazonense</i> Am14	+
<i>A. brasilense</i> Sp7	+
<i>A. brasilense</i> Cd	+
<i>A. brasilense</i> Sp107	+
<i>A. brasilense</i> Sp245	-
<i>A. brasilense</i> Jm6B2	-
<i>A. brasilense</i> Br14	+
<i>A. brasilense</i> KR77	+
<i>A. brasilense</i> S17	-
<i>A. brasilense</i> S27	+
<i>A. brasilense</i> SR55	+
<i>A. lipoferum</i> SR65	+
<i>A. brasilense</i> SR75	-
<i>A. halopraeferans</i> Au4	+
<i>A. irakense</i> KBC1	+
<i>A. irakense</i> KA3	+
<i>A. lipoferum</i> Sp59b	-
<i>A. lipoferum</i> RG20a	-
<i>P. putida</i> C-11	-
<i>P. putida</i> BA-11	-
<i>E. coli</i> XL-1	-
<i>E. coli</i> B-878	-
<i>A. calcoaceticum</i> A-122	-

Примечание. + наличие лизиса бактериальной культуры; - отсутствие лизиса бактериальной культуры.

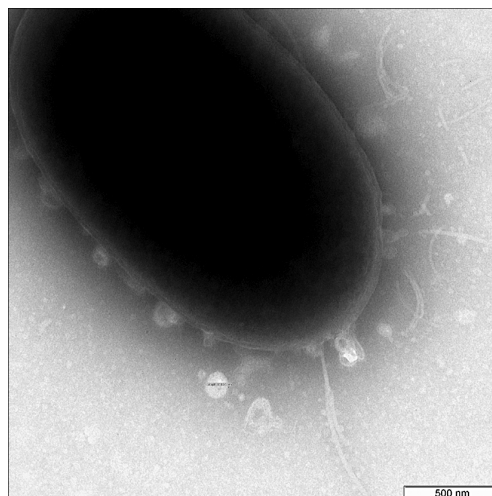


Рис. 2. Электронно-микроскопическое изображение бактерий *A. brasilense* Sp7 при взаимодействии с бактериофагом ФАб-Sp7. Масштаб 500 нм.

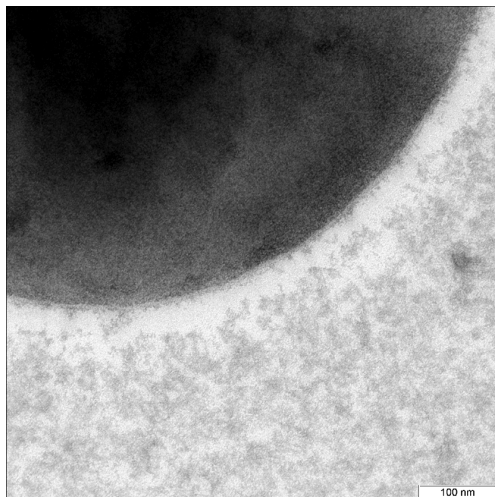


Рис. 3. Электронно-микроскопическое изображение бактерий *A. brasilense* Jm6B2 при взаимодействии с бактериофагом ΦAb-Sp7.

в качестве контроля использовали клетки данного штамма. Условия подготовки образца были аналогичны таковым при использовании клеток штамма Sp7. Показано (рис. 3), что адсорбция бактериофага ΦAb-Sp7 на микробной клетке штамма Jm6B2 не происходит.

Таким образом, в результате исследований был выделен бактериофаг из азотфиксирующих микроорганизмов *A. brasilense* Sp7 (ΦAb-Sp7). Бактериофаг отличается низкой репродуктивной способностью, поскольку выделяется только после воздействия на клетки низкой температуры. На газоне индикаторной культуры исследуемый бактериофаг образует прозрачные негативные колонии. Показано, что бактериофаг ΦAb-Sp7 вызывает лизис гомологичных фагу бактерий по серологической группе *A. brasilense* Sp7, Cd, Sp107, Br14, KR77, S27, SR55, *A. lipoferum* SR65, *A. amazonense* Am14, *A. halopraeferans* Au4, *A. irakense* KBC1 и KA3, но не проявляет активности в отношении клеток *A. brasilense* штаммов Sp245, Jm6B2, S17, SR75, *A. lipoferum* штаммов Sp59b и RG20a. Установлено, что бактериофаг ΦAb-Sp7 является специфичным по отношению к бактериям рода *Azospirillum*, но не активным в отношении бактерий гетерологичных родов. Электронно-микроскопический анализ показал, что выделенный бактериофаг хорошо адсорбируется на поверхности бактерий *A. brasilense* Sp7. С помощью электронной микроскопии также изучены морфологические параметры и определены размеры самих фаговых частиц.

