

Handwritten signature

ISSN 0507-4088



Д.И.ИВАНОВСКИЙ

ВОПРОСЫ ВИРУСОЛОГИИ

PROBLEMS OF VIROLOGY

1

Том 60 • 2015



издательство
"МЕДИЦИНА"

www.medlit.ru

Volume 60 • Issue 1 • 2015

**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

ЛР № 010215 от 29.04.97

Почтовый адрес:

115088, Москва,
ул. Новоостановская, 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: oao-meditsina@mail.ru
www.medlit.ru

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

Редактор **Е.И. Константинова**
Художественный редактор
А. В. Минаичев

Технический редактор
Т. В. Нечаева

Корректор **А. В. Малахова**
Переводчик **С. К. Чамороевский**
Верстка **Е. М. Архипова**

Сдано в набор 30.10.2014.
Подписано в печать 26.01.2015.
Формат 60 × 88%.
Печать офсетная.
Печ. л. 6,00.
Усл. печ. л. 5,88.
Уч.-изд. л. 6,36.
Заказ 5.

Отпечатано в типографии ООО
"Подольская Периодика",
142110, г. Подольск, ул. Кирова, 15
ISSN 0507-4088. *Вопр. вирусологии*. 2015.
Т. 60. №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 60 • 2015

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.)

Гендон Ю.З. (д.м.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., акад. РАН; Москва, Россия)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Кутырев В.В. (д.м.н., проф., акад. 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.А. (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., акад. РАН; Москва, Россия)

Резник В.И. (к.м.н.; Хабаровск, Россия)

Романенко В.В. (д.м.н., зам. рук. ФБУЗ "ЦГЭ в Свердловской обл."; Екатеринбург, Россия)

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., акад. 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, акад. РАН; Минск, Республика Беларусь)

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

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

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

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

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

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

Golovljova I. (PhD; Tallinn, Estonia)

Goujgoulova G. (PhD; Sofia, Bulgaria)

Hoenen T. (PhD; Hamilton, USA)

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

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

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

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

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

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

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

Oxford J. (DSc; London, UK)

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

Roggendorf M. (MD, Essen, Germany)

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

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

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

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

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

Vainionpää R. (Docent; Turku, Finland)

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

Webby R. (PhD, Memphis, USA)

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

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

VOPROSY VIROLOGII

(PROBLEMS OF VIROLOGY)

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

Volume 60 • 1 • 2015

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 Science, Professor

Scientific editor: **Zabrezhnyy A.D.**, Doctor of Biological Science, Professor

Members of editorial board:

Barinskiy I.F. – MD, PhD, DSc, Prof.; **Belousova R.V.** – Doctor of Veterinary Science, Prof.; **Galegov G.A.** – Doctor of Biological Science, Prof.; **Gendon Yu.Z.** – MD, PhD, DSc, Prof.; **Gulyukin M.I.** – Doctor of Veterinary Science, 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 Science, Prof., Academician of RAS; **Zuev V.A.** – MD, PhD, DSc, Prof.; **Ivanova O.E.** – MD, PdF, DSc, docent; **Karganova G.G.** – Doctor of Biological Science, docent; **Kiselev F.L.** – Doctor of Biological Science, 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. (Vladivostok); **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)



СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРЫ

- Лапин Б.А., Шевцова З.В.* К 50-летию открытия геморрагической лихорадки обезьян и вируса ГЛО 5
- Найхин А.Н., Лосев И.В.* Роль консервативных и гипервариабельных иммунодоминантных эпитопов внутренних белков вирусов гриппа А в формировании цитотоксического Т-клеточного иммунного ответа 11

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Логина Н.В., Дерябин П.Г., Вашкова В.В.* Биологическая характеристика коллекционных штаммов вирусов группы японского энцефалита 17
- Коломеец А.Н., Довгопольук Е.С., Сергеева И.В., Ястребов В.К., Тюменцев А.Т.* Показатели лекарственной устойчивости вируса иммунодефицита человека к антиретровирусным препаратам у ВИЧ-инфицированных лиц в Сибирском федеральном округе в 2010–2012 гг. 20
- Носик М.Н., Киселева И.А., Бочкова М.С., Рыжов К.А., Кравченко А.В., Покровский В.В.* Создание панели изолятов вируса иммунодефицита 1-го типа, резистентных к антиретровирусным препаратам 24
- Фазылов В.Х., Ткачева С.В., Мананова Э.Р., Якупова Ф.М.* Эффективность противовирусной терапии хронического гепатита С у пациентов, не ответивших на лечение, с учетом генотипирования по интерлейкину-28В 28
- Козлов В.Г., Иванов А.П., Иванова О.Е., Варгин В.В.* Получение поликлональных энтеровирусных антител (IgY) от куриц и их оценка в качестве альтернативы энтеровирусным нейтрализующим сывороткам кроликов 31
- Скорикова С.В., Буркитбаев Ж.К., Савчук Т.Н., Жибурт Е.Б.* Распространенность ВИЧ-, ВГС-, ВГВ-инфекций у доноров крови г. Астаны 34

В ПОМОЩЬ ВИРУСОЛОГУ

- Львов Н.Д., Абдулмеджидова А.Г.* Иммунные критерии активации герпесвирусной инфекции у женщин с физиологическим течением беременности 37
- Ерш А.В., Полтавченко А.Г., Пьянков С.А., Агафонов А.П., Кривенчук Н.А., Буторин Д.В.* Метод комплексной оценки гуморального иммунитета к детским вакциноуправляемым вирусным инфекциям 41
- Пирожков А.П., Тимофеев М.А., Борисевич И.В., Сыромятникова С.И., Шатохина И.В., Пантюхов В.Б., Ковальчук А.В., Борисевич С.В.* Чувствительность и специфичность набора реагентов для выявления антител к вирусу Хунин методом иммуноферментного анализа 46

CONTENTS

REVIEW

- Lapin B.A., Shevtsova Z.V.* To the 50th anniversary of the discovery of the simian hemorrhagic fever and SHF virus
- Naikhin A.N., Losev I.V.* The impact of conservative and hypervariable immunodominant epitopes in internal proteins of the influenza A virus on cytotoxic T-cell immune responses

ORIGINAL RESEARCH

- Loginova N.V., Deryabin P.G., Vashkova V.V.* The biological characteristic of the collection strains of viruses from the subgroup of Japanese encephalitis
- Kolomeets A.N., Dvzopoluk E.S., Sergeeva I.V., Yastrebov V.K., Tyumentsev A. T.* Indicators of the human immunodeficiency virus drug resistance to antiretroviral drugs in HIV-infected individuals in the Siberian federal district in 2010–2012
- Nossik M.N., Kiseleva I.A., Bochkova M.S., Ryzhov K.A., Kravtchenko A.V., Pokrovsky V.V.* A panel of the drug-resistance HIV-1 clinical isolates
- Fazylov V.Ch., Tkacheva S.V., Mananova E.R., Yakupova F.M.* Evaluation of the antiviral therapy for chronic hepatitis C in patients unresponsive to previous treatment with regard to the interleukin-28B genotypes
- Kozlov V.G., Ivanov A.P., Ivanova O.E., Wargin V.V.* Production of the polyclonal enterovirus antibodies of chicken (IgY) and its evaluation as alternative to the rabbit enterovirus neutralizing sera
- Skorikova S.V., Burkitbaev Zh.K., Savchuk T.N., Zhiburt E.B.* Prevalence and incidence of infections among blood donors in Astana
- Lvov N.D., Abdulmedzhidova A.G.* Immune signs of activation of the herpes simplex virus in women with physiological pregnancy
- Ersh A.V., Poltavchenko A.G., Pyankov S.A., Agaphonov A.P., Krivenchuk N.A., Butorin D.V.* The multiplex method of estimation of humoral immunity to vaccine regulated childhood infections
- Pirozhkov A.P., Timofeev M.A., Borisevich I.V., Syromiatnikova S.I., Shatokhina I.V., Pantyukhov V.B., Kovalchuk A.V., Borisevich S.V.* Sensitivity and specificity of the elisa kit for the detection of antibodies to Junin virus

TO VIROLOGIST'S AID

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

Лапин Б.А.¹, Шевцова З.В.²

К 50-летию открытия геморрагической лихорадки обезьян и вируса ГЛО

¹ФГБУ «НИИ медицинской приматологии» РАМН, 354376, Сочи; ²НИИ экспериментальной патологии и терапии АН Абхазии, 384900, Сухум

Подведены итоги изучения геморрагической лихорадки обезьян (ГЛО) и вируса ГЛО за прошедший период со времени их открытия. Установлено, что источником этой смертельной для азиатских макак инфекции являются африканские обезьяны – носители вируса. Сохраняется опасность возникновения эпизоотий в приматологических центрах при завозе этих обезьян для исследований. Подчеркивается важность полученной экспериментальной ГЛО макак. Эта модель является единственной безопасной и адекватной, необходимой для дальнейшего изучения вопросов патогенеза и оценки средств патогенетической терапии геморрагических лихорадок (ГЛ), опасных для человека.

Ключевые слова: *геморрагическая лихорадка обезьян; вирус ГЛО; Сухуми-64; Бетезда-64; эпизоотия; артери-вириды; ДВС-синдром; ГЛ; Эбола; Марбург; Ласса; макака.*

Для цитирования: *Вопросы вирусологии. 2015; 60 (1): 5–11.*

Lapin B.A.¹, Shevtsova Z.V.²

To the 50th anniversary of the discovery of the simian hemorrhagic fever and SHF virus

¹Research Institute of Medical Primatology, Russian Academy of Medical Sciences, 354376, Sochi, Russia; ²Research Institute of Experimental Pathology and Therapy, Abkhazian Academy of Sciences, 384900, Sukhum

The results of the study of SHF and virus SHF for the last period since their discovery are summed up. It was established that the source of this infection fatal for Asian macaques are African monkeys – virus carriers. There is still a danger of the occurrence of epizootics in Primatological Centers at the importation of these monkeys for research. The importance of the obtained experimental SHF in macaques was emphasized. This model is unique, safe and adequate. It is necessary for further study of pathogenesis and evaluation of the means of pathogenetic therapy of HF dangerous to human health.

Key words: *simian hemorrhagic fever; SHF virus; «Sukhumi-64»; «Bethesda-64»; epizootic; Arteriviridae; HF TGS syndrome; Ebola; Marburg; Lassa.*

Citation: *Voprosy virusologii. 2015; 60(1): 5–11. (In Russ.)*

Введение. В группу вирусных геморрагических лихорадок (ГЛ) человека в настоящее время включено 16 этиологически самостоятельных форм. Несмотря на то что их возбудители относятся к 5 различным семействам, эти заболевания проявляются однотипно. Для всех характерно развитие разнообразных проявлений геморрагического диатеза и сходство основных патогенетических звеньев, связанных с разрушением инфицированных клеток и патологической проницаемостью капилляров. В последние 15–20 лет наблюдаются тенденция к утяжелению течения таких особо опасных контагиозных ГЛ, как Эбола, Марбург, Ласса и др., а также расширение ареала их распространения с возможностью завоза на эндемичные территории разных стран [1, 2]. В связи с этим они включены в список инфекционных заболеваний, подлежащих уведомлению ВОЗ [3]. Средства этиотропной терапии и специфической профилактики отсутствуют, за исключением рибавирина – эффективного препарата для лечения аденовирусных геморрагических лихорадок (Ласса и южноамериканских). Применяемая патогенетическая терапия малоэффективна из-за недостаточной изученности патогенеза. Использо-

вание для этих целей обезьян как единственных животных, у которых заболевание протекает в сходной с человеческой форме, ограничено из-за опасности работы с этими вирусами. В связи с изложенным несомненный интерес представляет геморрагическая лихорадка обезьян (ГЛО), вирус которой не патогенен для человека.

Геморрагическая лихорадка обезьян. Знакомство с этой инфекцией состоялось в августе 1964 г. во время эпизоотии среди макак Сухумского питомника обезьян НИИЭПит АМН СССР. Неизвестное ранее заболевание было завезено с партией импортированных из Индии макак. Из привезенных 60 макак резусов в течение 1 мес погибли 55. Инфекция распространилась и на обезьян стада, размещенных в других помещениях питомника. В течение сентября и октября заболели и погибли еще 64 обезьяны рода макак. Эпизоотологический анализ показал, что передача инфекта внутри партии привезенных обезьян и от них животным стада происходила опосредованно, через недостаточно обработанный медицинский инструментарий (татуировка, лечебные и экспериментальные манипуляции).

Клинико-патоморфологическая характеристика. Клиническими признаками заболевания были вялость, анорексия, атаксия, тремор, сонливость, повышение температуры тела и различные проявления геморрагического диатеза. В периферической крови наблюдались нейтрофилез со сдвигом влево, лимфопения, появление в мазках крови микроформ нейтрофилов, эритро- и нормобластов, ретикулярных, плазматических клеток и атипичных мононуклеаров. У большинства животных отмечены бактериемия и протениурия. Все заболевшие обезьяны погибали в течение 5–14 дней с явлениями шока: снижением температуры тела, падением АД, частым слабым пульсом, цианозом, холодными конечностями, прострацией. При вскрытии признаки геморрагического диатеза наблюдались практически во всех органах, включая оболочки и ткань мозга; наиболее выраженными они были в слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). При гистологическом исследовании в стенках мелких сосудов и капилляров выявлены набухание и гибель эндотелия, отек, плазматическое пропитывание с отложением фибрина, фибриноидный некроз, капиллярно-венозные стазы и тромбозы – изменения, характерные для синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС). На этом фоне в органах были выражены дистрофические и некротические изменения, значительное повреждение лимфоидного аппарата и клеток ретикулоэндотелиальной системы (РЭС). Комплекс клинико-патоморфологических проявлений позволил отнести заболевание к группе ГЛ [4].

Этиология. Вирусная природа инфекции была установлена воспроизведением заболевания у здоровых макак резусов при парентеральном введении им материалов от больных обезьян (сыворотка, гомогенаты головного мозга), пропущенных через фильтры (свечи Шамберлана L_5 , L_7 , L_{11}). Были изучены основные биологические и физико-химические свойства вируса, выделенного и поддерживаемого в пассажах на макаках [5, 6]. Он обладал исключительно ограниченным спектром патогенности для животных и культур клеток. Вирус вызывал заболевание, сходное со спонтанным, и гибель только у обезьян рода макак. При заражении африканских обезьян (зеленые мартышки, красные обезьяны и павианы гамадрилы) развивалась инаппарантная инфекция с вирусемией. К вирусу были нечувствительны различные виды мелких лабораторных животных (мыши, крысы, хомяки, кролики, морские свинки), однодневные цыплята, куриные эмбрионы. У него не удалось обнаружить гемагглютинирующие свойства по отношению к эритроцитам человека, обезьян, кур, гусей, морских свинок, барана при трех температурных режимах и трех зонах рН. Вирус не размножался ни в одной из 38 зараженных культур клеток (первичные и постоянные). Перmissible оказались только клетки первичной культуры почек эмбриона макак резусов (ПЭМР). Цитопатическое действие наблюдалось лишь в 1-м пассаже. Однако размножение вируса в этих клетках продолжалось при пассировании. Это было доказано воспроизведением заболевания с гибелью у здоровых макак резусов при введении им культуральных материалов 3-го и 4-го пассажей. Таким образом, вирус удалось изолировать только в клетках ПЭМР [7]. По данным электронной микроскопии и фильтрации, размеры вирионов сферической формы находились в пределах 30 – 45 нм; плавучая плотность в градиенте хлорида цезия составляла 1,20–1,22 г/мл. Вирус был чувствителен к обработке эфиром и хлороформом, прогреванию при 60°C в течение 30 мин, сохранял патогенность для обезьян при лиофилизации.

Сравнение полученных результатов со свойствами известных вирусов ГЛ позволило сделать вывод о том,

что выделенный вирус является новым, не описанным ранее. Из этого следовало, что и вызываемая им ГЛО, имеющая свой самостоятельный этиологический агент, является новой нозологической формой, названной нами аналогичным образом. Выделенный и изученный штамм вируса ГЛО, обозначенный нами Сухуми-64, был принят в Государственную коллекцию вирусов СССР при Институте вирусологии им. Д.И. Ивановского АМН СССР и зарегистрирован как самостоятельный вид за подписью акад. В.М. Жданова, являвшегося в то время членом Международного комитета по классификации и таксономии вирусов [8].

Первое сообщение об открытии заболевания и вируса было сделано нами на IX Международном конгрессе по микробиологии в 1966 г. [9]. Как нам стало известно из персонального сообщения американского вирусолога С. Калтера, присутствовавшего на конгрессе, в 1964 г. через 2 мес после сухумской эпизоотии вспышка сходного заболевания наблюдалась в колонии обезьян Национального института здоровья в Бетезде, погибли 223 макаки. Полученные от больных обезьян материалы были заморожены. После конгресса С. Калтер посетил НИИЭПит. Он ознакомился с результатами нашего исследования, в частности, с не опубликованными еще данными о том, что перmissive для вируса являются клетки ПЭМР. Первые публикации об эпизоотии в Бетезде появились в 1968 г., т. е. спустя 2 года после наших первых сообщений. Американские ученые подтвердили полученные нами ранее результаты по характеристике заболевания и вируса и приняли названия, данные нами: SHF – simian hemorrhagic fever and SHFV – simian hemorrhagic fever virus [10, 11]. Для изоляции вируса они использовали также перmissive клетки ПЭМР – перевиваемую культуру этих клеток MA-104, в которой вирус размножался с цитопатическим эффектом (ЦПЭ). Выделенный штамм был обозначен НИН (позже Bethesda-64) [12]. В этой же культуре они изолировали и штамм Сухуми-64 из присланных нами сывороток больных макак. Ими было показано, что Сухуми-64 и НИН размножаются в клетках культуры MA-104 со сходным ЦПЭ и неотличимы в серологических реакциях связывания комплемента (РСК) и выполненных методом флюоресцирующих антител (МФА) [13]. В наших сравнительных исследованиях также было выявлено их антигенное родство в РСК. Однако в реакции нейтрализации *in vivo* (на макаках) перекрестной защиты не наблюдалось: каждый штамм нейтрализовался только гомологичной сывороткой. Все это свидетельствовало о том, что штаммы родственны, но не идентичны [14].

Более 30 лет вирус ГЛО не удавалось классифицировать. Постепенно накапливались данные разных авторов в пользу сделанного нами ранее вывода о том, что он является новым. Так, для идентификации вируса было проведено широкое серологическое исследование, в котором двумя методами (РСК и МФА) было проверено 100 вирусов из различных семейств с использованием в качестве эталонных штаммов Bethesda-64 и Сухуми-64. Только эти 2 штамма положительно реагировали с сывороткой к прототипному штамму НИН. Эти результаты показали, что вирус ГЛО не имеет антигенного родства ни с одним из проверенных вирусов, включая все известные возбудители, вызывающие ГЛ [15]. Результаты, полученные при электронно-микроскопическом исследовании инфицированных клеток MA-104, свидетельствовали об особенностях морфогенеза вируса ГЛО. Появлению полных вирионов в вакуолях цитоплазмы предшествовали уникальные ламинарные структуры, не описанные для других вирусов [16]. К 1998 г. была изучена молекулярная биология вируса, дана характери-

Эпизоотии ГЛО в колониях обезьян

Место расположения колонии	Время эпизоотии – год, месяц	Количество погибших макак	Штамм вируса		Ссылки
			название	размножение в культуре	
Сухуми, СССР	Июль 1964	64	Сухуми-64	+	Лапин Б.А., Шевцова З.В., 1966 [9]; Лапин Б.А. и др., 1967 [4]; Шевцова З.В. 1967, 1969 [5, 7]
Бетезда, США	Ноябрь 1964	223	Bethesda-64	+	Allen A.M. et al., 1968 [10] Palmer A.E. et al., 1968 [11] Tauraso N.M. et al., 1968 [13]
Дэвис, Калифорния, США	Октябрь 1967	520	Davis-67	–	Shelokov A. et al., 1971 [22] Tauraso N.M. et al, 1971 [15]
Сассекс, Великобритания	Январь 1968	140	Sussex-68	–	Shelokov A. et al., 1971 [22] Tauraso N.M. et al., 1971 [15]
Сассекс, Великобритания	Февраль 1969	205	Sussex-69	+	Tauraso N.M. et al., 1970 [23] Myers M.G. et al., 1972 [25]
Роквилл, США	Ноябрь 1972	212	Corbell-72	–	London W.T. 1973, 1977 [20, 21]; Madden D.L. et al., 1978 [24]
Университет Нью-Мексико, США	Апрель 1989	400	Нет данных	Нет данных	Kalter S.S., Heberling R.L., 1990 [26] Renquist D., 1990 [27]

стика генома, представленного плюс-нитью РНК, описаны молекулярные механизмы репликации, экспрессии генов, ряд вирусных белков. На основании полученных данных вирус ГЛО (SHF) был включен во вновь сформированное семейство *Arteriviridae* [17–19].

Эпизоотология. Двумя вышеописанными эпизоотиями 1964 г. история ГЛО только началась, и в последующем, в период с 1967 по 1989 г., в колониях макак приматологических учреждений разных стран наблюдались вспышки этой инфекции [15, 20–23]. Некоторые сведения об эпизоотиях, нанесших существенный ущерб, представлены в таблице. Болели и погибали только обезьяны рода макак. Клинико-патоморфологическая картина заболевания была сходной с наблюдавшимися в Сухуми и Бетезде. Во время этих эпизоотий было выделено 4 штамма вируса ГЛО. Подтвердились данные о физико-химических и биологических свойствах вируса. В культуре клеток удалось выделить только один из них – Sussex-69. Он размножался в клетках MA-104 с ЦПЭ, как и два первых (Сухуми-64 и Бетезда-64), и положительно реагировал с иммунной к ним сывороткой в РСК и МФА [24, 25]. Остальные штаммы (Davis 67, Sussex-68 и Corbell-72) не удалось размножить ни в одной, включая MA-104, клеточной культуре. Они были представлены нативными вирусосодержащими материалами, положительно реагировавшими с прототипной сывороткой только в РСК. Это свидетельствовало о том, что они родственны трем предыдущим штаммам, но не идентичны им (см. таблицу) [14, 15].

При анализе 5 первых эпизоотий прослеживалась связь их возникновения с привозом макак из Индии. Источник инфицирования остался неизвестным. Было очевидно, что макаки не являются основным хозяином вируса ГЛО. При скоротечности процесса и 100% летальности такой исход инфекции биологически не оправдан, он не выгоден микроорганизму для сохранения вида. Предположительно инфекцию азиатским макакам могли передать африканские обезьяны: зеленые мартышки, красные обезьяны (*patas*) или павианы гамадрилы. Как было показано при экспериментальном заражении, инфекция у них протекает субклинически с вирусемией [7]. Это предположение подтвердилось при анализе двух следующих вспышек, наблюдавшихся в 1972 г. в Роквилле и

в 1974 г. в Сухуми при небольшой вспышке ГЛО среди 9 макак лапундеров [28]. Источником инфекции оказались размещенные в соседних с макаками помещениях красные обезьяны, у которых заболевание протекало в инанпаратной форме с вирусемией. Это было доказано при обеих эпизоотиях (независимо друг от друга) воспроизведением заболевания с гибелью у здоровых макак при введении материалов (сыворотка или гомогенаты органов) от красных обезьян. Позже были получены дополнительные доказательства, что красные обезьяны с хронической инанпаратной инфекцией являются носителями вируса ГЛО. От этих обезьян был получен изолят вируса P-248 [29]. Он размножался в клетках MA-104 без ЦПЭ и положительно реагировал с сывороткой к прототипному штамму NIH в ELISA, но нейтрализовался только гомологичной сывороткой. Недавно появилось сообщение об обнаружении вируса ГЛО у красных колобусов в Национальном парке Кибал в Уганде [30]. Остается открытым вопрос о природном резервуаре вируса. Имеющиеся данные позволяют предположить, что в Африке существует комплекс родственных природных вариантов вируса, в циркуляции которых участвуют обезьяны. Изучение естественной истории вируса ГЛО продолжается.

Экспериментальная ГЛО макак как модель для изучения патогенетических механизмов, общих для заболеваний этой группы. В опытах на макаках резусах была воспроизведена и подробно охарактеризована экспериментальная ГЛО, сходная со спонтанной [31]. Сравнение полученных результатов с имеющимися в литературе данными литературы по различным ГЛ свидетельствовало в пользу мнения большинства исследователей о том, что в основе их патогенеза лежат общие патофизиологические механизмы. Для изучения этих механизмов адекватной моделью можно считать только обезьян, так как лишь у этих животных заболевание протекает в форме, сходной с человеческой. Учитывая вышеизложенное и отсутствие патогенности вируса ГЛО для человека, мы предложили и использовали экспериментальную ГЛО в качестве модели для изучения ряда вопросов патогенеза, общих для заболеваний этой группы [8, 32].

Результаты заражения макак различным путем (на слизистые глаз, через рот, под кожу, в вену, внутримышеч-

но и интрацеребрально) указывали на то, что основным способом проникновения вируса ГЛО является парентеральный [33]. Распространенность вируса в организме и его тропность изучали параллельно в биологической пробе (заражение макак) и с помощью МФА. Было обнаружено, что вирус циркулирует в крови со 2-го дня после заражения до гибели (6–21-й день) с максимальной концентрацией в разгар болезни (LD_{50} соответствовала 10^5 /мл). В период клинических проявлений вирус был обнаружен во всех исследованных органах (головной и спинной мозг, костный мозг, печень, почки, селезенка), а также в моче и смывах носоглотки. При использовании МФА вирусспецифический антиген был выявлен во всех названных органах. При этом диффузные скопления и глыбки антигена наблюдали преимущественно в эндотелии капилляров, макрофагах, купферовских клетках, глиальных элементах и других ретикулярных клетках [34]. Это свидетельствовало о тропности вируса к клеткам РЭС – моноцитарно-макрофагальной системы (ММС). Позже были получены доказательства, подтверждающие наши данные, а именно: мишенью для репликации вируса ГЛО являются клетки этой системы [35]. Исследователи установили, что штаммы Сухуми-64 и Bethesda-64 размножаются в культуре перитонеальных макрофагов макак резусов, причем инфекция сопровождается лизисом этих клеток. Следует отметить, что к такому же выводу пришли и исследователи, изучавшие тропность вируса Эбола на 4 видах лабораторных приматов. Ультраструктурное исследование органов зараженных обезьян выявило размножение вируса в макрофагах, эндотелии, фибробластах, гепатоцитах и клетках коры надпочечников [36].

Экспериментальная модель ГЛО была использована и для изучения сдвигов в системе гемостаза [37]. С этой целью у зараженных макак в динамике определяли 14 показателей, характеризующих его состояние. В инкубационный и начальный периоды, в разгар болезни и в терминальной стадии показатели этой системы имели противоположную направленность, причем в основном за счет изменений в сосудистом звене. Характер коагулограмм соответствовал наблюдаемым при тромбогеморрагическом синдроме (ТГС) или ДВС. Для этого синдрома характерна выявленная нами при данном заболевании фазность гемостатических изменений: смена первичной гиперкоагуляции вторичной гипокоагуляцией. Анализ гемостатических нарушений указывал также на то, что ТГС (ДВС) развивается по линии активации сосудистого компонента системы [8]. С нашими данными согласуются результаты, полученные при изучении гемостатических нарушений с развитием ДВС у макак во время эпизоотии ГЛО в Калифорнии (Davis-67) [38]. Аналогичные нарушения системы гемостаза описаны у макак и при желтой лихорадке [39].

Существенные сдвиги в процессе заболевания были обнаружены при исследовании кортикостероидной функции надпочечников [40]. Повышение уровня гидрокортизона в ранний период сопровождалось редукцией лимфоидной ткани и гиперкоагуляцией. О серьезном нарушении функции коры надпочечников свидетельствовало резкое падение продукции гидрокортизона в разгар заболевания и в терминальной стадии, что согласуется с наблюдавшимися в эти периоды гипотонией, геморагиями, снижением резистентности к бактериям, развитием периферического сосудистого коллапса. Все это указывает на вовлечение гормональной реакции коры надпочечников в патогенез ГЛО.

Сопоставление полученных клинико-лабораторных и патоморфологических данных позволило нам еще в 70-е годы прошлого века прийти к выводу, что в пато-

и танатогенезе ГЛО важную роль играет ТГС (ДВС), и предложить следующую схему последовательности развития патологических процессов [8]. В возникновении и развитии этого синдрома ведущей является выявленная тропность вируса к ретикулоэндотелиальным элементам (эндотелий сосудов, макрофаги, глия, купферовские клетки и др.). В результате их гибели повышается уровень тканевых факторов, что является пусковым механизмом повышения свертывания крови. Сдвигу в сторону гиперкоагуляции способствуют также высокий уровень гидрокортизона и нарушение противосвертывающей функции РЭС. Это реализуется развитием 1-й стадии ТГС. При повреждении эндотелия мелких сосудов и капилляров нарушается гемостатическое равновесие, которое поддерживается на поверхности контакта сосудов с кровью, повышается проницаемость сосудистой стенки, происходит протекание богатой фибриногеном плазмы во все ее слои и околососудистые пространства с последующим выпадением фибрина. Нарушаются вазомоторная и трофическая функции сосудов, формируются отечно-дистрофические изменения, повышается проходимость стенок сосудов для эритроцитов, что ведет к диapedезным кровоизлияниям и кровотечениям. Развитию расстройств кровообращения в микрорусле способствует падение уровня гидрокортизона, снижается фибринолитическая активность, способность крови к свертыванию. Весь комплекс происходящих изменений приводит к развитию геморрагического диатеза – 2-й стадии ТГС, падению сосудистого тонуса, необратимому шоку и гибели [8]. Наши представления о ключевой роли в развитии ДВС повышения уровня тканевых факторов в результате инфицирования клеток ММС при ГЛО согласуются с данными, полученными позже при изучении лихорадки Эбола на макаках [41] и павианах [36].

Заключение. В течение всего прошедшего полувекового периода ГЛО и ее возбудитель оставались в сфере внимания исследователей. На протяжении 25 лет эпизоотии этой инфекции наблюдались в различных приматологических учреждениях мира, нанося им значительный урон. Установлено, что источником инфекции для азиатских макак являются африканские обезьяны (в основном красные) – носители вируса. Сравнительное изучение выделенных при эпизоотиях штаммов с использованными в качестве эталонных Сухуми-64 и Bethesda-64 показало, что имеется комплекс природных вариантов вируса ГЛО. Оказалось, что эта инфекция эндемична для ряда регионов Африки, в которых обитающие там обезьяны участвуют в циркуляции вируса. Представляет интерес выяснение природного резервуара вируса и дальнейшее изучение естественной истории ГЛО. Сохраняется угроза возникновения эпизоотии инфекции при завозе африканских обезьян в приматологические учреждения.

Следует особенно подчеркнуть важность использования вируса ГЛО и воспроизведенной с его помощью модели в медицинских целях. Повышенный в последние 10–15 лет интерес к ним объясняется возросшим эпидемическим потенциалом особо опасных контагиозных для человека ГЛ (Эбола, Марбург, Ласса) и возможностью их интродукции на неэндемичные территории. Актуальность проблемы обусловлена и внесением их возбудителей в список биотеррористических агентов. Работа с этими вирусами с целью моделирования опасна, описаны случаи лабораторного заражения [42]. В литературе вновь поднимается вопрос о важности использования экспериментальной ГЛ макак как единственной безопасной адекватной модели, необходимой для изучения нерешенных вопросов патогенеза и оценки разра-

батываемых средств терапии ГЛ, опасных для человека. Исследованиям, планируемым в этой области, придается большое значение [43].

Отражением нарастающего интереса к проблеме ГЛО (SHF) являются многочисленные публикации, посвященные этой проблеме [44–47], а также монография J.H. Kuhn и соавт. [48], в которую включены наши материалы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Маркин В.А., Марков В.И. Вирусные геморрагические лихорадки – эволюция эпидемического потенциала. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2002; 1: 91–8.
2. Борисевич И.В., Маркин В.А., Фирсова И.В., Есеев А.А., Хамитов Р.А., Максимов В.А. Эпидемиология, профилактика, клиника и лечение геморрагических лихорадок (Марбург, Эбола, Ласса и Бразильской). *Вопросы вирусологии*. 2006; 5: 8–16.
3. Кутырев В.В. Актуальные проблемы особо опасных инфекционных болезней и санитарная охрана территорий в современных условиях. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2008; 1: 17–23.
4. Лапин Б.А., Пекерман С.М., Яковлева Л.А., Джикидзе Э.К., Шевцова З.В., Куксова М.И. и др. Вирусная геморрагическая лихорадка обезьян. *Вопросы вирусологии*. 1967; 2: 168–73.
5. Шевцова З.В. Изучение этиологии геморрагической лихорадки обезьян. *Вопросы вирусологии*. 1967; 1: 47–51.
6. Шевцова З.В., Куксова М.И., Джикидзе Э.К., Крылова Р.И., Данько Л.В. Экспериментальное изучение геморрагической лихорадки обезьян. В кн.: *Материалы Международного симпозиума «Биология и патология обезьян, изучение болезней человека в эксперименте на обезьянах»*. Тбилиси: 1966: 148–50.
7. Шевцова З.В. Дальнейшее изучение вируса геморрагической лихорадки обезьян. *Вопросы вирусологии*. 1969; 5: 604–7.
8. Шевцова З.В. *Геморрагическая лихорадка обезьян макак (этиология, клиника-морфологические особенности, патогенез)*. Дисс. ... докт. мед. наук. Сухуми; 1974.
9. Лапин Б.А., Шевцова З.В. Изучение вирусной геморрагической лихорадки обезьян. В кн.: *Тезисы IX Международного конгресса по микробиологии*. М.: 1966: 465–6.
10. Allen A.M., Palmer A.E., Tauraso N.M., Shelokov A. Simian hemorrhagic fever. II. Studies in pathology. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1968; 17: 413–21.
11. Palmer A.E., Allen A.M., Tauraso N.M., Shelokov A. Simian hemorrhagic fever. I. Clinical and epizootologic aspects of an outbreak among quarantined monkeys. *Am. J. Med. Hyg.* 1968; 17: 404–12.
12. Tauraso N.M., Shelokov A., Palmer A.E., Allen A.M. Simian hemorrhagic fever. III. Isolation of viral agent. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1968; 17: 422–31.
13. Tauraso N.M., Shelokov A., Allen A.M., Palmer A.E., Aulisio C.G. Two epizootics of simian hemorrhagic fever. *Nature*. 1968; 218: 876–7.
14. Lapin B.A., Shevtsova Z.V. On the identity of two simian hemorrhagic fever virus strains (Sukhumi and NIH). *Z. Versuchstierkunde*. 1971; 13: 21–4.
15. Tauraso N.M., Aulisio C.G., España C.D., Wood O.L. Simian hemorrhagic fever virus. In: Martini G.A., Siebert R., eds. *Marburg virus disease*. Berlin – Heidelberg – N.Y.: Springer; 1971: 208–15.
16. Wood O.L., Tauraso N.M., Liebhaber H. Structure and morphogenesis of simian hemorrhagic fever virus. *J. Gen. Virol.* 1970; 7: 129–36.
17. Godeny E.K., de Vries A.A.F., Wang X.C., Smith S.L., de Groot R.J. Identification of the leader-body junction for the viral subgenomic in RNAs and organization of the simian hemorrhagic fever virus genome: evidence for gene duplication during arterivirus evolution. *J. Virol.* 1998; 12(1): 862–7.
18. Snijder E.J., Meulenberg J.J. The molecular biology of arteriviruses. *J. Gen. Virol.* 1998; 79 (Pt 5): 961–79.
19. Regemortel M.N., Fauquet C., Bishop D., Carstens E., Estes M., Lemon S. et al., eds. *Virus Taxonomy: Classification and nomenclature of viruses: Seventh report of the International Committee on Taxonomy of viruses*. San Diego: Academic Press; 2000.
20. London W.T. An outbreak of simian hemorrhagic fever. In: *Primate Zoonoses Surveillance*. Atlanta: Center for Disease Control; 1973; rep no. 10: 5–6.
21. London W.T. Epizootology, transmission and approach to prevention of fatal simian hemorrhagic fever in rhesus monkeys. *Nature*. 1977; 268: 344–5.
22. Shelokov A., Tauraso N.M., Allen A.M., España C.D. Epizootic, clinical and pathological aspects of simian hemorrhagic fever. In: Martini G.A., Siebert R., eds. *Marburg virus disease*. Berlin – Heidelberg – N.Y.: Springer; 1971: 203–7.
23. Tauraso N.M., Myers M.G., McCarthy K., Tribe G.W. Simian hemorrhagic fever: The proceedings of the international symposium «Infection and Immunosuppression in subhuman primates». Balner H. and Beveridge W.I.B., eds. Copenhagen, Munksgaard – Baltimore: Williams & Wilkins; 1970: 101–9.
24. Madden D.L., Fucciolo D.A., Dorosz J.A., London W.T., Palmer A.E., Castellano G.A. Antigenic relationship of two strains of SHFV. *Lab. Anim. Sci.* 1978; 28 (4): 422–7.
25. Myers M.D., Vincent M.M., Hensen S.A., Tauraso N.M. Problems in laboratory isolation of simian hemorrhagic fever virus and isolation of the agent responsible for the Sussex-69 epizootic. *Appl. Microbiol.* 1972; 24 (1): 62–9.
26. Kalter S.S., Heberling R.L. Primate viral diseases in perspective. *J. Med. Primatol.* 1990; 19 (6): 519–35.
27. Renquist D. Outbreak of simian hemorrhagic fever. *J. Med. Primatol.* 1990; 19 (1): 77–9.
28. Шевцова З.В., Пекерман С.М., Крылова Р.И. Геморрагическая лихорадка обезьян по материалам Сухумского питомника. В кн.: Лапин Б.А., ред. *Моделирование патологических состояний человека*. М.: АМН СССР и ИПВЭ; 1977; II: 114–8.
29. Gravel M., London W.T., Rodriguez M., Palmer A.E., Hamilton R.S. Simian hemorrhagic fever: New virus isolate from a chronically infected patas monkey. *J. Gen. Virol.* 1980; 51: 99–106.
30. Lauck M., Hyeroba D., Tumukunde A., Weny G., Lank S.M., Chapman C.A. et al. Novel divergent simian hemorrhagic fever viruses in a wild Ugandan red Colobus monkey discovered using direct pyrosequencing. *PLoS*. 2011; 6 (4): e19056.
31. Lapin B.A., Shevtsova Z.V., Krylova R.I. Experimental hemorrhagic fever of monkeys: Proceedings 2nd Intern. Congress of Primatol. Hoffer H.O., ed. Atlanta. 1969; 3: 196–203.
32. Шевцова З.В., Лапин Б.А., Кармышева В.Я., Чумаков М.П. Геморрагическая лихорадка обезьян – модель для изучения патогенеза геморрагических лихорадок человека. В кн.: *Тезисы докладов «Использование обезьян в экспериментальной медицине»*. Сухуми, 12–14 ноября. Сухуми; 1974: 63–6.
33. Пекерман С.М., Шевцова З.В. Материалы о вспышке геморрагической лихорадки обезьян макак в Сухуми. В кн.: Чумаков М.П., ред. *Тезисы 17-й науч. сессии Института полиомиелита и вирусных энцефалитов «Актуальные проблемы вирусологии и профилактики вирусных заболеваний»*. М.: ИПВЭ; 1972: 326–7.
34. Шевцова З.В., Кармышева В.Я., Чумаков М.П. Вирусологическое изучение геморрагической лихорадки обезьян. *Вопросы вирусологии*. 1975; 4: 471–6.
35. Gravel M., Palmer A.E., Rodriguez M., London W.T., Hamilton R.S. Method to detect asymptomatic carriers of simian hemorrhagic fever virus. *Lab. Anim. Sci.* 1980; 30 (6): 988–91.
36. Рябникова Е.И., Лучко С.В., Гражданцева А.А., Рассадкин Ю.Н. Опыт использования лабораторных приматов при изучении вирусной геморрагической лихорадки Эбола. В кн.: *Материалы Всероссийской научной конференции «Перспективные направления использования лабораторных приматов в медико-биологических исследованиях»*. Сочи –Алдер; 2006: 32–8.
37. Уварова В.И., Шевцова З.В. Изучение системы гемостаза при геморрагической лихорадке макак. В кн.: Чумаков М.П., ред. *Тезисы 17-й науч. сессии Института полиомиелита и вирусных энцефалитов «Актуальные проблемы вирусологии и профилактики вирусных заболеваний»*. М.: ИПВЭ; 1972: 329–30.
38. Abildgard Ch., Harrison J., España C., Spangler W., Gribble D. Simian hemorrhagic fever: studies of coagulation and pathology. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1975; 24 (3): 537–44.
39. Dennis L.H., Reisberg B.E., Crosbie J., Crozier D., Conrad M.E. The original hemorrhagic fever: yellow fever. *Br. J. Hematol.* 1969; 17: 455–62.
40. Гончаров Н.П., Вербергер В., Шуберт К., Шевцова З.В. Секреторная функция коры надпочечников у макак резусов, больных геморрагической лихорадкой обезьян. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 1971; 2: 31–6.
41. Geisbert T.W., Young N.A., Jahrling P.B., Davis K.J., Kagan E., Hensley L.E. Mechanisms underlying coagulation abnormalities in Ebola hemorrhagic fever: over expression of tissue factor in primate monocytes/macrophages is a key event. *J. Inf. Dis.* 2003; 188 (11): 1618–29.
42. Семина Н.А., Ковалева Е.П. Заболевания медработников особо опасными инфекциями, ассоциированными с лабораторными зараженными. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2005; 1 (20): 23–8.
43. Johnson R., Cai V., Wahl-Jensen V., Fang Y., Friedrich T., Radoshitzky S.R. et al. Simian hemorrhagic fever virus as a model for risk group 4 pathogens. В кн.: *Материалы Второй международной конфе-*

ренции «Фундаментальные и прикладные аспекты медицинской приматологии». Сочи-Адлер; 2011; 1: 227–33.

