

ISSN 0507-4088



Д.И.ИВАНОВСКИЙ

ВОПРОСЫ ВИРУСОЛОГИИ

PROBLEMS OF VIROLOGY

2

Том 60 • 2015



издательство
"МЕДИЦИНА"

www.medlit.ru

Volume 60 • Issue 2 • 2015

**РОССИЙСКАЯ
АКАДЕМИЯ
НАУК**

Журнал "Вопросы вирусологии" представлен в следующих международных информационных-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: info@idm.msk.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 **В. С. Смирнова**

Переводчик **С. К. Чаморовский**

Верстка **Е. М. Архипова**

Сдано в набор 13.01.2015.

Подписано в печать 06.04.2015.

Формат 60 × 88%.

Печать офсетная.

Печ. л. 6,00.

Усл. печ. л. 5,88.

Уч.-изд. л. 6,36.

Заказ 106.

Отпечатано в типографии ООО

"Подольская Периодика",

142110, г. Подольск, ул. Кирова, 15

ISSN 0507-4088. *Вопр. вирусологии.* 2015.

Т. 60. №2 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.

2

Том 60 • 2015

Редакционная коллегия

Главный редактор: ЛЬВОВ Д.К. (д.м.н., проф., академик 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.)

Белюсова 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., академик РАН)

Гурцевич В.Э. (д.м.н., проф.)

Ершов Ф.И. (д.м.н., проф., академик РАН)

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

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

Онищенко Г.Г. (д.м.н., проф., академик 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.л., 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 Л.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)

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, 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 (Ph.D, Beijing, P.R. China)

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

RUSSIAN ACADEMY OF SCIENCES
VOPROSY VIRUSOLOGII
(PROBLEMS OF VIROLOGY)

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

Volume 60 • 2 • 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 Sciences, Professor

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

Members of editorial board:

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

Editorial council

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

Aliper T.I. – Sc.D., Prof. (Moscow)

Anan'ev V.Yu. – MD, PhD (Vladivostok)

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

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

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

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

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

Garbuz Yu.A. – MD (Khabarovsk)

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

Grigor'ev S.N. – MD (Magadan)

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

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

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

Ivanov L.I. – MD (Khabarovsk)

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

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

Lebedev G.B. – MD (Anadyr')

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

Lisitsin E.A. – MD, PhD (Vladimir)

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

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

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

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

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

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

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

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

Reznik V.I. – MD, PhD (Khabarovsk)

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

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

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

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

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

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

Yanovich V.A. – MD, PhD (Birobidzhan)

Yashkulov K.B. – MD, PhD (Elista)

Advisory Board

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

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)

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

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

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

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

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

Golovljova I. – PhD (Tallinn, Estonia)

Goujgoulova G. – PhD (Sofia, Bulgaria)

Hoenen T. – PhD (Hamilton, USA)

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

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

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

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

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

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

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

Oxford J. – DSc. (London, UK)

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

Roggendorf M. – MD (Essen, Germany)

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

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

Tashiro M. – PhD, MD (Tokyo, Japan)

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

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

Vainionpää R. – Docent (Turku, Finland)

Webster R. – PhD, DSc. (Memphis, USA)

Webby R. – PhD (Memphis, USA)

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

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



Izdatel'stvo Meditsina

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Мукомолов С.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., академик РАН; Москва, Россия)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ИНОСТРАННЫЕ ЧЛЕНЫ РЕДАКЦИОННОГО СОВЕТА

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Golovljova I. (PhD; Tallinn, Estonia)

Goujgoulova G. (PhD; Sofia, Bulgaria)

Hoenen T. (PhD; Hamilton, USA)

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

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

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

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

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

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

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

Oxford J. (DSc.; London, UK)

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

Roggendorf M. (MD, Essen, Germany)

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

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

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

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

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

Vainionpää R. (Docent; Turku, Finland)

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

Webby R. (PhD, Memphis, USA)