На сегодняшний день в литературе нет работ, описывающих морфологические особенности (электронно-микроскопическое изучение) взаимодействия бактериофагов почвенных бактерий с соответствующими микробными клетками. Помимо этого, метод электронной микроскопии позволил быстро на уровне отдельных клеток, регистрировать начальные стадии адсорбции бактериофагов на элементарных бактериях по сравнению с традиционными методами, что позволило существенно сократить время диагностики культур.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1, 4–16 см. REFERENCES)

- Уткин Д.В., Ерохин П.С., Осина Н.А., Конов Н.П. Оценка фаголизательности штаммов холерных вибрионов с использованием атомно-силовой микроскопии. *Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология*. 2013; 13 (3): 81–4.
- Краевский С.В. *Атомно-силовая микроскопия аффинных взаимодействий в микробиологии*: Дисс. ... канд. биол. наук. Оболенск; 2011.

REFERENCES

- Chang J.T., Schmid M.F., Haase-Pettingell C., Weigele P.R., King J.A., Chiu W. Visualizing the structural changes of bacteriophage Epstein15 and its *Salmonella* host during infection. *J. Mol. Biol.* 2010; 402(4): 731–40.
- Utkin D.V., Erokhin P.S., Osina N.A., Konov N.P. Assessment fagolizabelnosti strains of *V. cholerae* using atomic force microscopy. *Izvestiya Saratovskogo universiteta. Novaya seriya. Seriya: Khimiya. Biologiya. Ekologiya*. 2013; 13 (3): 81–4. (in Russian)
- Kraevskiy S.V. *Atomic Force Microscopy of Affinity Interactions in Microbiology*: Diss. Obolensk; 2011. (in Russian)
- Kang A.S., Barbas C.F., Janda K.D., Benkovic S.J., Lerner R.A. Linkage of recognition and replication functions by assembling combinatorial antibody Fab libraries along phage surfaces. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1991; 88(10): 4363–6.
- Suttle C.A. Viruses in the sea. *Nature*. 2005; 437: 356–61.
- Ewing B., Hillier L., Wendl M.C., Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.* 1998; 8(3): 175–85.
- Germida J.J., Khachatourians G.G. Transduction of *Escherichia coli* in soil. *Can. J. Microbiol.* 1988; 34(2): 190–3.
- Boyer M., Haurat J., Samain S., Segurens B., Gavory F., González V. et al. Bacteriophage prevalence in the genus *Azospirillum* and analyses of the first genome sequence of an *Azospirillum brasilense* integrative phage. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008; 74(3): 861–74.
- Gerhardt P., ed. *Manual of Methods for General Bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington, DC; 1981.
- Martha R.J., Clokie, Andrew M., Kropinski, eds. *Bacteriophages Methods and Protocols. Vol. 1: Isolation, Characterization, and Interaction*. Humana Press; 2008: 113–26.
- Sambrook J., Fritsch D.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. (v. 1–3). Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Lab. Press; 1989.
- Boyer M., Haurat J., Samain S., Segurens B., Gavory F., González V. et al. Bacteriophage prevalence in the genus *Azospirillum* and analyses of the first genome sequence of an *Azospirillum brasilense* integrative phage. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008; 74(3): 861–74.
- Stengele I., Bross P., Garces X., Giray J., Rasched I. Dissection of functional domains in phage fd adsorption protein. Discrimination between attachment and penetration sites. *J. Mol. Biol.* 1990; 212(1): 143–9.
- Jakes K.S., Davis N.G., Zinder N.D. A hybrid toxin from bacteriophage f1 attachment protein and colicin E3 has altered cell receptor specificity. *J. Bacteriol.* 1988; 170(9): 4231–8.
- Russel M., Whirlow H., Sun T.P., Webster R.E. Low-frequency infection of F-bacteria by transducing particles of *Filamentous* bacteriophages. *J. Bacteriol.* 1988; 170(11): 5312–6.
- Krebber C., Spada S., Desplancq D., Krebber A., Ge L., Pluckthun A. Selectively infective phage (SIP): a mechanistic dissection of a novel in vivo selection for protein–ligand interactions. *J. Mol. Biol.* 1997; 268(3): 607–18.

Поступила 29.08.14