44. Johnson R.F., Dodd L.E., Yellayi S., Gu W., Cann J.A., Jett C. et al. Simian hemorrhagic fever virus infection of rhesus macaques as a model of viral hemorrhagic fever: clinical characterization and risk factors for severe disease. *Virology*. 2011; 421 (2): 129–40.
45. Геморрагическая лихорадка обезьян – ГЛЮ. В кн: Лапин Б.А., Джикидзе Э.К., Шевова З.В., Стасилевич З.Н. *Моделирование инфекционных заболеваний человека на лабораторных приматах*. Сочи: ООО Стерх; 2011: 184–8.
46. Vatter H.A., Brinton M.A. Differential responses of disease-resistant and disease-susceptible primate macrophages and myeloid dendritic cells to simian hemorrhagic fever virus infection. *J. Virol.* 2014; 88 (4): 2095–106. Epub ahead of print 2013 Dec 11.
47. Lauck M., Sibley S.D., Hyeroba D., Tumukunde A., Weny G., Chapman C.A. et al. Exceptional simian hemorrhagic fever virus diversity in a wild African primate community. *J. Virol.* 2013; 87 (1): 688–91.
48. Kuhn J., Jahrling P.B., Calisher C.H., eds. *Simian Hemorrhagic Fever*. Archives of Virology Supplement Vol. 21. London: Springer; 2015.

REFERENCES

1. Markin V.A., Markov V.I. Viral haemorrhagic fevers – evolution of the epidemic potential. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, immunobiologii*. 2002; 1: 91–8. (in Russian)
2. Borisovich I.V., Markin V.A., Firsova I.V., Evseev A.A., Khamitov R.A., Maksimov V.A. Hemorrhagic (Marburg, Ebola, Lassa, and Bolivian) fevers: epidemiology, clinical pictures, and treatment. *Voprosy virusologii*. 2006; 51 (5): 8–16. (in Russian)
3. Kutyrev V.V. Quarantine infectious diseases and sanitary control of territories in modern conditions. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, immunobiologii*. 2008; 1: 17–23. (in Russian)
4. Lapin B.A., Pekerman S.M., Iakovleva L.A., Dzhikidze E.K., Shevtsova Z.V., Kuksova M.I. et al. Hemorrhagic fever in monkeys. *Voprosy virusologii*. 1967; 12 (2): 168–73. (in Russian)
5. Shevtsova Z.V. Study of the etiology of hemorrhagic fever in monkeys. *Voprosy virusologii*. 1967; 12 (1): 47–51. (in Russian)
6. Shevtsova Z.V., Kuksova M.I., Dzhikidze E.K., Krylova R.I., Dan'ko L.V. Experimental study of hemorrhagic fever monkeys. In: *Biology and pathology of monkeys, the study of human disease in an experiment on monkeys. Proceedings of the International Symposium [Materialy Mezhdunarodnogo simpoziuma «Biologiya i patologiya obez'yan, izuchenie bolezney cheloveka v eksperimente na obez'yanakh»]*. Tbilisi; 1966: 148–50. (in Russian)
7. Shevtsova Z.V. A further study of simian hemorrhagic fever virus. *Voprosy virusologii*. 1969; 14 (5): 604–7. (in Russian)
8. Shevtsova Z.V. *Hemorrhagic fever in Macaca monkeys (etiology, clinical and morphological features, pathogenesis)* [Gemorragicheskaya lixoradka obez'yan makak (etiologiya, kliniko-morfologicheskie osobennosti, patogenez)]; Diss. Sukhumi; 1974. (in Russian)
9. Lapin B.A., Shevtsova Z.V. The study of viral hemorrhagic fever in monkeys. In: *Abstracts of the IX International Congress on Microbiology [Tezisy IX Mezhdunarodnogo kongressa po mikrobiologii]*. Moscow; 1966: 465–6. (in Russian)
10. Allen A.M., Palmer A.E., Tauraso N.M., Shelokov A. Simian hemorrhagic fever. II. Studies in pathology. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1968; 17: 413–21.
11. Palmer A.E., Allen A.M., Tauraso N.M., Shelokov A. Simian hemorrhagic fever. I. Clinical and epizootologic aspects of an outbreak among quarantined monkeys. *Am. J. Med. Hyg.* 1968; 17: 404–12.
12. Tauraso N.M., Shelokov A., Palmer A.E., Allen A.M. Simian hemorrhagic fever. III. Isolation of viral agent. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1968; 17: 422–31.
13. Tauraso N.M., Shelokov A., Allen A.M., Palmer A.E., Aulisio C.G. Two epizootics of simian hemorrhagic fever. *Nature*. 1968; 218: 876–7.
14. Lapin B.A., Shevtsova Z.V. On the identity of two simian hemorrhagic fever virus strains (Sukhumi and NIH). *Z. Versuchierkunde*. 1971; 13: 21–4.
15. Tauraso N.M., Aulisio C.G., España C.D., Wood O.L. Simian hemorrhagic fever virus. In: Martini G.A., Siebert R., eds. *Marburg virus disease*. Berlin–Heidelberg–N.Y.: Springer; 1971: 208–15.
16. Wood O.L., Tauraso N.M., Liebhaber H. Structure and morphogenesis of simian hemorrhagic fever virus. *J. Gen. Virol.* 1970; 7: 129–36.
17. Godeny E.K., de Vries A.A.F., Wang X.C., Smith S.L., de Groot R.J. Identification of the leader-body junction for the viral subgenomic in RNAs and organization of the simian hemorrhagic fever virus genome: evidence for gene duplication during arterivirus evolution. *J. Virol.* 1998; 12(1): 862–7.
18. Snijder E.J., Meulenberg J.J. The molecular biology of arteriviruses. *J. Gen. Virol.* 1998; 79 (Pt 5): 961–79.
19. Regemortal M.N., Fauquet C., Bishop D., Carstens E., Estes M., Lemon S. et al., eds. *Virus Taxonomy: Classification and nomenclature of viruses: Seventh report of the International Committee on Taxonomy of viruses*. San Diego: Academic Press; 2000.
20. London W.T. An outbreak of simian hemorrhagic fever. In: *Primate Zoonoses Surveillance*. Atlanta: Center for Disease Control; 1973; rep no. 10: 5–6.
21. London W.T. Epizootology, transmission and approach to prevention of fatal simian hemorrhagic fever in rhesus monkeys. *Nature*. 1977; 268: 344–5.
22. Shelokov A., Tauraso N.M., Allen A.M., España C.D. Epizootic, clinical and pathological aspects of simian hemorrhagic fever. In: Martini G.A., Siebert R., eds. *Marburg virus disease*. Berlin – Heidelberg – N.Y.: Springer; 1971: 203–7.
23. Tauraso N.M., Myers M.G., McCarthy K., Tribe G.W. Simian hemorrhagic fever: The proceedings of the international symposium «Infection and Immunosuppression in subhuman primates». Balner H. and Beveridge W.I.B., eds. Copenhagen, Munksgaard – Baltimore: Williams & Wilkins; 1970: 101–9.
24. Madden D.L., Fuccillo D.A., Dorosz J.A., London W.T., Palmer A.E., Castellano G.A. Antigenic relationship of two strains of SHFV. *Lab. Anim. Sci.* 1978; 28 (4): 422–7.
25. Myers M.D., Vincent M.M., Hensen S.A., Tauraso N.M. Problems in laboratory isolation of simian hemorrhagic fever virus and isolation of the agent responsible for the Sussex-69 epizootic. *Appl. Microbiol.* 1972; 24 (1): 62–9.
26. Kalter S.S., Heberling R.L. Primate viral diseases in perspective. *J. Med. Primatol.* 1990; 19 (6): 519–35.
27. Renquist D. Outbreak of simian hemorrhagic fever. *J. Med. Primatol.* 1990; 19 (1): 77–9.
28. Shevtsova Z.V., Pekerman S.M., Krylova R.I. Hemorrhagic fever in monkeys on materials of the Sukhumi monkey colony. In: Lapin B.A., ed. *Modeling of human pathological states [Modelirovaniye patologicheskikh sostoyaniy cheloveka]*. Moscow: AMS USSR and IPVE; 1977; II: 114–8. (in Russian)
29. Gravel M., London W.T., Rodriguez M., Palmer A.E., Hamilton R.S. Simian hemorrhagic fever: New virus isolate from a chronically infected patas monkey. *J. Gen. Virol.* 1980; 51: 99–106.
30. Lauck M., Hyeroba D., Tumukunde A., Weny G., Lank S.M., Chapman C.A. et al. Novel divergent simian hemorrhagic fever viruses in a wild Ugandan red Colobus monkey discovered using direct pyrosequencing. *PLoS*. 2011; 6 (4): e19056.
31. Lapin B.A., Shevtsova Z.V., Krylova R.I. Experimental hemorrhagic fever of monkeys: Proceedings 2nd Intern. Congress of Primatol. Hoffer H.O., ed. Atlanta. 1969; 3: 196–203.
32. Shevtsova Z.V., Lapin B.A., Karmysheva V.Ja., Chumakov M.P. Hemorrhagic fever in monkeys – the model for studying the pathogenesis of human hemorrhagic fevers. In: *Usage of monkeys in experimental medicine: Abstracts of reports [Tezisy dokladov «Ispol'zovanie obez'yan v eksperimental'noy meditsine»]*. Sukhumi, 12–14 November. Sukhumi; 1974: 63–6. (in Russian)
33. Pekerman S.M., Shevtsova Z.V. Materials on an outbreak of hemorrhagic fever in rhesus monkeys in Sukhumi. In: Chumakov M.P., ed. *Actual problems of virology and prevention of viral diseases: Abstracts of the 17 scientific session of the Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis*. Moscow: IPVE; 1972: 326–7. (in Russian)
34. Shevtsova Z.V., Karmysheva V.Ja., Chumakov M.P. Virological study of simian hemorrhagic fever. *Voprosy virusologii*. 1975; (4): 471–6. (in Russian)
35. Gravel M., Palmer A.E., Rodriguez M., London W.T., Hamilton R.S. Method to detect asymptomatic carriers of simian hemorrhagic fever virus. *Lab. Anim. Sci.* 1980; 30 (6): 988–91.
36. Ryabchikova E.I., Luchko S.V., Grazhdantseva A.A., Rassadkin Yu.N. Experience in the use of laboratory primates in the study of Ebola viral hemorrhagic fever. In: *Perspective directions of the use of laboratory primates in biomedical researches: Proceedings of the All-Russian Scientific Conference [Materialy Vserossiyskoy nauchnoy konferentsii. «Perspektivnye napravleniya ispol'zovaniya laboratornykh primatov v mediko-biologicheskikh issledovaniyakh»]*. Sochi–Adler; 2006: 32–8. (in Russian)
37. Uvarova V.I., Shevtsova Z.V. Study of the hemostasis system in hemorrhagic fever of macaques. In: Chumakov M.P., ed. *Actual problems of virology and prevention of viral diseases: Abstracts of the 17 scientific session of the Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis*. Moscow: IPVE; 1972: 329–30. (in Russian)
38. Abilgard Ch., Harrison J., España C., Spangler W., Gribble D. Simian hemorrhagic fever: studies of coagulation and pathology. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1975; 24 (3): 537–44.
39. Dennis L.H., Reisberg B.E., Crosbie J., Crozier D., Conrad M.E. The original hemorrhagic fever: yellow fever. *Br. J. Hematol.* 1969; 17: 455–62.
40. Goncharov N.P., Verberger K., Shubert K., Shevtsova Z.V. The secretory function of the adrenal cortex in Macacus Rhesus with simian hemorrhagic fever. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 1971; 15 (2): 31–7. (in Russian)

41. Geisbert T.W., Young H.A., Jahrling P.B., Davis K.J., Kagan E., Hensley L.E. Mechanisms underlying coagulation abnormalities in Ebola hemorrhagic fever: over expression of tissue factor in primate monocytes/macrophages is a key event. *J. Inf. Dis.* 2003; 188 (11): 1618–29.
42. Semina N.A., Kovaleva E.P. Diseases of health workers caused by especially dangerous infections associated with laboratory contaminations. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika.* 2005; 1 (20): 23–8. (in Russian)
43. Johnson R., Cai V., Wahl-Jensen V., Fang Y., Friedrich T., Radoshitzky S.R., et al. Simian hemorrhagic fever virus as a model for risk group 4 pathogens. In: *Fundamental and Applied Aspects of Medical Primatology: Proceedings of the Second International Conference.* Sochi–Adler; 2011; 1: 227–33.
44. Johnson R.F., Dodd L.E., Yellayi S., Gu W., Cann J.A., Jett C. et al. Simian hemorrhagic fever virus infection of rhesus macaques as a model of viral hemorrhagic fever: clinical characterization and risk factors for severe disease. *Virology.* 2011; 421 (2): 129–40.
45. Simian haemorrhagic fever – SHF. In: Lapin B.A., Dzhikidze E.K., Shevtsova Z.V., Stasilevich Z.N. *Modeling of human infectious diseases in laboratory primates* [Modelirovanie infektsionnykh zabollevaniy cheloveka na laboratornykh primatakh]. Sochi: Sterh LLC; 2011: 184–8. (in Russian)
46. Vatter H.A., Brinton M.A. Differential responses of disease-resistant and disease-susceptible primate macrophages and myeloid dendritic cells to simian hemorrhagic fever virus infection. *J. Virol.* 2014; 88 (4): 2095–106. Epub ahead of print 2013 Dec 11.
47. Lauck M., Sibley S.D., Hyeroba D., Tumukunde A., Weny G., Chapman C.A. et al. Exceptional simian hemorrhagic fever virus diversity in a wild African primate community. *J. Virol.* 2013; 87 (1): 688–91.
48. Kuhn J., Jahrling P.B., Calisher C.H., eds. Simian Hemorrhagic Fever. Archives of Virology Supplement Vol. 21. London: Springer; 2015.

Получена 16.01.14

Received 16.01.14

© НАЙХИН А.Н., ЛОСЕВ И.В., 2015

УДК 578.832.083.3

Найхин А.Н., Лосев И.В.

Роль консервативных и гипервариабельных иммунодоминантных эпитопов внутренних белков вирусов гриппа А в формировании цитотоксического Т-клеточного иммунного ответа

ФГБУ «НИИ экспериментальной медицины» СЗО РАМН, 197376, Санкт-Петербург

Цитотоксический Т-клеточный иммунитет имеет важное значение в предотвращении развития гриппозной инфекции и смягчении ее тяжести. Сведения о механизмах индукции вирусспецифических CD8⁺ Т-лимфоцитов (ВЦТЛ) у людей способствуют лучшему пониманию эпидемиологии гриппа и путей совершенствования его вакцинопрофилактики. В последние годы благодаря появлению новых иммунологических и генно-инженерных методик в мировой литературе накоплен материал об особенностях формирования ВЦТЛ-иммунного ответа к различным эпитопам внутренних белков вирусов гриппа А. В настоящем обзоре обобщены эти сведения. Основное внимание уделяется: (i) формированию гетеросубтипического ВЦТЛ-иммунного ответа к консервативным иммунодоминантным сайтам; (ii) механизмам ухода от контроля гриппозной инфекции хозяинскими ВЦТЛ с помощью эволюционных эскап-мутаций; (iii) роли хозяйского HLA-гаплотипа на развитие этого типа иммунного ответа. Обсуждается важность цитируемых материалов для функциональной и прикладной иммунологии, а также для вакцинного дела.

Ключевые слова: *противогриппозный иммунитет; цитотоксический Т-клеточный иммунитет к вирусам гриппа А; иммунодоминантные консервативные и вариабельные эпитопы вирусов гриппа А; эскап-мутаций.*

Для цитирования: *Вопросы вирусологии. 2015; 60 (1): 11–16.*

Naikhin A.N., Losev I.V.

The impact of conservative and hypervariable immunodominant epitopes in internal proteins of the influenza A virus on cytotoxic T-cell immune responses

Institute of Experimental Medicine, Russian Academy of Medical Sciences, 197376, St. Petersburg, Russia

The cytotoxic T-cell immune response plays an important role in the prevention of influenza infection and reducing of the illness severity. The knowledge about mechanisms of the virus-specific CD8⁺ T-cell induction in humans is necessary for better understanding of influenza epidemiology and vaccine development. Due to application of new immunological and genetic methods in last years, considerable amount of data became available in the literature about CD8⁺ T-cell immune responses to different influenza A viruses. This review summarizes these data. The main attention is paid to (i) heterosubtypic CTL responses to conservative immunodominant sites; (ii) mechanisms of viral escape from the virus-specific CTLs by means of evolutionary escape-mutations; (iii) influence of the HLA haplotype on CD8⁺ T-cell immune responses. The importance of these data for immunology and vaccinology is discussed.

Key words: *anti-influenza immunity; cytotoxic T-cell immune responses to influenza A viruses; immunodominant conservative and variable epitopes of influenza A viruses; escape-mutations.*

Citation: *Voprosy virusologii. 2015; 60(1): 11–16. (In Russ.)*

Для корреспонденции: Найхин Анатолий Нойевич, д-р мед. наук, проф.; e-mail: vaccine@mail.ru
Correspondence to: Anatoliy Naykhin, MD, PhD, DSc, Prof; e-mail: vaccine@mail.ru

Наиболее изученные консервативные иммунодоминантные ВЦТЛ-эпитопы внутренних белков вирусов гриппа А [4, 8, 12, 14, 16–23]

Эпитоп	Аминокислотная последовательность	HLA-рестрикция
NP ₄₄₋₅₂	CTELKLSDY	A1
NP ₁₇₄₋₁₈₄	ILRGSVAHK	B27
NP ₂₆₅₋₂₇₃	RRSGAAGAAVK	A3
M1 ₅₈₋₆₆	GILGFVFTL	A*0201
M1 ₁₂₈₋₁₃₅	ASCMGLIY	B*3501
PB1 ₅₉₁₋₅₉₉	VSDGGPNLY	A1

Исследования цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) проводятся со второй половины 70-х годов прошлого века, т. е. с момента их четкой идентификации. Эти исследования были основаны на анализе цитотоксического иммунного ответа к цельным вирионам вирусов гриппа А и их отдельным белкам. В конце XX – начале XXI века сформировался новый подход к изучению данного вопроса, основанный на тестировании пулов ЦТЛ, проявляющих специфичность к различным эпитопам внутренних и внешних белков вириона. Переход на новое качество в анализе Т-клеточного цитотоксического иммунного ответа связан с возможностью использования новых технологических приемов, а именно:

– идентификация вирусспецифических ЦТЛ (ВЦТЛ) фенотипа CD8⁺ не только в традиционном цитотоксическом тесте с применением радиоизотопов, но и в таких методиках, как ELISPOT и цитометрическая фиксация внутриклеточных цитокинов после вирусной стимуляции *in vitro* мононуклеаров периферической крови (МПК);

– стимуляция МПК как цельными вирусами, так и их генно-инженерными вариантами: обратногогенетическими структурами с аминокислотными заменами в пределах изучаемых эпитопов, отдельными синтетическими пептидами и мультимерными антигенпрезентирующими комплексами, включающими различные МНС-молекулы в сочетании с вирусными пептидами;

– использование обширного массива компьютерных биоинформативных баз данных по аминокислотному секвенсу различных штаммов, а также по построению трехмерных моделей белковых структур вириона с вычленением иммунофункциональных сайтов.

В настоящем обзоре предпринята попытка обобщить накопившиеся за последние годы данные о продукции ЦТЛ, специфичных к консервативным и гипервариабельным иммунодоминантным эпитопам внутренних белков вируса гриппа А. В цитируемых работах использовались перечисленные выше методики в тех или иных композиционных вариантах.

ВЦТЛ фенотипа CD8⁺ играют важную роль в контроле вирусных инфекций посредством цитолитического разрушения зараженных клеток с последующей их элиминацией из организма. В отношении гриппозной инфекции доказана роль ВЦТЛ в снижении тяжести заболевания и предотвращении инфицирования как в экспериментальных опытах на мышах [1], так и при заражении добровольцев [2].

ВЦТЛ контролируют вирусную инфекцию, в том числе и гриппозную, путем распознавания в клетке пептидов, которые возникают в результате процессинга вирусных белков протеосомами антигенпрезентирующих клеток. Далее эти обработанные протеины транспортируются в эндоплазматический ретикулум, где они связываются с комплементарными молекулами главного комплекса гистосовместимости класса I (МНСI). Этот комплекс транспортируется в мембрану инфицированных клеток для узнавания ВЦТЛ через их Т-клеточный рецептор (TCR).

При процессинге вирусных белков генерируется большое количество пептидов, но в конечном счете только некоторые из них презентуются в комплексе с молекулами МНСI и узнаются ВЦТЛ для последующего запуска лизиса клеток-мишеней. Эти комплексы названы иммунодоминантными [3]. Наличие иммунодоминантных комплексов продемонстрировано при изучении цитотоксического Т-клеточного иммунного ответа у людей [4] и животных [5].

Привлечение в комплексы молекул МНСI не является случайным, поскольку они формируют ВЦТЛ-иммунный

ответ к вирусам гриппа А в проекции на аллельное многообразие человеческой популяции по человеческому лимфоцитарному антигену, т. е. по HLA-гаплотипу. Именно HLA-гаплотип и определяет набор иммунодоминантных эпитопов, которые могут быть узнаны ВЦТЛ. Данный феномен называется HLA-рестрикцией ВЦТЛ-иммунного ответа. У людей различают три серотипа HLA-молекул (A, B, C) с их аллельными вариантами. У линейных мышей СВА ВЦТЛ-иммунный ответ развивается к иммунодоминантным эпитопам, рестриктированным по H-2* [6].

У людей и лабораторных животных главными мишенями для ВЦТЛ являются иммунодоминантные эпитопы внутренних белков вирусов гриппа А, присутствующие на поверхностной мембране инфицированных клеток. Наибольшее количество таких эпитопов отмечено в нуклеопротеине (NP) и матриксном белке (M). На сегодняшний день в качестве иммунодоминантных описано 10 аминокислотных последовательностей NP, M, полимерного (PB1) и неструктурного (NS) белков: NP₄₄₋₅₂, NP₁₀₉₋₁₁₁, NP₁₇₄₋₁₈₄, NP₂₆₅₋₂₇₃, NP₃₃₈₋₃₄₇, NP₃₈₃₋₃₉₁, NP₄₁₈₋₄₂₆, NS₁₂₂₋₁₃₀, PB1₅₉₁₋₅₉₉, M₅₈₋₆₆ [1, 7–13]. Эти последовательности презентуются в сочетании с HLA-молекулами A1, A3, B37, B8 и B27 [4]. Данные эволюционного биоинформативного компьютерного анализа показали, что у штаммов вирусов гриппа А (H3N2) 1957–2010 годов выделения иммунодоминантные эпитопы, взаимодействующие с TCR и направленные на индукцию CD8⁺-Т-клеток, составляли не более 3–3,5% от всех изученных эпитопов [14–17]. При этом такие эпитопы присутствовали во всех вакцинных штаммах, использовавшихся в обозначенный промежуток времени.

Подавляющее большинство иммунодоминантных эпитопов всех внутренних белков вирусов гриппа А в эволюционном смысле являются консервативными и даже глубоко консервативными. В табл. 1 приведены наиболее изученные из них. Среди последних ярким примером может служить иммунодоминантный эпитоп матриксного белка M1₅₈₋₆₆, презентуемый молекулами HLA-A*0201, т. е. аллелью, в высокой степени преобладающей в человеческой популяции [18]. Этот эпитоп присутствует в разных подтипах вируса гриппа А. Доказано, что ВЦТЛ-иммунный ответ к вирусу гриппа А у HLA-A*0201-позитивных людей более интенсивный, чем у негативных по этой аллели лиц [4].

Консервативные иммунодоминантные эпитопы внутренних вирусных белков обладают функциональными ограничениями, сдерживающими появление в них антигенных изменений [21]. По-видимому, именно этот феномен и определяет полноценное формирование гетеросубтипического Т-клеточного цитотоксического иммунитета, т. е. иммунитета, опосредованного перекрестно реагирующими ЦТЛ, специфическими к разным подти-

Гипервариабельные иммунодоминантные ВЦТЛ-эпитопы внутренних белков вируса гриппа А(Н3N2)

Эпитоп	Стартовая аминокислотная последовательность	Escape-мутации в эпитопе (аминокислотная замена)	HLA-рестрикция	Расположение escape-мутации	Временная эволюционная характеристика появления escape-мутации	Ссылка
NP ₁₀₃₋₁₁₁	KWMRELVLVY	K103R	B*1503	В зоне контакта с TCR	Циклический	[22]
NP ₂₅₁₋₂₅₉	AEIEDLIFS	S259L	B*4002		Та же	[22]
NP ₃₈₀₋₃₈₈	ELKSRWAI	R384G	B*0801	Якорный участок	Фиксированный	[16]
NP ₃₈₃₋₃₉₁	SRYWIRTR	R384G	B*2705		Та же	[16]
		R384K			Транзиторный	[16, 20]
NP ₄₁₈₋₄₂₆	LFPDKPTIM	P423S D421E M425V	B*3501	В зоне контакта с TCR	Фиксированный	[7]
NSI ₁₂₂₋₁₃₀	AIMDKNIL	D125E	A*0201			[43]
		I129M				

Примечание. Циклический – периодически повторяющиеся мутации; фиксированный – закрепленные мутации; транзиторный – отмеченные только в пределах одного сезона.

пам вирусов гриппа А, в том числе и зоонозного происхождения. В опытах *in vivo* и на основании эпидемиологических данных показано, что этот тип иммунитета может снижать тяжесть естественной и экспериментальной гриппозной инфекции [24–30].

Стратегия выживания всех вирусов основана на уходе от адаптивного иммунного ответа хозяина. Для этого они обладают набором специальных механизмов. В частности, уход от ВЦТЛ-иммунного ответа основан на предотвращении узнавания соответствующих эпитопов этими клетками путем разрегулирования взаимодействия вирусных пептидов с молекулами МНСI [31, 32]. Осуществляется это главным образом двумя альтернативными путями. Вирусы с крупным ДНК-геномом и большой кодирующей способностью могут экспрессировать в течение инфекции различные белки, которые интерферируют пути антигенного процессинга и презентации. Это продемонстрировано на ВИЧ-1 (Nef-белок), аденовирусах (белок E3/19K), герпес-вирусе (белок, кодирующий антигенную презентацию) [33–35]. Кроме того, данный феномен описан в отношении вируса хориоменингита [36, 37], гепатитов В [38, 39] и С. На примере ВИЧ, гепатита С и вируса Эпштейна–Барр доказано, что мутантные варианты, предшествующие новому актуальному вирусу, элиминируются из циркуляции в результате воздействия на них селективного пресса хозяйских ВЦТЛ на популяционном уровне [33, 37, 40–42].

Вирусы, использующие в процессе репликации РНК-полимеразу с низкой точностью воспроизведения или обратную транскриптазу, обычно имеют небольшие геномы. Последние не экспрессируют белки, которые предотвращают узнавание ВЦТЛ соответствующих эпитопов. Такие вирусы обладают другим механизмом адаптации – накопление в процессе антигенного дрейфа точечных мутаций в иммунодоминантных сайтах вследствие воздействия на них популяционного иммуноселективного пресса. Это относится к сайтам, которые узнаются как антителами, так и ВЦТЛ. Такие мутации, обозначенные как escape-мутации, могут содействовать закреплению новых дрейфовых вариантов вирусов гриппа А в человеческой популяции.

Ранее считалось, что escape-мутации сосредоточены в структуре поверхностных белков этих вирусов, т. е. в гемагглютинине (НА) и нейраминидазе (НА). В последние годы появились работы, доказывающие существование таких мутаций в иммунодоминантных ВЦТЛ-эпитопах внутренних белков вирусов гриппа А. На сегодняшний

день escape-мутации обнаружены в пяти иммунодоминантных эпитопах NP и в одном NSI (табл. 2).

Показано, что вирусы гриппа А [4, 7, 16, 22, 44], подобно другим вирусам [31, 32, 45], могут резко снижать ВЦТЛ-иммунный ответ у людей при наличии escape-мутаций в перечисленных в табл. 2 гипервариабельных антигенных эпитопах. Это связано с тем, что выявленные естественные дрейфовые мутации с различными аминокислотными заменами в данных эпитопах ослабляют и даже отменяют презентацию комплементарных молекул МНСI у людей, соответственно позитивных по гаплотипу HLA. Тем самым обеспечивается уход от узнавания вариабельных сайтов вирусного белка хозяйскими ВЦТЛ. Удаление или замена escape-мутаций приводят к восстановлению узнавания ВЦТЛ соответствующего антигенного сайта [16, 46, 47]. Эволюционный аминокислотный сиквенс-анализ разных штаммов вируса гриппа А(H1N1) и А(H3N2), изолированных в течение длительных отрезков времени (от 10 до 73 лет), показал, что escape-мутации в структуре NP появляются на отдельных этапах антигенного дрейфа и быстро (в течение одного сезона) закрепляются в человеческой популяции [22]. Феномен их быстрой фиксации объяснен в теоретической модели [48].

По базам данных аминокислотного сиквенса актуальных и ранее циркулировавших штаммов вируса гриппа А определено число ко-мутаций, ассоциированных с escape-мутацией NP-R384G [49]. В других работах, основанных на анализе репродукции вируса гриппа А/Гонконг/1/68(H3N2) с набором различных ко-мутаций в NP (E375G, M239V, D127E, R65K), показано, что мутация R384G резко снижала репродукцию этого штамма, а введение только одной ко-мутации E375G восстанавливало его урожайность [50, 51]. Это свидетельствует о том, что в природе способность escape-мутаций в иммунодоминантных сайтах NP супрессировать репликацию вирусов гриппа А компенсируется наличием ко-мутаций, которые восстанавливают их репродуктивную активность.

Известна повышенная способность элиминировать раковые и вирусинфицированные клетки цитотоксическими Т-клетками с высокой функциональной avidностью [52–55]. На основе использования различных синтетических пептидов проведен сравнительный анализ функциональной avidности разных клонов человеческих ВЦТЛ, реагировавших *in vitro* с консервативными (NP₄₄₋₅₂, NP₁₇₄₋₁₈₄, NP₂₆₅₋₂₇₃, M1₅₈₋₆₆, P1₅₉₁₋₅₉₉) и вариабельными (NP₃₈₀₋₃₈₈, NP₃₈₃₋₃₉₁, NP₄₁₈₋₄₂₆) эпитопами [8]. Самые

высокие показатели avidности зафиксированы у клонов ВЦТЛ, реагировавших с переменными штаммами, особенно с NP₄₁₈₋₄₂₆. Это свидетельствует о том, что наибольший вклад в популяционный селективный пресс на вирусы гриппа А оказывают именно клоны ВЦТЛ с высокой функциональной avidностью. В результате в иммунодоминантных переменных сайтах внутренних белков вирусов накапливаются escape-мутации, что, во-первых, снижает узнавание ВЦТЛ этих сайтов, во-вторых, повышает репродуктивную активность нового вируса. Все вместе это способствует персистенции последнего в человеческой популяции и удлинению нового этапа селекции штаммов.

Удаление методом обратной генетики гипервариабельных иммунодоминантных эпитопов NP₃₈₃₋₃₉₁ или NP₄₁₈₋₄₂₆ вирусов гриппа А результировалось в значительном снижении уровня IFN γ -экспрессирующих CD8⁺-Т-клеток после стимуляции *in vitro* этими модифицированными вирусами культур лимфоцитов доноров, позитивных соответственно по HLA-B*2705 и HLA-B*3501 [20, 56]. Кроме того, это сопровождалось и торможением литической активности ВЦТЛ в отношении вирусзараженных клеток-мишеней. В целом приведенные данные показали, что потеря только одного из гипервариабельных иммунодоминантных эпитопов NP существенно влияет на функциональную активность ВЦТЛ, что проявляется снижением продукции IFN γ и их литической активности. Биологический смысл данных феноменов пока до конца не ясен, ибо по сути они направлены как бы против самого вируса, т. е. обеспечивают торможение его репликации. Возможно, что сохранение IFN γ -продуцирующей и литической активности Т-клеток при контакте с новым вирусом каким-то образом влияет на дальнейшую эволюцию escape-мутаций.

Как уже упоминалось выше, иммунодоминантные консервативные эпитопы внутренних белков вируса гриппа А формируют за счет индукции кроссреактивных ЦТЛ гетеросубтипический цитотоксический иммунитет населения против всех подтипов этого возбудителя. Его индукция особенно важна в случае возникновения пандемии, когда у популяции отсутствует В-клеточная иммунологическая память к HA и/или NA возбудителя. В связи с этим отдельно изучен вопрос об узнавании гомо- и гетерологичных вариантов вирусов гриппа А(H1N1) и А(H3N2) человеческими рестриктивными по HLA-B*3501 клонами ЦТЛ, проявляющими специфичность к разным природным escape-мутациям в пределах эпитопа NP₄₁₈₋₄₂₆ [46]. Небольшая пропорция таких ЦТЛ, специфических к одному мутантному варианту, реагировала с другими мутантными вариантами. Эти данные служат доказательством существования пула кроссреактивных ЦТЛ, специфичных не только к консервативным эпитопам NP разных подтипов вируса гриппа А, но и к гипервариабельным эпитопам этого белка. В экспериментальном опыте на мышах, экспрессирующих молекулы HLA-B*2705 и трансгенных по этой аллели, показано, что полноценный ВЦТЛ – иммунный ответ к гипервариабельному иммунодоминантному эпитопу NP₃₈₃₋₃₉₁ вируса А/PR/8/34(H1N1) развивался только в том случае, когда животные были предварительно заражены гетерологичным вирусом А(H3N2) [57]. Совокупность приведенных данных свидетельствует в пользу того, что, во-первых, пул перекрестно реагирующих ЦТЛ, специфичных к иммунодоминантным гипервариабельным сайтам NP, продуцирует в организме только при наличии предшествующих контактов с циркулирующими подтипами вируса гриппа А, во-вторых, этот пул может увеличиваться по мере возрастания числа инфицированных гетеросубтипическими вариантами и, в-третьих,

данный пул, оказывая иммуноселективный прессинг, способствует возникновению escape-мутаций в переменных сайтах NP.

И наконец, в экспериментальном опыте *in vivo* проведено влияние гипервариабельных сайтов NP на тяжесть проявления гриппозной инфекции [13, 57]. Удаление природной escape-мутации NP-R384G из вируса А/PR/8/34 (H1N1) вызвало снижение тяжести первичной инфекции у мышей с рестрикцией по HLA-B*2705. При этом показатели аттенуации вируса коррелировали с увеличением интенсивности ВЦТЛ-иммунного ответа. По-видимому, в природе возникновение escape-мутаций в гипервариабельных иммунодоминантных участках NP циркулирующего вируса гриппа А сопровождается не только ослаблением ВЦТЛ-иммунного ответа хозяина, но и как следствие повышением патогенности данного вируса.

Обобщая с теоретических позиций представленный в настоящем обзоре материал, можно отметить следующее.