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

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

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENTS

ОБЗОРЫ

Ершов Ф.И., Наровлянский А.Н. Использование индукторов интерферона при вирусных инфекциях. 5

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Гончарова Е.В., Сенюта Н.Б., Смирнова К.В., Щербак Л.Н., Гурцевич В.Э. Вирус Эпштейна-Барр (ВЭБ) в России: инфицированность населения и анализ вариантов гена *LMP1* у больных ВЭБ-ассоциированными патологиями и здоровых лиц 11

Хисматуллина Н.А., Гулюкин А.М., Гулюкин М.И., Иванов А.В., Сабирова В.В., Южаков А.Г., Александрова Н.М., Самерханов И.И., Алипер Т.И. Два случая гидрофобии в Республике Татарстан: прижизненная и постмортальная лабораторная диагностика 18

Кузнецова С.А., Исакова-Сивак И.Н., Кузнецова В.А., Петухова Г.Д., Лосев И.В., Донина С.А., Руденко Л.Г., Найхин А.Н. Влияние точечных мутаций в генах полимеразного комплекса вируса гриппа A/PR/8/34 (H1N1) на иммунный ответ мышей 25

Селимова Л.М., Серебровская Л.В., Иванова Л.А., Кравченко А.В., Буравцова Е.В. Показатели CD4-клеток и вирусной нагрузки у пациентов, инфицированных вирусом иммунодефицита человека 1-го типа (ВИЧ-1) 31

Шибнев В.А., Гараев Т.М., Финогенова М.П., Калнина Л.Б., Носик Д.Н. Противовирусное действие водных экстрактов березового гриба *Inonotus obliquus* на вирус иммунодефицита человека 35

Михайлов М.И., Мамедов М.К., Дадашева А.Э. Вирусологические показатели повышенной эпидемической опасности у лиц с высоким риском парентерального инфицирования вирусом гепатита С 38

Закутский Н.И., Бальшева В.И., Хухорова И.Ю., Юрков С.Г. Инфекционные и иммуногенные свойства вируса лихорадки долины Рифт в зависимости от уровня пассажей и условий хранения. 41

Бальшева В.И., Прудникова Е.Ю., Гальнбек Т.В., Бальшев В.М. Перевиваемая сублиния клеток A₄C₂/9K и ее использование в исследованиях с вирусом африканской чумы свиней 43

ЮБИЛЕЙ

В. В. Малиновская (к 80-летию со дня рождения). 48

REVIEW

Ershov F. I., Narovlyansky A. N. Usage of interferon inducers during viral infections

ORIGINAL RESEARCH

Goncharova E. V., Senyuta N. B., Smirnova K. V., Shcherbak L. N., Diduk S. V., Gurtsevich V. E. Epstein-Barr virus (EBV) in Russia: infection of the population and analysis of the *LMP1* gene variants in patients with EBV-associated pathologies and healthy individuals

Khismatullina N. A., Gulyukin A. M., Gulyukin M. I., Ivanov A. V., Sabirova V. V., Yuzhakov A. G., Alexandrova N. M., Samerkhanov I. I., Aliper T. I. Two cases of hydrophobia in the Republic of Tatarstan: in vivo and postmortem laboratory diagnosis

Kuznetsova S. A., Isakova-Sivak I. N., Kuznetsova V. A., Petukhova G. D., Losev I. V., Donina S. A., Rudenko L. G., Naikhin A. N. Effect of point mutations in the polymerase genes of the influenza A/PR/8/34 (H1N1) virus on the immune response in a mouse model

Selimova L. M., Serebrovskaya L. V., Ivanova L. A., Kravchenko A. V., Buravtsova E. V. Parameters of the CD4-cell count and viral load in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infected patients

Shibnev V. A., Garaev T. M., Finogenova M. P., Kalnina L. B., Nosik D. N. Antiviral activity of aqueous extracts of the birch fungus *Inonotus obliquus* on the human immunodeficiency virus