Подавляющее большинство иммунодоминантных эпитопов внутренних белков вируса гриппа А являются консервативными, т. е. не подверженными антигенному дрейфу под влиянием популяционного иммуноселективного пресса со стороны хозяйских ВЦТЛ. Их антигенный дрейф сдерживается функциональными самоограничениями, скорее всего, на уровне вирусного генома. Функциональная активность этих иммунодоминантных консервативных эпитопов определяет наличие у населения гетеросубтипического ВЦТЛ-иммунитета к разным подтипам вируса гриппа А.

Некоторые иммунодоминантные ВЦТЛ-эпитопы внутренних белковых структур вирусов гриппа А, рестриктивные по тем или иным HLA-аллелям, в антигенном смысле относятся к переменным и гипервариабельным. Антигенные изменения таких эпитопов ассоциированы с ускользанием от их узнавания вирус-специфическими CD8⁺-Т-лимфоцитами за счет появления escape-мутаций в якорных последовательностях или последовательностях, контактирующих с TCR. Это приводит к разрегулированию процесса связывания вирусных пептидов с комплементарными молекулами MHC I и прерывает качество презентации хозяйским ВЦТЛ. В результате нарушается контроль гриппозной инфекции данными клетками.

Даже единичные природные аминокислотные замены в гипервариабельных ВЦТЛ-эпитопах вирусных внутренних белков влияют на многие патогенетические признаки: количественные показатели ВЦТЛ-иммунного ответа и функциональную активность данных клеток (лизис инфицированных клеток-мишеней, выработка IFN γ), репликативные свойства вируса, тяжесть гриппозной инфекции.

Аккумуляция escape-мутаций в переменных иммунодоминантных ВЦТЛ-эпитопах внутренних белков вирусов гриппа А связана с повышенным иммуноселективным воздействием ВЦТЛ с высокой функциональной активностью, что ускоряет появление escape-мутаций, как следствие пролонгирует персистенцию вируса на органном и популяционном уровне.

Среди пула перекрестно реагирующих ВЦТЛ существует небольшая по численности субпопуляция этих клеток, которые узнают различные естественные escape-мутации в пределах гипервариабельного иммунодоминантного эпитопа (NP₄₁₈₋₄₂₆). По-видимому, число таких кроссреактивных ВЦТЛ может увеличиваться после повторных инфицирований людей разными подтипами вируса гриппа А, что приводит к возникновению ВЦТЛ-

иммунитета против новых escape-мутаций, селекционированных под влиянием иммунопресса.

С практической точки зрения иммуноэпитопный анализ вирусов гриппа А открывает перспективу разработки новых подходов к совершенствованию иммуногенности гриппозных вакцин (особенно живых) в части индукции ВЦТЛ-иммунного ответа.

Первый из них касается манипуляций с escape-мутациями. При анализе представленного материала складывается впечатление, что исключение методом обратной генетики таких мутаций из иммунодоминантных эпитопов внутренних вирусных белков вакцинного штамма может реализоваться в усилении и/или расширении продукции перекрестно реагирующих ЦТЛ, специфичных к консервативным эпитопам, т. е. в стимуляции полноценного гетеросубтипического CD8⁺-Т-клеточного иммунитета. Введение такой вакцины в случае возникновения угрозы пандемического распространения новых вирусов гриппа А будет способствовать стимуляции у людей ВЦТЛ-иммунологической памяти к консервативным антигенным последовательностям, общим для всех подтипов вирусов гриппа А, в том числе и зоонозного происхождения. Хотя подобный препарат и не предотвратит развитие пандемии, но, безусловно, будет способствовать снижению тяжести инфекции и смертности населения. В настоящее время активно разрабатывается направление по использованию в дизайне вакцин консервативных иммунодоминантных ВЦТЛ-эпитопов внутренних белков вируса гриппа А [14, 15, 17, 19, 23, 58–60].

Второй подход связан с анализом существующего принципа приготовления живых гриппозных вакцин с точки зрения индукции ВЦТЛ-иммунитета. Он основан на обратногогенетическом или реассортационном включении полного набора внутренних белков вирусов гриппа от холодоадаптированных доноров аттенуации: А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) в России и А/Энн Арбор/6/60 (H2N2) в США. В процессе пассирования этих штаммов при пониженной температуре они приобрели присущие только им точечные мутации в генах почти всех внутренних белков вируса гриппа А. Вопрос о вовлечении этих мутаций в зоны иммунодоминантных эпитопов остается открытым. Если в этом плане обнаружатся какие-либо негативные иммунологические последствия, то их можно устранить методом обратной генетики.

Третий подход опирается на анализ популяционного ВЦТЛ-иммунного ответа. Так, с момента прекращения циркуляции вирусов гриппа А (H2N2) прошло более 45 лет. За это время в циркулирующих штаммах вирусов гриппа А (H1N1) и А (H3N2) накопилось определенное число дрейфовых аминокислотных замен в пределах иммунодоминантных эпитопов внутренних белковых структур вириона. Именно с такими мутантными штаммами и контактировало население. В результате у людей генерировались клоны ЦТЛ иммунологической памяти, специфические к данным эпитопам этих подтипов вируса гриппа А. В то же время вакцинация живыми вакцинами индуцирует клоны ЦТЛ, специфические к эпитопному профилю внутренних белков донора аттенуации подтипа А (H2N2). Иммунологические последствия такого несоответствия требуют специального изучения. И в этом случае обратная генетика дает возможность иммунокоррекции вакцинных штаммов.

И, наконец, четвертый подход касается оценки иммуногенности гриппозных вакцин по индукции цитотоксического Т-клеточного иммунитета. На сегодняшний день он основан только на анализе общего пула ВЦТЛ. Такой анализ не конкретизирует поствакцинальный

иммунный ответ ни по его эпитопной направленности (иммунодоминантность, вариабельность, консервативность ВЦТЛ-эпитопов внутренних белков), ни по HLA-аллельной принадлежности вакцинируемых лиц. Между тем именно эти характеристики являются основополагающими во влиянии на качественные и количественные параметры ВЦТЛ-иммунного ответа на вакцинные штаммы.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках проекта № 14-15-00034.

ЛИТЕРАТУРА [REFERENCES]

1. Taylor P.M., Askonas B.A. Influenza nucleoprotein-specific cytotoxic T-cell clones are protective in vivo. *Immunology*. 1986; 58 (3): 417–20.
2. McMichael A.J., Gotch F.M., Noble G.R., Beare P.A. Cytotoxic T-cell immunity to influenza. *N. Engl. J. Med.* 1983; 309 (1): 13–7.
3. Yewdell J.W. Confronting complexity: real-world immunodominance in antiviral CD8⁺ T cell responses. *Immunity*. 2006; 25: 533–43.
4. Boon A.C., de Mutsert G., Graus Y.M., Fouchier R.A., Sintnicolaas K., Osterhaus A.D., Rimmelzwaan G.F. The magnitude and specificity of influenza A virus-specific cytotoxic T-lymphocyte responses in humans is related to HLA-A and -B phenotype. *Virology*. 2002; 76: 582–590.
5. Chen W., Pang K., Masterman K.A. et al. Reversal in the immunodominance hierarchy in secondary CD8⁺ T cell responses to influenza A virus: roles for cross-presentation and lysis-independent immunodominance. *J. Immunol.* 2004; 173: 5021–7.
6. Belz G.T., Xie W., Doherty P.C. Diversity of epitope and cytokine profiles for primary and secondary influenza A virus-specific CD8⁺ T cell responses. *J. Immunol.* 2001; 166: 4627–33.
7. Boon A.C., de Mutsert G., Graus Y.M. et al. Sequence variation in a newly identified HLA-B35-restricted epitope in the influenza A virus nucleoprotein associated with escape from cytotoxic T lymphocytes. *J. Virol.* 2002; 76 (5): 2567–72.
8. Boon A.C., de Mutsert G., Fouchier R.A., Osterhaus A.D., Rimmelzwaan G.F. The hypervariable immunodominant NP_{418–426} epitope from the influenza A virus nucleoprotein is recognized by cytotoxic T lymphocytes with high functional avidity. *J. Virol.* 2006; 80 (12): 6024–32.
9. DiBrino M.T., Tsuchida T., Turner R.V. et al. An HLA-B35-restricted epitope modified at an anchor residue results in an antagonist peptide. *Eur. J. Immunol.* 1993; 26: 335–339.
10. Huet S., Nixon D.F., Rothbard J.B. Structural homologies between two HLA B27-restricted peptides suggests residues important for interaction with HLA B27. *Int. Immunol.* 1990; 2: 311–6.
11. McMichael A.J., Gotch F.M., Rothbard J. HLA B37 determines an influenza virus nucleoprotein epitope recognized by cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 1986; 164: 1397–406.
12. Rimmelzwaan G.F., Kreijtz J.H., Bodewes R., Fouchier R.A., Osterhaus A.D. Influenza virus CTL epitopes, remarkably conserved and remarkably variable. *Vaccine*. 2009; 27: 6363–5.
13. Sutton J., Rowland-Jones S., Rosenberg W. et al. A sequence pattern for peptides presented to cytotoxic T lymphocytes by HLA B8 revealed by analysis of epitopes and eluted peptides. *Eur. J. Immunol.* 1993; 23: 447–453.
14. Heiny A.T., Miotto O., Srinivasan K.N., Khan A.M., Zhang G.L., Brusich V. et al. Evolutionarily conserved protein sequences of influenza A viruses, avian and human, as vaccine targets. *PLoS ONE* (2007) / www.plosone.org/ Issue 11/e1190.
15. Tan P.T., Heiny A.T., Miotto O., Salmon J., Marques E.T., Lemonnier F., August J.T. Conservation and diversity of influenza A (H1N1) HLA-restricted T cell epitope candidates for epitope-based vaccines. *PLoS ONE* (2010) / www.plosone.org/ vol. 5/ Issue 1/e8754.
16. Voeten J.T.M., Bestebroer N.M., Nieuwkoop N.J., Fouchier R.A., Osterhaus A.D., Rimmelzwaan G.F. Antigenic drift in the influenza A virus (H3N2) nucleoprotein and escape from recognition by cytotoxic T lymphocytes. *J. Virol.* 2000; 74 (15): 6800–7.
17. Wu K.-W., Chien C.-Y., Li S.-W., King C.-C., Chang C.-H. Highly conserved influenza A virus epitope sequences as candidates of H3N2 flu vaccine targets. *Genomics*. 2012; doi: 10.1016/j.ygeno.2012.06.003.
18. Marsh S., Parham P., Barber L. *The HLA facts book*. Academic Press, London, United Kingdom, 2000.
19. Assarsson E., Bui H.-H., Sidney J., Zhang Q., Glenn J., Oseroff C. et al. Immunomic analysis of the repertoire of T-cell specificities for influenza A virus in humans. *J. Virol.* 2008; 82 (24): 12 241–51.

20. Berkhoff E.G., Boon A.C., Nieuwkoop N.J., Fouchier R.A., Sint-nicolaas K., Osterhaus A.D., Rimmelzwaan G.F. A mutation in the HLA-B82705-restricted NP₃₈₃₋₃₉₁ epitope affects the human influenza A virus-specific cytotoxic T-lymphocyte response in vitro. *J. Virol.* 2004; 78 (10): 5216–22.
21. Berkhoff E.G., de Wit E., Geelhoed-Mieras M.M., Boon A.C., Symons J., Fouchier R.A. et al. Functional constraints of influenza A virus epitopes limit escape from cytotoxic T lymphocytes. *J. Virol.* 2005; 79: 11 239–46.
22. Berkhoff E.G., Geelhoed-Mieras M.M., Fouchier R.A., Osterhaus A.D., Rimmelzwaan G.F. Assessment of the extent of variation in influenza A virus cytotoxic T-lymphocyte epitopes by using virus-specific CD8⁺ T-cell clones. *J. General Virology.* 2007; 88: 530–5.
23. Stanekova Z., Vareckova E. Conserved epitopes of influenza A virus inducing protective immunity and their prospects for universal vaccine development. *Virology J.* 2010; 7: 351.
24. Найхин А.Н. Противогриппозный иммунитет: отечественный вклад в изучение проблемы и перспективные направления развития исследований. *Мед. академ. журнал.* 2010; 10 (4): 249–55.
- [Naykhin A.N. Anti-influenza immunity: the contribution of Russian scientists to the research work and promising directions. *Med. Academic J.* 2010; 10 (4): 249–55]. (in Russian)
25. Найхин А.Н., Чиркова Т.В., Петухова Г.Д., Кореньков Д.А., Донина С.А., Руденко Л.Г. Стимуляция гомо- и гетерологической Т-клеточной иммунологической памяти у волонтеров, привитых живой реассортантной гриппозной вакциной типа А(Н5N2). *Вопросы вирусологии.* 2012; 1: 38–42.
- [Naikhin A.N., Chirkova T.V., Petukhova G.D., Korenkov D.A., Donina S.A., Rudenko L.G. Stimulation of homo- and heterologic T-cell immunological memory in volunteers inoculated with live influenza A (H5N2) reassortant vaccine. *Voprosy virusologii.* 2012; 1: 38–42]. (in Russian)
26. Найхин А.Н. Гетеросубтипический иммунитет к вирусам гриппа А: эпидемиологические данные, вовлеченность разных иммунологических факторов, вакцинация. *Вопросы вирусологии.* 2012; 57 (3): 4–9.
- [Naikhin A.N. Heterosubtypic immunity to influenza A viruses: epidemiological data, involvement of different immunological factors, vaccination. *Voprosy virusologii.* 2012; 57 (3): 4–9]. (in Russian)
27. Epstein S.L. Prior H1N1 influenza infection and susceptibility of Cleveland Family Study participants during the H2N2 pandemic of 1957: an experiment of nature. *J. Infect. Dis.* 2006; 193 (1): 49–53.
28. Grebe K.M., Yewdell J.W., Bennink J.R. Heterosubtypic immunity to influenza A virus: where do we stand? *Microbes Infect.* 2008; 10 (July (9)): 1024–9.
29. Kreijtz J.H., Bodewes R., van Amerongen G. et al. Primary influenza A virus infection induces cross-protective immunity against a lethal infection with a heterosubtypic virus strain in mice. *Vaccine.* 2007; 25 (January(4)): 612–20.
30. Kreijtz J.H., de Mutsert G., van Baalen C.A. et al. Cross-recognition of avian H5N1 influenza virus by human cytotoxic T-lymphocyte populations directed to human influenza A virus. *J. Virol.* 2008; 82 (11): 5161–6.
31. Koup R.A. Virus escape from CTL recognition. *J. Exp. Med.* 1994; 180: 779–82.
32. Oldstone M.B. How viruses escape from cytotoxic T lymphocytes: molecular parameters and players. *Virology.* 1997; 234: 179–85.
33. Borrow P., Lewicki H., Wei X. et al. Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. *Nat. Med.* 1997; 3: 205–11.
34. Jugovic P., Hill A.M., Tomazin R. et al. Inhibition of major histocompatibility complex class I antigen presentation in pig and primate cells by herpes simplex virus type 1 and 2 ICP47. *J. Virol.* 1998; 72: 5076–84.
35. Khanna R., Burrows S.R., Argaet V., Moss D.J. Endoplasmic reticulum signal sequence facilitated transport of peptide epitopes restores immunogenicity of an antigen processing defective tumour cell line. *Int. Immunol.* 1994; 6: 639–45.
36. Moskophidis D., Zinkernagel R.M. Immunobiology of cytotoxic T-cell escape mutants of lymphocytic choriomeningitis virus. *J. Virol.* 1995; 69: 2187–93.
37. Pircher H.D., Moskophidis D., Rohrer U. et al. Viral escape by selection of cytotoxic T cell-resistant virus variants in vivo. *Nature.* 1990; 346: 629–33.
38. Bertoletti A., Costanzo A., Chisari F.V. et al. Cytotoxic T lymphocyte response to a wild type hepatitis B virus epitope in patients chronically infected by variant viruses carrying substitutions within the epitope. *J. Exp. Med.* 1994; 180: 933–43.
39. Bertoletti A., Sette A., Chisari F.V. et al. Natural variants of cytotoxic epitopes are T-cell receptor antagonists for antiviral cytotoxic T cells. *Nature.* 1994; 369: 407–10.
40. Borrows J.M., Borrows S.R., Poulsen L.M. et al. Unusually high frequency of Epstein-Barr virus genetic variants in Papua New Guinea that can escape cytotoxic T-cell recognition: implications for virus evolution. *J. Virol.* 1996; 70: 2490–6.
41. de Campos-Lima P.O., Levitsky V., Brooks J. et al. T cell responses and virus evolution: loss of HLA A11-restricted CTL epitopes in Epstein-Barr virus isolates from highly A11-positive populations by selective mutation of anchor residues. *J. Exp. Med.* 1994; 179: 1297–305.
42. Guglietta S., Garbuglia A.R., Pacciani et al. Positive selection of cytotoxic T lymphocyte escape variants during acute hepatitis C virus infection. *Eur. J. Immunol.* 2005; 35: 2627–37.
43. Man S., Newbery H., Crotzer V.I. et al. Definition of human T cell epitope from influenza A non-structural protein 1 using HLA-A21 transgenic mice. *Inf. Immunol.* 1995; 7: 597–605.
44. Rimmelzwaan G.F., Fouchier R.A., Osterhaus A. Influenza virus-specific cytotoxic T lymphocytes: a correlate of protection and a basis for vaccine development. *Current Opinion in Biotechnology.* 2007; 18: 529–36.
45. Ploegh H.L. Viral strategies of immune evasion. *Science.* 1998; 280: 248–53.
46. Boon A.C., de Mutsert G., van Baarle D., Smith D.J., Lapedes A.S., Fouchier R.A. et al. Recognition of homo- and heterosubtypic variants of influenza A viruses by human CD8⁺ T lymphocytes. *J. Immunol.* 2004; 172: 2453–60.
47. Portela A., Digard P. The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. *J. Gen. Virol.* 2002; 83 (April (Pt 4)): 723–34.
48. Gog J.R., Rimmelzwaan G.F., Osterhaus A.D., Grenfell B.T. Population dynamics of rapid fixation in cytotoxic T lymphocyte escape mutants of influenza A. *PNAS.* 2003; 100 (19): 11 143–7.
49. Macken C., Lu H., Goodman J., Boykin L. The value of a database in surveillance and vaccine selection. Options for the control of influenza IV. *Elsevier Science.* Amsterdam. The Netherlands, 2001: 103–6.
50. Rimmelzwaan G.F., Berkhoff E.G., Nieuwkoop N. J. et al. Functional compensation of a detrimental amino acid substitution in a cytotoxic-T-lymphocyte epitope of influenza A viruses by comutations. *J. Virology.* 2004; 78 (16): 8946–9.
51. Rimmelzwaan G.F., Berkhoff E.G., Nieuwkoop N.J., Smith D.J., Fouchier R.A., Osterhaus A.D. Full restoration of viral fitness by multiple compensatory co-mutations in the nucleoprotein of influenza A virus cytotoxic T-lymphocyte escape mutants. *J. General Virology.* 2005; 86: 1801–5.
52. Alexander-Miller M.A. High-avidity Cd8⁺ T cell: optimal soldiers in the war against viruses and tumors. *Immunol. Res.* 2005; 31: 13–24.
53. Derby M., Alexander-Miller M., Tse R., Berzofsky J. High-avidity CTL exploit two complementary mechanisms to provide better protection against viral infection than low-avidity CTL. *J. Immunol.* 2001; 166: 1690–7.
54. O'Connor D.H., Allen T.M., Vogel T.U. et al. Acute phase cytotoxic T lymphocyte escape is a hallmark of simian immunodeficiency virus infection. *Nat. Med.* 2002; 8: 493–9.
55. Zeh H.J., Perry-Lalley III.D., Dudley M.E. High-avidity CTLs for two self-antigens demonstrate superior in vitro and in vivo antitumor efficacy. *J. Immunol.* 1999; 162: 989–94.
56. Berkhoff E.G., Geelhoed-Mieras M.M., Verschuren E.J., Baalen C.A., Gruters R.A., Fouchier R.A., Osterhaus A.D., Rimmelzwaan G.F. The loss of immunodominant epitopes affects interferon- γ production and lytic activity of the human influenza virus-specific cytotoxic T lymphocyte response in vitro. *J. Clinical and Exp. Immunol.* 2007; 148: 296–306.
57. Bodewes R., Geelhoed-Mieras M.M., Nieuwkoop N.J., Hanson J.A., David C.S., Fouchier R.A., Osterhaus A.D., Rimmelzwaan G.F. Redundancy of the influenza A virus-specific cytotoxic T lymphocyte response in HLA-B*2705 transgenic mice limits the impact of a mutation in the immunodominant NP₃₈₃₋₃₉₁ epitope on influenza pathogenesis. *Virus Research.* 2011; 155: 123–30.
58. Carrat F., Flahault F. Influenza vaccine: The challenge of antigenic drift. *Vaccine.* 2007; 25: 6852–62.
59. Elhefnawi M., ALAidi O., Mohamed N., Kamar M., El-Azab I., Zaba S., Siam R. Identification of novel conserved functional motifs across most influenza A viral strains. *Virology J.* 2011; 8: 44.
60. Li C., Rappuoli R., Xu X.-N. Correlates of protection against influenza infection in humans – on the path to a universal vaccine? *Current Opinion in Immunology.* 2013; 25: 470–6.

Поступила 30.12.13

Received 30.12.13

Логина Н.В., Дерябин П.Г., Вашкова В.В.

Биологическая характеристика коллекционных штаммов вирусов группы японского энцефалита

ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава России, 123098, Москва

Многолетнее (с 1966 г.) изучение биологических свойств флавивирусов подгруппы японского энцефалита (ЯЭ) в лаборатории генетики арбовирусов ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава России позволило собрать и депонировать в Государственную коллекцию штаммы вируса ЯЭ, среди которых имеются штаммы вируса ЯЭ, изолированные из природных очагов в различных географических зонах, а также штаммы, полученные в лаборатории экспериментальным путем.

Перечислены находящиеся на сохранении коллекционные штаммы флавивирусов японского энцефалита, лихорадки Западного Нила (ЛЗН) и Усуту. Приводятся сведения о происхождении штаммов и их патогенности для экспериментальных животных.

Ключевые слова: *флавивирусы подгруппы японского энцефалита; история выделения; патогенность для белых мышей.*

Для цитирования: *Вопросы вирусологии. 2015; 60(1): 17–20.*

Loginova N.V., Deryabin P.G., Vashkova V.V.

The biological characteristic of the collection strains of viruses from the subgroup of Japanese encephalitis

D.I. Ivanovsky Institute of Virology, Ministry of Health of the Russian Federation, 123098, Moscow, Russia

Perennial (since 1966) study of the biological properties of the viruses from the flavivirus subgroups of the Japanese encephalitis (JE) made it possible to collect and deposit in the State collection of JE virus strains JE virus strains isolated from natural foci in different geographic zones, as well as the JE virus strains selected in the laboratory. The collection of the flaviviruses strains of Japanese encephalitis complex, West Nile fever (West Nile virus and Usutu), which were studied and preserved, are listed. The data are provided on the origin of strains and their pathogenicity for laboratory animals.

Key words: *flaviviruses complex of Japanese encephalitis; history of selection; pathogenicity for experimental animals.*

Citation: *Voprosy virusologii. 2015; 60(1): 17–20. (In Russ.)*

Для обеспечения биобезопасности населения в рамках программы «Новые и возвращающиеся инфекции в системе биологической безопасности государства» в настоящее время большое значение имеет изучение как вновь выделяемых штаммов вирусов, патогенных и высокопатогенных для человека, так и сохранение и изучение архивных штаммов этих вирусов. Понятие «архивный штамм вируса» означает выделенный в прошлые годы штамм вируса из различных материалов (органы животного или человека, переносчики), а также в различных географических зонах мира и депонированный в Государственную коллекцию вирусов. Изучение ряда особенностей этих штаммов, таких как биологические свойства (нейровирулентность, патогенность, инфекционная и антигенная активности), анализ молекулярно-биологических особенностей, изучение последовательности генома, делают возможным следить за их историей и эволюцией, влиянием внешних факторов на эти процессы, а также решать ряд других фундаментальных и прикладных задач.

Результаты многолетнего (с 1966 г.) изучения биологических свойств флавивирусов подгруппы японского энцефалита (ЯЭ) в лаборатории генетики арбовиру-

сов ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава России позволили собрать и депонировать в Государственную коллекцию вирусов (ГКВ) большую коллекцию штаммов вируса ЯЭ, среди которых имеются как штаммы вируса ЯЭ, изолированные из природных очагов в различных географических зонах мира, так и штаммы, полученные в лаборатории экспериментальным путем. Многие вирусы из этой коллекции представляют практический интерес как кандидаты в производственные штаммы, пригодные для разработки на их основе диагностических и профилактических препаратов.

Цель настоящего сообщения – публикация каталога имеющихся и охарактеризованных по биологическим свойствам штаммов флавивирусов подгруппы ЯЭ: ЯЭ, лихорадки Западного Нила (ЛЗН) и Усуту.

В табл. 1 приведены сведения по 19 имеющимся на хранении штаммам этих вирусов. Материалом для хранения служила, как правило, 10% суспензия ткани головного мозга, взятого на высоте проявлений симптомов поражения ЦНС у инфицированных внутримозговым способом новорожденных мышей (3–4-е дни после заражения). Вирус хранится в лиофилизирован-

Перечень и история выделения коллекционных штаммов флавивирусов подгруппы ЯЭ

№ п/п	Вирус	Штамм	Материал выделения	Год выделения	Место выделения	Кем выделен	Количество пассажей перед сохранением	Условное обозначение
1	ЯЭ	Джагар 01 (JaGAR01)	Пул комаров <i>C. tritaeniar</i>	1959	Япония префектура Гунма	Kitaoka	30–35	Джагар 01
2	ЯЭ	ДВК-4	Мозг человека	1943	СССР, Уссурийский край	Е.Н. Левкович	Неизвестно	ДВК-4
3	ЯЭ	Sasazaki (Сасазакки)	То же	1966	Япония	Oya	40–45	Sas
4	ЯЭ	Mizushima (Мицushima)	То же	1966	"	Kitaoka	Неизвестно	m-pk
5	ЯЭ	Мукаи m-pk	Пул комаров, дальнейшая аттенуация	1964	"	Yokishigi, Kanda, Inoue	2	m-pk
6	ЯЭ	Peking 1 (Пекин 1)	Мозг человека	1949	Китай	Фан Дзе Мин	40–45	P-1
7*	ЯЭ	Nakajama (Накаяма)	То же	1935	Япония	Mitamura, Kitaoka	Не менее 85	Нак
8*	ЯЭ	Японский 47	" "	1945	Манчжурия	А.И. Дробышевская	Не менее 75	Я-47
9*	ЯЭ	28	" "	1956	Китай	Гу Фан Джоу	30–35	28
10*	ЯЭ	29	" "	1956	"	Гу Фан Джоу	30–35	29
11	ЯЭ	К 33	Получен экспериментально	1979	СССР	Н.В. Логинова	Более 30	К 33
12	ЯЭ	К 40	То же	1979	СССР	Н.В. Логинова	Более 30	К 40
13	ЯЭ	К 43	" "	1979	СССР	Н.В. Логинова	Более 30	К 43
14	ЯЭ	К 3	" "	1984	СССР	П.Г. Дерябин, Н.В. Логинова	25–30	К 3
15	ЛЗН	Egypt 101 (Египет 101)	Сыворотка крови больного человека	1956	Египет	Melnick и соавт.	12	Eg 101
16	ЛЗН	Ig 2266	Пул комаров	1955	Индия	Donawate и соавт.	3	Ig 2266
17	ЛЗН	B956	Сыворотка крови больного человека	1937	Африка, Уганда	Smithburn и соавт.	Около 30	B956
18	ЛЗН	П-1640	Смесь органов трех поползней	1968	СССР, Азербайджан	С.Я. Гайдамович и соавт.	3	П-1640
19	Усуту	AR-1776	Пул комаров	1959	Южная Африка	McIntosh и соавт.	7	Усуту

Примечание. * – штаммы хранятся в ГКВ ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава России.

ном виде в ампулах при низкотемпературном режиме (-40°C, -70°C) хранения. Периодически проводятся проверки сохранения исходных свойств коллекционных штаммов.

Среди штаммов вируса ЯЭ в коллекции находятся пять экспериментально полученных авторских вариантов этого вируса. Это мутант *m-pk* вируса Мукаи из Японии, а также отечественные клонированные штаммы вируса ЯЭ – К33, К40, К43 и К3.

В 1964 г. японский исследователь Y. Inoue сообщил о выделении мутантного варианта штамма Мукаи, *m-pk*, который был получен после серийных пассажей родительского штамма в культурах клеток кожи эмбрионов белых мышей [1]. Далее культивирование вируса проводили в первичных культурах почки свиней, что позволило получать значительные объемы культуральной жидкости, содержащей мутант вируса ЯЭ – *m-pk*. Также первично полученный в клетках кожи эмбрионов мыши материал культивировали в перевиваемых клетках почки эмбриона свиньи – *PS* (штамм *m-PS*). Авторы доказали, что аттенуированный вариант вируса Мукаи, *m-pk*, является высокоиммуногенным штаммом, а после однократной подкожной инъекции поросётам штамм *m-pk* вызывал значительное нарастание гематоглобинин-

ингибирующих и вируснейтрализующих антител (АТ). Это позволило авторам успешно использовать этот штамм для иммунизации свиней в очагах ЯЭ на территории Японии.

Штамм *m-pk* был передан для изучения в Ленинград (ныне Санкт-Петербург) профессору А.А. Смородинцеву. Штамм прошел дополнительное клонирование методом конечных разведений, один из клонов получил название *m-pk/L*. Он прошел всестороннее экспериментальное изучение и после положительных характеристик был использован для иммунизации 528 волонтеров, при этом после двукратного введения вакцины у 80–90% из них определили нарастание титра вируснейтрализующих АТ, причем продолжительность индуцированного иммунитета длилась по крайней мере 1 год [1–3].

Также штамм *m-pk* был передан автором проф. В.В. Погодиной в Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов РАМН для изучения [4]. В нашу коллекцию штамм *m-pk* поступил от В.В. Погодиной.

Авторские штаммы вируса ЯЭ – К33, К40, К43 – получены при целенаправленных исследованиях по получению измененных стабильных вариантов вируса ЯЭ.

Штамм К33 вируса ЯЭ выделен методом клонирования из мелкой бляшки (0,1 мм в диаметре) разнораз-

Таблица 2

Структура различных вариантов лекарственной устойчивости ВИЧ-1 к АРВ препаратам (в %) в 2010–2012 гг.

Вирус	Штамм	Патогенность для нелинейных белых мышей		
		ic*	sc*	ip*
ЯЭ	Джагар 01	6,8	5,05	4,85
ЯЭ	ДВК-4	8,12	3,18	6,12
ЯЭ	Сазаки	8,92	5,16	6,86
ЯЭ	Мицushima	3,36	1,16	2,31
ЯЭ	Мукаи m-pk	4,32	0	1,15
ЯЭ	Пекин 1	9,00	5,60	6,32
ЯЭ	Накаяма	6,15	3,06	3,93
ЯЭ	Я-47	8,36	3,90	4,17
ЯЭ	28	7,20	2,70	3,15
ЯЭ	29	6,80	4,2	4,32
ЯЭ	К33	8,25	1,5	3,0
ЯЭ	К40	6,18	1,78	3,92
ЯЭ	К43	3,5	0	1,4
ЯЭ	К3	6,7	0	2,32
ЛЗН	Египет 101	7,06	3,16	4,18
ЛЗН	Ig2266	6,07	2,18	3,56
ЛЗН	B956	6,55	3,18	5,18
ЛЗН	П-1640	5,25	3,8	4,32
Усуту	AR-1776	5,11	0	1,22

Примечание. * – внутримозговой, подкожный и внутрибрюшинный способы заражения в Ig LD₅₀/мл.

мерных бляшек, образующихся под агаром в культурах клеток куриного эмбриона при заражении клеток популяцией штамма Накаяма. Выделенный клон прошел семь последовательных пассажей в первичных культурах эмбриона мыши при 37°C с целью закрепления исходных характеристик. После 30 пассажей в мозге белых мышей он стабильно сохраняет свойства слабопатогенного при подкожном введении штамма (табл. 2), однако обладает слабой антигенной и иммуногенной активностью.

Штамм К40 вируса ЯЭ является клонированным вариантом штамма Пекин-1. Популяция штамма Пекин-1 формирует в культурах клеток куриного эмбриона под агаром бляшки разного размера от 3 мм (крупные в 70% популяции) до 1,2 мм (мелкие до 30%). К40 выделен из крупной бляшки (3 мм). Далее прошел два пассажа в клетках культуральной линии PS, после чего пассировался в головном мозге белых мышей. Клон сохраняет стабильно исходную высокую церебральную и периферическую активность (см. табл. 2), однороден по признаку размера бляшек (сохраняет крупнобляшковую характеристику), отличается высокой антигенной и иммуногенной способностью.

Штамм К43 выделен из мелкой бляшки (1,3 мм в диаметре) штамма Пекин-1, который предварительно прошел 85 последовательных пассажей в первичной культуре клеток эмбриона овцы (линия П-1-85ПЭО). После выделения прошел шесть дополнительных пассажей в клетках ВНК-21 при 37°C. Далее пассируется через головной мозг белых мышей. Стабильно сохраняет свойства аттенуированного штамма – слабая церебральная и периферическая активность, наряду с этим он является антигенно- и иммуногенно-активным вариантом вируса ЯЭ [4, 5].

Штамм К3 вируса ЯЭ получен из хронически инфицированной линии культур клеток головного мозга мышечных сосунков, предварительно зараженной К33 вируса ЯЭ (ГМС-1-К33). [6]. Доказано, что при данных условиях формируется персистентная инфекция клеток с фазами стадийного развития (дегенерация и репопуляция), связанными с высокой цитопролиферативной способностью хронически инфицированных вирусом ЯЭ клеток. Наряду с этими явлениями персистирующий вирус также подвергался изменениям по разным показателям активности. На 108-м пассаже линии ГМС-1-К33 (422-е сутки наблюдения) после 3-кратного клонирования из крупной бляшки (2,5 мм) выделен клон 3 (К3) вируса ЯЭ. Он отличался сниженной нейровирулентностью для белых беспородных мышей, а также уникальной способностью вызывать выраженную цитодеструкцию первичных фибробластов 9-дневных куриных эмбрионов и размножаться в этих культурах клеток в необычайно высоких для вируса ЯЭ титрах (9–10 lg БОЕ/мл.) [7]. Биологические свойства К3 оказались оптимальными для разработки на его основе культуральной инактивированной вакцины против ЯЭ [8]. Штамм К3 (так же, как ранее, К33, К40 и К43 вируса ЯЭ) депонирован в ГКВ. Получен российский патент за № 1 751 203 на изобретение «Штамм Virus japonici encephalitis для приготовления диагностических и профилактических препаратов» [9].

Помимо трех эталонных штаммов вируса ЛЗН в коллекции сохраняется штамм П-1640 (см. табл. 1), выделенный группой отечественных ученых во главе с проф. С.Я. Гайдамович из органов трех поползней в Азербайджане в 1969 г. [10]. Авторы определили его как штамм, принадлежащий к африканско-средиземноморскому генотипу, к которому относятся штаммы Египет 101 и B956 вируса ЛЗН в отличие от индийского генотипа штамма Ig2266. Патогенность штамма П-1640 не отличалась от эталонных штаммов обоих генотипов вируса (см. табл. 2).

Штамм AR-1776 вируса Усуту изучен в связи с антигенной близостью с вирусами ЯЭ и ЛЗН (см. табл. 1). При определении патогенности этого вируса оказалось, что он является естественно аттенуированным вариантом: штамм не патогенен для мышей при подкожном, внутримышечном и внутрибрюшинном заражении (см. табл. 2).

В отношении вируса Усуту показано [11], что его циркуляция в странах Европы (Италия, Австрия, Швейцария, Германия, Венгрия) с 1966 г. (а может быть, и ранее) связывалась с падежом диких птиц разных видов. Полагают, что причины таких вспышек заболевания птиц вызваны изменениями климатических условий. Длительные периоды влажной и жаркой погоды способствуют эффективности трансмиссии вируса чувствительным хозяевам, встречающимся с возбудителем впервые.

Таким образом, депонированные в ГКВ штаммы флавивирусов подгруппы ЯЭ, изолированных из природных источников или полученных экспериментальным путем, представляют собой уникальную отечественную коллекцию для изучения истории и эволюции вирусов подгруппы ЯЭ, а также для разработки и совершенствования диагностических и профилактических препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Inoue Y.K. An attenuated mutant of Japanese encephalitis virus. *Bull. World Health Organization*. 1964; 30: 181–5.
2. Inoue Y.K. An attenuated Japanese encephalitis vaccine. *Progr. Med. Virol.* 1975; 19: 247–56.

3. Piyenko V., Panov A.G., Prozorova I.N. et al. Biologic and immunogenic properties of Japanese B encephalitis. *Am. J. Epidemiol.* 1972; 95: 148–56.
4. Погодина В.В., Чумаков М.П., Киселева Л.А., Левина и др. Характеристика аттенуированного m-мутанта вируса ЯЭ в аспекте генетической стабильности, однородности и культуральных особенностей. В кн.: *Арбовирусы, передаваемые комарами*. М.; 1969: 174–84.
5. Логинова Н.В. Характеристика вариантов вируса японского энцефалита по ряду генетических признаков. В кн.: *Материалы XV научной сессии Института полиомиелита и вирусных энцефалитов*. М.; 1968; вып. 3: 230–1.
6. Логинова Н.В. *Биология флавивирусов подгруппы японского энцефалита*: Автореф. дисс. ... д-ра мед. наук. М.: 1985.
7. Дерябин П.Г., Логинова Н.В. Высокопродуктивный аттенуированный вариант вируса японского энцефалита. *Вопросы вирусологии*. 1995; 6: 265–8.
8. Логинова Н.В., Дерябин П.Г., Тихомиров Е.Е., Карпова Е.Ф. Инактивированная культуральная вакцина для профилактики японского энцефалита (экспериментально лабораторная схема производства и контроля). *Вопросы вирусологии*. 2007; 3: 26–9.
9. Дерябин П.Г., Логинова Н.В. *Патент № 1751203 на изобретение: Штамм Virus japonici encephalitis для приготовления диагностических и профилактических препаратов. Патент 1751203 РФ*. Зарегистрировано в Гос. Реестре изобретений 28 июля 1993.
10. Гайдамович С.Я., Никифоров Л.П., Громашевский В.Л. и др. Выделение арбовирусов из групп А и В в Азербайджане. В кн.: *Материалы XV научной сессии Института полиомиелита и вирусных энцефалитов*. М.; 1968; вып. 3: 185–6.
11. Weissenbröck H., Bakonyi T., Rossi G., Mani P., Nowotny N. Usutu virus, Italy, 1996. *Emerg. Infect. Dis.* 2013; 19 (2): 274–7.
2. Inoue Y.K. An attenuated Japanese encephalitis Vaccine. *Progr. Med. Virol.* 1975; 19: 247–56.
3. Piyenko V., Panov A.G., Prozorova I.N. et al. Biologic and immunogenic properties of Japanese B encephalitis. *Am. J. Epidemiol.* 1972; 95: 148–56.
4. Pogodina V.V., Chumakov M.P., Kiseleva L.A. et al. The characteristic of an attenuated m-mutant of virus JE in aspect of genetic stability, uniformity and cultural features. *Arbovirusy, peredavaemye komarami*. Moscow; 1969: 174–84. (in Russian)
5. Loginova N.V. The characteristic of strains of a virus of Japanese encephalitis on a number of genetic signs. *Proc. XV scientific session of Institute of poliomyelitis and virus encephalitis*. Moscow; 1968: 230–1. (in Russian)
6. Loginova N.V. Biology flavivirus subgroups of Japanese encephalitis. Dr. med. Sci. Diss. Moscow; 1985. (in Russian)
7. Deryabin P.G., Loginova N.V. Highly productive attenuated variant of Japanese encephalitis virus. *Voprosy virusologii*. 1995; 6: 265–8. (in Russian)
8. Loginova N.V., Deryabin P.G., Tihomirov E.E., Karpova E.F. Tissue culture inactivated vaccine for the prevention of Japanese encephalitis: experimental and laboratory process and control layout. *Voprosy virusologii*. 2007; 3: 26–9. (in Russian)
9. Patent N. 1751203 for the invention: «Virus japonici encephalitis strain for preparation of diagnostic and preventive preparations. The Patent holder of the D.I. Ivanovsky Institute of Virology of the Russian Academy of Medical Science. Country: Russian Federation. Authors: Deryabin P.G., Loginova N.V. It is registered in State. register of inventions on July 28, 1993, is valid from July 28.
10. Gaydamovich S.Ya., Nikiforov L.P., Gromashevskiy V.L. et al. Allocation of arboviruses from groups A and B in Azerbaydzhan. *Proc. XV scientific session of Institute of poliomyelitis and virus encephalitis*. Moscow; 1968: 185–6. (in Russian)
11. Weissenbröck H., Bakonyi T., Rossi G., Mani P., Nowotny N. Usutu virus, Italy, 1996. *Emerg. Infect. Dis.* 2013; 19 (2): 274–7.

REFERENCES

1. Inoue Y.K. An attenuated mutant of Japanese encephalitis virus. *Bull. World Health Organization*. 1964; 30: 181–5.

Поступила 23.05.13

Received 2305.13

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 616.98:578.828.61-092:612.017.1.064]-085.015.8

Колomeец А.Н.^{1,2}, Довгополюк Е.С.², Сергеева И.В.², Ястребов В.К.¹, Тюменцев А.Т.²

Показатели лекарственной устойчивости вируса иммунодефицита человека к антиретровирусным препаратам у ВИЧ-инфицированных лиц в Сибирском федеральном округе в 2010–2012 гг.

¹ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора, 644080, Омск;

²Сибирский федеральный окружной центр по профилактике и борьбе со СПИД, 644080, Омск

Исследовали распространенность мутаций лекарственной устойчивости к основным трем классам антиретровирусных (АРВ) препаратов у пациентов, получающих АРВ-терапию. Среди основных мутаций лекарственной устойчивости за весь период наблюдения отмечена высокая частота мутаций M184V, K101E, K103N, Y181C и G190S, влияющих на развитие устойчивости ВИЧ-1 к нуклеозидным и нуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы (НИОТ и ННИОТ). Освещены проблемы практического применения результатов исследования лекарственной устойчивости ВИЧ-1 в регионах Сибирского федерального округа (СФО).

Ключевые слова: ВИЧ-1; лекарственная устойчивость; генотипирование; секвенирование.

Для цитирования: *Вопросы вирусологии*. 2015; 60 (1): 20–23.

Kolomeets A.N.^{1,2}, Dovgopolyuk E.S.², Sergeeva I.V.², Yastrebov V.K.¹, Tyumentsev A.T.²

Indicators of the human immunodeficiency virus drug resistance to antiretroviral drugs in HIV-infected individuals in the Siberian federal district in 2010-2012

¹Omsk Research Institute of Natural Focal Infections, Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 644080, Omsk, Russia; ²Siberian Federal District Center for AIDS Prevention, 644080, Omsk, Russia

Для корреспонденции: Колomeец Анна Николаевна, канд. мед. наук; e-mail: arbitasfoc2@gmail.com
Correspondence to: Anna Kolomeets, MD, PhD; e-mail: arbitasfoc2@gmail.com

The prevalence of the mutations of resistance to the main three classes of antiretroviral agents in patients receiving antiretroviral therapy was tested. Among the main drug resistance mutations for the entire period of observation was a high frequency of the occurrence M184V mutation, K101E, K103N, Y181C, and G190S influencing the development of the HIV resistance to nucleoside and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. The problems of the practical application of the study of HIV drug resistance in the regions of the Siberian Federal District were emphasized.

Key words: HIV; drug resistance; genotyping; sequencing.

Citation: *Voprosy virusologii*. 2015; 60(1): 20–23. (In Russ.)

Постоянное дивергентное развитие ВИЧ-1, приводящее к росту заболеваемости до эпидемического уровня, происходит за счет большого разнообразия квазивидов ВИЧ-1 у каждого инфицированного [1–4].

Лекарственная устойчивость ВИЧ-1 к антиретровирусным (АРВ) препаратам – сложный феномен, который включает мутации, возникающие под селективным давлением АРВ-препаратов, и взаимодействие между мутациями. Формирование мутантных квазивидов ВИЧ-1, устойчивых к АРВ-препаратам, наблюдается примерно у 30–40% получающих высокоактивную антиретровирусную терапию (ВААРТ) пациентов [5]. На формирование лекарственной устойчивости оказывают влияние несколько факторов, в том числе особенности репликации ВИЧ-1, которая характеризуется высокой скоростью [6, 7], большим количеством ошибок [8, 9] и происходит даже на фоне АРВ-терапии [10, 11]. Также отмечается высокая частота рекомбинаций между штаммами при суперинфекции [12, 13]. АРВ-терапия представляет собой эффективный инструмент для контроля прогрессирования ВИЧ-1-инфекции, хотя и ограничена развитием лекарственной устойчивости. Определение лекарственной устойчивости к АРВ-препаратам является важным дополнением в общей схеме ВААРТ, так как в большинстве случаев позволяет объяснить причину неэффективности терапии и назначить оптимальную комбинацию препаратов. Смена АРВ-препаратов без учета данных о развившейся устойчивости может привести к развитию перекрестной устойчивости ВИЧ-1, что еще больше затруднит выбор схемы терапии. Нужно отметить, что немаловажную роль в смене схемы терапии без клинических показаний играет также несовершенная система менеджмента АРВ-терапии в России, в частности система закупок и поставок препаратов [14].

Материалы и методы

Нами были проанализированы 475 образцов плазмы крови, полученные от ВИЧ-1-инфицированных пациентов из различных регионов Сибирского федерального округа (СФО), с целью выявления мутаций, ассоциированных с устойчивостью к нуклеозидным и нуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы (НИОТ и ННИОТ), а также ингибиторам протеазы (ИП) ВИЧ-1. Отбор пациентов, определение степени их приверженности к лечению и назначение необходимых предварительных исследований (вирусная нагрузка) проводили лечащие врачи центров по профилактике и борьбе со СПИД субъектов РФ (центров СПИД). Последним было предложено отбирать пациентов для исследования в соответствии с методическими рекомендациями [15]. Большинство пациентов получали ВААРТ с необходимостью ее коррекции из-за вирусологической или иммунологической неудачи. Исключение составили двое «наивных» пациентов в 2011 г. из Новосибирской области и трое «наивных» пациентов в 2012 г. из Иркутской области, для которых также было проведено стандартное исследование. Приверженность пациентов к лечению определяли их лечащие врачи соответственно рекомендациям ВОЗ на основании метода подсчета таблеток. Кровь за-

бирали непосредственно в центрах СПИД в пробирку с этилендиаминтетраацетатом (ЭДТА) с последующим отделением плазмы, которую затем транспортировали в Сибирский федеральный окружной центр по профилактике и борьбе со СПИД. До исследования образцы плазмы хранили при -82°C . Параллельно проанализированы схемы ВААРТ обследованных пациентов, показатели и сроки определения вирусной нагрузки (ВН).

Выделение РНК ВИЧ-1, обратнотранскриптазную полимеразную цепную реакцию (ОТ-ПЦР), секвенирующую ПЦР (целостный протеазный ген ВИЧ-1 с кодонов 1–99 и 2/3 гена обратной транскриптазы с кодонов 1–335) проводили с использованием модуля коммерческой тест-системы ViroSeq «HIV-1 Genotyping System» v. 2.0 («Celera Diagnostics», «Abbott», США), согласно инструкции производителя. Секвенирование очищенных фрагментов проводили на генетическом анализаторе ABI Prism 3100-Avant в 2010–2011 гг. и 3500xL в 2012 г. («Applied Biosystems», США). Для выявления и анализа мутаций, ведущих к лекарственной устойчивости ВИЧ-1, использовали программу ViroSeq v. 2.8, а также программу HIVdb Program v.6.3.0 (<http://sierra2.stanford.edu/sierra/servlet/JSierra?action=sequencelinput>). Для анализа распространенности основных мутаций резистентности ВИЧ-1 руководствовались списком, размещенным на сайте Стэнфордской базы данных лекарственной устойчивости [16]. Для определения подтипов ВИЧ-1 на основе полученных нуклеотидных последовательностей были использованы программы: Comet HIV-1 v.0.5 (<http://comet.retrovirology.lu/>) и HIV BLAST (http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/BASIC_BLAST/basic_blast.html).

Статистическая обработка данных осуществлена с помощью пакета прикладных программ Microsoft Excel 2003 с использованием параметрических критериев описательной статистики. Величины нормированных отклонений были приняты равными 2 ($t = 2$), что соответствует уровню значимости 0,05. Ошибку репрезентативности определяли по формуле:

$$m_p = \pm \sqrt{pq} / n.$$

Результаты и обсуждение

Проведено выделение РНК из всех доставленных на исследование проб, но получить ПЦР-продукт удалось только для 384 ($80,8 \pm 4,0\%$) образцов. При этом довольно высокой оказалась доля нуклеотидных последовательностей, в которых не было выявлено конкретных мутаций ни к одному препарату из групп НИОТ, ННИОТ и ИП (табл. 1), несмотря на ожидаемую лекарственную устойчивость.

Причиной отсутствия мутаций ВИЧ-1, ассоциированных с лекарственной устойчивостью у пациентов, получавших ВААРТ, может быть недостаточное селективное давление АРВ-препаратов из-за низкой приверженности пациентов к лечению или из-за иных причин прерывания либо изменения схемы терапии [13]. В результате, в популяции вируса доминирует дикий штамм, не несущий мутаций лекарственной устойчивости, а устойчивые квазивиды ВИЧ-1 находятся в минорном состоянии.

Структура различных вариантов лекарственной устойчивости ВИЧ-1 к АРВ-препаратам (в %) в 2010–2012 гг.

Год	Вариант резистентности			Не удалось получить ПЦР-продукт
	высокая лекарственная устойчивость хотя бы к одному препарату какой-либо группы АРВ-препаратов	любая другая лекарственная устойчивость, кроме высокой	нет лекарственной устойчивости ни к одному препарату	
2010	42,8±8,8	4,0±3,5	27,0±7,9	26,2±7,8
2011	41,2±7,7	4,8±3,3	40,0±7,6	14,0±5,4
2012	47,0±7,4	9,0±4,2	23,0±6,2	21,0±6,0

Наличие таких квазивидов невозможно обнаружить с использованием секвенирования, если они составляют менее 20–30% всей вирусной популяции [17].

Анализ степени приверженности терапии среди всех участвовавших в исследовании пациентов свидетельствовал о ее низких показателях (табл. 2).

Образцы с отсутствием каких-либо мутаций лекарственной устойчивости были получены в основном от пациентов с умеренной приверженностью терапии (38,0 ± 10,0% в 2010 г.; 36,0 ± 7,5% в 2011 г.; 52,0 ± 7,4% в 2012 г.).

Невозможность проанализировать некоторые образцы посредством секвенирования из-за отсутствия ПЦР-продукта могла быть связана с порогом чувствительности используемой тест-системы и, что закономерно, с ВН у обследуемого пациента. Так, чувствительность тест-системы HIV-1 Genotyping System v. 2.0 такова, что ее рекомендовано применять при ВН не ниже 1000 копий в 1 мл плазмы человека. При анализе образцов,

Таблица 1

давших отрицательный результат в ОТ-ПЦР за 2010–2012 гг., было установлено, что 18 ± 7,9% образцов имели ВН при последнем обследовании менее 1000 копий/мл, т. е. ниже порога чувствительности тест-системы. Что касается срока определения ВН до момента взятия крови для исследования резистентности, то 41,5 ± 4,5% образцов были получены с превышением рекомендуемого срока, т. е. > 2 нед, что также повлияло на результаты исследования.

Среди основных мутаций лекарственной устойчивости за весь период наблюдения отмечена высокая частота встречаемости мутаций M184V, K101E, K103N, Y181C и G190S, влияющих на развитие резистентности ВИЧ-1 к НИОТ и ННИОТ (табл. 3).

Особенно часто встречалась мутация M184V, ведущая к развитию лекарственной устойчивости высокого уровня к НИОТ (ламивудину и эмтрицитабину (35,2 ± 7,9–49,3 ± 8,3%)). Что касается мутаций к препаратам группы ННИОТ, на первый план выступили мутации: K101E, ведущая к развитию средней лекарственной устойчивости к невирапину и низкой лекарственной устойчивости к эфавирензу, этравирину и рилпивирину; K103N и G190S, вызывающие высокую лекарственную устойчивость к невирапину и эфавирензу. Лекарственную устойчивость к ИП выявляли значительно реже, что объясняется наличием высокого генетического барьера у препаратов данной группы [17]. Полученные результаты согласовывались с наиболее часто применяемыми режимами АРВ-терапии. Так, в 2010 г. 1-е место по частоте назначения среди обследованных на наличие лекарственной устойчивости пациентов занимала схема ЗТС+АЗТ+ЕФВ (25,6 ± 7,8%); 2-е место принадлежало схеме ЗТС+АЗТ+ЛПВ/г (11,6 ± 5,7%), несколько меньше назначали схемы ЗТС+АЗТ+НВП (9,3 ± 5,2%) и ЗТС+d4Т+ЛПВ/г (7,0 ± 4,5%). В 2011 г. 1-е и 2-е место осталось также за схемами ЗТС+АЗТ+ЕФВ (18,0 ± 6,0%) и ЗТС+АЗТ+ЛПВ/г (11,3 ± 5,0%). На 3-м месте оказалась схема ЗТС+d4Т+ЛПВ/г (6,0 ± 3,7%). В 2012 г. 1-е место заняла схема ЗТС+АЗТ+ЛПВ/г (12,0 ± 4,8%), 2-е – ЗТС+АВС+ЛПВ/г (7,0 ± 3,8%), а на схемы

Таблица 2

Показатели приверженности к лечению среди пациентов, у которых проведено исследование резистентности ВИЧ-1 (в %)

Год	Степень приверженности			Не указана
	высокая	средняя	низкая	
2010	17,5 ± 7,9	46,0 ± 10,3	27,0 ± 9,2	9,5 ± 6,1
2011	20,4 ± 6,7	45,5 ± 8,3	26,9 ± 7,4	7,2 ± 4,3
2012	17,0 ± 6,2	54,0 ± 8,2	22,0 ± 6,8	7,0 ± 4,2

Частота выявления основных мутаций к АРВ-препаратам

Год	Мутации к НИОТ и частота их выявления, %									
	K65R	D67N	K70R	L74V	Y115F	Q151M	M184I	M184V	T215F	T215Y
2010	1,1 ± 2,2	3,2 ± 3,6	5,4 ± 4,7	0 ± 2,1	0 ± 2,1	0 ± 2,1	0 ± 2,1	43,0 ± 10,3	3,2 ± 3,6	2,2 ± 3,0
2011	0 ± 1,4	5,5 ± 3,8	4,8 ± 3,6	1,4 ± 1,9	0,7 ± 1,4	1,4 ± 1,9	0 ± 1,4	35,2 ± 7,9	0,7 ± 1,4	0 ± 1,4
2012	0 ± 1,4	1,4 ± 1,9	0 ± 1,4	8,2 ± 4,5	3,4 ± 3,0	0 ± 1,4	2,7 ± 2,7	49,3 ± 8,3	0 ± 1,4	0 ± 1,4
	Мутации к ННИОТ и частота их выявления, %									
	K101E	K101N	K103N	E138A	E138G	E138K	Y181C	G190A	G190Q	G190S
2010	14,0 ± 7,2	1,1 ± 2,2	7,5 ± 5,5	2,2 ± 3,0	2,2 ± 3,0	0 ± 2,1	6,5 ± 5,1	2,2 ± 3,0	1,1 ± 2,2	19,4 ± 8,2
2011	6,2 ± 4,0	0,7 ± 1,4	9,0 ± 4,8	1,4 ± 1,9	0 ± 1,4	0,7 ± 1,4	1,4 ± 1,9	1,4 ± 1,9	0 ± 1,4	12,4 ± 5,5
2012	6,2 ± 4,0	0 ± 1,4	12,3 ± 5,4	0 ± 1,4	0 ± 1,4	0 ± 1,4	4,8 ± 3,5	2,1 ± 2,4	0 ± 1,4	8,9 ± 4,7
	Мутации к ИП и частота их выявления, %									
	L33F	M46I	M46L	I47V	I50L	I50V	L76V	I84V		
2010	0 ± 2,1	2,2 ± 3,0	0 ± 2,1	0 ± 2,1	1,1 ± 2,2	6,5 ± 5,1	0 ± 2,1	0 ± 2,1		
2011	1,4 ± 1,9	2,8 ± 2,7	0,7 ± 1,4	0,7 ± 1,4	0 ± 1,4	2,1 ± 2,4	0,7 ± 1,4	0 ± 1,4		
2012	2,7 ± 2,7	0 ± 1,4	0 ± 1,4	0,7 ± 1,4	0 ± 1,4	0 ± 1,4	0 ± 1,4	0 ± 1,4		2,1 ± 2,4

Таблица 3

ЗТС+АЗТ+ЕФВ, ЗТС+АВС+ЕФВ и ЗТС+ддI+ЕФВ приходилось по 6,0 ± 3,5%. Нужно отметить, что в общем по России основными назначаемыми в 2012 г. схемами были ЗТС+АЗТ+ЛРВ/г и ЗТС+АЗТ+ЕФВ [14].

Что касается «наивных» пациентов, ни в одном случае не было выявлено мутаций, рекомендуемых в качестве индикаторов передаваемой лекарственной устойчивости.

При генотипировании в большинстве случаев доминировал подтип А-1 (97,8 ± 3,0% в 2010 г., 86,9 ± 5,6% в 2011 г. и 77,4 ± 6,9% в 2012 г.). С 2011 г. в структуре субтипов стала нарастать доля циркулирующей рекомбинантной формы 02_AG (1,1 ± 2,2% в 2010 г., 11,0 ± 5,2% в 2011 г., 18,5 ± 6,4% в 2012 г.). Основная часть таких образцов (100,0 ± 1,4% в 2011 г.; 74,0 ± 7,2% в 2012 г.) была получена из Новосибирской области.

Выводы

1. В период 2010–2012 гг. среди пациентов, получающих ВААРТ, наибольшее распространение имели мутации, ассоциированные с лекарственной устойчивостью ВИЧ-1 к препаратам групп НИОТ и ННИОТ.

2. В регионах СФО доминирует подтип А-1 ВИЧ-1.

3. Проведенные исследования свидетельствуют о недостаточно отработанной системе менеджмента АРВ-терапии, в частности использования в клинической практике такой опции, как исследование лекарственной устойчивости ВИЧ-1 к АРВ-препаратам.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беляков Н.А., Рахманова А.Г., ред. *Вирус иммунодефицита человека – медицина: руководство для врачей*. 2-е изд. СПб: Балтийский медицинский образовательный центр; 2011.
2. Покровский В.В., ред. *ВИЧ-1-инфекция и СПИД: клинические рекомендации*. 2-е изд., перераб. и доп. М.: ГЭОТАР-МЕД; 2010.
3. Львов Д.К., ред. *Медицинская вирусология*. М.: МИА; 2008.
4. Урываев Л.В., Бобкова М.Р., Лаповок И.А. ВИЧ-1-инфекция – вызов человечеству. Есть ли шансы победить заболевание? *Вопросы вирусологии*. 2012; Приложение 1: 104–26.
5. Maldarelli F. HIV Drug Resistance. In: Zeichner S., Read J., eds. *Textbook of Pediatric HIV Care*. Cambridge: 2006 : 334–54.
6. Sato H., Orenstein J., Dimitrov D., Martin M. Cell-to-cell spread of HIV-1 occurs within minutes and may not involve the participation of virus particles. *Virology*. 1992; 2 (186): 712–24.
7. Mittler J.E., Markowitz M., Ho D.D., Perelson A.S. Improved estimates for HIV-1 clearance rate and intracellular delay. *AIDS*. 1999; 11 (13): 1415–7.
8. Paoloni-Giacobino A., Rossier C., Pappasavvas M.P., Antonarakis S.E. Frequency of replication/transcription errors in (A)(T) runs of human genes. *Hum. Genet.* 2001; 1 (109): 40–7.
9. O'Neil P.K., Sun G., Yu H., Ron Y., Dougherty J.P., Preston B.D. Mutational analysis of HIV-1 long terminal repeats to explore the relative contribution of reverse transcriptase and RNA polymerase II to viral mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 2002; 41 (277): 38 053–61.
10. Persaud D., Pierson T., Ruff C., Finzi D., Chadwick K.R., Margolick J.B. et al. A stable latent reservoir for HIV-1 in resting CD4(+) T lymphocytes in infected children. *J. Clin. Invest.* 2000; 7 (105): 995–1003.
11. Ruff C.T., Ray S.C., Kwon P., Zinn R., Pendleton A., Hutton N. et al. Persistence of wild-type virus and lack of temporal structure in the latent reservoir for human immunodeficiency virus type 1 in pediatric patients with extensive antiretroviral exposure. *J. Virol.* 2002; 18 (76): 9481–92.
12. Kellam P., Larder B.A. Retroviral recombination can lead to linkage of reverse transcriptase mutations that confer increased zidovudine resistance. *J. Virol.* 1995; 2 (69): 669–74.
13. Gomez Carrillo M., Avila M., Hierholzer J., Pando M., Martinez P.L., McCutchan F.E. et al. Mother to child HIV type 1 transmission

in Argentina: BF recombinants have predominated in infected children since the mid-1980s. *AIDS Res. Hum. Retrovirus*. 2002; 7 (18): 477–83.

14. *Лечить нельзя отказывать: отчет по результатам исследования силами сообщества людей, живущих с ВИЧ-1*. Available at: http://itpcru.org/netcat_files/10/196/Zakupki_FINAL.pdf.
15. *Определение чувствительности вируса иммунодефицита человека к лекарственным препаратам: Методические рекомендации № 5956-РХ*: утв. зам. Министра здравоохранения и соц. развития Российской Федерации 06.08.2007.
16. *Major HIV Drug Resistance Mutations*. Available at: http://hivdb.stanford.edu/pages/download/resistanceMutations_handout.pdf.
17. Wolf E. HIV Resistance testing. In: Hoffmann C., Rockstroh J.K., Kamps B.S., eds. *HIV Medicine*. 2007: 321–52.

REFERENCES

1. Belyakov N.A., Rakhmanova A.G. eds. *Human immunodeficiency virus – medicine: a guide for physicians* [Вирус иммунодефицита человека – медицина: руководство для врачей]. 2nd ed. St. Petersburg: Baltiyskiy meditsinskiy obrazovatel'nyy tsentr; 2011. (in Russian)
2. Pokrovsky V.V., ed. *HIV infection and AIDS : clinical guidelines* [ВИЧ-1-инфекция и СПИД: клинические рекомендации]. 2nd ed., rev. and add. Moscow: GEOTAR-MED; 2010. (in Russian)
3. L'vov D.K., ed. *Medical Virology* [Meditsinskaya virusologiya]. Moscow: MIA; 2008. (in Russian)
4. Uryvaev L.V., Bobkova M.R., Lapovok I.A. HIV infection – a challenge to humanity. Is there any chance of defeating the disease? *Voprosy virusologii*. 2012; Prilozhenie 1: 104–26. (in Russian)
5. Maldarelli F. HIV Drug Resistance. In: Zeichner S., Read J., eds. *Textbook of Pediatric HIV Care*. Cambridge: 2006 : 334–54.
6. Sato H., Orenstein J., Dimitrov D., Martin M. Cell-to-cell spread of HIV-1 occurs within minutes and may not involve the participation of virus particles. *Virology*. 1992; 2 (186): 712–24.
7. Mittler J.E., Markowitz M., Ho D.D., Perelson A.S. Improved estimates for HIV-1 clearance rate and intracellular delay. *AIDS*. 1999; 11 (13): 1415–7.
8. Paoloni-Giacobino A., Rossier C., Pappasavvas M.P., Antonarakis S.E. Frequency of replication/transcription errors in (A)(T) runs of human genes. *Hum. Genet.* 2001; 1 (109): 40–7.
9. O'Neil P.K., Sun G., Yu H., Ron Y., Dougherty J.P., Preston B.D. Mutational analysis of HIV-1 long terminal repeats to explore the relative contribution of reverse transcriptase and RNA polymerase II to viral mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 2002; 41 (277): 38 053–61.
10. Persaud D., Pierson T., Ruff C., Finzi D., Chadwick K.R., Margolick J.B. et al. A stable latent reservoir for HIV-1 in resting CD4(+) T lymphocytes in infected children. *J. Clin. Invest.* 2000; 7 (105): 995–1003.
11. Ruff C.T., Ray S.C., Kwon P., Zinn R., Pendleton A., Hutton N. et al. Persistence of wild-type virus and lack of temporal structure in the latent reservoir for human immunodeficiency virus type 1 in pediatric patients with extensive antiretroviral exposure. *J. Virol.* 2002; 18 (76): 9481–92.
12. Kellam P., Larder B.A. Retroviral recombination can lead to linkage of reverse transcriptase mutations that confer increased zidovudine resistance. *J. Virol.* 1995; 2 (69): 669–74.
13. Gomez Carrillo M., Avila M., Hierholzer J., Pando M., Martinez P.L., McCutchan F.E. et al. Mother to child HIV type 1 transmission in Argentina: BF recombinants have predominated in infected children since the mid-1980s. *AIDS Res. Hum. Retrovirus*. 2002; 7 (18): 477–83.
14. *Treat you can not refuse: a report on the results of research by a community of people living with HIV*. Available at: http://itpcru.org/netcat_files/10/196/Zakupki_FINAL.pdf. (in Russian)
15. *Determination of the sensitivity of the human immunodeficiency virus to drugs*. Guidelines number 5956-BC: approved. Deputy. Minister of Health of the Russian Federation and social Development 06.08.2007. (in Russian)
16. *Major HIV Drug Resistance Mutations*. Available at: http://hivdb.stanford.edu/pages/download/resistanceMutations_handout.pdf.
17. Wolf E. HIV Resistance testing. In: Hoffmann C., Rockstroh J.K., Kamps B.S., eds. *HIV Medicine*. 2007: 321–52.

Получена 14.08.13

Received 14.08.13

Носик М.Н.¹, Киселева И.А.¹, Бочкова М.С.², Рыжов К.А.¹, Кравченко А.В.³, Покровский В.В.³

Создание панели изолятов вируса иммунодефицита 1-го типа, резистентных к антиретровирусным препаратам

¹ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 115088, Москва; ²ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава России, 123098, Москва; ³ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, 111123, Москва

Создана панель из 16 изолятов ВИЧ-1, выделенных от больных, которые получали лечение и у которых была выявлена резистентность к лекарственным препаратам. Показано, что данные изоляты обладают устойчивостью к нуклеозидным аналогам ингибитора обратной транскриптазы (ОТ) (ретровир, эпивир) и ненуклеозидным аналогам ингибитора ОТ (вирамун). Изоляты характеризуются стабильной репродукцией вируса. Средний показатель процента клеток, экспрессирующих вирусный Аг, составил 14–20%. Инфекционный титр вируса составил 2,4 Ig ТЦИД₅₀. При анализе нуклеотидных последовательностей выделенных изолятов установлено, что все они относятся к субтипу А, доминирующему на большей части РФ. Данная панель может служить биотехнологической базой для изучения антиретровирусных препаратов нового поколения и создания экспериментальных вакцинных препаратов.

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция; панель изолятов ВИЧ-1; резистентность к АРВ-препаратам.

Для цитирования: *Вопросы вирусологии*. 2015; 60(1): 24–27.

Nossik M.N.¹, Kiseleva I.A.¹, Bochkova M.S.², Ryzhov K.A.¹, Kravtchenko A.V.³, Pokrovsky V.V.³

A panel of the drug-resistance HIV-1 clinical isolates

¹I.I. Mechnikov Research institute for Vaccines and Sera, 115088, Moscow, Russia; ²D.I. Ivanovsky Research Institute of Virology, Ministry of Health of the Russian Federation, 123098, Moscow, Russia; ³Central Research Institute of Epidemiology, Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 111123, Moscow, Russia

A panel of 16 HIV-1 isolates was designed. Those isolates were isolated from patients undergoing HAART and developing resistance to the antiretroviral drugs. It was shown that the isolates were resistant to nucleoside RT inhibitors (retrovir, epivir) and non-nucleoside inhibitors (viramun). Isolates had stable replication activity. Average rate of cells expressing viral Ag was 14–20%. The infectious titer was 2.4 Ig TCID₅₀. The sequencing showed that all isolates were of the subtype A dominating in the major part of Russian Federation. This panel could be used as the biotechnological base for studying antiretroviral drugs of new generation and for the design of experimental vaccines.

Key words: HIV-infection; panel of HIV-1 isolates; drug resistance.

Citation: *Voprosy virusologii*. 2015; 60(1): 24–27. (In Russ.)

В силу широкой распространенности применения высокоактивной антиретровирусной (АРВ) терапии формирование резистентности у ВИЧ-инфицированных лиц к лекарственным препаратам приобретает все большее значение. К сожалению, возникновение штаммов ВИЧ, устойчивых к действию АРВ-препаратов, неизбежно вследствие высокой скорости репликации вируса, приводящей к большой частоте мутаций в вирусном геноме, а также в связи с тем, что АРВ-терапию необходимо проводить на протяжении всей жизни пациента.

Все больше появляется сообщений о передаче резистентных штаммов ВИЧ лицам, которые ранее не проходили АРВ-терапию, в результате чего проводимое лечение не дает положительных результатов [1–4]. В настоящее время в странах Европы и Соединенных Штатах Америки у 16–27% пациентов, не получавших ранее АРВ-терапию, и у 50–70% пациентов, прошедших АРВ-терапию, лечение не дает никаких положительных результатов [5, 6]. В странах с низким и средним уровнем дохода уровень передачи резистентных штаммов ВИЧ лицам, которые ранее не проходили АРВ-терапию, остается пока довольно низким (3,7%) и не превышает 5% [7]. В России этот показатель составляет 1% [8–10]. Но с учетом увеличивающегося доступа к АРВ-терапии неизбежно, что в нашей стране мы тоже столкнемся с

проблемой резистентности штаммов ВИЧ-1 к АРВ-препаратам. Это потребует корректировки существующих схем лечения и разработки новых лекарственных препаратов.

Цель данной работы состояла в создании панели изолятов ВИЧ 1-го типа (ВИЧ-1), резистентных к АРВ-препаратам, применяемым в настоящее время, для изучения АРВ-препаратов нового поколения.

Материалы и методы

Изоляты вируса. Вирус выделяли из крови ВИЧ-инфицированных лиц старше 18 лет и с их письменного информированного согласия по стандартной методике [11].

Клетки. В работе использовали перевиваемые лимфобластоидные клеточные линии MT-4 и Jurkat из коллекции «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» РАМН, а также лимфоциты периферической крови (ЛПК), которые выделяли по стандартной методике [1, 2]. Клетки культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением 10% сыворотки эмбрионов коров, 100 мкг/мл гентамицина. Жизнеспособность клеток определяли подсчетом количества живых и погибших клеток после их окрашивания 0,1% раствором трипанового синего.

Исследование репродукции вируса проводили на мо-

дели неинфицированных лимфобластоидных клеток MT-4, Jurkat. Клетки инфицировали лизатом ЛПК пациентов и инкубировали при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ 98% влажности в течение 5–10 дней до момента учета результатов. Учет результатов проводили окрашиванием клеток тетразолиевым красителем («Sigma», США) и спектрофотометрией и методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческого иммуноферментного набора фирмы «Биорад» (Франция) на фотометре «Мультискан», световой микроскопией: исследование цитопатического действия (ЦПД) вируса на клетки и вирусиндуцируемого синцитийобразования (синцитий – конгломерат нескольких клеток с общей клеточной оболочкой, образовавшейся в результате слияния их мембран).

Иммунофлюоресценция. Реакцию непрямо́й иммунофлюоресценции для определения уровня T4-, T8-лимфоцитов и клеток, экспрессирующих антигены ВИЧ, проводили с использованием набора моноклональных антител (производства ГУ НИИ иммунологии Минздрава России на микроскопе «Оптон», Германия).

Исследование противовирусного действия химиопрепарата. Исследуемый препарат добавляли к клеткам и инфицировали вирусом в дозе 0,01 ТЦИД₅₀/клетка. Применяли три разные схемы введения:

- за 1 ч до заражения клеток вирусом;
- одновременное заражение клеток вирусом и внесение препарата;
- через 1 ч после заражения клеток.

Инкубировали культуры клеток при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ и 98% влажности 5–6 дней. Результаты учитывали по оценке жизнеспособности клеток при помощи красителя, наличию ЦПД и вирусиндуцируемого синцитийобразования, а также по наличию антигена вируса в культуральной жидкости (иммуноферментная тест-система для выявления антигена р24 ВИЧ-1 ДС-ИФА-ВИЧ-АГ-скрин НПО «Диагностические системы»).

Степень цитодеструкции оценивали под микроскопом по общепринятой четырехкрестовой системе знаками + или - соответственно количеству погибших клеток в каждой из четырех лунок, соответствующих одному исследуемому показателю.

++++ – 100% гибель клеток в четырех лунках, использованных в опыте на одно разведение;

+++ – 75% гибель клеток в каждой из четырех лунок;

++ – 50% гибель клеток в каждой из четырех лунок;

+ – 25% гибель клеток в каждой из четырех лунок.

Степень защиты клеток от цитодеструктивного действия вируса определяли по формуле:

$$\% \text{ защиты} = A - B / K - B \cdot 100,$$

где *A* – количество жизнеспособных клеток в опытной группе; *B* – то же в инфицированной культуре (контроль вируса); *K* – то же в неинфицированной культуре (контроль клеток).

Анализ нуклеотидных последовательностей. Генетический анализ области, кодируемой геном *pol*, проводили с помощью субтипспецифических праймеров, подходящих для изучения вариантов ВИЧ-1, циркулирующих на территории России [12]. Рассчитали и синтезировали праймеры, комплементарные наиболее консервативной области генома ВИЧ – фрагменту гена *pol* – гену обратной транскриптазы (ОТ), которые позволяют выявлять с высокой эффективностью большинство субтипов ВИЧ-1, в особенности субтип А, наиболее распространенный на территории РФ. Последовательности подбирали по консенсусной последовательности субтипа А, взятой из базы данных генетических последовательностей национальной лаборатории Los Alamos, с помощью программы для подбора праймеров Oligo 7. Проверку

Таблица 1

Клинико-эпидемиологические показатели у пациентов с ВИЧ-инфекцией, проживающих в Центральном федеральном округе

Половой состав	Возраст, годы	Стадия заболевания	Количество РНК-копий в 1 мл	Количество CD4 ⁺ -клеток в 1 мл
Женщина	29	IVБ	61 718	313
Мужчина	21	IVA	36 303	177
Мужчина	20	IVБ	22 934	266
Мужчина	24	IVБ	42 114	154
Мужчина	29	IVБ	40 235	147
Мужчина	33	IVБ	37 794	268
Женщина	24	III	4 289	340
Мужчина	32	III	8 772	352
Мужчина	36	III	29 596	223
Мужчина	36	IVA	3 668	200
Мужчина	33	IVA	17 590	226
Женщина	22	IVA	17 699	301
Мужчина	33	III	1 102	285
Мужчина	31	IVA	93 051	105
Мужчина	38	IVA	18 590	280
Мужчина	30	IVA	7 103	287

проводили по базе данных, используя консенсусные последовательности всех субтипов ВИЧ-1 и последовательностей ДНК человека с помощью программы Vector NTI Advance.

Для анализа субтипов использовали данные HIV Drug Resistance Database.

Результаты и обсуждение

В ходе работы были собраны образцы крови от 16 ВИЧ-инфицированных лиц, получающих АРВ-

Таблица 2

Схема лечения пациентов с ВИЧ-инфекцией АРВ-препаратами

НИОТ	ННИОТ	ИП	ИС
АЗТ + диданозин	Эфавиренц	–	–
Комбивир	Эфавиренц	–	–
Ламивудин	Этравирин	Дарунавир	Энфувиртид
Диданозин + зидовудин	Эфавиренц	–	–
Зидовудин + ламивудин	Эфавиренц	–	–
АЗТ + диданозин	Эфавиренц	–	–
АЗТ + диданозин	Эфавиренц	–	–
Диданозин + некавир	Невиррапин	–	–
Комбивир	Эфавиренц	–	–
Диданозин + зидовудин	Эфавиренц	–	–
Комбивир (ламивудин + зидовудин)	Невиррапин	–	–
Зидовудин + ламивудин	Невиррапин	–	–
Абакавир + диданозин	–	Дарунавир	–
Ламивудин	Эфавиренц	Атазанавир	–
АЗТ + диданозин	Эфавиренц	–	–
Комбивир (ламивудин + зидовудин)	Эфавиренц	–	–

Примечание. АЗТ – азидотимидин.