Mikhaylov M. I., Mamedov M. K., Dadasheva A. E. Viral indicators of the increased epidemiological hazard of subjects from high risk groups of hepatitis C virus parenteral infection

Zakutskiy N. I., Balysheva V. I., Khukhorova I. Ju., Yurkov S. G. Infectious, immunogenic, and protective characteristics of the Rift Valley fever virus depending on the passage level and storage conditions

Balysheva V. I., Prudnikova E. Yu., Galnbek T. V., Balyshhev V. M. Continuous cell subline A₄C₂/9K and its application to the african swine fever virus study

ANNIVERSARY

V. V. Malinovskaya (on the occasion of his 80th birthday)

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

Ершов Ф.И., Наровлянский А.Н.

Использование индукторов интерферона при вирусных инфекциях

ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи»
Минздрава России, 123098, г. Москва

В результате многолетнего целенаправленного скрининга отечественным исследователям удалось создать группу оригинальных индукторов интерферона (ИИ), имеющих высокий химиотерапевтический индекс и пригодных для профилактики и лечения вирусных инфекций и ряда других заболеваний. Клиническое применение ИИ касается, в первую очередь, широкого круга вирусных инфекций: гриппа и других ОРВИ, герпеса, гепатитов, энцефалитов, бешенства, медленных и смешанных инфекций и др. В обзоре обобщается накопленный к настоящему времени опыт и делается заключение об основных достоинствах ИИ, которые индуцируют сбалансированный синтез не обладающего антигенностью собственного эндогенного интерферона (ИФН). Подчеркивается, что однократное введение ИИ включает синтез ИФН в определенных популяциях клеток и органов и обеспечивает относительно длительную циркуляцию ИФН на терапевтическом уровне и создание в организме длительной антивирусной резистентности. Сделано заключение, что в целом ИИ, обладая выраженными противовирусными и иммуномодулирующими свойствами, используются в настоящее время как эффективные средства предупреждения и лечения целого ряда заболеваний. Тот факт, что различающиеся по своей химической природе ИИ действуют на разные этапы репродукции вирусов и различные звенья врожденного и приобретенного иммунитета, объясняет расширяющиеся масштабы применения этой группы препаратов в медицинской практике.

Ключевые слова: *интерфероны; индукторы интерферона; интерферонотерапия; профилактика и лечение вирусных инфекций.*

Для цитирования: *Вопросы вирусологии. 2015; 60(2): 5–10.*

Ershov F.I., Narovlyansky A.N.

Usage of interferon inducers during viral infections

Federal State Budgetary Institution «Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 123098, Moscow, Russia

Domestic researchers succeeded to create a group of original interferon inducers (II) with a high chemotherapeutic index and suitable for the prevention and treatment of viral infections and a number of other diseases. Clinical application of II concerns, first of all, a wide range of viral infections: influenza and other acute respiratory viral infections, herpes, hepatitis, encephalitis, rabies, slow and mixed infections, etc. The accumulated experience is generalized and the conclusion is made about the main advantages of II, which induce a balanced synthesis of endogenous interferon without antigenicity of its own. It is emphasized that a single injection of II "includes" synthesis of IFN in certain populations of cells and organs and provides a relatively long circulation of IFN at a therapeutic level and creation of long-term anti-virus resistance. It is concluded that, in general, interferon inducers with pronounced antiviral and immunomodulatory properties are currently used as effective tools for the prevention and treatment of a variety of diseases. The fact that II different in their chemical nature act at different stages of reproduction of viruses and affect various links of the innate and adaptive immunity explains the increased scope of the application of this group of drugs in medical practice.