Таблица 3

Фенотипические и генотипические свойства выделенных изолятов

Субтип	Клетки, экспрессирующие Ag, %	Наличие синцития	Инфекционный титр вируса, Ig ТЦИД ₅₀
A	20	-	2,0
A	15	+	2,0
A	20	-	2,5
A	15	-	2,0
A	19	-	2,5
A	20	-	3,0
A	18	+	2,0
A	23	+	2,5
A	16	-	2,5
A	14	+	2,0
A	18	+	2,0
A	14	+	2,5
A	16	+	3,0
A	14	+	2,0
A	15	+	2,0
A	30	-	3,5

терапию и проживающих на территории Центрального региона РФ. В исследованную группу изолятов ВИЧ-1 входили вирусы, выделенные от ВИЧ-инфицированных лиц, находившихся на III (25%) и IV (75%) стадии ВИЧ-инфекции (классификация В.И. Покровского). Эффективность выделения вирусов составила 100%. При серологическом анализе сывороток крови методом ИФА и иммуноблотта выявили наличие антител к детерминантам ВИЧ-1. Клинико-эпидемиологические показатели обследованных лиц представлены в табл. 1.

Среди обследованных 81% составили мужчины и 19% женщины. Средний возраст больных 29,4 года, женщины моложе мужчин (25 и 30,5 года соответственно).

Больные получали лечение комбинацией препаратов, относящихся к нуклеозидным и нуклеотидным аналогам ингибитора ОТ (НИОТ и ННИОТ), а также ингибиторами протеазы (ИП) и ингибитором связывания (ИС) вируса с мембраной клетки (табл. 2).

Результаты исследований изолятов на мононуклеарных клетках крови и лимфобластоидных клеточных линиях показали, что для изолятов характерна стабильная репродукция вируса, сопровождаемая характерным цитопатическим действием и синцитиообразованием (табл. 3). Клетки, экспрессирующие вирусный Ag, составили в среднем 14–20%. Инфекционный титр вируса, определяемый по 50% тканевой цитопатической дозе вируса на культуре клеток, составил 2,4 Ig ТЦИД₅₀.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что, несмотря на АРВ-терапию, полностью подавить репликацию вируса не удастся. Это подтверждается и данными, полученными в ходе проверки антивирусного действия химиопрепаратов разных классов (табл. 4).

В ходе проверки антивирусного действия НИОТ (ретровир, эпивир) и ННИОТ (вирамуно) показано, что они не оказывают противовирусного действия в отношении вируса, вследствие чего показатель защиты клеток от инфицирования не достигает 50%. При этом отмечена выраженная цитодеструктивная дегенерация клеток. Между тем при внесении аналогичных препаратов в культуру клеток, инфицированных референс-штабмом,

Таблица 4

Исследование противовирусной активности химиопрепаратов

№ изолята	ЦПД	Защита, %		
		НИОТ		ННИОТ
		ретровир, 2,67 мкг/мл	эпивир, 5 мкг/мл	вирамуно, 5 мкг/мл
Контроль клеток	0		98	
Контроль вируса	4		47	
Контроль вируса	0	93	85	91
1	4	33	31	20
2	3	44	39	34
3	4	31	29	30
4	3	39	40	45
5	3	48	45	45
6	3	39	38	40
7	3	37	39	42
8	4	32	34	30
9	4	36	38	37
10	4	39	42	44
11	4	35	37	40
12	3	44	40	45
13	4	38	38	41
14	4	22	20	39
15	3	42	44	43
16	4	30	33	28

наблюдается защитное действие химиопрепаратов (процент защиты 85–93%). Это свидетельствует о том, что штаммы устойчивы к лекарственным препаратам данного класса.

В результате анализа нуклеотидных последовательностей выделенных изолятов установили, что все они относятся к субтипу А, доминирующему на большей части РФ [9, 13, 14].

Все 16 изолятов, выделенных от больных, которые получали АРВ-терапию и у которых выявлена резистентность к лекарственным препаратам, депонированы в Государственную коллекцию вирусов ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава России (№ депонентов 1188, 1204, 1205, 1206, 1207, 1208, 1209, 1210, 1211, 1212, 1213, 1214, 1215, 1216, 1217, 1218).

Таким образом, в ходе работы создана панель из 16 изолятов ВИЧ-1, выделенных от больных, которые получали лечение и у которых выявлена резистентность к лекарственным препаратам, широко применяющимся в АРВ-терапии: к НИОТ и ННИОТ. Данная панель может служить биотехнологической базой для изучения АРВ-препаратов нового поколения и создания экспериментальных вакцинных препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Alteri C., Svicher V., Gori C. et al. Characterization of the patterns of drug-resistance mutations in newly diagnosed HIV-1 infected patients naïve to the antiretroviral drugs. *BMC Infect. Dis.* 2009; 9: 111. doi: 10.1186/1471-2334-9-111.
2. Hrazic M., Pellegrin I., Deveaux C. et al. Genotypic drug resistance during HIV-1-primary infection in France (1996–1999): frequency and response to treatment. *AIDS.* 2002; 16: 793–6.
3. Lapadula G., Izzo I., Gargiulo F. et al. Updated prevalence of genotypic resistance among HIV-1 positive patients naïve to antiretroviral therapy: a single center analysis. *J. Med. Virol.* 2008; 80: 747–53.

4. Little S., Holte S., Routy J. et al. Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV. *N. Engl. J. Med.* 2002; 347: 385–94.
5. Hirsch M.S., Gunthard H.F., Schapiro J.M. et al. Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection: 2008 recommendations of an international AIDS society-USA panel. *Clin. Infect. Dis.* 2008; 47: 266–85.
6. Shafer R.W., Rhee S.Y., Bennett D.E. Consensus resistance mutations for epidemiological surveillance: basic principles and potential controversies. *Antivir. Ther.* 2008; 13: 59–68.
7. WHO HIV drug resistance fact sheet. Available at: http://www.who.int/hiv/facts/drug_resistance/en/index.html
8. Nosik M., Ryzhov K., Kravtchenko A. et al. Genotypic Analyses of HIV in antiretroviral drug-naïve patients from Moscow and Moscow Region, Russia. In: *Proceedings 6th IAS conference on HIV pathogenesis, treatment and prevention*. 2011, July 17–20; Rome; Italy: CDA002.
9. Казеннова Е.В., Антонова О.В., Кузин С.Н. и др. Молекулярно-эпидемиологическое исследование распространения ВИЧ-1 на территории Республики Саха (Якутия). *Вопросы вирусологии*. 2011; 5: 30–4.
10. Рахманова А.Г., Петрова Л.В., Яковлев А.А. и др. Результаты определения резистентности ВИЧ к антиретровирусным препаратам у ВИЧ-инфицированных больных по материалам ГИБ № 30 им. С.П. Боткина. В кн.: *2-я конференция по вопросам ВИЧ/СПИД в Восточной Европе и Центральной Азии (EECAAC 2008)*. 2008, Май 3–5; Москва. М.: 2008: 90.
11. Маренникова С.С., Степанова Л.Г., Носик М.Н. и др. О штаммовых особенностях циркулирующего в СССР ВИЧ-1 по данным изучения его свойств в клеточных культурах. *Вопросы вирусологии*. 1991; 5: 356–61.
12. Носик М.Н., Рыжов К.А., Киселева И.А., Кравченко А.В., Покровский В.В. Биологические свойства штаммов вируса иммунодефицита человека, выделенных от ВИЧ-инфицированных лиц на территории России за 2009–2010 гг. *ЗНИСО*. 2011; 4: 31–4.
13. Ryzhov K.A., Nosik M.N., Pokrovsky V.V. et al. The genetic diversity of human immunodeficiency virus-1 circulating in the territory of Russia. In: *Proceedings 5th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention*. 2009; July 19–22; Cape Town; South Africa: CDA034.
14. Ryzhov K.A., Nosik M.N., Kravtchenko A.V. et al. Epidemiological monitoring of HIV-infection in the territory of Russia. In: *VIII Miedzynarodowej naukowii-praktycznej konferencji Dynamika naukowych Badan-2012*. 2012; July 7–15; Przemysl; Poland; Nauka I studia; 8: 72–4.
- during HIV-1-primary infection in France (1996–1999): frequency and response to treatment. *AIDS*. 2002; 16: 793–6.
3. Lapadula G., Izzo I., Gargiulo F. et al. Updated prevalence of genotypic resistance among HIV-1 positive patients naïve to antiretroviral therapy: a single center analysis. *J. Med. Virol.* 2008; 80: 747–53.
4. Little S., Holte S., Routy J. et al. Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV. *N. Engl. J. Med.* 2002; 347: 385–94.
5. Hirsch M.S., Gunthard H.F., Schapiro J.M. et al. Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection: 2008 recommendations of an international AIDS society-USA panel. *Clin. Infect. Dis.* 2008; 47: 266–85.
6. Shafer R.W., Rhee S.Y., Bennett D.E. Consensus resistance mutations for epidemiological surveillance: basic principles and potential controversies. *Antivir. Ther.* 2008; 13: 59–68.
7. WHO HIV drug resistance fact sheet. Available at: http://www.who.int/hiv/facts/drug_resistance/en/index.html
8. Nosik M., Ryzhov K., Kravtchenko A. et al. Genotypic Analyses of HIV in antiretroviral drug-naïve patients from Moscow and Moscow Region, Russia. In: *Proceedings 6th IAS conference on HIV pathogenesis, treatment and prevention*. 2011, July 17–20; Rome; Italy: CDA002.
9. Kazennova E.V., Antonova O.V., Kuzin S.N. et al. Molecular-epidemiological study of HIV-1 in the territory of Saha Republic (Yakutia). *Voprosy virusologii*. 2011; 5: 30–4. (in Russian)
10. Rakhmanova A.G., Petrova L.V., Yakovlev A.A. et al. Results of study of HIV drug resistance among HIV patients basing on clinical material from S.P. Botkin State Infectious Disease Clinic N 30. In: *2nd Conference on HIV/AIDS in Eastern Europe and Central Asia (EECAAC 2008)*. 2008, May 3–5 [2-ya konferentsiya po voprosam VICH/SPID v Vostochnoy Evrope i Tsentral'noy Azii (EESAAS 2008)]. 2008, May 3–5; Moscow. (in Russian)
11. Marennikova S.S., Stepanova L.G., Nosik M.N. et al. Biological properties of HIV-1 strains circulating in the USSR. *Voprosy virusologii*. 1991; 5: 356–61. (in Russian)
12. Nosik M.N., Ryzhov K.A., Kiseleva I.A., Kravtchenko A.V., Pokrovsky V.V. *Biological properties of HIV-strains isolated from HIV-infected individuals in the territory of Russia in 2009–2010 years*. *ZNiSO*. 2011; 4: 31–4. (in Russian)
13. Ryzhov K.A., Nosik M.N., Pokrovsky V.V. et al. The genetic diversity of human immunodeficiency virus-1 circulating in the territory of Russia. In: *Proceedings 5th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention*. 2009; July 19–22; Cape Town; South Africa: CDA034.
14. Ryzhov K.A., Nosik M.N., Kravtchenko A.V. et al. Epidemiological monitoring of HIV-infection in the territory of Russia. In: *VIII Miedzynarodowej naukowii-praktycznej konferencji Dynamika naukowych Badan-2012*. 2012; July 7–15; Przemysl; Poland; Nauka I studia; 8: 72–4.

REFERENCES

1. Alteri C., Svicher V., Gori C. et al. Characterization of the patterns of drug-resistance mutations in newly diagnosed HIV-1 infected patients naïve to the antiretroviral drugs. *BMC Infect. Dis.* 2009; 9: 111. doi: 10.1186/1471-2334-9-111.
2. Hrazic M., Pellegrin I., Deveaue C. et al. Genotypic drug resistance

Поступила 23.05.13

Received 23.05.13

Фазылов В.Х., Ткачева С.В., Мананова Э.Р., Якупова Ф.М.

Эффективность противовирусной терапии хронического гепатита С у пациентов, не ответивших на предыдущее лечение, с учетом генотипирования по интерлейкину-28В

ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России, 420012, Казань

В настоящее время определение генотипов в локусах rs8099917 и rs12979860 гена ИЛ-28В человека является необходимым для пациентов с генотипом 1 HCV, так как позволяет прогнозировать получение стойкого вирусологического ответа (СВО) при комбинированной противовирусной терапии (ПВТ) интерфероном- α (ИФН- α) и рибавирином. В осуществлении противовирусной активности, помимо ИФН- α , участвуют и другие цитокины, в частности интерлейкин-1 β (ИЛ-1 β) и интерферон-гамма (ИФН- γ). Цель исследования – оценить эффективность ПВТ ХГС с включением цитокиновых препаратов у пациентов с неблагоприятными генотипами по ИЛ-28В, не ответивших на предыдущую терапию. Включение цитокиновых препаратов в повторное лечение ХГС в комбинации с ИФН- α 2b и рибавирином позволило получить СВО у 44,4% пациентов с неблагоприятным генетическим фоном по ИЛ-28В с достижением биохимического ответа при отсутствии серьезных нежелательных реакций (НР), что свидетельствует о целесообразности применения препаратов Беталейкин® и Ингарон в составе тройной ПВТ у больных, не ответивших на предыдущее лечение.

Ключевые слова: хроническая HCV-инфекция; противовирусная терапия; цитокины; генотипы ИЛ-28В.

Для цитирования: Вопросы вирусологии. 2015; 60 (1): 28–31.

Fazylov V.Ch., Tkacheva S.V., Mananova E.R., Yakupova F.M.

Evaluation of the antiviral therapy for chronic hepatitis C in patients unresponsive to previous treatment with regard to the interleukin-28B genotypes

Kazan State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, 420012, Kazan, Russia

The identification of the single nucleotide polymorphisms (SNP) at rs8099917 and rs12979860 loci of IL-28B gene is presently necessary for patients with the genotype HCV-1 to predict sustained viral response (SVR) in case of combined antiviral therapy with interferon and ribavirin. In addition to the implementation of the antiviral activity of IFN- α , interleukin-1 β (IL-1 β) and interferon-gamma (IFN- γ) are involved. The goal of this work was to evaluate the efficacy of the HCV therapy with cytokines in patients unresponsive to previous therapy with unfavorable genotypes of IL-28B gene. SVR was achieved in 44.4% of patients with an unfavorable IL-28B genetic background with biochemical response without serious adverse effects or unexpected adverse effects, thereby corroborating the inclusion of proven safety Betaleukin® and Ingaron in the schemes of the antiviral therapy in combination with standard interferon- α and ribavirin in patients with recurrent HCV-infection.

Key words: chronic HCV-infection; anti-HCV treatment; cytokines; IL-28B genotypes.

Citation: Voprosy virusologii. 2015; 60(1): 28–31. (In Russ.)

Клиническая тактика ведения пациентов с хроническим гепатитом С (ХГС) включает коррекцию кофакторов, ведущих к прогрессированию фиброза печени, и назначение комбинированной противовирусной терапии (ПВТ) пегилированными интерферонами альфа (пегИФН- α) и рибавирином [1] с достижением стойкого вирусологического ответа (СВО – отсутствие РНК вируса гепатита С через 24 нед после окончания терапии) у 54–56% больных [2]. Ежедневное введение стандартных ИФН- α в высоких дозах часто и не без успеха используют в практической медицине, поскольку авторы во многом ориентируются на аналогичные исследования за рубежом, где в качестве основного аргумента подобного терапевтического режима рассматривается максимальное приближение ИФН- α к профилю пегИФН- α [3–5]. Определение генотипа пациента по интерлейкину-28В (ИЛ-28В) в настоящее время рекомендуется при предварительной консультации пациентов с HCV-1, так как позволяет прогнозировать при благоприятном генотипе ИЛ-28В получение СВО у 70–80% пациентов, получаю-

щих в течение 48 нед пегИФН- α и рибавирин [6,7]. В настоящее время показано, что частота выявления генотипа СС rs12979860 среди моноинфицированных с HCV генотипов 2 и 3 составляет 46 и 55% соответственно, а при HCV генотипа 1 – 33,5% [8]. Вирус гепатита С имеет механизмы противодействия защитным реакциям организма за счет блокирования биологического действия ИФН- α , что может быть причиной «неответа» на терапию. В то же время известно, что в осуществлении противовирусной активности, помимо ИФН- α , участвуют и другие цитокины, в частности интерлейкин-1 β (ИЛ-1 β) и интерферон-гамма (ИФН- γ). Иммуностимулирующее действие и способность индуцировать продукцию ИФН лежат в основе противовирусной активности ИЛ-1 β , однако наиболее интересными являются данные о том, что сам ИЛ-1 β оказывает прямое ингибирующее действие на репликацию вируса гепатита С в клетках гепатомы человека. В ФГУП «ГосНИИ ОЧБ» ФМБА России (Санкт-Петербург) в 1995 г. разработана лекарственная форма рекомбинантного ИЛ-1 β человека – препарат Беталей-

кин® (№ Р N000222/01 от 20.12.2007), разрешенный к клиническому использованию в качестве иммуностимулятора при вторичных иммунодефицитных состояниях, а также при лечении ХГС (Лобзин Ю.В., Жданов К.В. и др., 2013). ИФН-γ – препарат Ингарон (№ Р ЛС-000924 от 18.11.2005) подавляет репликацию вирусной РНК, синтез вирусных белков и сборку зрелых вирусных частиц, оказывает цитотоксическое воздействие на вирусинфицированные клетки и блокирует синтез β-TGF, ответственных за развитие фиброза легких и печени. Проведенные в НИИ гриппа РАМН и НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи исследования (Ф.И. Ершов, О.И. Киселев) позволили заключить, что Ингарон обладает выраженной противовирусной активностью в отношении РНК-содержащих вирусов.

Цель исследования – оценить эффективность ПВТ ХГС с включением цитокиновых препаратов у пациентов с неблагоприятными генотипами по ИЛ-28В, не ответивших на предыдущую терапию.

Материалы и методы

В исследование было включено 43 пациента с ХГС (58% мужчин) в возрасте $35,9 \pm 0,78$ года со сроком инфицирования $5,6 \pm 0,34$ года. Исходные показатели активности HCV-инфекции определялись высокой вирусной нагрузкой РНК-HCV > 400 000 МЕ/мл у 23 (53,5%) больных; генотипом 1 у 28 (65,1%) исследуемых; уровнем аланинаминотрансферазы (АЛТ) $84,4 \pm 5,57$ ед/л ($N = 23,19 \pm 9,93$ ед/л). По результатам фиброэластометрии печени (по METAVIR) степень фиброза не превышала F3 (12,5 кПа).

Диагноз ХГС устанавливали на основании эпидемиологических, клинико-лабораторных данных и подтверждали выявлением специфических маркеров инфицирования HCV методом иммуноферментного анализа (ИФА), детекцией РНК-HCV (с генотипированием) с чувствительностью качественного метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) для обнаружения РНК-HCV 111,1 МЕ/мл, количественного – 277,5 МЕ/мл. Всем пациентам как в ходе подготовки к терапии, так и на ее фоне (4, 12, 24, 48 нед ПВТ), а также через 24 нед после окончания проводили общепринятые исследования.

Полиморфизм единичных нуклеотидов (ПЕН) в локусах rs8099917 и rs12979860 гена ИЛ-28В выявляли с помощью набора реагентов «АмплиСенс Геноскрин-IL-28В-FL» (лаборатория вирусных гепатитов отделения молекулярной диагностики ЦНИИЭ, Москва – зав. лабораторией, д-р мед. наук В.П. Чуланов). Количественное определение содержания цитокинов (ИФН-γ, ИЛ-1β) в сыворотках крови пациентов и здоровых лиц проводили методом твердофазного ИФА (тест-система ООО «Цитокин»).

Исходные данные о пациентах представлены в табл. 1.

В зависимости от схемы ПВТ и генотипирования по ИЛ-28В больные были разделены на 4 группы (табл. 1): в 1-ю ($n = 10$) и 2-ю ($n = 10$) группы вошли пациенты, не ответившие на предыдущую комбинированную ПВТ (ИФН-α и рибавирин); 3-ю ($n = 10$) и 4-ю ($n = 13$) – группы сравнения – составили «наивные» пациенты. Предыдущая ПВТ в 1-й и 2-й группах была проведена у 55% больных стандартными ИФН-α; у 45% – пегИФН-α в сочетании с рибавирином.

Больные 1, 2 и 3-й групп имели неблагоприятные генотипы СТ, ТТ (rs12979860) и TG, GG (rs8099917) гена ИЛ-28В, 4-й – сочетание благоприятных генотипов СС (rs12979860) и ТТ (rs8099917). Пациенты 1-й группы по-

Данные о пациентах

Характеристика пациентов	1-я группа ($n = 10$)	2-я группа ($n = 10$)	3-я группа ($n = 10$)	4-я группа ($n = 13$)
Мужчины, n (%)	7 (70)	7 (70)	4 (40)	7 (54)
Возраст, годы ($M \pm m$)	$35,0 \pm 2,56$	$32,9 \pm 1,2$	$37,5 \pm 1,5$	$38,5 \pm 5,2$
Срок инфицирования, n (%)				
до 10 лет	7 (70)	7 (70)	8 (80)	12 (92,3)
10–15 лет	3 (30)	3 (30)	2 (20)	1 (7,7)
ИМТ ($M \pm m$), кг/м ²	$24,2 \pm 1,25$	$24,0 \pm 1,02$	$26,5 \pm 2,1$	$24,1 \pm 1,5$
Вирусная нагрузка РНК-HCV, n (%)				
< 400 000 МЕ/мл	6 (60)	4 (40)	6 (60)	4 (30,8)
> 400 000 МЕ/мл	4 (40)	6 (60)	4 (40)	9 (69,2)
Генотип HCV, n (%)				
1a/1b	10 (100)	4 (40)	7 (70)	7 (54)
3a	–	6 (60)	3 (30)	6 (46)
АЛТ ($M \pm m$), ед/л	$77,8 \pm 5,3$	$98,8 \pm 4,8$	$49,0 \pm 5,7$	$89,1 \pm 6,5$
Предыдущая терапия, n (%)				
пегИФН-α	6 (60)	3 (30)		
стИФН-α	4 (40)	7 (70)		

Примечание. ИМТ – индекс массы тела.

лучали ПВТ по схеме: рекомбинантный ИФН-α2b (препарат Интераль®-П) по 5 млн МЕ ежедневно, подкожно (п/к) в течение 12 нед, затем через день по 5 млн МЕ до окончания лечения в сочетании с рибавирином 10–15 мг/кг/сут (800–1200 мг/сут) per os и Беталейкин® п/к по 0,005 мкг/кг через день в течение первых 12 нед лечения (всего на курс 45 инъекций). Пациентов 2-й группы лечили по схеме: рекомбинантный ИФН-α2b (препарат Альфарон®) в дозе 5 млн МЕ ежедневно п/к в течение 12 нед, затем по 3 млн МЕ ежедневно до окончания ПВТ, рибавирин в зависимости от массы тела 10–15 мг/кг/сут (800–1200 мг) per os и препарат Ингарон внутримышечно по 500 000 МЕ через день в течение 24 нед (всего на курс 90 инъекций). Пациенты 3-й и 4-й групп получали стандартные ИФН-α2b (Альфарон®, Интераль®-П) в дозе 5 млн МЕ ежедневно п/к в течение 12 нед, затем по 3 млн МЕ ежедневно до окончания ПВТ и рибавирин 10–15 мг/кг/сут (800–1200 мг). Длительность терапии в группах составляла 24–48 нед в зависимости от генотипов HCV.

Результаты и их обсуждение

Частота распределения генотипов ПЕН по ИЛ-28В у пациентов исследуемых групп ($n = 43$) представлена в табл. 2. При исследовании цитокинового профиля у пациентов 1-й и 2-й групп до лечения показатели ИЛ-1β ($5,2 \pm 2,12$ и $41,7 \pm 16,4$ пкг/мл; $p < 0,001$) и ИФН-γ ($0,510 \pm 0,004$ и $35,7 \pm 7,2$ пкг/мл; $p < 0,001$) были достоверно ниже показателей здоровых лиц без статистических различий между группами.

Два пациента (по одному в 1-й и 2-й группах) выбыли в ходе ПВТ (на 2-й и 3-й неделях терапии) из-за низкой приверженности лечению. Вирусологический ответ у пациентов на ПВТ представлен в табл. 3. Быстрый вирусологический ответ (БВО) получен в 1-й группе у 44,4% пациентов, во 2-й – у 22,2%, в 3-й – у 30% и в 4-й – у 61,6% больных. Ранний вирусологический ответ (РВО) наблюдался у 100% пациентов 3-й и 4-й групп. СВО достигнут у 44,4% пациентов в 1-й группе (все с генотипом 1 HCV), у 44,4% получавших цитокиновую терапию

Таблица 2

Частота распределения генотипов ИЛ-28В у больных ХГС в исследуемых группах

Группа	rs12979860, n (%)			rs8099917, n (%)		
	CC	CT	TT	TT	TG	GG
1-я (n = 10)	–	7 (70)	3 (30)	–	9 (90)	1 (10)
2-я (n = 10)	–	10 (100)	–	–	10 (100)	–
3-я (n = 10)	–	10 (100)	–	–	5 (50)	5 (50)
4-я (n = 13)	13 (100)	–	–	13 (100)	–	–

Таблица 3

Вирусологический ответ (ВО) на ПВТ у пациентов с ХГС при различных схемах лечения

Срок наблюдения	1-я группа, n (%)	2-я группа, n (%)	3-я группа, n (%)	4-я группа, n (%)
БВО на 4-й неделе ПВТ	4 (44,4)	2 (22,2)	3 (30)	8 (61,5)
РВО на 12-й неделе ПВТ	4 (44,4)	7 (77,8)	10 (100)	13 (100)
ВО на 24-й неделе ПВТ	6 (66,7)	7 (77,8)	6 (60)	13 (100)
ВО на 48-й неделе ПВТ	5 (55,6)	1 (33,3), n = 3	7 (43)	7 (53,8)
СВО на 24-й неделе после ПВТ	4 (44,4)	4 (44,4)	3 (30)	8 (61,5)

Ингароном (с генотипом 1 HCV у 33%, с генотипом 3 HCV у 50% больных), у 30% 3-й группы (с генотипом 1 HCV у 14,3%, с генотипом 3 HCV у 33,3%) и у 61,5% 4-й группы (с генотипом 1 HCV у 42,9%, с генотипом 3 HCV – у 83,3%).

Наилучший ответ на ПВТ был достигнут в группе «наивных» пациентов с благоприятными генотипами CC rs12979860 и TT rs8099917 по ИЛ-28В, при этом с максимальным результатом у исследованных с генотипом 3 HCV. Данных литературы о предсказательной ценности различных генотипов в гене ИЛ-28В у больных с HCV, не относящимся к генотипу 1, недостаточно, но последние исследования показывают взаимосвязь вариаций ПЕН в локусах (rs12979860 и rs8099917) и ответа на комбинированную терапию pegИФН и рибавирином у этой категории пациентов [9].

Динамика биохимических показателей на фоне ПВТ (уровень АЛТ). В 1-й группе к 4-й неделе лечения уровень АЛТ нормализовался у 45% больных, у 45% был повышенным до 3 N, у 10% – 3–5 N; на 24-й неделе ПВТ: нормальные показатели АЛТ зафиксированы у 55% пациентов; у остальных были повышены до 3 N; на 48-й неделе лечения у всех больных (n = 5) отмечен нормальный уровень АЛТ. Во 2-й группе к 4-й неделе ПВТ уровень АЛТ нормализовался у 33% больных, у 44% был повышенным до 3 N, у 22% – свыше 5 N; на 24-й неделе лечения нормальные показатели АЛТ зафиксированы у 55,6% пациентов. В 3-й группе к 4-й неделе терапии нормальный уровень АЛТ отмечен у 28% больных, у 72% он оставался повышенным до 3 N; к 24-й неделе лечения нормальные показатели АЛТ зафиксированы у 72% пациентов, у 28% они были повышены до 3 N. В 4-й группе к 4-й неделе лечения уровень АЛТ нормализовался у 53,8% больных, у 38,5% был повышенным до 3 N, у 7,7% – 3–5 N; на 24-й неделе ПВТ нормальные показатели АЛТ зафиксированы у 84,6% пациентов, у остальных они были повышены до 3 N.

К 24-й неделе диспансерного наблюдения пациентов, достигшие СВО, имели уровни АЛТ в пределах показателей здоровых лиц во всех 4 группах.

При анализе нежелательных явлений были учтены побочные эффекты всех препаратов, включенных в экспериментальные комплексные схемы ПВТ: рекомбинантные ИЛ-1β и ИФН-α2b, ИФН-γ, рибавирин. Не зарегистрировано ни одного случая серьезной нежелательной реакции (НР) или непредвиденной НР. У всех больных наблюдался гриппоподобный синдром разной степени выраженности (гипертермию купировали введением парацетамола или нестероидных противовоспалительных препаратов). В области подкожного введения Беталейкина® через 4–6 ч у 100% пациентов появлялись гиперемия и слабовыраженный инфильтрат, которые не были проявлениями инфицирования и не требовали врачебного вмешательства. НР в ответ на введение Ингарона отсутствовали.

Таким образом, применение цитокиновых препаратов при повторном лечении ХГС в комбинации с ИФН-α2b и рибавирином позволило получить СВО у 44,4% пациентов с неблагоприятным генетическим фоном по ИЛ-28В с достижением биохимического ответа при отсутствии серьезных НР, что свидетельствует о целесообразности использования Беталейкина® и Ингарона в составе тройной ПВТ у больных, не ответивших на предыдущее лечение.

ЛИТЕРАТУРА

- European Association for the Study of the Liver. EASL clinical practice guidelines: management of hepatitis C virus infection. *J. Hepatol.* 2011; 55: 245–64.
- Hadziyannis S.J., Sette H.Jr., Morgan T.R., Balan V., Diago M., Marcellin P. et al. Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: A randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann. Intern. Med.* 2004; 140 (5): 346–55.
- Bruno R., Brunetti E., Maffezzini E. et al. Daily dose interferon for chronic hepatitis C: a prospective randomized study. *Hepatology.* 1998; 28: (4), pt. 2: 572A, abstr. 1637.
- Еналеева Д.Ш., Фазылов В.Х., Созинов А.С. Хронические вирусные гепатиты В, С и D. М.: «Медпресс-информ»; 2011: 257–9.
- Никитин И.Г., Гогова Л.М., Байкова И.Е. и др. Человеческий лейкоцитарный альфа-интерферон в комбинированной терапии больных хроническим гепатитом С, инфицированных не 1-м генотипом вируса. Клинические перспективы гастроэнтерологии, гепатологии. 2009; 1: 33–7.
- Rauch A., Kutalik Z., Descombes P. et al. Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study. *Gastroenterology.* 2010; 138: 1338–45.
- Козина А.Н. Возможности персонализированного подхода к лечению гепатита С на основании разработанных генетических тестов определения варианта полиморфизма гена ИЛ-28В / А.Н. Козина, Д.Д. Абрамов, Е.А. Климова и др. Лечащий врач. 2011; 10: 39–43.
- McCarthy J., Li J., Thompson A. et al. Replicated association between an IL28B gene variant and a sustained response to pegylated interferon and ribavirin. *Gastroenterology.* 2010; 138: 2307–14.
- Rauch A., Kutalik Z., Descombes P. et al. Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study. *Gastroenterology.* 2010; 138: 1338–45.

REFERENCES

- European Association for the Study of the Liver. EASL clinical practice guidelines: management of hepatitis C virus infection. *J. Hepatol.* 2011; 55: 245–64.
- Hadziyannis S.J., Sette H.Jr., Morgan T.R., Balan V., Diago M., Marcellin P. et al. Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: A randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann. Intern. Med.* 2004; 140 (5): 346–55.
- Bruno R., Brunetti E., Maffezzini E. et al. Daily dose interferon for chronic hepatitis C: a prospective randomized study. *Hepatology.* 1998; 28: (4), pt. 2: 572A, abstr. 1637.
- Enaleeva D.Sh., Fazylov V.Kh., Sozinov A.S. Chronic viral hepatitis B, C and D. [Khronicheskie virusnye gepatity V, S i D]. Moscow: «Medpress-inform»; 2011: 257–9. (in Russian)

5. Nikitin I.G., Gogova L.M., Bajkova I.E. et al. Human leukocyte interferon alpha in combination therapy in patients with chronic hepatitis C infected with non-1 genotype virus. *Klinicheskie perspektivy gastroenterologii, gepatologii*. 2009; 1: 33–7. (in Russian)
6. Rauch A., Kutalik Z., Descombes P. et al. Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study. *Gastroenterology*. 2010; 138: 1338–45.
7. Kozina A.N. Vozможnosti personificirovannogo podhoda k lecheniyu gepatita S na osnovanii razrabotannyh geneticheskikh testov opre-

- deleniya varianta polimorfizma gena IL-28B / A.N. Kozina, D.D. Abramov, E.A. Klimova et al. *Lechashchiy vrach*. 2011; 10: 39–43.
8. McCarthy J., Li J., Thompson A. et al. Replicated association between an IL28B gene variant and a sustained response to pegylated interferon and ribavirin. *Gastroenterology*. 2010; 138: 2307–14.
9. Rauch A., Kutalik Z., Descombes P. et al. Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study. *Gastroenterology*. 2010; 138: 1338–45.

Поступила 25.04.14
Received 25.04.14

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015
УДК 578.835.11.083.2

Козлов В.Г.¹, Иванов А.П.¹, Иванова О.Е.¹, Варгин В.В.²

Получение поликлональных энтеровирусных антител (IgY) от куриц и их оценка в качестве альтернативы энтеровирусным нейтрализующим сывороткам кроликов

¹ФГУП «Предприятие по производству бактерийных и вирусных препаратов Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова», 142782, Москва; ²ФГБУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова», 142782, Москва

Представлены экспериментальные доказательства эффективности иммунизаций куриц породы леггорн энтеровирусами человека для получения специфических антител (IgY), не уступающих по нейтрализующей активности коммерческим кроличьим энтеровирусным диагностическим сывороткам (ЭДС). В отличие от цитотоксичности большинства ЭДС IgY неактивны по отношению к индикаторным клеткам, используемым в реакции нейтрализации (РН). «IgY-технология» значительно результативнее и экономичнее традиционной иммунизации млекопитающих за счет многократного уменьшения количества продуцентов при одновременном увеличении выхода целевых продуктов, снижения объемов иммуногенов, сокращения продолжительности цикла иммунизации и числа инъекций.

Ключевые слова: энтеровирусные антитела IgY из яичного желтка куриц; энтеровирусные диагностические сыворотки кроликов.

Для цитирования: *Вопросы вирусологии*. 2015; 60 (1): 31–34.

Kozlov V.G.¹, Ivanov A.P.¹, Ivanova O.E.¹, Wargin V.V.²

Production of the polyclonal enterovirus antibodies of chicken (IgY) and its evaluation as alternative to the rabbit enterovirus neutralizing sera

¹ Federal State Enterprise for Manufacture of Bacterial and Viral Preparations, Shumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis, 142782, Moscow, Russia; ² M.P. Shumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis, 142782, Moscow, Russia

Experimental data show the usefulness of the Leghorn chicken as a producer of the enterovirus neutralizing antibodies (IgY). The resulting serum is not inferior to the specific activity of the commercial rabbit enterovirus diagnostic sera (EDS) in the neutralization reaction. The IgY have lower backgrounds than mammalian IgG and do not cause toxic effect to cell culture. Compared with the conventional manufacturing method EDS IgY, preparation process is much more effective: the number of serum producers is significantly lower, whereas the yield of the product is higher. Reduction of the volume of the immunogens, immunization cycle, and number of injections is also an advantage of this manufacturing method.

Key words: enterovirus antibodies from egg yolk (IgY) of chicken; enterovirus-neutralizing diagnostic rabbit sera.

Citation: *Voprosy virusologii*. 2015; 60(1): 31–34. (In Russ.)

Введение

На протяжении последних десятилетий серьезной проблемой для здравоохранения многих стран стали периодически возникающие распространенные вспышки энтеровирусных заболеваний, многие из которых представляют угрозу для здоровья людей [1, 2]. Вследствие этиологического непостоянства и полиморфизма манифестных форм энтеровирусной инфекции (ЭВИ)

основными источниками диагностической информации являются высокочувствительные лабораторные исследования. В реализуемой на территории Российской Федерации системе эпидемиологического надзора за ЭВИ [3] диагностическое пространство формируется на основе традиционных вирусологических и серологических методов и современных молекулярных методик (обратнотранскриптазная полимеразная цепная реакция (ОТ-ПЦР), микрочипы). Для идентификации энтерови-

Для корреспонденции: Козлов Виталий Григорьевич, канд. мед. наук; e-mail: vgzozlov@mail.ru
Correspondence to: Vitaliy Kozlov, MD, PhD; e-mail: vgzozlov@mail.ru

Энтеровирусы, использованные в экспериментах

Вид. серотип, штамм	Источник и год получения	Титр в Ig ККИД ₅₀ /мл	
		клетки RD	клетки HEp-2-C
A, Коксаки А7, АВ-IV	Институт сывороток, США, 1975	8,3	—
B, Коксаки В2, JVB	ВОЗ, 1974	—	7,3
B, ECHO 3, Morrisey	ВОЗ, 1975	8,3	—
B, ECHO 30, Bastianni	ВОЗ, 1970	6,3	—
C, полиовирус типа 1, Mahoney	ЦНИИЭиГ, ЧССР, 1956	9,0	—
D, энтеровирус 70, J 670/71	ВОЗ, 1992	7,0	—

Примечание. ККИД – клеточная культуральная инфекционная доза.

русов до уровня серотипа практические вирусологические лаборатории обычно прибегают к регламентированной ВОЗ реакции нейтрализации (РН), основанной на подавлении инфекционности тестируемых агентов специфическими сыворотками.

Классическим методом получения нейтрализующих сывороток является гипериммунизация животных. Итог иммунизаций не всегда прогнозируем, поскольку определяется не только надлежащим балансом ключевых факторов иммунного ответа (свойства продуцентов, антигенов, адъювантов, схемы иммунизации), но и практически не поддающимися учету и измерению многочисленными прямыми и косвенными воздействиями окружающей среды. Традиционные проблемы сывороточного производства характерны и для серийного изготовления отечественных энтеровирусных диагностических сывороток (ЭДС), получаемых от рандомбредных (нелинейных) кроликов. Слабая видовая иммунореактивность и выраженная индивидуальность иммунного ответа продуцентов этой категории существенно снижают эксплуатационные характеристики ЭДС.