Key words: *interferons; interferon inducers; interferon therapy; preventive measures and therapy of viral infections.*

Citation: *Voprosy virusologii. 2015; 60 (2): 5–10. (In Russ.)*

For correspondence: *Feliks Ershov, MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS; e-mail: felixershov@gmail.com*

Введение

Опыт почти 50-летнего клинического использования интерферонов (ИФН) доказал их несомненную профилактическую и терапевтическую эффективность при вирусных инфекциях. Вместе с тем практика длительного (многомесячного) применения высокоактивных доз ИФН, например при хронических вирусных гепатитах В и С, неврологических заболе-

ваниях (рассеянный склероз), в онкологии (лейкозы, саркомы), выявила ряд нежелательных побочных эффектов, в частности появление антиинтерфероновых антител, сводящих на нет эффект интерферонотерапии. Кроме того, доказана способность ряда вирусов «обходить» действие ИФН [1, 2].

Важным альтернативным подходом стало использование препаратов, относящихся к индукторам эн-

Таблица 1

Клинически пригодные индукторы интерферона

Химическая природа	Препараты (коммерческие названия)
А. Синтетические соединения	
1. Низкомолекулярные: флуореноны и акриданоны	Амиксин [®] , Циклоферон [®] , Неовир [®]
2. Полимеры (дсРНК): поли(А)-поли(У); поли(И)-поли(Ц)	Полудан [®] , Амплиген [®]
Б. Природные соединения	
1. Полифенолы	Мегосин [®] , Кагоцел [®]
2. Полимеры (дсРНК)	Ларифан [®] , Ридостин [®]
Примечание. дсРНК – двуспиральная РНК.	

догенного ИФН (ИИ), что существенно расширило возможности интерферонотерапии.

В результате многолетнего целенаправленного скрининга отечественным исследователям удалось создать группу оригинальных ИИ (табл. 1), имеющих высокий химиотерапевтический индекс и пригодных для профилактики и лечения вирусных инфекций и ряда других заболеваний [1, 3–10].

Изучение эффективности отобранных ИИ при различных вирусных инфекциях показало, что спектр их клинической активности фактически совпадает с активностью ИФН [1, 3, 5, 9, 11].

Клиническое применение ИИ касается в первую очередь широкого круга вирусных инфекций: гриппа и других острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ), герпеса, гепатитов, энцефалитов, бешенства, медленных и смешанных инфекций и др. При введении в организм ИИ вызывают стимуляцию пролиферации и дифференцировки клеток, модуляцию дифференцировки клеток, синтез мембранных рецепторов, а также активацию различных звеньев системы иммунитета (макрофагов, цитотоксических Т-клеток, антителообразующих В-клеток, естественных киллеров (ЕК) и др.). Действие ИИ осуществляется в комплексе с другими медиаторами воспалительных и иммунных ответов (цитокинов), а также совместно с гормонами и нейромедиаторами.

В данном обзоре суммированы основные итоги использования ИИ при разных формах вирусной инфекционной патологии.

Применение ИИ при острых вирусных инфекциях

На ранних этапах вирусного инфицирования сами вирусы играют роль ИИ [1, 2]. В результате происходят три взаимосвязанных события, которые могут предотвратить дальнейшее распространение вирусов и генерализацию инфекции:

- внутриклеточная ингибция репродукции вирусов ИФН, образующимся в ответ на инфекцию;
- активация врожденного иммунитета и удаление инфекционного материала с помощью ЕК, цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) и фагоцитирующих нейтрофилов;
- защита вновь образованным ИФН окружающих незараженных клеток.

Однако дальнейшее развитие инфекционного заболевания может пойти по пути острого или хронического процесса (при сниженной сопротивляемости

организма, дефектности систем ИФН и иммунитета, большой множественности инфицирования и т. д.). В этом случае основную роль в противовирусной защите организма играют:

- продолжение продукции ИФН- α и ИФН- β ;
- продукция ИФН- γ ;
- активация клеточного иммунитета;
- стимуляция макрофагально-фагоцитарной системы;
- активация продукции ранних цитокинов – интерлейкинов (ИЛ-12, ИЛ-18, ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10), фактора некроза опухоли (ФНО);
- развитие адаптивного (специфического) иммунного ответа.

Ослабленная иммунная система не всегда справляется с защитой организма, так как многие вирусы подавляют действие ИФН и угнетают врожденный иммунный ответ. При этом течение болезни грозит тяжелыми осложнениями, особенно если на вирусное заболевание наслаивается бактериальная флора. Как следует из материалов изложенных ниже, на этом этапе показано использование ИФН и ИИ.

Грипп и другие острые респираторные вирусные инфекции

Возбудители ОРВИ составляют обширную (более 200 представителей) группу вирусов, относящихся к разным семействам и объединенных способностью вызывать респираторные инфекции [3–6]. К ним относятся вирусы гриппа А и В, аденовирусы, РС-вирус, вирусы парагриппа и др. Все они вызывают клинически сходные симптомы заболевания (интоксикация, температурная реакция, катаральные явления).

Основным средством профилактики гриппа является вакцинация, эффективность которой зависит от входящих в состав вакцин антигенных вариантов вируса, актуальных для данного сезона. Как известно, применение вакцин против гриппа не защищает человека от других возбудителей ОРВИ.

В последнее время большое внимание уделяется средствам, оказывающим этиотропное воздействие на широкий спектр респираторных вирусов и стимулирующим врожденный и приобретенный иммунитет. Именно к таким средствам относятся ИФН и ИИ. Результаты проведенных ранее рандомизированных плацебоконтролируемых исследований свидетельствуют о высокой эффективности этих препаратов [3–8].

Первым клинически использованным ИИ был синтетический низкомолекулярный акриданон Амиксин[®] [3]. В настоящее время для экстренной профилактики гриппа и других ОРВИ во время сезонных подъемов заболеваемости наиболее широко используют Циклоферон[®] и Кагоцел[®]. Эффективность этих препаратов отмечена при профилактике моно- и смешанных инфекций, вызванных различными респираторными вирусами [7, 8], которые активируют ИФН, фагоцитоз, активность ЕК и цитотоксических Т-клеток, а также синтез IgG.

Применение ИИ при хронических вирусных инфекциях

Хронические вирусные инфекции (ХВИ), вызываемые вирусами герпеса, гепатита и иммунодефицита человека (ВИЧ), относятся к числу наиболее рас-

Таблица 2

Терапевтическая эффективность ИИ при ХГВИ

Препарат	Улучшение, %	Без эффекта, %	Без рецидивов	
			время ремиссии, мес	% случаев
Ридостин®	79	21	6	33
Циклоферон®	84,4	15,6	7-8	82,4
Кагоцел®	75	25	6-7	75
Ацикловир	66,6	33,4	3-4	32

пространенных заболеваний человека. При ХВИ наблюдается подавление иммунной системы организма, приводящее к стойким вторичным иммунодефицитным состояниям. В основе нарушений иммунитета, вызываемых вирусами, лежит их уникальная способность вырабатывать белки, блокирующие рецепторы главного комплекса гистосовместимости I и II классов, что затрудняет передачу сигнала от антигенпрезентирующих клеток к клеткам-продуцентам иммунной системы и угнетает продукцию ИФН и других цитокинов.

Хронические герпесвирусные инфекции

Лечение хронических герпесвирусных инфекций (ХГВИ), в первую очередь направлено на подавление репродукции вируса в период обострения и формирование адекватного иммунного ответа. Цели лечения – купирование рецидива в наиболее короткие сроки, сокращение сроков реэпителлизации, профилактика рецидивов и уменьшение их частоты и тяжести [12, 13].

ИИ могут служить ценным дополнением к хорошо известным этиотропным противовирусным средствам (Ацикловир®, Валацикловир® или Фамцикловир®), особенно в тех случаях, когда существует вероятность развития резистентности к названным препаратам.