Известно, что высокой иммунореактивностью к чужеродным белкам обладают птицы, а иммуноглобулины (Ig) птиц класса Y по ряду показателей превосходят функционально аналогичные IgG млекопитающих [4]. Благодаря филогенетической отдаленности доноров и реципиентов IgY не взаимодействуют с белками млекопитающих. Постоянный трансовариальный транспорт антител способствует их накоплению в больших количествах в яичном желтке. Бескровный способ получения IgY соответствует принципам гуманной техники работ с зоологическими объектами [5]. Несмотря на очевидную перспективность использования птиц в качестве эффективных источников специфических антител, ранее их не использовали для изготовления энтеровирусных иммунодиагностических реагентов.

Целью нашей работы было получение энтеровирусных поликлональных антител (IgY) от куриц породы леггорн (КЛ) и определение пригодности IgY для идентификации энтеровирусов в РН.

Материалы и методы

В экспериментах использовали прототипные штаммы иммунологически неравноценных энтеровирусов человека видов А–D из производственной коллекции ФГУП «ПИПВЭ им. М.П. Чумакова» РАМН (табл. 1). Специфичность вирусов была подтверждена в РН моноспецифическими сыворотками (ФГУП «ПИПВЭ им. М.П. Чумакова» РАМН; Baylor University, USA) и полиспецифическими референс-препаратами («RIVM», Билтховен, Нидерланды).

Объектами иммунизации были 5–6-месячные несущиеся КЛ (птицефабрика «Птичное», Московской обл.). Контрольными продуцентами были 3-месячные кролики породы шиншилла (КШ) рандомбредной категории (ФГБУ «НЦБМТ» РАМН). Все манипуляции с зоологическими объектами осуществляли при строгом соблюдении правил, предписанных для работ с экспериментальными животными.

КЛ и КШ иммунизировали по индивидуальным схемам (табл. 2). Иммунизацию КЛ проводили либо без адъюванта, либо использовали полный или неполный адъювант Фрейнда (Freunds Complete Adjuvant, «Modified Calbiochem Corporation», США; Freunds Incomplete Adjuvant, «DIFCO Laboratories», США). Сбор яиц начинали через 2–3 нед после завершения полного цикла иммунизаций. Яйца сохраняли в течение 2 мес при 4°C. Желтки хранили неопределенно долгое время при -20°C. Экстракцию IgY проводили в соответствии с методом,

применяемым для выделения иммунных продуктов из желтка яиц КЛ, иммунизированных *E. coli* [6]. IgY стерилизовали с помощью фильтров Millipore (0,45 мкм).

Иммунизацию КШ проводили с использованием в качестве адъюванта вазелиново-ланолиновой эмульсии (8,5 частей вазелинового масла и 1,5 части ланолина безводного), стандартно применяемой при изготовлении ЭДС. Сыворотки получали из цельной крови, взятой через 7 дней после завершения полного цикла иммунизации. Сыворотки стерилизовали с помощью фильтров Millipore (0,8–0,22 мкм) и перед употреблением инактивировали в течение 30 мин при 56°C.

Нейтрализующую активность и специфичность полученных иммунных продуктов определяли микрометодом РН [3]. Индикаторной системой РН были предоставленные NIBSC (Великобритания) клетки RD (происходящие из рабдомиосаркомы человека) или клетки HEp-2-C (происходящие из эпителиальной карциномы человека).

Результаты

В предшествующих экспериментах выявлены низкая специфическая активность IgY, полученных в отсутствие адъюванта, и снижение или даже полное подавление яйценоскости КЛ, иммунизируемых совместно с полным адъювантом Фрейнда. Результаты тестирования IgY КЛ, иммунизированных в присутствии неполного адъюван-

Таблица 2

Схемы иммунизации

Условия и объекты иммунизации	Порядок иммунизации					
	1	2	3	4	5	6
	<i>Кролики/курицы</i>					
Интервал между иммунизациями, дни		21/30	14/30	14	35	35
	<i>Кролики</i>					
Объем и путь введения энтеровирусов, неполного адъюванта Фрейнда и вазелиново-ланолиновой эмульсии	Вирус 5,0 мл в/в; вирус + вазелиново-ланолиновая эмульсия 5,0 мл + 5,0 мл в/м	Вирус по 10,0 мл в/в				
	<i>Курицы</i>					
	Вирус + неполный адъювант Фрейнда 1,0 мл + 1,0 мл в/м					

Примечание. в/в – внутривенно; в/м – внутримышечно.

Таблица 3

Характеристики куриных IgY и иммунных сывороток кроликов

Иммунные продукты	Нейтрализующая активность*		Цитотоксичность**	
	IgY***	сыворотки	IgY	сыворотки
Полиовирус типа 1	3200–4800***	3200–6400*** (4800) [†]	<5***	40–320*** (320) [†]
Коксаки А7	400	200–800 (600)	< 5	20–40 (40)
Коксаки В2	1200	400–1200 (1200)	< 5	10–60 (40)
ЕСНО 3	800	800–3200 (800)	< 5	10–30 (20)
ЕСНО 30	600	400–1200 (800)	< 5	5–10 (10)
Энтеро-70	200	150–400 (200)	< 5	5–10 (10)

Примечание. * – обратные величины разведений, содержащих 1 НЕ; ** – обратные величины разведений, токсичных для индикаторных клеток; *** – диапазон индивидуальных показателей; [†] – показатели нейтрализующей активности смесей сывороток.

та Фрейнда, приведены в табл. 3. Как правило, уровни специфической активности однотипных IgY, выделенных из различных желтков, практически совпадали и были сопоставимы с показателями активности смесей кроличьих сывороток соответствующих типов. В функциональном отношении все IgY соответствовали требованиям, предъявляемым к качеству ЭДС для РН, а именно: 1 нейтрализующая единица (НЕ) определялась в разведении 1:200, 20 НЕ нейтрализовали 32–320 ККИД гомологичных энтеровирусов и не нейтрализовали 32–320 ККИД гетерологичных энтеровирусов. В отличие от цитотоксичности кроличьих сывороток IgY не вызывали неспецифические изменения индикаторных клеток.

Обсуждение

По ряду практических и экономических соображений эффективность производства сывороточных диагностических препаратов определяется максимальным иммунным ответом продуцентов на наименьшее число раздражений минимальными дозами антигена. Этим условиям наиболее полно соответствовала технология изготовления высококачественных энтеровирусных референс-сывороток («RIVM», Нидерланды) на генетически однородных SPF (specific pathogen free) лошадях и кроликах [7]. Однако значительные экономические затраты на соблюдение специализированных зооигиенических условий разведения, содержания и эксплуатации животных-продуцентов препятствовали крупномасштабному производству сывороток «RIVM». Рентабельность производства отечественных ЭДС обеспечивалась за счет использования экономически доступных нелинейных кроликов, содержащихся в открытых (конвенциональных) системах, не защищающих животных от инфекционных агентов. Слабость и неравноценность иммунного ответа этой категории продуцентов с различной эффективностью компенсировали увеличением числа иммунизаций и объемом антигенов, вводимых в кровеносное русло. Агрессивный характер подобных иммунизаций был причиной местных и общих реакций, преждевременно изнашивающих продуцентов и снижающих качество целевых продуктов. В частности, инициируемая внутривенными иммунизациями цитотоксичность ЭДС способствовала ложноотрицательной оценке РН [8].

Эксперименты по иммунизации энтеровирусами КЛ показали возможность стабильного получения специфических антител (IgY) улучшенного качества. Уровни нейтрализующей активности IgY, сопоставимые с аналогичными показателями кроличьих иммунных сывороток соответствующих типов, были достигнуты при двукратном сокращении числа иммунизаций и пятикратном

уменьшении объема вводимого антигена. В отличие от негативных последствий длительно чередующихся внутривенных инъекций и кровопусканий у КШ КЛ легко переносили цикл внутримышечных иммунизаций. Объективным показателем этого было отсутствие неспецифических реакций на IgY со стороны клеток RD и НЕР-2-С, исключивших ложноотрицательную интерпретацию результатов реакции нейтрализации. С учетом среднего содержания специфического IgY в яичном желтке и показателей яйценоскости (кладка яйца через 1–2 дня на протяжении 4–5 мес) суммарный выход IgY от каждого продуцента в 5–7 раз превосходил средний объем иммунной сыворотки, получаемой от одного кролика.

Заключение

Несмотря на предварительный характер наших экспериментов по иммунизации ограниченного количества КЛ отдельными представителями всех видов энтеровирусов человека, выявлена корреляция уровней нейтрализующей активности однотипных IgY и ЭДС. Однако изготовление IgY было результативнее и экономичнее сывороточного производства за счет увеличения выхода целевых продуктов при одновременном многократном уменьшении количества продуцентов, объемов иммуногена и сокращения продолжительности цикла иммунизации.

Таким образом, «IgY-технология», улучшающая характеристики иммунодиагностических продуктов без компромисса с состоянием их продуцентов, может рассматриваться в качестве перспективной альтернативы традиционным способам получения антител от млекопитающих. Этот вывод в совокупности с данными о терапевтическом эффекте специфических IgY [9] и юридическими аспектами охраны благополучия животных, законодательно защищенных во многих странах [10], позволяет считать, что получение птичьих антител не долго сохранит статус экспериментальной методики.

ЛИТЕРАТУРА

1. Иванова О.Е., Еремеева Т.П., Лукашов А.Н., Байкова О.Ю., Морозова Н.С., Мустафина А.Н. Наблюдение за циркуляцией неполомелитных энтеровирусов в Российской Федерации в 1999–2007 гг. *Медицинская вирусология. Тр. ИПВЗ им. М.П. Чумакова РАМН*. 2008; XXV: 11–22.
2. Лукашов А.Н., Иванова О.Е., Худякова Л.В. Социально-экономическая значимость энтеровирусной инфекции и ее роль в структуре инфекционной патологии в мире. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2010; 5: 113–20.
3. *Рекомендации по эпидемиологическому надзору за энтеровирусом для поддержки программы ликвидации полиомиелита*. Женева: ВОЗ; 2005.
4. Schade R., Calzado E.G., Sarmiento R., Chacana P.A., Parankiewicz-Asplund J., Terzolo H.R. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. *ALTA*. 2005; 33: 129–54.
5. Russell W.M.S., Burch R.L. *The Principles of Humane Experimental Technique*. 1959. London, Methuen & Co LTD: reprinted 1992 by UFAW, South Mimms, UK.
6. Akita E.M., Nakai S. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *E. coli* strain. *J. Immunol. Meth.* 1993; 160: 207–14.
7. *Horse serum for typing of enteroviruses*. National institute of public health and the environment (RIVM), Bilthoven, NL.
8. Козлов В.Г., Викторова Е.Г., Набатников П.А. Цитотоксические свойства кроличьих энтеровирусных диагностических сывороток. Особенности и локализация. *Вопросы вирусологии*. 2009; 1: 22–7.
9. Liou J.F., Chang C.W., Taiiu J.J., Yu C.K., Lei H.Y., Chen L.R., Tai C. Passive protection effect of chicken egg yolk immunoglobulins on enterovirus 71 infected mice. *Vaccine*. 2010; 28: 8189–96.
10. Каркищенко Н.Н. *Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биологических исследованиях*. М.; 2010.

REFERENCES

1. Ivanova O.E., Eremeeva T.P., Lukachov A.N., Baykova O.Yu., Morozova N.S., Mustafina A.N. *Observation of non-polio enterovirus circulation in the Russian Federation in 1999–2007. [Nablyudeniye za tsirkulyatsiyey nepoliomielitnikh enterovirusov v Rossiyskoy Federatsii v 1999–2007 gg.]*. Medical Virology (Moscow). Proceedings of the M.P. Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis RAMS. 2008; XXV: 11–22. (in Russian)
2. Lukashov A.N., Ivanova O.E., Khudyakova L.V. *Social and economic significance of enterovirus infection and its role in etiologic structure of infectious diseases in the world. [Sotsial'no-ekonomicheskaya znachimost' enterovirusnoy infektsii i ee rol' v structure infektsionnoy patologii v mire]*. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, immunobiologii. 2010; 5: 113–20. (in Russian)
3. *Recommendations for the epidemiologic surveillance of enteroviruses to support polio eradication. [Rekomendatsii po epidemiologicheskomu nadzoru za enterovirusami dlya podderzhki programmy likvidatsii poliomielitita]*. Geneva: WHO; 2005.
4. Schade R., Calzado E.G., Sarmiento R., Chacana P.A., Parankiewicz-Asplund J., Terzolo H.R. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. *ALTA*. 2005; 33: 129–54.
5. Russell W.M.S., Burch R.L. *The Principles of Humane Experimental Technique*. 1959. London, Methuen & Co LTD: reprinted 1992 by UFAW, South Mimms, UK.
6. Akita E.M., Nakai S. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *E. coli* strain. *J. Immunol. Meth.* 1993; 160: 207–14.
7. *Horse serum for typing of enteroviruses*. National institute of public health and the environment (RIVM), Bilthoven, NL.
8. Kozlov V.G., Viktorova E.G., Nabatnikov P.A. *Cytotoxic properties of diagnostic sera to enteroviruses. Specific features and localization. Voprosy virusologii.* 2009; 1: 22–7. (in Russian)
9. Liou J.F., Chang C.W., Tailiu J.J., Yu C.K., Lei H.Y., Chen L.R., Tai C. Passive protection effect of chicken egg yolk immunoglobulins on enterovirus 71 infected mice. *Vaccine*. 2010; 28: 8189–96.
10. Karkishchenko N.N. *Guidance on laboratory animals and alternative models in biological studies. [Rukovodstvo po laboratornym zivotnym I al'ternativnym modelyam v biologicheskikh issledovaniyakh]*. M.; 2010. (in Russian)

Поступила 01.08.13

Received 01.08.13

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015
УДК 615.38:614.2

Скорикова С.В.¹, Буркитбаев Ж.К.¹, Савчук Т.Н.¹, Жибурт Е.Б.²

Распространенность ВИЧ-, ВГС-, ВГВ-инфекций у доноров крови Астаны

¹Республиканское государственное предприятие на праве хозяйственного ведения (РГП на ПХВ) «Научно-производственный центр трансфузиологии» Минздрава Республики Казахстан, 010000, г. Астана, Республика Казахстан; ²ФГБУ Национальный медико-хирургический центр имени Н.И. Пирогова Минздрава России, 105203, Москва

Определили распространенность и встречаемость инфекций у 28 248 доноров крови г. Астаны в 2012 г. Расчетный остаточный риск трансфузионного инфицирования составил для вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) 1,2; вируса гепатита С (ВГС) 137,7; вируса гепатита В (ВГВ) 125,4 на 1 млн донораций. Высокий риск трансфузионного инфицирования ВИЧ, ВГВ и ВГС стимулирует активное внедрение мер повышения безопасности крови: отбор доноров, повышение чувствительности методов скрининга инфекций, инактивацию патогенов в компонентах крови и рациональное назначение гемотрансфузий в клинике.

Ключевые слова: *кровь; донор; переливание; риск; инфекции; ВИЧ; гепатит; распространенность; встречаемость.*

Для цитирования: *Вопросы вирусологии. 2015; 60 (1): 34–36.*

Skorikova S.V.¹, Burkitaev Zh.K.¹, Savchuk T.N.¹, Zhiburt E.B.²

Prevalence and incidence of infections among blood donors in Astana

¹Research and Production Center of Transfusiology of Republic of Kazakhstan, 010000, Astana, Republic of Kazakhstan; ²Pirogov National Medical Surgical Center, Ministry of Health of the Russian Federation, 105203, Moscow, Russia

The prevalence and incidence of infections among 28,248 blood donors in Astana in 2012 was determined. The estimated residual risk of the transfusion infection was as follows: for HIV – 1,2, HCV – 137,7, HBV – 125,4 per 1 million donations. High risk of transfusion infection with HIV, hepatitis B, and C stimulates the active implementation of the measures for increasing the safety of blood: the selection of donors, increasing the sensitivity of infections screening methods, inactivation of pathogens in blood components and transfusion management appointment at the clinic.

Key words: *blood; donor; transfusion; risk; infections; HIV; hepatitis; prevalence; incidence.*

Citation: *Voprosy virusologii. 2015; 60(1): 34–36. (In Russ.)*

Введение

Общепризнано, что, несмотря на все меры безопасности, остаточный риск передачи инфекции с донорской кровью сохраняется из-за серонегативного окна и других особенностей течения инфекционного процесса [1–5].

Распространенность, превалентность – количество случаев определенной болезни в популяции в определенный момент. В трансфузиологии – количество заболеваний у первичных доноров (чаще в год).

Встречаемость, инцидентность – количество случаев заболевания, возникших в течение определенного вре-

Для корреспонденции: Скорикова Светлана Викторовна; e-mail: tarkiff@mail.ru
Correspondence to: Svetlana Skorikova; e-mail: tarkiff@mail.ru

Таблица 1

Показатели донорства крови в Нидерландах в 2011 г.

Показатель	n
Число доноров	389 350
Число доноров цельной крови	329 283
Частота донаций цельной крови в год	1,63
Частота донаций плазмы в год	5,88
Число доноров на 1000 жителей	23,3
Количество донаций	885 836
Количество донаций цельной крови	538 282
Количество аферезов	347 554

мени в определенной популяции. В трансфузиологии – выявление заболеваний у регулярных доноров [6].

Остаточный риск передачи гемотрансмиссивных инфекций рассчитывают как произведение продолжительности серонегативного периода инфекции и встречаемости [7]. По состоянию на 23.01.2015 указанная статья G. Schreiber и соавт. процитирована в 837 публикациях.

В соответствии с нормативами Евросоюза ежегодный отчет о деятельности учреждений службы крови должен включать показатели встречаемости и распространенности маркеров гемотрансмиссивных инфекций у доноров крови и ее компонентов [8].

В первой российской публикации о распространенности и встречаемости у доноров крови встречаемость определили как частное количества выявленных инфекций и числа кадровых доноров [9].

Бразильские коллеги учитывают срок между серонегативной и серопозитивной донацией каждого донора: из 8 реальных случаев сероконверсии, зарегистрированных в 2007 г., получились 2,87 расчетных случая. При этом в 2007 г. интервал между донациями 212 186 повторных доноров составил 92 095 человеко-лет, а расчетная встречаемость составила 3,11 на 100 000 человеко-лет [10].

В отчете службы крови Нидерландов за 2011 г. наряду с точными количественными показателями (табл. 1) указано, что доля первичных доноров составляет 10% [11].

Также в отчете приведены данные о распространенности и встречаемости инфекций (табл. 2). При расчете встречаемости коллеги учитывают интервал между серонегативной и серопозитивной донациями. У доноров, инфицированных вирусом гепатита В (ВГВ), частота донаций 0,8 в год, у заболевших сифилисом – 1,4 раза в год.

Представляет интерес определить распространенность и встречаемость инфекций у доноров г. Астаны.

Материалы и методы

В 2012 г. обследовали 28 248 доноров, сделавших 41 990 донаций крови и ее компонентов.

Образец крови от каждой донации обследовали на маркеры четырех гемотрансмиссивных инфекций: вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) (антиген р24 ВИЧ-1 и антитела к ВИЧ-1/2), вирус гепатита В (ВГВ) (поверхностный антиген ВГВ, HBsAg), вирус гепатита С (ВГС) (антитела к ВГС); сифилис (антитела класса М и G к бледной трепонеме).

Скрининг проводили методом иммунохемилюминесцентного анализа на автоматическом анализаторе Architect i 2000 sr («Abbott Laboratories», США). Для исследования маркеров четырех вышеперечисленных инфекций использовали соответственно тесты: Architect HIV Combo, Architect HBsAg Qual.II, Architect anti-HCV и Architect Syphilis TP.

Таблица 2

Инфекции у доноров Нидерландов в 2011 г.

Инфекция	Первичные (n = 40 000*)		Повторные (n = 350 000*)	
	абс.	распространенность	абс.	встречаемость
ВИЧ	1	2,5	0	0
ВГВ	13	33	7	1,6
ВГС	7	17,9	0	0
Сифилис	10	23	5	2
HTLV-I/II	3	7,7	0	0
Всего ...	34	84,1	12	3,6

Примечание. * – расчетные показатели, точных данных в отчете нет. ВИЧ – вирус иммунодефицита человека; ВГС – вирус гепатита С.

В соответствии с рекомендациями ВОЗ первично реактивные образцы тестировали повторно в двух поставках тем же методом [12].

Положительные образцы дополнительно исследовали методом иммуноферментного анализа с использованием диагностикомов Genscreen HIV 1/2 Ag/Ab ULTRA, Monolisa HBsAg ULTRA, Monolisa HCV Ag/Ab ULTRA, Syphilis Total («Bio-Rad», Франция).

Положительные образцы с маркерами ВИЧ-инфекции направляли на подтверждающее исследование в Центр СПИДа; подтверждающее исследование остальных трех инфекций выполняли соответственно с использованием диагностикомов Вектогеп В-HBsAg, подтв. тест, ВГС-блот Бест и РекомбиБест антипаллидум («Вектор-Бест», Россия).

Положительное заключение об инфицированности и необходимости отстранения донора делали на основании положительных результатов всех четырех вышеописанных этапов обследования. Отстраненных доноров направляли для получения соответствующей медицинской помощи у врача-инфекциониста.

При расчете встречаемости инфекций учли, что повторные доноры выполнили 24 378 донаций в 2012 г. Средняя частота донаций составила 2,29 раза в год.

Распространенность рассчитывали на 100 000 доноров.

Встречаемость рассчитывали на 100 000 человеко-лет с учетом средней частоты донаций.

Результаты и обсуждение

Результаты исследования представлены в табл. 3.

943 положительных результата инфекций получены у 918 доноров: 25 доноров имели положительный результат на два инфекционных маркера в следующем сочетании: ВГВ и сифилис – 12 доноров; ВГС и сифилис – 8 доноров; ВГВ и ВГС – 6 доноров. В табл. 3 эти доноры

Таблица 3

Инфекции у доноров крови в г. Астане в 2012 г.

Инфекция	Первичные (n = 17 612)		Повторные (n = 10 636)	
	абс.	распространенность	абс.	встречаемость
ВИЧ	10	56,8	1	21,5
ВГВ	383	2174,7	36	775,8
ВГС	207	1175,3	40	862,0
Сифилис	219	1243,5	47	1012,8
Всего ...	819	4650,2	124	2672,2

Таблица 4

Остаточный риск трансфузионного инфицирования в г. Астане в 2012 г.

Инфекция	Период окна, дни	Встречаемость	Остаточный риск трансфузионного инфицирования на 1 млн донаций
ВИЧ	20,3*	21,5	1,2
ВГВ	59**	775,8	125,4
ВГС	58,3*	862,0	137,7

Примечание. * – по данным [13]; ** – по данным [7].

учтены дважды соответственно выявленным маркерам ГТИ и категории донора.

Остаточные риски трансфузионного инфицирования ВГВ, ВГС и ВИЧ являются основными объективными количественными показателями вирусной безопасности службы крови. Оценки остаточных рисков трансфузионного инфицирования ВГС, рассчитанные на основе анализа данных обследования (скрининга) доноров крови, мониторинга реципиентов множественных трансфузий и контрольного тестирования плазмы крови для производства ее препаратов, близки по значению и составляют 940, 1600 и 630 на 1 млн кроводач, трансфузий и единиц плазмы соответственно [14].

Рассчитанные классическим способом остаточные риски трансфузионного инфицирования в США составили для ВИЧ 2,03; для ВГС 9,70; для ВГВ – 15,83 на 1 млн донаций [7].

По нашим данным, остаточные риски трансфузионного инфицирования при переливании крови доноров г. Астаны для ВИЧ аналогичны данным американских коллег, а в отношении ВГВ и ВГС на порядок выше, чем в США, и в 5–10 раз ниже, чем в России.

Отдельно следует отметить необходимость программного определения встречаемости инфекций с индивидуальной регистрацией периода между серонегативной и серопозитивной донациями.

Выводы

1. Впервые определены распространенность и встречаемость гемотрансмиссивных инфекций у доноров крови Казахстана. Эти показатели целесообразно ввести в официальную отчетность организаций службы крови государств-участников СНГ.

2. Высокие остаточные риски трансфузионного инфицирования ВИЧ, ВГВ и ВГС стимулирует активное внедрение мер по повышению безопасности крови: отбор доноров, повышение чувствительности методов скрининга инфекций, инактивацию патогенов в компонентах крови и рациональное назначение гемотрансфузий в клинике.

ЛИТЕРАТУРА

1. Жибурт Е.Б., Бельгесов Н.В., Ващенко Т.Н., Бондаренко И.Г., Токмаков В.С., Васильюк В.Б. Аланинаминотрансфераза – суррогатный маркер вирусного гепатита. *Вопросы вирусологии*. 1995; 40 (1): 25–7.
2. Жибурт Е.Б. Повышение вирусной безопасности препаратов крови. *Вопросы вирусологии*. 2004; 49 (4): 46–8.
3. Жибурт Е.Б. Аланинаминотрансфераза – суррогатный маркер вирусного гепатита. *Вопросы вирусологии*. 2005; 50 (6): 18–20.
4. Жибурт Е.Б., Губанова М.Н., Ключева Е.А., Коденев А.Т., Шестаков Е.А. Особенности национального скрининга маркеров инфекций в донорской крови. *Вестник Росздравнадзора*. 2010; 1: 75–9.
5. Зубкова Н.В., Филатова Е.В., Зубов С.В. Серологические и молекулярно-генетические маркеры вируса гепатита С у инфицированных доноров. *Вопросы вирусологии*. 2010; 55 (5): 34–6.

6. Enticott J.C., Kandane-Rathnayake R.K. Prevalence versus incidence. *Transfusion*. 2012; 52 (9): 1868–70.
7. Schreiber G.B., Busch M.P., Kleinman S.H., Korelitz J.J. The risk of transfusion-transmitted viral infections. The Retrovirus Epidemiology Donor Study. *N. Engl. J. Med.* 1996; 334 (26): 1685–90.
8. Directive 2002/98/EC of the European Parliament and of the Council of 27 January 2003 setting standards of quality and safety for the collection, testing, processing, storage and distribution of human blood and blood components and amending Directive 2001/83/EC
9. Жибурт Е.Б., Карваев А.В., Вайсман Д.А., Мадзаев С.Р. Особенности национальной оценки риска передачи инфекций при переливании крови. *Вестник Росздравнадзора*. 2013; 1: 75–7.
10. de Almeida-Neto C., Sabino E.C., Liu J., Blatya P.F., Mendrone-Junior A., Salles N.A. et al. Prevalence of serologic markers for hepatitis B and C viruses in Brazilian blood donors and incidence and residual risk of transfusion transmission of hepatitis C virus. *Transfusion*. 2013; 53 (4): 827–34.
11. *Sanquin Blood Supply*. Available at: <http://www.sanquin.nl/en/> (accessed 16th of July 2013).
12. *Скрининг донорской крови на гемотрансмиссивные инфекции. Рекомендации Всемирной организации здравоохранения*. Женева: ВОЗ; 2010.
13. Busch M.P., Glynn S.A., Stramer S.L., Strong D.M., Caglioti S., Wright D.J. et al. A new strategy for estimating risks of transfusion-transmitted viral infections based on rates of detection of recently infected donors. *Transfusion*. 2005; 45 (2): 254–64.
14. Куликов С. М., Гармаева Т.Ц., Зингерман Б.В., Филатов Ф.П., Судариков А.Б., Михайлова Е.А. и др. Вирусная безопасность гемотрансфузии и методы ее оценки. *Гематология и трансфузиология*. 2011; 53 (4): 3–5.

REFERENCES

1. Zhiburt E.B., Bel'gesov N.V., Vashchenko T.N., Bondarenko I.G., Tokmakov V.S., Vasilyuk V.B. Alanin aminotransferase as viral hepatitis surrogate marker. *Voprosy virusologii*. 1995; 40 (1): 25–7. (in Russian)
2. Zhiburt E.B. Increasing of blood products viral safety. *Voprosy virusologii*. 2004; 49 (4): 46–8. (in Russian)
3. Zhiburt E.B. Alanin aminotransferase as viral hepatitis surrogate marker. *Voprosy virusologii*. 2005; 50 (6): 18–20. (in Russian)
4. Zhiburt E.B., Gubanova M.N., Klyueva E.A., Kodenev A.T., Shestakov E.A. Features of the national screening markers of infections in donated blood. *Vestnik Roszdravnadzora*. 2010; 1: 75–9. (in Russian)
5. Zubkova N.V., Filatova E.V., Zubov S.V. Serological and molecular genetic markers of hepatitis C virus from infected donors. *Voprosy virusologii*. 2010; 55 (5): 34–6. (in Russian)
6. Enticott J.C., Kandane-Rathnayake R.K. Prevalence versus incidence. *Transfusion*. 2012; 52 (9): 1868–70.
7. Schreiber G.B., Busch M.P., Kleinman S.H., Korelitz J.J. The risk of transfusion-transmitted viral infections. The Retrovirus Epidemiology Donor Study. *N. Engl. J. Med.* 1996; 334 (26): 1685–90.
8. Directive 2002/98/EC of the European Parliament and of the Council of 27 January 2003 setting standards of quality and safety for the collection, testing, processing, storage and distribution of human blood and blood components and amending Directive 2001/83/EC
9. Zhiburt E.B., Karavaev A.V., Vaysman D.A., Madzaev S.R. Features of national risk assessment of transmission of infection through blood transfusion. *Vestnik Roszdravnadzora*. 2013; 1: 75–7. (in Russian)
10. de Almeida-Neto C., Sabino E.C., Liu J., Blatya P.F., Mendrone-Junior A., Salles N.A. et al. Prevalence of serologic markers for hepatitis B and C viruses in Brazilian blood donors and incidence and residual risk of transfusion transmission of hepatitis C virus. *Transfusion*. 2013; 53 (4): 827–34.
11. *Sanquin Blood Supply*. Available at: <http://www.sanquin.nl/en/> (accessed 16th of July 2013).
12. Blood donor screening for blood-transmitted disease. WHO guidelines: Zheneva: WHO; 2010.
13. Busch M.P., Glynn S.A., Stramer S.L., Strong D.M., Caglioti S., Wright D.J. et al. A new strategy for estimating risks of transfusion-transmitted viral infections based on rates of detection of recently infected donors. *Transfusion*. 2005; 45 (2): 254–64.
14. Kulikov S.M., Garmaeva T.Ts., Zingerman B.V., Filatov F.P., Sudarikov A.B., Mikhailova E.A. et al. Viral safety of blood transfusions and it's evaluation methods. *Gematologiya i transfusiologya*. 2011; 53 (4): 3–5. (in Russian)

Получено 25.10.13
Received 25.10.13

Иммунные критерии активации герпесвирусной инфекции у женщин с физиологическим течением беременности

¹ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава России, 123098, Москва; ²Клиника ОАО «Медицина», 125047, Москва

Реактивацию вируса простого герпеса (ВПГ) часто наблюдают у женщин во время беременности, однако возникающие при этом изменения в иммунной системе недостаточно изучены. В данной работе представлен сравнительный анализ выявления специфических противовирусных антител класса IgM и IgG, определения их титров и авидности в парных сыворотках 49 ВПГ-положительных беременных женщин без отягощенного акушерско-гинекологического анамнеза. Результаты серологического исследования сравнивали с количественным определением интерферона γ (ИФН γ) в образцах сыворотки крови, а также с уровнем спонтанной и индуцированной продукции цитокина лимфоцитами крови. Для этого забирали по 5,0 мл крови из вены при взятии на учет беременных женщин (на 9–11-й неделе беременности) и повторно – спустя 4 нед. Неспецифическую индукцию ИФН γ проводили с использованием фитогемагглютинина (ПанЭко, Россия). Концентрации приведенных иммунных маркеров в образцах оценивали методом иммуноферментного анализа с использованием сертифицированных коммерческих наборов ЗАО «Вектор-Бест» (Россия) и НПО «Диагностические системы» (Россия).

Ни у одной из 49 женщин не были выявлены IgM-антитела в парных сыворотках. Высокоавидные IgG-антитела были выявлены у всех женщин в титрах 1:50–1:100, однако при повторном заборе крови в образцах сыворотки 32 женщин (основная группа) обнаружено увеличение титров антител до 1:600–1:800. Женщины с отсутствием роста антител составили контрольную группу ($n = 17$). Количественный анализ ИФН γ у женщин обеих групп показал, что содержание цитокина в первых образцах сыворотки и уровень спонтанной продукции у женщин основной группы были статистически значимо выше, чем у женщин контрольной группы (4,2 против 2,7, $p = 0,05$; 7,5 против 2,0, $p = 0,03$ соответственно). В образцах крови, взятых спустя 4 нед, наблюдали снижение концентрации сывороточного ИФН γ (2,6 против 4,2, $p = 0,049$) и спонтанной ее продукции (4,5 против 7,5, $p = 0,046$) по сравнению с первыми образцами клинического материала.

Полученные данные продемонстрировали, что реактивация ВПГ-инфекции происходит у женщин с физиологически протекающей беременностью и отсутствием отягощенного акушерско-гинекологического анамнеза. Увеличение концентрации ИФН γ в сыворотке крови и уровня спонтанной продукции цитокина является наиболее ранним признаком обострения инфекционного процесса у женщин во время беременности. Эти изменения предшествуют росту количества IgG-антител и приходят к нормальным значениям к моменту подъема уровня непрямого маркера ВПГ. Отсутствие IgM-антител к вирусу не является строгим критерием неактивной инфекции.

Ключевые слова: герпесвирусная инфекция; ВПГ; беременность; антитела; IgG; интерферон-гамма.

Для цитирования: Вопросы вирусологии. 2015; 60 (1): 37–40.

Lvov N.D.¹, Abdulmedzhidova A.G.²

Immune signs of activation of the herpes simplex virus in women with physiological pregnancy

¹ D.I. Ivanovsky Institute of Virology, Ministry of Health of the Russian Federation, 123098, Moscow, Russia; ² JSC Medicina, 125047, Moscow, Russia

Reactivation of the herpes simplex virus (HSV) is frequently observed in women during pregnancy. However, the concomitant changes in the immune system are still insufficiently understood. The goal of this work was to present a comparative analysis intended to identify specific antiviral IgM antibodies and IgG to determine their titles, concentration, and avidity in paired sera of 49 HSV-positive pregnant women without complicated obstetric-gynecological history. The serology results were compared with the quantitative determination in the serum IFN γ , as well as with the level of spontaneous and induced cytokine production by blood lymphocytes. For this purpose, 5.0 ml of blood from a vein was collected in pregnant women (9–11 weeks of gestation). The procedure was repeated in 4 weeks. The nonspecific induction of the IFN γ was performed using phytohemagglutinin (PanEco, Russia). Given the concentration of the immune markers in the samples, such values were evaluated by ELISA using certified commercial kits available from Vector-Best Ltd. (Russia) and Diagnostic System Scientific Manufacturing Association (Russia). IgM antibodies in paired sera had not been detected in any of the 49 women. High-avidity IgG antibodies were detected in all women in the titer 1:50 - 1:100, but in the second sample of sera from 32 women (study group) antibody titers were found to be as high as 1:600 - 1:800. The women with no growth of the serum antibodies were included in the control group ($n = 17$). Comparative analysis of the amount of IFN γ in sera showed that the content of the cytokine in the first blood sample and the level of the spontaneous production in women of the study group were statistically significantly higher than in the control group (4.2 vs. 2.7, $p = 0.05$; 7.5 vs. 2.0, $p = 0.03$, respectively). In the blood samples taken after 4 weeks the serum concentration of IFN γ (2.6 vs. 4.2, $p = 0.049$), and its spontaneous product (4.5 vs. 7.5, $p = 0.046$) were considerably lower than in the first blood samples. These results demonstrate that the reactivation of the HSV infection occurs in women with normal pregnancy and

the lack of complicated obstetric and gynecological history. Increasing the concentration of IFN γ serum levels and spontaneous cytokine production is the earliest sign of acute infection in the women during pregnancy. These changes precede the increase in the IgG antibodies and assume normal values when the level of indirect marker of HSV rises. The lack of the IgM antibodies to the virus is not a strict criterion of inactive infection.

Key words: herpes virus infection; HSV; pregnancy; antibodies; IgG; interferon-gamma.

Citation: *Voprosy virusologii. 2015; 60(1): 37–40. (In Russ.)*

Распространенность инфекции, вызванной вирусом простого герпеса (ВПГ), в популяции человека превышает 90% [1]. Заболевание характеризуется хроническим течением и реактивацией под влиянием внешних факторов (переохлаждение, инсоляция, стресс, иммуносупрессия), которые стимулируют экспрессию вирусного генома [2]. Обострение инфекции наблюдают также во время беременности [3], что обусловлено изменением уровня женских половых гормонов, участвующих в регуляции функции иммунной системы [4, 5]. Известно, что первичная ВПГ-инфекция приводит к врожденной герпесвирусной инфекции у новорожденного [3]. Рекуррентная инфекция характеризуется бессимптомным течением [6] и может привести к внутриутробному инфицированию плода, хотя частота поражения плода при вторичной инфекции низкая [7]. В то же время фундаментальных знаний об изменениях в иммунной системе при активации ВПГ-инфекции у женщин во беременности недостаточно, к тому же они противоречивы.

Целью данной работы было проведение сравнительного анализа концентраций антител класса IgM и IgG к антигенам ВПГ, уровня интерферона-гамма (ИФН γ) в сыворотке крови, а также показателей спонтанной и индуцированной продукции цитокина для диагностики реактивации герпесвирусной инфекции у ВПГ-позитивных беременных женщин.

Материалы и методы

Материал. Были обследованы 49 женщин в возрасте от 27 до 35 лет (средний возраст $31,7 \pm 3,3$ года), обратившихся в клинику ОАО "Медицина" для дородового наблюдения на 9–11-й неделе беременности в течение 2012 г. Ведение беременности осуществляли в соответствии с приказом Минздрава России от 12 ноября 2012 г. "Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи по профилю "акушерство и гинекология (за исключением использования вспомогательных репродуктивных технологий)" № 572н.