Среди ИИ наибольший терапевтический эффект при лечении простого герпеса и опоясывающего лишая дают природные дсРНК Ларифан® и Ридостин® и производное госсипола Кагоцел®, которые обеспечивают необходимую иммуномодуляцию, ускоряют процесс выздоровления и удлиняют периоды ремиссии [3, 11, 14].

Первым из ИИ для лечения больных рецидивирующим герпесом кожи и слизистых оболочек и опоясывающим лишаем был Ларифан®, применение которого в период предвестников часто позволяет предупредить дальнейшее развитие обострения, а в начале рецидива заболевания – сократить сроки клинического проявления и значительно увеличить межрецидивный период.

Вторым ИИ из группы дсРНК, примененным против вируса простого герпеса (ВПГ), стал Ридостин®. Было показано, что если лечение Ридостином® начинали в острой фазе заболевания, продолжительность рецидива сокращалась, а само заболевание принимало abortивный характер. Применение Ридостина® в период ремиссии приводит к развитию стертых форм герпеса.

При использовании низкомолекулярных ИИ (Циклоферон®, Кагоцел®) отмечена нормализация показателей интерфероновой системы, активация Т- и В-клеточных звеньев иммунитета и значительное увеличение количества нейтрофилов и моноцитов [11].

Основными клиническими показателями эффективности терапии ИИ являются сокращение длительности и тяжести течения рецидива и снижение частоты их возникновения. Как видно из табл. 2, эффективность трех использованных ИИ близка по этим показателям и превосходит препарат сравнения Зовиракс® (Ацикловир).

К числу наиболее распространенных вирусных заболеваний (6-10%) взрослого населения относится генитальный герпес. Показано, что терапия с приме-

нением ИИ приводила к более раннему (на 3-5-й день) исчезновению признаков заболевания по сравнению с больными, получавшими общепринятую терапию (на 7-9-й день). Нормализация иммунологических показателей сопровождалась снижением продукции вируса. Отмечена также нормализация продукции ИФН-α и ИФН-γ [12-14].

При комплексном лечении рецидивы заболевания в течение последующих 6 мес отмечали в 3 раза реже, чем у пациентов, получавших базисную терапию.

При лечении офтальмогерпеса наиболее широко применяется синтетическая дсРНК Полудан® [3]. При раннем назначении удавалось излечить до 60% больных с наиболее тяжелыми (глубокими) формами герпетического поражения роговицы.

Вирусассоциированный гломерулонефрит в 25% случаев связан с цитомегаловирусом (ЦМВ), в 51,1% случаев – с ВПГ, у 6,2% больных выявлялись одновременно антигены ВПГ и ЦМВ. Противовирусный эффект ИИ более выражен в отношении вируса ВПГ, чем ЦМВ [5, 11].

В целом ИИ могут быть использованы как в монотерапии герпесвирусных инфекций в качестве препаратов выбора, так и в комплексной терапии с базисными этиотропными средствами. Комплексные схемы лечения позволяют увеличить периоды ремиссии и значительно уменьшить тяжесть заболевания. Перспективным представляется сочетанное использование ИИ с препаратами ИФН и противовирусными вакцинами.

Вирусные гепатиты

Gepatit A. Первыми ИИ, примененными для лечения среднетяжелых форм вирусного гепатита А, были Амиксин® и Циклоферон® [3, 5, 15, 16]. У

Таблица 3

Эффективность различных лекарственных препаратов при лечении детей, больных ХВГ

Препарат, путь введения	Ремиссия				Рецидив, %
	первичная, %	стабильная, %	полная, %	отсутствующие, %	
Инtron A® (n = 6), в/м	83	50	50,0	33	16
Виферон® (n = 13), ректально	69	23	23	46	30
Циклоферон® (n = 36), в/м	47	55	44	38	5

Примечание. в/м – внутримышечно.