В выборку были включены ВПГ-позитивные женщины на основании детекции IgG-антител к белкам ВПГ типов 1 и 2 в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа (ИФА). Критериями исключения из выборки были отсутствие IgG анти-ВПГ в сыворотке крови (ВПГ-негативные женщины), наличие активной инфекции другой вирусной или бактериальной этиологии, системных аутоиммунных заболеваний и иммунодефицитных состояний, а также указания на отягощенный акушерско-гинекологический анамнез или бесплодие в анамнезе.

На основании добровольного информированного согласия пациенток и в соответствии со стандартами, утвержденными этическим комитетом ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава РФ, у всех женщин дважды забирали по 5 мл крови из вены для исследования содержания IgM- и IgG-антител к белкам ВПГ (анти-ВПГ) и количественного определения ИФН γ в сыворотке крови, а также для оценки уровня спонтанной и индуцированной продукции цитокина лимфоцитами крови. Первый забор крови осуществляли при взятии на учет беременных женщин (на 9–11-й неделе беременности), повторный – спустя 4 нед. Образцы полученных сывороток хранили в виде аликвот при -40°C до проведения ИФА.

Количественный анализ антител к белкам ВПГ (анти-ВПГ). Для выявления противовирусных антител класса IgM использовали набор «ВектоВПГ-IgM» фирмы «Вектор-Бест» (Россия). Определение IgG-антител проводили с помощью сертифицированных коммерческих наборов для ИФА «ДС-ИФА-Анти-ВПГ-1,2-0» фирмы НПО «Диагностические системы» (Россия). Для оценки роста анти-ВПГ проводили детекцию антител в парных сыворотках. Анализ и интерпретацию результатов осуществляли в соответствии с инструкциями фирмы-производителя. Результаты представляли в титрах и в коэффициентах позитивности (КП).

Определение avidности антител. Индекс avidности специфических IgG определяли с помощью набора «ДС-ИФА-Анти-ВПГ-1,2-С-Авидность» фирмы НПО «Диагностические системы» (Россия). Результаты оценивали согласно рекомендациям фирмы-производителя.

Количественный анализ ИФН γ . Одновременно с серологическим исследованием у беременных женщин изучали содержание ИФН γ в сыворотке крови, а также уровень спонтанной и индуцированной продукции цитокина лимфоцитами периферической крови. Для этого венозную кровь забирали в пробирки, содержащие гепарин. С целью определения спонтанного уровня ИФН γ десятикратно разведенную кровь (после удаления плазмы) культивировали в среде RPMI 1640 («ПанЭко», Россия), содержащей 5% бычьей эмбриональной сыворотки («ПанЭко», Россия), в условиях 5% CO $_2$ и 37 $^{\circ}\text{C}$. Для неспецифической индукции ИФН γ в среду культивирования добавляли фитомагглютинин («ПанЭко», Россия) в концентрации 5 мкг/мл и инкубировали при тех же условиях. Через 20 ч отбирали супернатант и хранили в виде аликвот при -40°C до проведения ИФА. Для оценки уровня цитокина в сыворотке крови и в аликвотах культуральных жидкостей использовали сертифицированный коммерческий набор для ИФА фирмы «ВекторБест» (Россия). Чувствительность тест-системы составила 2 пкг/мл.

В работе не использован метод ПЦР для диагностики вируса в связи с тем, что скрининговое исследование на ВПГ данным методом не является обязательным в соответствии с приказом № 572н Минздрава России от 12 ноября 2012 г. Молекулярно-биологические исследования ВПГ-инфекции проводятся у женщин группы риска либо при наличии клинического эпизода заболевания.

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью пакета программ Excel и Biostat. Для анализа уровня ИФН γ и антител к ВПГ оценивали нормальность выборки путем определения среднего значения КП антител и медианного значения, так как нормальная выборка характеризуется совпадением указанных параметров [8]. При установленной нормальной выборке математическую обработку данных проводили с помощью парного критерия Стьюдента, при ненормальной выборке использовали непараметрический критерий Манна-Уитни. Различия считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты

На основании результатов обследования в соответствии с приказом Минздрава России № 572н от 12 ноября 2012 г. установлено, что у всех наблюдавшихся женщин беременность протекала без патологии.

Таблица 1
Количественная оценка содержания антител класса IgG к ВПГ (в КП) в парных сыворотках беременных женщин

Исследованный материал (сыворотка крови)	Основная группа (n = 32)	Контрольная группа (n = 17)
I забор крови	1,83 ± 0,9*	4,7 ± 2,8
II забор крови	5,3 ± 1,4*	5,15 ± 2,57

Примечание. * – статистическая значимость, парный критерий Стьюдента, $p = 0,0001$.

Из инфекционного анамнеза: 11 женщин указывали на герпесвирусное поражение периоральной области с частотой 1–2 раза в год, 2 пациентки – на единственный эпизод генитального герпеса, 36 женщин отрицали клинически выраженные проявления ВПГ-инфекции любой локализации.

Результаты серологического исследования представлены в табл. 1, концентрации IgG-антител выражены в КП. В образцах сывороток первого забора материала у 49 женщин с нормально развивающейся беременностью обнаружены IgG-антитела к белкам ВПГ в титре 1:50–1:100 и ни в одном случае не выявлены IgM. Изучение индекса авидности IgG показало, что у всех женщин обнаружены высокоавидные вирусспецифические антитела (индекс авидности ≥ 90). В сыворотках, полученных в результате повторного забора крови, также не выявили антитела класса IgM к белкам ВПГ, однако у части беременных женщин наблюдали увеличение концентрации IgG анти-ВПГ (титр антител составил 1:600–1:800). На основании этого критерия 49 женщин были разделены на две группы: основную группу (n = 32) составили женщины, у которых во вторых образцах сывороток наблюдали рост антител к вирусу по сравнению с первыми образцами; в контрольную группу (n = 17) вошли женщины, у которых содержание изученных антител в парных сыворотках было сопоставимым.

В работе проведена количественная оценка содержания сывороточного ИФН γ , а также уровня спонтанной и индуцированной продукции цитокина у женщин обеих групп. Данные приведены в табл. 2, из которой видно, что в первых образцах клинического материала у женщин основной группы уровень ИФН γ выше, чем у женщин контрольной группы, при этом концентрации цитокина в сыворотках и уровень спонтанной продукции были увеличены в статистически значимых пределах (p

= 0,05 и $p = 0,03$ соответственно). В клиническом материале, полученном спустя 4 нед, не выявили различий в содержании ИФН γ у женщин обеих групп.

Кроме того, по результатам, представленным в табл. 2, концентрация сывороточного ИФН γ и спонтанная продукция цитокина у женщин основной группы статистически значимо выше в первых образцах, чем во вторых ($p = 0,049$ и $p = 0,046$ соответственно), тогда как концентрации индуцированной продукции ИФН γ не различались. У женщин контрольной группы в парных образцах крови были получены сопоставимые уровни цитокина.

Обсуждение

В работе оценивали показатели иммунного ответа у беременных женщин при активации ВПГ-инфекции: уровень непрямого маркера вируса и провоспалительный цитокин – ИФН γ . Выбор данного цитокина был основан на том, что при нормальном иммунном ответе на ВПГ-инфекцию наблюдают корреляцию между активностью заболевания и концентрацией ИФН γ [9, 10]. ИФН γ синтезируется CD4 $^{+}$ - и CD8 $^{+}$ -Т-лимфоцитами [11] в ответ на их стимуляцию вирусными антигенами [12]. Количество ИФН γ -синтезирующих CD4 $^{+}$ - и CD8 $^{+}$ -клеток (ВПГ-специфичных) составляет от 0,2 до 1% от общего числа мононуклеаров в периферической крови [13, 14]. Цитокин обладает множеством функций: активирует естественные клетки-киллеры, дендритные клетки, макрофаги и частично Т-клетки [15], что приводит к локализации инфекционного очага. Кроме того, ИФН γ оказывает прямое влияние на ВПГ путем супрессии вирусного белка ICP4 [16].

Всем беременным женщинам было проведено серологическое исследование. У 49 женщин ни в одном из изученных образцов сывороток не были выявлены антитела класса IgM. Вследствие низкой частоты обнаружения IgM анти-ВПГ при рекуррентной ВПГ-инфекции некоторые исследователи считают, что детекция этих антител может применяться в качестве вспомогательного теста для диагностики обострения заболевания [17]. При изучении IgG анти-ВПГ у 32 беременных женщин из 49 (основная группа) обнаружили статистически значимое увеличение количества антител, что является одним из признаков активности ВПГ-инфекции. Представляют интерес результаты исследования ИФН γ у этой группы женщин (n = 32). В первых образцах содержание цитокина в сыворотке и спонтанная его продукция достоверно выше, чем у женщин контрольной группы (n = 17), что свидетельствует об эндогенном стимулировании интерферонпродуцирующих клеток вирусом [18]. С другой стороны, значения индуцированной продукции цитокина в группах не различались – признак отсутствия функционального истощения Т-лимфоцитов в результате хронически активной ВПГ-инфекции [19].

Был проведен сравнительный анализ содержания ИФН γ и IgG анти-ВПГ в сыворотках, полученных с интервалом 4 нед. Установлено, что повышение содержания сывороточного и спонтанного ИФН γ предшествовало подъему уровня IgG-антител. К моменту детекции роста непрямого маркера ВПГ происходило снижение концентрации указанных фракций цитокина. Результат объясняется тем, что наиболее ранней иммунной реакцией на ВПГ-инфекцию является синтез ИФН γ [20], что подтверждается обнаружением рецептора α к ИФН γ (ИФН γ -R α) на поверхности вируссодержащих клеток через 4 ч после инфицирования [21]. Об этом также свидетельствует увеличение уровня цитокина у серонегативных партнеров ВПГ-позитивных

Таблица 2
Сравнительный анализ концентрации ИФН γ в парных сыворотках беременных женщин, у которых наблюдали рост уровня IgG к ВПГ и беременных женщин с отсутствием увеличения количества IgG-антител

Объект исследования	Медианные значения концентраций ИФН γ , пкг/мл		p (критерий Манна-Уитни)	
	основная группа (n = 32)	контрольная группа (n = 17)		
I забор крови	Сыворотка крови	4,2*	2,7	0,05
	Спонтанная продукция	7,5**	2,0	0,03
	Индукцированная продукция	1861,6	1374,9	0,2
II забор крови	Сыворотка крови	2,6*	1,98	0,8
	Спонтанная продукция	4,5**	3,6	0,31
	Индукцированная продукция	1784,7	1253,6	0,12

Примечание. * – $p = 0,049$, ** – $p = 0,046$.

лиц [22] и у пациентов с бессимптомным течением герпесвирусной инфекции [23]. С другой стороны, ИФН γ оказывает ингибирующее действие на функцию клеток Т-хелперы 2 и В-клетки, что приводит к более отсроченному гуморальному иммунному ответу на вирус [24].

У обследованных женщин по данным УЗИ и биохимических маркеров первого скринингового исследования не выявлено негативного влияния активации ВПГ-инфекции на плод. Это объясняется выборкой наблюдений, в которую были включены ВПГ-положительные женщины с отсутствием заболевания в анамнезе или редкими клиническими проявлениями его, что свидетельствует о нормальном функционировании иммунной системы. Показано, что рекуррентная герпесвирусная инфекция в I триместре беременности приводит к внутриутробному инфицированию плода в 1% случаев, тогда как в III триместре – в 30–50% случаев [6].

Суммируя полученные данные, можно заключить, что реактивация ВПГ-инфекции происходит в том числе у женщин с физиологически протекающей беременностью и отсутствием отягощенного акушерско-гинекологического анамнеза. Увеличение концентрации сывороточного ИФН γ и уровня спонтанной продукции цитокина может быть единственным проявлением обострения инфекционного процесса у женщин во время беременности, тогда как отсутствие IgM-антител к вирусу не является строгим критерием латентной ВПГ-инфекции, а обнаружение роста содержания IgG анти-ВПГ позволяет с опозданием судить об активации инфекционного процесса.

ЛИТЕРАТУРА | REFERENCES |

1. Michael P. Nicoll, João T Proença, Stacey Efstathiou. The molecular basis of herpes simplex virus latency. *FEMS Microbiol Rev.* 2012; 36 (3): 684–705.
2. Guey-Chuen Perng, Clinton Jones. Towards an Understanding of the Herpes Simplex Virus Type 1 Latency-Reactivation Cycle. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2010; 262 415.
3. Singhal P., Naswa S., Marfatia Y.S. Pregnancy and sexually transmitted viral infections. *Indian J. Sex. Transm. Dis.* 2009; 30 (2): 71–8.
4. Kaushic C., Roth K.L., Anipindi V., Xiu F. Increased prevalence of sexually transmitted viral infections in women: the role of female sex hormones in regulating susceptibility and immune responses. *J. Reprod. Immunol.* 2011; 88 (2): 204–9.
5. Wira C.R., Fahey J.V., Ghosh M., Patel M.V., Hickey D.K., Ochiel D.O. Sex hormone regulation of innate immunity in the female reproductive tract: the role of epithelial cells in balancing reproductive potential with protection against sexually transmitted pathogens. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2010; 63(6): 544–65.
6. Anzivino E., Fioriti D., Mischitelli M., Bellizzi A., Barucca V., Chiarini F. et al. Herpes simplex virus infection in pregnancy and in neonate: status of art of epidemiology, diagnosis, therapy and prevention. *Virology Journal.* 2009; 6: 40.
7. Gianluca Straface, Alessia Selmin, Vincenzo Zanardo, Marco De Santis, Alfredo Ercoli, and Giovanni Scambia. Herpes Simplex Virus Infection in Pregnancy. *Infect. Dis Obstet Gynecol.* 2012; 2012: 385 697.
8. Гланц С. *Медико-биологическая статистика.* М.: Практика: 1998.
[Glants S. *Biomedical Statistics (Mediko-biologicheskaya statistika).* Moscow: Praktika; 1998]. (in Russian)

9. Spruance S.L., Tyring S.K., Smith M.H., Meng T.C. Application of a topical immune response modifier, resiquimod gel, to modify the recurrence rate of recurrent genital herpes: a pilot study. *J. Infect. Dis.* 2001; 184: 196–200.
10. McKenna D. B., Neill W. A., Norval M. Herpes simplex virus-specific immune responses in subjects with frequent and infrequent orofacial recurrences. *Br. J. Dermatol.* 2001; 144: 459–64.
11. Held K., Derfuss T. Control of HSV-1 latency in human trigeminal ganglia-current overview. *J. Neurovirol.* 2011; 17 (6): 518–27.
12. Tang V.A., Rosenthal K.L. Intravaginal infection with herpes simplex virus type-2 (HSV-2) generates a functional effector memory T cell population that persists in the murine genital tract. *J. Reprod. Immunol.* 2010; 87 (1–2): 39–44.
13. Hosken N., McGowan P., Meier A., Koelle D.M., Sleath P., Wagener F. et al. Diversity of the CD8+ T cell response to herpes simplex virus type 2 proteins among persons with genital herpes. *J. Virol.* 2006; 80: 5509–15.
14. Posavad C.M., Wald A., Hosken N., Huang M.-L., Koelle D.M., Corey L. T cell immunity to herpes simplex virus in seronegative persons: silent infection or acquired immunity. *J. Immunol.* 2003; 170: 4380–8.
15. Huang W.Y., Su Y.H., Yao H.W., Ling P., Tung Y.Y., Chen S.H. et al. Beta interferon plus gamma interferon efficiently reduces acyclovir-resistant herpes simplex virus infection in mice in a T-cell-independent manner. *J. Gen. Virol.* 2010; 91 (Pt 3): 591–8.
16. Van Opendenbosch N., De Regge N., Van Poucke M., Peelman L., Favoreel H.W. Effects of interferon on immediate-early mRNA and protein levels in sensory neuronal cells infected with herpes simplex virus type 1 or pseudorabies virus. *Vet. Microbiol.* 2011; 152 (3–4): 401–6.
17. Choudhry S., Ramachandran V.G., Das S., Bhattacharya S.N., Mogha N.S. Serological profile of HSV-2 in patients attending STI clinic: evaluation of diagnostic utility of HSV-2 IgM detection. *Indian J. Pathol. Microbiol.* 2009; 52 (3): 353–6.
18. Ершов Ф.И., Киселев О.И. *Интерфероны и их индукторы (от молекул до лекарств).* Монография. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2005. [Ershov F.I., Kiselev O.I. *Interferons and their inducers (from molecules to medicine) (Interferony i ih induktory (ot molekuly do lekarstv)).* Moscow: GEOTAR-Media; 2005]. (in Russian)
19. Chentoufi A.A., Kritzer E., Tran M.V., Dasgupta G., Lim C.H., Yu D.C. et al. The herpes simplex virus 1 latency-associated transcript promotes functional exhaustion of virus-specific CD8+ T cells in latently infected trigeminal ganglia: a novel immune evasion mechanism. *J. Virol.* 2011; 85 (17): 9127–38.
20. Chentoufi A.A., Dervillez X., Dasgupta G., Nguyen C., Kabbara K.W., Jiang X. et al. The herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript inhibits phenotypic and functional maturation of dendritic cells. *Viral Immunol.* 2012; 25 (3): 204–15.
21. Li Liang and Bernard Roizman Expression of Gamma Interferon-Dependent Genes Is Blocked Independently by Virion Host Shutoff RNase and by US3 Protein Kinase. *J. Virol.* 2008; 82(10): 4688–96.
22. Posavad C.M., Remington M., Mueller D.E., Zhao L., Magaret A.S., Wald A. et al. Detailed characterization of T cell responses to herpes simplex virus-2 in immune seronegative persons. *J. Immunol.* 2010; 184 (6): 3250–9.
23. Singh R., Kumar A., Creery W.D., Ruben M., Guiluvi A., Diaz-Mitoma F. Dysregulated expression of IFN-gamma and IL-10 and impaired IFN-gamma-mediated responses at different disease stages in patients with genital herpes simplex virus-2 infection. *Clin. Exp. Immunol.* 2003a; 133: 97–107.
24. Игнатов П.Е. *Иммунитет и инфекция.* М.: Время; 2002. [Ignatov P.E. *Immunity and Infection (Immunitet i infektsiya).* Moscow: Vremya; 2002]. (in Russian)

Поступила 16.01.14

Received 16.01.14

Ерш А.В.¹, Полтавченко А.Г.¹, Пьянков С.А.¹, Агафонов А.П.¹, Кривенчук Н.А.², Буторин Д.В.²

Метод комплексной оценки гуморального иммунитета к детским вакциноуправляемым вирусным инфекциям

¹ФБУН ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, 630559, пос. Кольцово, Новосибирская обл.;
²ЗАО «ИмДи», 630559, пос. Кольцово, Новосибирская обл.

Представлены результаты лабораторных испытаний метода комплексной оценки гуморального иммунитета к краснухе, кори и эпидемическому паротиту на основе мультиплексного дот-иммуноанализа на плоских белковых матрицах (иммуночипах). Показано, что результаты дот-анализа хорошо коррелируют с данными, полученными с использованием коммерческих моноспецифических наборов для иммуноферментного анализа (ИФА). При этом мультиплексный анализ более оперативен и экономичен по сравнению с ИФА и может выполняться во внелабораторных условиях.

Ключевые слова: вирус кори; вирус паротита; вирус краснухи; поствакцинальный иммунитет; мультиплексный дот-иммуноанализ.

Для цитирования: *Вопросы вирусологии*. 2015; 60(1): 41–45.

Ersh A.V.¹, Poltavchenko A.G.¹, Pyankov S.A.¹, Agaphonov A.P.¹, Krivenchuk N.A.², Butorin D.V.²

The multiplex method of estimation of humoral immunity to vaccine regulated childhood infections

¹ State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 630559, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia; ²ImDi Ltd., 630559, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia

The goal of this work was to present the results of the laboratory tests of the multiplex dot immunoassay method using protein microarray for complex estimation of humoral immunity to measles, mumps, and rubella viruses. It was shown that the obtained results were in a good agreement with data of commercial monospecific ELISA kits. The developed method is fast, requires fewer resources, and may be used in the field.

Key words: *measles virus; mumps virus; rubella virus; vaccinal immunity; multiplex dot-immunoassay.*

Citation: *Voprosy virusologii*. 2015; 60(1): 41–45. (In Russ.)

Среди болезней, управляемых средствами активной иммунизации, видное место занимают корь, краснуха и эпидемический паротит. Эти болезни относятся к вирусным антропонозным инфекциям с одинаковым путем передачи и сходной контагиозностью. Традиционно они считаются детскими инфекциями, однако в последнее время все чаще этим заболеваниям подвергается и взрослое население. Плановая и масштабная вакцинопрофилактика привела к существенному снижению показателей заболеваемости этими инфекциями. Особенно значительные успехи достигнуты за последнее десятилетие, что позволило в отдельных регионах мира прогнозировать ликвидацию этих болезней. В Российской Федерации действуют национальные проекты по снижению и элиминации этих инфекций, в результате реализации которых к 2009 г. удалось значительно снизить заболеваемость детского населения краснухой и эпидемическим паротитом, а заболеваемость корью снизилась до спорадических случаев. В 2010 г. в России – первой из стран Европейского региона – начата процедура сертификации территории как свободной от эндемичной (местной) кори [1], однако в 2011 г. в Европейских странах и ряде регионов России эпидемиологическая ситуация по кори осложнилась, отмечен рост заболеваемости краснухой и эпидемическим паротитом, в связи с чем в ряде стран Европы и СНГ 60-я сессия ЕРБ ВОЗ перенесла достижение региональных целей элиминации кори и краснухи с 2010 г. на 2015 г. [2].

Среди причин ухудшения эпидемиологической об-

становки наряду с неполным охватом вакцинацией выделяются недостаточная эффективность применяемых вакцин, нарушение правил обращения с вакцинами и истощение прививочного иммунитета в старших возрастных группах [1]. Вследствие этих причин, несмотря на массовые прививки, значительная часть населения не обладает защитным иммунитетом и нуждается в дополнительной вакцинации. Выявление таких лиц может быть произведено путем серологического обследования. В настоящее время для серологического обследования наиболее широко применяется иммуноферментный анализ (ИФА). В России для диагностики кори, эпидемического паротита и краснухи доступны моноспецифические отечественные и зарубежные ИФА-наборы, отвечающие современным требованиям, однако выполнение ИФА требует специального оборудования и персонала с навыками работы, а для анализа необходимы образцы плазмы или сыворотки крови, полученной из вены. Кроме того, стоимость анализа единичных образцов или небольших по количеству серий сывороток достаточно высока и становится экономически целесообразной только при массовых обследованиях, а результаты разных анализов трудно свести в единую систему для формирования персональных иммунологических профилей.

Ранее мы сообщали о разработке мультиплексного (многопрофильного) теста для одновременного выявления антител к восьми возбудителям перинатальных инфекций [3–6]. Тест, основанный на дот-иммуноанализе на плоских белковых матрицах (иммуночипах), может

выполняться во внелабораторных условиях, а также более оперативен и экономичен по сравнению с ИФА. В настоящей работе представлены результаты лабораторных испытаний аналогичного экспериментального теста для комплексной оценки гуморального иммунитета к краснухе, кори и эпидемическому паротиту.

Материалы и методы

Материалы. В работе использовали: трис-НСI, твин-20, казеин, азид натрия, протеин А *Staphylococcus aureus* (SpA) («Sigma», США); химические реактивы отечественного производства с квалификацией не ниже чда.

Вирусные антигены. Антиген вируса краснухи, представлен композицией рекомбинантных белков E1, E2 и С производства фирмы «Капель» (Москва). Антиген вируса кори [7] получали из штамма НовО/96 вируса кори, а антиген вируса паротита [8] – из штамма Драгун вируса эпидемического паротита, депонированных в коллекции культур микроорганизмов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Вирусы культивировали на монослой клеток Vero с последующей очисткой и концентрированием в градиенте плотности сахарозы, а также инактивацией вирусной активности прогреванием в течение 1 ч при 56°C.

Сыворотки. В работе использовали рабочую панель из донорских сывороток, предоставленную ЗАО «ИмДи», а также калибровочные образцы из наборов «ВекторКорь-IgG» и «ВекторРубелла-IgG» производства ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск).

Дот-иммуноанализ. Набор для комплексной оценки гуморального иммунитета к вирусам краснухи, кори и паротита рассчитан на 20 мультиплексных анализов. Он включал в себя 4 блока по 5 белковых матриц и 4 многоячеечные аналитические ванны, заполненные рабочими растворами и герметизированные фольгой. Технические детали изготовления набора аналогичны описанным в предыдущих публикациях [3–6]. Общий вид набора и

схема нанесения антигенов и контролей на иммуночип приведены на рис. 1.

Дот-анализ образцов сыворотки (5 мкл) или цельной крови (10 мкл) проводили в аналитических ваннах с применением коллоидного золота (20 нм), связанного с белком А *Staphylococcus aureus* (Au-SpA), с усилением (физическим проявителем) и стабилизацией (щелочным раствором тиомочевины) оптического сигнала. Принципиальная схема анализа и время, необходимое для выполнения его отдельных этапов, приведены на рис. 2.

После анализа иммуночипы подсушивали на воздухе и визуально учитывали результаты по наличию или отсутствию темных пятен в местах нанесения соответствующих антигенов. После этого изображение иммуночипов оцифровывали с использованием планшетного сканера и анализировали с применением специально разработанной компьютерной программы. Эта программа позволяет определять оптическую плотность в каждой зоне нанесения антигена и выражать ее в процентах диапазона от положительного контроля – IgG человека ($K+ = 100\%$) до отрицательного контроля – зоны свободной от антигенов ($K- = 0\%$), а также задавать отсекаемые значения – ОП_{крит}, определенные предварительно по панели отрицательных сывороток, и выдавать на печать протокол исследования. Корреляционный анализ выполняли с помощью программы Excel.

Иммуноферментный анализ. В качестве тестов сравнения при оценке показателей многопрофильного анализа использовали коммерческие наборы для ИФА: «ВекторКорь-IgG», «ВекторПаротит-IgG» и «ВекторРубелла-IgG» производства ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск); «Корь-IgG-ДС», «Мелиса Паротит-IgG» и «Мелиса Краснуха-IgG» производства ЗАО «МБС» (Новосибирск); «Корь-IgG-антитела», «Паротит-IgG-антитела» и «Краснуха-IgG-антитела» производства ООО «ИмДи-спектр» (Новосибирск). ИФА выполняли в

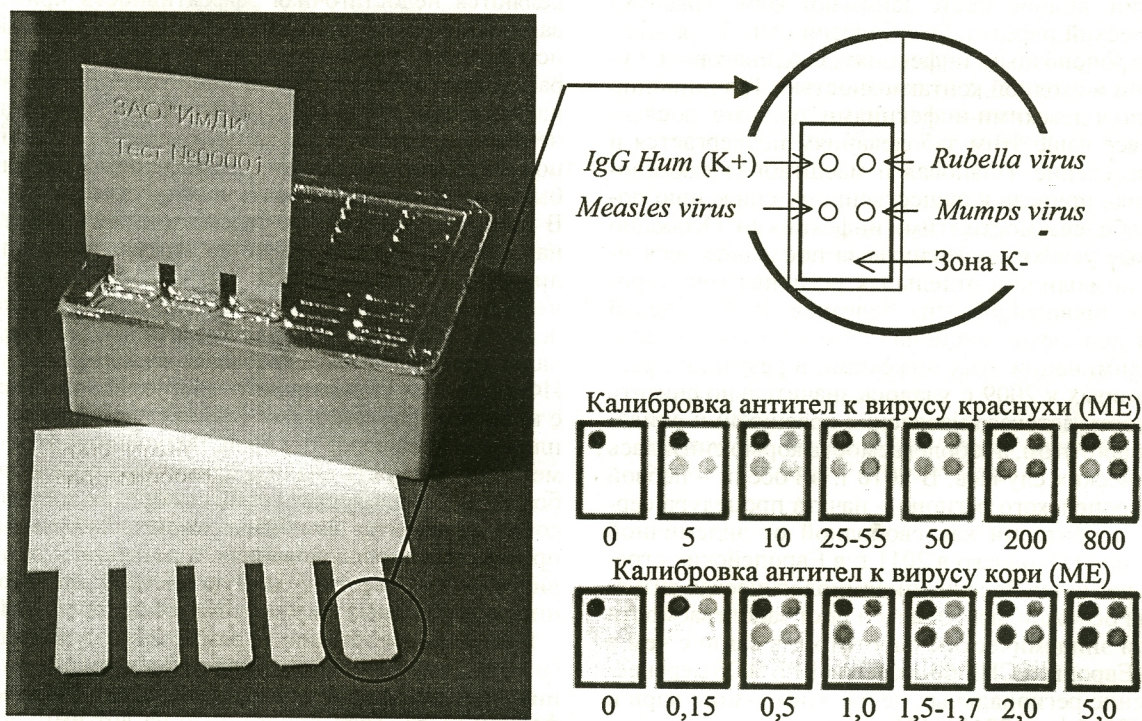


Рис. 1. Общий вид теста для комплексной оценки гуморального иммунитета к вирусам краснухи, кори и эпидемического паротита; схема нанесения антигенов на иммуночип; а также результаты определения чувствительности дот-иммуноанализа с использованием калибровочных образцов антител класса G к вирусам краснухи и кори из соответствующих наборов для ИФА, производства ЗАО «Вектор-Бест». Цифры под иммуночипами обозначают содержание (в МЕ) специфических антител в образце.

Результаты определения содержания антител класса G к вирусам кори, паротита и краснухи в образцах панели сывороток с применением моноспецифических наборов для ИФА и многопрофильного dot-анализа

№ образца	КОРЬ				ПАРОТИТ				КРАСНУХА			
	"ИмДи-спектр"	"МБС"	"Вектор-Бест"	иммуно-чип	"ИмДи-спектр"	"МБС"	"Вектор-Бест"	иммуно-чип	"ИмДи-спектр"	"МБС"	"Вектор-Бест"	иммуно-чип
1	0,088	0,065	0,078	6,0	0,073	0,142	0,086	3,3	> 2	0,669	> 2	67,0
2	0,087	0,082	0,120	25,0	0,081	0,148	0,194	2,6	> 2	1,214	> 2	83,0
3	0,112	0,262	0,237	16,0	0,079	0,167	0,123	11,0	> 2	0,753	> 2	57,0
4	0,096	0,099	0,279	8,8	0,095	0,186	0,083	1,2	0,263	0,218	0,489	16,0
5	0,087	0,079	0,128	7,2	0,073	0,172	0,112	5,5	> 2	1,105	> 2	49,0
6	0,977	1,808	> 2	68,0	1,539	1,268	1,564	85,0	1,839	0,830	> 2	65,0
7	0,114	0,083	0,096	8,8	1,364	1,141	0,987	55,0	> 2	0,566	1,945	45,0
8	1,253	1,235	1,464	50,0	0,761	0,649	0,738	37,0	1,632	0,412	1,929	36,0
9	1,620	1,665	> 2	58,0	0,626	1,180	0,913	51,0	1,444	0,355	0,999	22,0
10	0,218	0,311	0,529	16,0	1,369	1,706	1,720	75,0	> 2	0,854	> 2	55,0
11	0,084	0,173	0,086	1,3	0,108	0,165	0,072	1,0	0,246	0,168	1,539	21,0
12	0,085	0,176	0,129	3,6	0,083	0,145	0,070	4,1	> 2	0,832	> 2	81,0
13	0,091	0,071	0,113	1,0	0,140	0,348	0,483	18,0	0,533	0,103	0,797	30,0
14	0,086	0,071	0,119	6,9	0,110	0,168	0,172	13,0	0,643	0,173	1,274	35,0
15	0,085	0,075	0,095	4,6	0,116	0,143	0,139	3,2	> 2	0,667	> 2	74,0
16	1,909	1,733	1,868	66,0	0,276	0,394	0,441	16,0	> 2	1,365	> 2	82,0
17	0,414	1,246	1,673	49,0	0,106	0,257	0,182	11,0	0,093	0,046	0,089	2,4
18	0,475	1,224	1,024	46,0	0,111	0,164	0,121	9,3	0,249	0,070	0,427	8,2
19	0,095	0,403	0,542	12,0	0,126	0,176	0,149	5,0	0,982	0,268	0,893	21,0
20	0,812	1,591	1,648	59,0	0,408	0,415	0,661	21,0	1,602	0,488	> 2	39,0
21	0,575	1,503	> 2	24,0	0,224	0,372	0,407	8,1	0,843	0,234	0,642	20,0
22	0,540	0,451	0,832	22,0	0,111	0,284	0,258	3,7	1,222	0,424	1,266	45,0
23	0,137	0,317	0,668	34,0	0,113	0,325	0,304	7,8	> 2	0,920	> 2	87,0
24	0,181	0,762	1,112	29,0	0,359	1,308	0,753	19,0	1,484	0,690	1,911	46,0
25	0,715	1,576	> 2	60,0	0,634	> 2	0,698	29,0	1,519	0,729	1,646	49,0
26	0,102	0,191	0,446	7,8	0,130	0,173	0,312	5,7	> 2	0,985	> 2	61,0
27	0,580	1,277	1,999	40,0	0,148	0,611	0,333	14,0	0,446	0,219	0,758	24,0
28	0,661	1,133	1,650	28,0	0,162	0,355	0,291	4,5	0,462	0,191	1,026	34,0
29	1,442	1,822	> 2	47,0	0,160	0,444	0,401	8,1	0,074	0,040	0,079	1,9
30	0,100	0,078	0,230	1,4	0,111	0,187	0,104	0,7	0,072	0,036	0,079	0,4
31	0,276	0,151	0,512	11,0	0,151	0,303	0,369	9,8	0,064	0,041	0,092	0,3
32	0,323	0,467	0,423	13,0	0,742	1,475	0,804	20,0	0,069	0,040	0,082	1,7
33	0,111	0,131	0,357	4,6	0,164	0,209	0,366	4,3	0,099	0,037	0,112	1,0
34	0,269	0,537	0,999	22,0	0,329	1,042	0,582	22,0	0,080	0,042	0,118	0,2
35	0,129	0,139	0,492	4,5	0,230	0,907	0,426	11,4	0,128	0,057	0,081	0,9
36	0,207	0,386	0,121	4,0	0,247	0,499	0,348	1,6	0,215	0,041	0,078	0,5
37	0,569	0,828	1,469	27,0	0,092	0,218	0,080	3,0	> 2	1,645	> 2	54,0
38	0,474	0,878	0,957	25,0	0,101	0,212	0,085	9,0	1,125	0,836	0,639	29,0
39	> 2	> 2	> 2	62,0	0,070	0,112	0,074	4,0	> 2	> 2	> 2	70,0
40	1,671	1,826	1,678	39,0	0,068	0,113	0,077	7,0	0,657	0,438	0,535	26,0
41	0,673	0,997	0,829	30,0	0,556	0,685	0,414	44,0	> 2	> 2	> 2	69,0
42	1,157	0,865	1,936	39,0	0,332	0,429	0,256	26,0	> 2	> 2	> 2	63,0
43	0,633	0,752	1,347	34,0	0,338	0,514	0,499	26,0	1,959	> 2	> 2	89,0
44	0,315	0,412	0,646	24,0	0,274	0,385	0,422	20,0	0,076	0,123	0,159	2,4
45	0,666	0,964	0,809	28,0	0,432	0,574	0,471	26,0	> 2	> 2	> 2	62,0
ОП _{крит}	0,294	0,268	0,318	10,0	0,270	0,351	0,416	15,0	0,270	0,245	0,493	15,0

Калибровочные образцы из соответствующих тест-систем производства ЗАО "Вектор-Бест"

Анти-тела к вирусу кори, МЕ	МЕ	БЕСТ	Чип	Антитела к вирусу краснухи, МЕ	МЕ	БЕСТ	Чип
	5	> 2	98,3		800	> 2	72,0
	2	1,317	97,0		200	> 2	63,0
	1,5-1,7	1,280	98,0		50	1,595	54,0
	1	0,906	57,0		25-55	1,176	26,0
	0,5	0,600	20,0		10	0,493	20,0
	0,15	0,218	5,6		5	Н.о.	19,0
	0	0,098	0,8		0	0,072	0,2

Примечание. Приведены оптические сигналы (ОП₄₅₀), полученные при анализе образцов с использованием моноспецифических наборов ООО «ИмДи-спектр», ЗАО «МБС» и ЗАО «Вектор-Бест», а также оптические сигналы (в отн. ед. доли положительного контроля), зарегистрированные с применением иммуночипов. Более темным фоном выделены образцы, положительные по результатам теста. Жирным шрифтом выделены образцы с протективными титрами антител. МЕ – международные единицы. Н.о. – анализ не проводили.

Таблица 2

Коэффициенты корреляции данных табл. 1, полученных с использованием разных наборов для определения антител класса G к вирусам кори, паротита и краснухи

Инфекция	Набор	"ИмДи-спектр"	"МБС"	"Вектор-Бест"	Иммуночип
Корь	"ИмДи"		0,870	0,814	0,808
	"МБС"	0,870		0,926	0,904
	"Вектор-Бест"	0,814	0,926		0,877
Паротит	"ИмДи"		0,818	0,924	0,935
	"МБС"	0,818		0,828	0,722
	"Вектор-Бест"	0,924	0,828		0,902
Краснуха	"ИмДи"		0,801	0,940	0,916
	"МБС"	0,801		0,799	0,814
	"Вектор-Бест"	0,940	0,799		0,913

соответствии с прилагаемыми инструкциями. Результаты регистрировали на сканирующем спектрофотометре «Multiscan 310С» («Titerteck», Финляндия) при λ 450 нм.

Результаты и обсуждение

Сравнение эффективности выявления антител класса G к вирусам краснухи, кори и паротита с применением моноспецифических наборов для ИФА и многопрофильного дот-иммуноанализа проводили на рабочей панели сывороток, предоставленной ЗАО «ИмДи», а оценку лимита определения – на серии калибровочных образцов из соответствующих ИФА тест-систем. Результаты сравнительного исследования приведены в табл. 1.

Видно, что использованные наборы по-разному классифицируют на положительные и отрицательные некоторые образцы панели. Так, при анализе 45 проб сывороток панели наборы ООО «ИмДи-спектр», ЗАО «МБС», ЗАО «Вектор-Бест» и наш многопрофильный тест относят к положительным образцам: по содержанию антител к вирусу кори – № 23, 29, 32 и 31, по содержанию антител к паротиту – № 16, 22, 16 и 17, а по наличию антител к вирусу краснухи – № 32, 27, 33 и 34 соответственно.

Следует отметить, что основные разночтения образцов перечисленными наборами установлены при анализе проб сывороток с низким содержанием определяемых антител.

Результаты, полученные с использованием этих наборов, существенно различаются и по величине оптических сигналов на одинаковых образцах панели. Вероятно, это связано с различиями в антигенных композициях и/или в технологических приемах изготовления наборов, применяемых производителями. Данные корреляционного анализа оптических сигналов приведены в табл. 2. Корреляция результатов, полученных с применением иммуночипов, и данных, зарегистрированных тремя наборами для ИФА, сопоставима по своему значению с корреляцией данных между этими ИФА-наборами. При этом лучшее совпадение значений оптической плотности дот-анализа антител к паротиту и краснухе наблюдается с результатами, полученными с использованием наборов ООО «ИмДи-спектр», изготовленных с применением таких же антигенов.

Задачей оценки поствакцинального гуморального иммунитета является не только констатация наличия или отсутствия антител к инфекционному агенту, но и определение их уровня, достаточного для защиты от заболевания. Доступные в литературе данные относительно минимальных протективных уровней антител неоднозначны. Так, для краснухи этот уровень варьирует от 10 МЕ/мл [9] до 25 МЕ/мл [10], а для кори – от 0,2 МЕ/мл [11] до 0,5 МЕ/мл [12]. Вероятно, такая неоднозначность связана с различиями подходов авторов к комплексной оценке гуморальных и клеточных факторов иммунитета. Ряд наборов для ИФА-антител к вирусам краснухи и кори содержит калибровочные образцы с определенным содержанием специфических антител. Такие образцы из наборов ЗАО «Вектор-Бест» мы использовали для калибровки многопрофильного теста. Результаты приведены в нижней части таблицы 1, а вид иммуночипов после калибровки показан на рис. 1. Образцы с содержанием антител к вирусам кори и краснухи, превышающим протективные уровни (0,5 МЕ/мл для кори и 10 МЕ/мл для краснухи), выделены в табл. 1 жирным шрифтом. Видно, что результаты по определению защитных уровней

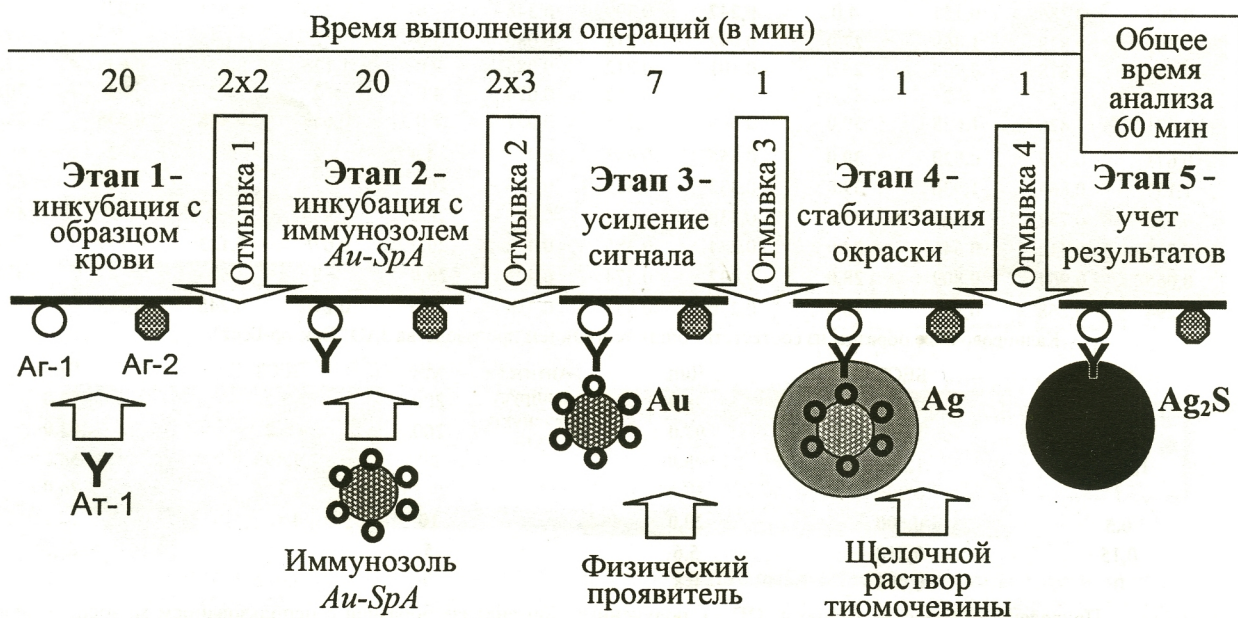


Рис. 2. Общая схема многопрофильного дот-иммуноанализа антител с применением иммунозоля золота, усилением сигнала физическим проявлением и стабилизацией окраски щелочным раствором тиомочевины.

антител при использовании наборов ЗАО «Вектор-Бест» и многопрофильным дот-анализом совпадают, за исключением образца № 2, определенного нашим тестом как сыворотка с протективным уровнем антител к вирусу кори, но отрицательного по этому показателю в других использованных тест-системах. На иммуночипах оптические сигналы от сывороток с протективными уровнями антител выглядят как отчетливо различимые невооруженным глазом темные пятна в местах нанесения соответствующих антигенов (см. рис. 1). Таким образом, учет результатов анализа таких образцов может легко и надежно осуществляться визуально.

В отношении эпидемического паротита достоверных сведений о защитных уровнях антител в литературе нам найти не удалось. В такой ситуации при оценке наличия защитного иммунитета, вероятно, следует ориентироваться просто на наличие специфических антител без количественного учета их содержания. Такие образцы, положительные по антителам к вирусу паротита, в табл. 1 также выделены жирным шрифтом.

Приведенные выше данные свидетельствуют о возможности использования мультиплексного набора для комплексной оценки поствакцинального иммунитета. При этом многопрофильный тест может значительно облегчить осуществление серомониторинга. Он не требует оборудования и энергообеспечения, поэтому может выполняться в сельских больницах, в отдаленных районах, где количество подлежащих обследованию невелико, а аппаратное обеспечение не позволяет провести ИФА-диагностику. По предварительным данным (ограниченное число экспериментов), для проведения этого теста можно использовать 10 мкл цельной крови, которую легко можно получить проколом пальца. Это обстоятельство особенно важно в педиатрической практике, поскольку у малолетних детей взятие даже 5 мл крови из вены считается значительной кровопотерей. По себестоимости комплексный тест незначительно превышает одно исследование в моноспецифическом ИФА. Таким образом, многопрофильный тест может служить инструментом для контроля коллективного и индивидуального иммунитета с целью коррекции мероприятий по борьбе с детскими вакциноуправляемыми инфекциями.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 12.04.2010 № 23 «О реализации Программы ликвидации кори в Российской Федерации к 2010 году в рамках стратегического плана Европейского региона ВОЗ 2005–2010.* Available at: <http://base.garant.ru/12178062>.
2. *Обновленная приверженность достижению к 2015 г. целей ликвидации кори и краснухи и профилактики синдрома врожденной краснухи и устойчивое поддержание свободного от полиомиелита статуса в Европейском регионе ВОЗ. Резолюция 60-й сессии Европейского регионального комитета ВОЗ. Москва, 13–16 сентября 2010 г.* Available at: <http://www.EUR/RC60/R12>.
3. Полтавченко А.Г., Яковченко А.М., Кривенчук Н.А., Зайцев Б.Н. Многопрофильная серодиагностика инфекционных заболеваний. 1. Выбор формата белковых чипов и материала для изготовления подложки. *Биотехнология.* 2006; 5: 77–87.
4. Полтавченко А.Г., Яковченко А.М., Кривенчук Н.А. Многопрофильная серодиагностика инфекционных заболеваний. 2. Иммуобилизация антигенов на подложке белкового чипа. *Биотехнология.* 2007; 1: 86–94.
5. Полтавченко А.Г., Яковченко А.М., Кривенчук Н.А., Карпышев Н.Н. Многопрофильная серодиагностика инфекционных заболеваний. 3. Визуализация результатов анализа. *Биотехнология.* 2007; 2: 63–71.
6. Полтавченко А.Г., Яковченко А.М. Многопрофильная серодиагностика инфекционных заболеваний. 4. Лабораторные испыта-

- ния многопрофильного теста. *Биотехнология.* 2007; 3: 88–94.
7. Пьянков С.А., Агафонов А.П., Лебедев Л.Р. и др. *Комплексный антиген вируса кори, используемый в качестве компонента иммуноферментной тест-системы для диагностики антител к вирусу кори.* Патент РФ, № 2441666; 2011.
8. Агафонов А.П., Пьянков С.А., Дутов В.Н. *Штамм вируса паротита Драгун для получения антигена – компонента тест-системы и иммуноферментная тест-система для диагностики антител к вирусу паротита.* Патент РФ № 2348691; 2010.
9. Юминова Н.В. Диагностика краснухи в Российской Федерации. *Вакцинация. Новости вакцинопрофилактики.* 2004; 6: 18–22.
10. *Постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 28 июля 2011 г. № 108 «Об утверждении СП 3.1.2952–11 «Профилактика кори, краснухи и эпидемического паротита.* Available at: <http://bazazakonov.ru/doc/?ID=2866674>.
11. Arguelles M.H., Orellana M.L., Castello A.A., Villegas G.A., Masini M., Vera O.D. et al. Measles virus-specific antibody levels in individuals in Argentina WHO received a one-dose vaccine. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44: 2733–8.
12. Bouche F., Ammerlaan W., Berthet F., Houard S., Schneider F., Muller C.P. Immunosorbent assay based on recombinant hemagglutinin protein produced in a high-efficiency mammalian expression system for surveillance of measles immunity. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36: 721–6.

REFERENCES

1. *Resolution of the Chief State Sanitary Doctor of the Russian Federation dated April 12, 2010 No. 23 «On the implementation of the measles elimination program of in Russian Federation by 2010 as part of the strategic plan for the WHO European Region 2005–2010».* Available at: <http://base.garant.ru/12178062>.
2. *Renewed commitment to elimination of measles and rubella and prevention of congenital rubella syndrome by 2015 and Sustained support for polio-free status in the WHO European Region. Resolution of Sixtieth session WHO Regional Committee for Europe. Moscow, 13–16 September 2010.* Available at: <http://www.EUR/RC60/R12>
3. Poltavchenko A.G., Yakovchenko A.M., Krivenchuk N.A., Zaitsev B.N. Multiplexed serodiagnostics of infectious diseases. 1. Selection of the format of protein microarrays and the substrate material. *Biotechnologiya.* 2006; 5: 77–87. (in Russian)
4. Poltavchenko A.G., Yakovchenko A.M., Krivenchuk N.A. Multiplexed serodiagnostics of infectious diseases. 2. Immobilization of antigens on a protein microarray substrate. *Biotechnologiya.* 2007; 1: 77–87. (in Russian)
5. Poltavchenko A.G., Yakovchenko A.M., Krivenchuk N.A., Karpyshchev N.N. Multiplexed serodiagnostics of infectious diseases. 3. Visualization of the assay results. *Biotechnologiya.* 2007; 2: 63–71. (in Russian)
6. Poltavchenko A.G., Yakovchenko A.M. Multiplexed serodiagnostics of infectious diseases 4. Laboratory trials of the multiplexed test prototype. *Biotechnologiya.* 2007; 3: 88–94. (in Russian)
7. Pyankov S.A., Agaphonov A.P., Lebedev L.P. et al. *Combined antigen of Measles virus used as component ELISA-system for diagnostic of antibodies to Measles virus.* Patent RF, № 2441666; 2011 (in Russian)
8. Agaphonov A.P., Pyankov S.A., Dutov V.N. *Strain of Mumps virus Dragun for production of antigen – component ELISA-system for diagnostic of antibodies to Mumps virus.* Patent RF, № 2348691; 2010. (in Russian)
9. Yuminova N.V. Diagnostic of Rubella in Russian Federation. *Vaccinatsiya. Novosti vaksino profilaktiki.* 2004; 6: 18–22. (in Russian)
10. *Resolution of the Chief State Sanitary Doctor of the Russian Federation dated July 28, 2011 No. 108 «On approval of SR 3.1.2952–11 «Prevention of measles, rubella and mumps».* Available at: <http://bazazakonov.ru/doc/?ID=2866674>.
11. Arguelles M.H., Orellana M.L., Castello A.A., Villegas G.A., Masini M., Vera O.D. et al. Measles virus-specific antibody levels in individuals in Argentina WHO received a one-dose vaccine. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44: 2733–8.
12. Bouche F., Ammerlaan W., Berthet F., Houard S., Schneider F., Muller C.P. Immunosorbent assay based on recombinant hemagglutinin protein produced in a high-efficiency mammalian expression system for surveillance of measles immunity. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36: 721–6.

Поступила 07.10.13
Received 07.10.13

Пирожков А.П.¹, Тимофеев М.А.¹, Борисевич И.В.², Сыромятникова С.И.¹, Шатохина И.В.¹, Пантюхов В.Б.¹,
Ковальчук А.В.¹, Борисевич С.В.¹

Чувствительность и специфичность набора реагентов для выявления антител к вирусу Хунин методом иммуноферментного анализа

¹ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Минобороны России, 141306, г. Сергиев Посад-6; ²ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, 127051, Москва

В статье обсуждаются методические подходы, использованные для определения чувствительности и специфичности набора реагентов для выявления антител к вирусу Хунин методом иммуноферментного анализа (ИФА). Сравнение ИФА и реакции нейтрализации (РН) показало наличие прямой зависимости между уровнем титров антител в сыворотках крови иммунизированных животных, определяемых обоими методами. Полученные результаты позволили сформировать панели положительных и отрицательных сывороток крови для определения чувствительности и специфичности разработанного набора реагентов. Чувствительность набора реагентов при изучении проб сывороток крови иммунизированных морских свинок и кроликов (определяемых в РН как положительные) составила не менее 98%. При изучении проб, которые определяются в РН как сомнительные, чувствительность набора реагентов составила не менее 68% при специфичности 98%.

Ключевые слова: набор реагентов; иммуноферментный анализ; выявление антител; чувствительность; специфичность; аргентинская геморрагическая лихорадка, вирус Хунин.

Для цитирования: Вопросы вирусологии. 2015; 60 (1): 46–49.

Pirozhkov A.P.¹, Timofeev M.A.¹, Borisevich I.V.², Syromiatnikova S.I.¹, Shatokhina I.V.¹, Pantyukhov V.B.¹,
Kovalchuk A.V.¹, Borisevich S.V.¹

Sensitivity and specificity of the elisa kit for the detection of antibodies to Junin virus

¹ Central Scientific Research Institute N. 48, Ministry of Defense of the Russian Federation, 141306, Sergiev Posad, Russia; ² Scientific Center for Expertise of Medical Products, Ministry of Health of the Russian Federation, 127051, Moscow, Russia

The goal of this work was to describe methodological approaches to determination of sensitivity and specificity of the enzyme-linked immunosorbent assay kit (ELISA Kit) for detection of the specific anti-Junin virus (JV) antibody. Comparison of ELISA to plaque reduction neutralization test (PRNT) showed direct relationship between antibody titers in the samples of serum of immunized animals, determined by either PRNT or ELISA methods. The obtained results provided an opportunity to form the panels of positive and negative serum samples to determine the sensitivity and specificity of the ELISA Kit. Sensitivity of the ELISA Kit was at least 98% when studying the samples of serum of immunized guinea pigs and rabbits (determined as positive in PRNT). The sensitivity of the ELISA Kit was at least 68% when studying the samples determined by PRNT as uncertain positive. The specificity was 98%. The specificity of the ELISA Kit was 98%.

Key words: reagent kit; enzyme linked immunosorbent assay; antibody detection; sensitivity; specificity; Argentine hemorrhagic fever; Junin virus.

Citation: *Voprosy virusologii*. 2015; 60(1): 46–49. (In Russ.)

Аргентинская геморрагическая лихорадка (АГЛ) – особо опасная природно-очаговая инфекция, возбудителем которой является вирус Хунин (род *Arenavirus*, семейство *Arenaviridae*). Заболевание характеризуется тяжелым течением с выраженным геморрагическим синдромом, поражением различных органов и высокой летальностью. В среднем летальность при АГЛ составляет от 10 до 20%, количество тяжелых форм заболевания достигает 40% [1–3]. При своевременном введении иммунной плазмы реконвалесцентов в первые 8 сут летальность снижается до 1% [4, 5].

Ареал инфекции находится в Аргентине в местах обитания природных хозяев возбудителя *Calomys musculinus* и *S. lauscha*, у которых инфекция протекает в латентной форме. Инфицирование людей обычно происходит при контакте с зараженными грызунами или аэрогенно при вдыхании инфекционных продуктов выделений

грызунов. Источником инфекции также может быть и больной человек, но вероятность передачи заболевания от больных людей (контагиозность) низкая [6–8]. Заболеваемость АГЛ составляет от 100 до 4000 человек ежегодно. При серологическом обследовании населения в эпидемических очагах количество серопозитивных составляло до 12% [1–3].

Специалистами ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России разработан набор реагентов для выявления антител к вирусу Хунин методом иммуноферментного анализа (ИФА) в сыворотке крови человека, предназначенный для применения в практике мобильных диагностических групп Центра специальной лабораторной диагностики особо опасных и экзотических инфекционных заболеваний [9]. Одним из этапов разработки диагностических наборов реагентов является лабораторно-экспериментальное изучение, в ходе которого оценива-

ют чувствительность и специфичность экспериментальных серий препарата.

В связи с этим целью данной работы было лабораторно-экспериментальное изучение чувствительности и специфичности набора реагентов для выявления антител к вирусу Хунин методом ИФА.

Согласно требованиям Санитарных правил 3.3.2.561–96 и ГОСТ Р ЕН 13612–2010, при клинических испытаниях диагностических препаратов чувствительность разработанных наборов реагентов необходимо оценивать на материале, полученном от лиц (пробандов) опытной группы, а специфичность определять на материале, полученном от лиц контрольных групп. При этом основную группу следует формировать из больных и носителей возбудителя того инфекционного заболевания, для диагностики которого предназначен препарат. Диагноз должен быть подтвержден другими надежными методами исследования. В контрольные группы необходимо включать здоровых людей и лиц с заболеваниями, сходными по клинической картине с заболеванием лиц основной группы. Отсутствие на территории РФ заболеваемости особо опасными аренавирусными инфекциями исключало возможность использования для оценки чувствительности и специфичности набора реагентов материалов от больных АГЛ и схожими заболеваниями. Кроме того, в РФ в настоящее время также отсутствуют зарегистрированные препараты для диагностики АГЛ, что исключало проведение сравнительной оценки чувствительности. Таким образом, для решения поставленной цели необходимо было обосновать методику проведения оценки чувствительности и специфичности и провести лабораторно-экспериментальное изучение серий препарата.

Материалы и методы

Вирусы. В работе использовали штамм ХJ вируса Хунин, депонированный в Национальной коллекции штаммов вирусов геморрагических лихорадок I группы патогенности в ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России. Исходная культура поступила в ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России из Института вирусологии им. Д.И. Ивановского АМН СССР. Эталонная (музейная) культура штамма была приготовлена путем проведения двух пассажей через головной мозг белых мышей-сосунков.

Рабочую культуру вируса Хунин получали путем культивирования в постоянной линии клеток Vero (V) в ферментерах на микроносителе Cytodex-3 по определенной методике [10].

Инактивацию вируса проводили с помощью формалина в конечной концентрации формальдегида 0,0165% по объему. Для получения концентрированного очищенного препарата вируса Хунин использовали метод осаждения с помощью полиэтиленгликоля (ПЭГ) мол. массой 6000 D и метод ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы. К осветленной вирусосодержащей жидкости добавляли 5 N раствор натрия хлорида до конечной концентрации 0,3 N и 50% раствор ПЭГ-6000 до конечной концентрации 7%. Суспензию тщательно перемешивали и оставляли на 18–20 ч при температуре от 2 до 6°C. Выпавший осадок отделяли центрифугированием при 40 000 g в течение 1 ч при температуре от 2 до 6°C. После центрифугирования осадок растирали и добавляли трис-HCl-буфер (рН 7,3). Полученную суспензию осветляли центрифугированием в течение 15 мин при 20 000 g. Надосадочную жидкость наслаивали на линейный градиент 25 – 50% сахарозы и центрифугировали в течение 150 мин при 80 000 g при температуре от 2 до 6°C. Фракцию сахарозы, содержащую антиген вируса Хунин, диализировали против трис-HCl-буфера (рН 7,3) при температуре от 2 до 6°C в течение 24 ч с двукратной сменой раствора.

Для оценки специфичности набора реагентов использовали сыворотки крови морских свинок и кроликов, иммунизированных культурой вируса Ласса, штамм Сьерра-Леоне, который депонирован в Национальной коллекции штаммов вирусов геморрагических лихорадок I группы патогенности в ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России. Исходная культура была получена из музея Института вирусологии им. Д.И. Ивановского.

Животные. Использовали аутобредных морских свинок (масса от 0,2 до 0,3 кг) и кроликов породы шиншилла массой от 2 до 2,5 кг. Животных получали из вивария ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России. Для получения иммунной сыворотки морским свинкам вводили внутрибрюшинно вирусосодержащую культуральную жидкость в дозе 1000 БОЕ. Кроликов иммунизировали троекратно с интервалом 14 сут согласно схеме, представленной ранее [11]. Отбор крови производили на 30-е сутки после инфицирования у выживших животных.

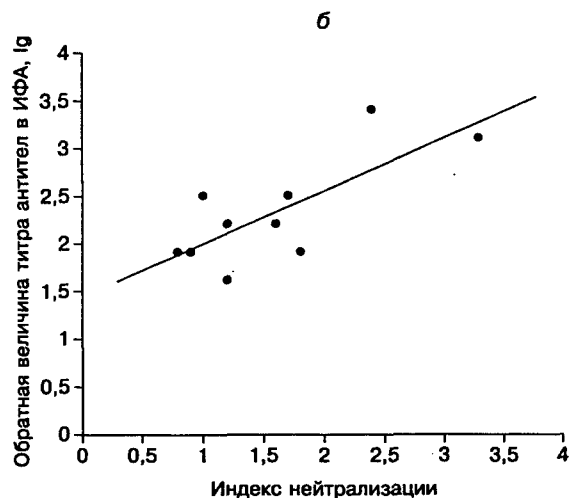
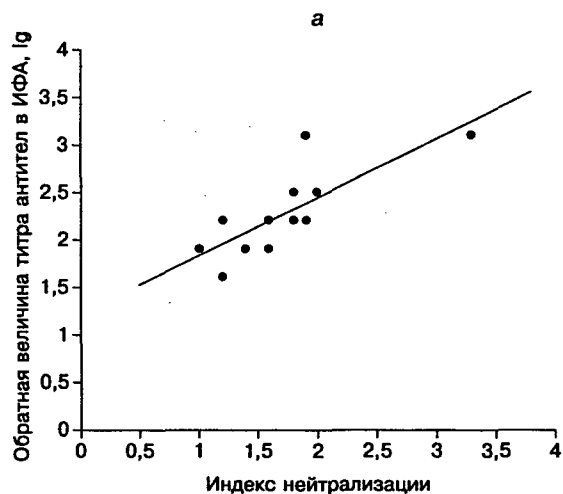
ИФА. Выявление антител проводили с помощью набора реагентов для выявления антител к вирусу Хунин методом иммуноферментного анализа «ИФА-АТ-Хунин» (экспериментальные серии № 01/09, 02/09, 03/09), изготовленного в ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России, согласно инструкции по применению. В качестве конъюгата для выявления специфических антител использовали белок А, конъюгированный с биотином («Sigma», кат. № P 2165), и стрептавидин с пероксидазой хрена («Sigma», кат. № S 5512) в стабилизирующем буферном растворе [12]. Учет результатов анализа проводили на фотометре Multiskan EX фирмы «Labsystems» при длине волны 450 нм. Результаты анализа считали положительными, если среднее значение оптической плотности в лунках с исследуемым образцом превышало значение оптической плотности в лунках с отрицательным контролем на 0,2 [13].

Реакция нейтрализации. Реакцию нейтрализации проводили с использованием постоянной культуры клеток GMK-AN-1(D) методом подавления бляшкообразования под агаром [14]. Расчет биологической активности вируса Хунин при титровании на культуре клеток проводили по методике Кербера в модификации И.П. Ашмарина [15]. Нейтрализующую способность сыворотки выражали в виде индекса нейтрализации (в случае использования разных разведений вируса и одного разведения сыворотки) и в виде титра вируснейтрализующих антител (при использовании разных разведений сыворотки и одного разведения вируса). Индекс нейтрализации (максимальное количество вируса, которое может быть нейтрализовано сывороткой) от 0 до 1,0 расценивался как отрицательный, от 1,0 до 1,7 – как сомнительный и выше 1,7 – как положительный [16].

Результаты и обсуждение

В ходе исследований проведена оценка возможности сравнения чувствительности разработанного набора реагентов и реакции нейтрализации. На первом этапе исследований необходимо было подтвердить наличие прямой зависимости между уровнем титра антител в ИФА и нейтрализующей способностью сывороток крови иммунизированных животных. Были изучены сыворотки крови кроликов и морских свинок, результаты исследования представлены на рисунке. Установлено, что между уровнем титров антител в ИФА и индексом нейтрализации в реакции нейтрализации существует прямая зависимость. Коэффициент корреляции при изучении сывороток крови иммунизированных кроликов и морских свинок составил 0,78 и 0,75 соответственно.

Полученные результаты позволили провести сравнительную оценку чувствительности реакции нейтрализа-



Зависимость между титром антител в ИФА и индексом нейтрализации сывороток крови иммунизированных вирусом Хунин кроликов (а) и морских свинок (б).

ции и разработанного набора реагентов для выявления антител к вирусу Хунин методом ИФА при качественном анализе сывороток крови лабораторных животных на наличие вирусспецифических антител (табл. 1).

Представленные в табл. 1 данные свидетельствуют о том, что разработанный набор реагентов для выявления антител к вирусу Хунин методом ИФА обладает более высокой чувствительностью по сравнению с реакцией нейтрализации.

Следовательно, в результате проведенных исследований установлено, что для оценки чувствительности разработанного набора реагентов можно использовать пробы сыворотки крови, содержание специфических антител в которых подтверждено реакцией нейтрализации. Поэтому на следующем этапе работы были отобраны пробы сыворотки крови у лабораторных животных, в которых были выявлены вируснейтрализующие антитела. При создании панели сывороток был использован подход, описанный ранее [17], в основе которого лежит принцип использования двух групп сывороток с низким и высоким уровнем специфических антител. Для каждого вида животных были сформированы по две опытные группы сывороток крови, одна с индексом нейтрализации более 1,7, а другая – от 1,0 до 1,7. Общее количество проб каждой группы доводили до 50 путем смешивания сывороток. При выявлении антител в сыворотке крови инфицированных животных также были исследованы другие показатели диагностической эффективности набора реагентов, одним из которых являлась специ-

фичность. Для изучения данного показателя, помимо опытной группы проб (состоящих из заведомо положительных сывороток), была сформирована контрольная группа проб, состоящая из сывороток крови животных, инфицированных возбудителем того же семейства, – аренавирусом Ласса. Индекс нейтрализации сывороток контрольной группы составлял от 1,7 до 2,0. Результаты изучения диагностической эффективности набора реагентов, представленные в табл. 2, позволяют сделать вывод о том, что при изучении заведомо положительных проб с высоким уровнем специфических антител (индекс нейтрализации более 1,7) набор реагентов обладает чувствительностью (отношение количества положительных результатов в опытной группе к общему количеству проб в этой группе) не менее 98%. При изучении положительных проб с низким уровнем специфических антител (индекс нейтрализации от 1,0 до 1,7) чувствительность составила не менее 68%. Специфичность набора реагентов, которая представляла собой отношение количества отрицательных результатов в контрольной группе к общему количеству проб в этой группе, составила не менее 98%. Ожидаемая ценность положительного результата (отношение количества положительных результатов в обеих опытных группах к общему количеству положительных результатов) составила

Таблица 1
Сравнительная оценка чувствительности набора реагентов для выявления антител к вирусу Хунин в ИФА и реакции нейтрализации

Лабораторное животное	Число проб сыворотки крови	Доля положительных результатов (в %) при использовании			
		набора реагентов серии №			реакции нейтрализации
		1	2	3	
Морская свинка	10	90,0	80,0	80,0	40
Кролик	12	91,6	83,3	91,6	50

Примечание. Все пробы, положительные в реакции нейтрализации, давали также положительную реакцию в ИФА.

Таблица 2
Диагностическая эффективность набора реагентов при исследовании проб сыворотки крови инфицированных морских свинок и кроликов

Лабораторное животное	Исследуемые пробы	Индекс нейтрализации проб	Результат ИФА	
			положительный	отрицательный
Морская свинка	Опытные	1,7–2,0	49	1
		1,0–1,7	38	12
	Контрольные	1,7–2,0	0	50
Кролик	Опытные	1,7–3,0	50	0
		1,0–1,7	34	16
		1,7–2,0	1	49

Примечание. Индекс нейтрализации для основной группы установлен в реакции нейтрализации с культурой штамма ХJ вируса Хунин, для контрольной группы проб – с культурой штамма Сьерра-Леоне вируса Ласса.

не менее 99%, отрицательного (отношение количества отрицательных результатов в контрольной группе к общему количеству отрицательных результатов) не менее 75%.

Заключение

Проведено лабораторно-экспериментальное изучение чувствительности и специфичности набора реагентов для выявления антител к вирусу Хунин методом ИФА.

Разработаны методические подходы к способу определения чувствительности набора реагентов для выявления антител к аренавирусу I группы патогенности Хунин. Установлено, что титры антител в ИФА, которые выявляются в сыворотках иммунизированных лабораторных животных с помощью разработанного набора реагентов, находятся в прямой корреляции с индексом нейтрализации. При этом набор реагентов для выявления антител к вирусу Хунин методом ИФА обладает более высокой чувствительностью по сравнению с реакцией нейтрализации.

Чувствительность набора реагентов для выявления антител к вирусу Хунин методом ИФА при изучении проб сывороток крови иммунизированных морских свинок и кроликов, определяемых в реакции нейтрализации как положительные, составила не менее 98%. При изучении проб, которые определяются в реакции нейтрализации как сомнительные, чувствительность набора реагентов составила не менее 68%. Специфичность набора реагентов при изучении проб сывороток крови морских свинок и кроликов, иммунизированных вирусом Ласса, составила не менее 98%.

ЛИТЕРАТУРА

1. De Bracco M.E., Rimoldi M.T. Argentine hemorrhagic fever. *Journal of Medicine*. 1970; 299 (5): 216–21.
2. Maiztegui J.I. Clinical and epidemiological patterns of Argentine haemorrhagic fever. *Bulletin of The World Health Organization*. 1975; 52 (4–6): 567–75.
3. Peters C.J. Arenaviruses. In: Richman D.D., Whitley R.J., Hayden F.G., eds. *Clinical Virology*, 2nd ed. Washington: ASM Press; 2002: 949–69.
4. Enria D.A., Briggiler A.M., Fernandez N.J. Importance of dose of neutralising antibodies in treatment of Argentine haemorrhagic fever with immune plasma. *Lancet*. 1984; 8397: 255–6.
5. Maiztegui J.I., Fernandez N.J., de Damilano A.J. Efficacy of immune plasma in treatment of Argentine haemorrhagic fever and association between treatment and a late neurological syndrome. *Lancet*. 1979; 324 (8154): 1216–7.
6. Strickland T.G., Mills J.N., McKee Jr K.T. South American Hemorrhagic Fevers. *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases*. 2000; 31 (3): 279–81.
7. Childs J.E., Peters C.J. Ecology and epidemiology of arenaviruses and their hosts. In: Saivato M.S., eds. *The Arenaviridae*. Plenum. New York; 1993: 331–73.
8. Bowen M.D., Peters C.J., Nichol S.T. Phylogenetic analysis of the Arenaviridae: Patterns of virus evolution and evidence for cospeciation between arenaviruses and their rodent hosts. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 1997; 8: 301–16.
9. Онщенко Г.Г., Васильев Н.Т., Максимов В.А., Борисевич И.В., Марков В.И. Центр специальной лабораторной диагностики и лечения особо опасных и экзотических инфекционных заболеваний в системе противоэпидемической защиты территории Российской Федерации. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2001; 6: 114–5.
10. Борисевич И.В., Михайлов В.В., Потрываева Н.В., Малинкин Ю.Н., Кириллов А.П., Краснянский В.П. и др. Разработка иммуноферментной тест-системы для определения антигена вируса Эбола. *Вопросы вирусологии*. 1996; 41 (5): 232–4.
11. Орлова С.В., Годнева А.Т., Игнат'ев Г.М. Иммунизация кроликов вирусом Ласса. *Вопросы вирусологии*. 1990; 35 (1): 59–61.
12. Пирожков А.П., Борисевич И.В., Снеткова О.Ю., Андрюшук И.А., Сыромятникова С.И., Хмелев А.Л. и др. Стабилизация пероксидазных конъюгатов иммуноферментных наборов реагентов для выявления антигенов вирусов Эбола и Марбург. *Вопросы вирусологии*. 2010; 55 (1): 45–8.
13. Пирожков А.П., Борисевич И.В., Хмелев А.Л., Снеткова О.Ю.,

- Марков В.И., Максимов В.А. и др. Разработка иммуноферментных тест-систем для диагностики особо опасных геморрагических лихорадок. *Биотехнология*. 2009; 4: 91–5.
14. Хмелев А.Л., Борисевич И.В., Пантюхов В.Б., Пирожков А.П., Сыромятникова С.И., Шагокина И.В. и др. Использование морских свинок для оценки эффективности гетерологичного иммуноглобулина против Боливийской геморрагической лихорадки. *Вопросы вирусологии*. 2009; 54 (4): 42–4.
 15. Ашмарин И.П., Вороб'ев А.А. *Статистические методы в микробиологических исследованиях*. Л.: Гос. изд. мед. лит.; 1962.
 16. Здродовский П.Ф., Соколов М.И., ред. *Руководство по лабораторной диагностике вирусных и риккетсиозных болезней*. М.; 1965.
 17. Канаев А.Н., Воробьева М.С., Шалунова И.В., Перебоева Л.А., Максютов А.З., Киселев Н.Н. и др. Конструирование стандартных панелей сывороток с нормированным уровнем IgG-антител. *Вопросы вирусологии*. 1996; 4: 161–6.

REFERENCES

1. De Bracco M.E., Rimoldi M.T. Argentine hemorrhagic fever. *Journal of Medicine*. 1970; 299 (5): 216–21.
2. Maiztegui J.I. Clinical and epidemiological patterns of Argentine haemorrhagic fever. *Bulletin of The World Health Organization*. 1975; 52 (4–6): 567–75.
3. Peters C.J. Arenaviruses. In: Richman D.D., Whitley R.J., Hayden F.G., eds. *Clinical Virology*, 2nd ed. Washington: ASM Press; 2002: 949–69.
4. Enria D.A., Briggiler A.M., Fernandez N.J. Importance of dose of neutralising antibodies in treatment of Argentine haemorrhagic fever with immune plasma. *Lancet*. 1984; 8397: 255–6.
5. Maiztegui J.I., Fernandez N.J., de Damilano A.J. Efficacy of immune plasma in treatment of Argentine haemorrhagic fever and association between treatment and a late neurological syndrome. *Lancet*. 1979; 324 (8154): 1216–7.
6. Strickland T.G., Mills J.N., McKee Jr K.T. South American Hemorrhagic Fevers. *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases*. 2000; 31 (3): 279–81.
7. Childs J.E., Peters C.J. Ecology and epidemiology of arenaviruses and their hosts. In: Saivato M.S., eds. *The Arenaviridae*. Plenum. New York; 1993: 331–73.
8. Bowen M.D., Peters C.J., Nichol S.T. Phylogenetic analysis of the Arenaviridae: Patterns of virus evolution and evidence for cospeciation between arenaviruses and their rodent hosts. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 1997; 8: 301–16.
9. Onishchenko G.G., Vasil'ev N.T., Maksimov V.A., Borisевич I.V., Markov V.I. Center for Special laboratory diagnosis, and treatment of high-risk and exotic infectious diseases in the system of protection of anti-epidemic in the Russian Federation. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii*. 2001; 6: 114–5. (in Russian)
10. Borisевич I.V., Mikhaylov V.V., Potryvaeva N.V., Malinkin Yu.N., Kirillov A.P., Krasnianskii V.P. et al. Development of an enzyme immunoassay test system for the determination of the Ebola virus antigen. *Voprosy virusologii*. 1996; 41 (5): 232–4. (in Russian)
11. Orlova S.V., Godneva A.T., Ignat'ev G.M. Immunization of rabbits with Lassa virus. *Voprosy virusologii*. 1990; 35 (1): 59–61. (in Russian)
12. Pirozhkov A.P., Borisевич I.V., Snetkova O.Yu., Androshchuk I.A., Syromiatnikova S.I., Khmelev A.L. et al. Stabilization of peroxidase conjugate immunoassay reagent kits for the detection of antigens of viruses Ebola and Marburg. *Voprosy virusologii*. 2010; 55 (1): 45–8. (in Russian)
13. Pirozhkov A.P., Borisевич I.V., Khmelev A.L., Snetkova O.Yu., Markov V.I., Maksimov V.A. et al. Development of ELISA test systems for the diagnosis of high-risk of hemorrhagic fever. *Biotechnologiya*. 2009; 4: 91–5. (in Russian)
14. Khmelev A.L., Borisевич I.V., Pantyukhov V.B., Pirozhkov A.P., Syromiatnikova S.I., Shatokhina I.V. et al. The use of guinea pigs to evaluate the effectiveness of heterologous immunoglobulin against Bolivian hemorrhagic fever. *Voprosy virusologii*. 2009; 54 (4): 42–4. (in Russian)
15. Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. *Statistical methods in microbiological studies [Statisticheskie metody v mikrobiologicheskikh issledovaniyakh]*. Leningrad: St. pub. med. lit.; 1962. (in Russian)
16. Zdrodovskiy P.F., Sokolov M.I., eds. *Manual for the laboratory diagnosis of viral and rickettsial diseases [Rukovodstvo po laboratornoy diagnostike virusnykh i rikketsioznykh bolezney]*. M.; 1965. (in Russian)
17. Kanaev A.N., Vorobyeva M.S., Shalunova I.V., Pereboeva L.A., Maksyutov A.Z., Kiselev N.N. et al. Construction of standard panels of sera with a normalized level of IgG-antibody. *Voprosy virusologii*. 1996; 4: 161–6. (in Russian)