82,6% больных наблюдали нормализацию пигментного обмена. Нормализация размеров печени происходила в среднем быстрее на 2,5 дня. При лечении Циклофероном® происходила также нормализация показателей иммунологической реактивности (содержания С₃ компонента комплемента, уровня белков сыворотки крови: преальбумина, трансферрина) по сравнению с теми же показателями у больных, получавших плацебо на фоне базисной терапии.

ИИ при хронических вирусных гепатитах

Благоприятными условиями для прекращения вирусной репликации и успешной терапии хронических вирусных гепатитов (ХВГ) является небольшой срок заболевания, молодой возраст пациентов, невысокий уровень репликации вируса и выраженное повышение уровня аланинаминотрансферазы (АЛТ) – не менее чем в 2 раза.

Эффективность лечения ИФН зависит также от ряда других факторов (генотипа вируса, уровня нагрузки вирусной ДНК или РНК, активности воспалительного процесса в печени). Наибольший эффект отмечен у больных с низкой репликацией вируса и высоким уровнем АЛТ. У части больных в процессе лечения формируется резистентность к препаратам рекомбинантного ИФН из-за выработки антител и еще чаще возникают нежелательные побочные явления. Перспективным направлением является использование ИИ, которые лишены указанного недостатка ИФН [3].

К ИИ, разрешенным для лечения вирусных гепатитов В и С, относятся только низкомолекулярные препараты – Амиксин® и Циклоферон® [10, 11, 15], которые при длительных повторных введениях не вызывают развития гипореактивности, столь характерной для полимерных ИИ. Показано, что у большинства пациентов, получавших эти ИИ, значительно падал уровень ферментемии и нормализовались показатели тимоловой пробы. К концу 1-го месяца происходила элиминация IgM и анти-НВс из крови и на 3-м месяце лечения – сероконверсия НВеAg на анти-НВе. Сравнительное изучение эффективности препаратов ИФН (Интрон А® и Виферон®) с ИИ (Циклоферон®) при лечении детей с ХВГ показало близкие результаты (табл. 3).

Следует отметить, что монотерапия ХВГС Циклофероном® не всегда приводит к положительному результату. Однако несмотря на отсутствие эффекта в ряде случаев, суммарная статистическая оценка уровня вирусемии, а также динамика спектра антител к структурным и неструктурным белкам вируса говорят в пользу выраженной противовирусной активности Циклоферона®.

Длительность применения ИИ при ХВГ составляет не менее 12 месяцев, как это принято при терапии ИФН [10].

В последнее время исследована эффективность комбинированного применения ИИ Циклоферона® с ИФН-α Реальдирином® (двойная терапия), а также Реальдирином® с Циклофероном® и Рибамидилом® (тройная терапия) [15].

Как и ожидалось, максимальный терапевтический эффект при лечении больных ХВГС наблюдали при использовании Циклоферона® в схемах тройной терапии.

Следует отметить, что не показано назначение

ИИ как средств монотерапии больным ХВГС, интерфероновый статус которых свидетельствует о выраженной депрессии системы ИФН, поскольку индуктор не способен обеспечить у таких больных синтез эндогенного ИФН в достаточном количестве. Таким больным перед назначением ИИ рекомендуется проводить заместительную терапию препаратами ИФН-α.

При слабом (I степень) угнетении способности клеток-продуцентов к продукции ИФН-α/β схемы комбинированного лечения препаратами ИФН-α с Циклофероном® позволяли в 1,9 раза повысить степень ответа на противовирусную терапию по сравнению с монотерапией ИФН-α и достичь полной ремиссии у 60% больных. В этом случае было вполне оправдано применение сочетанной схемы использования препаратов ИФН-α и Циклоферона®.

При умеренном (II степень) подавлении системы ИФН комбинированные схемы введения препаратов позволяли достичь полного ответа у 30% больных. В этом случае более эффективной также была схема сочетанного введения препаратов, когда дефицит функциональной активности клеток-продуцентов ИФН компенсировался заместительной терапией препаратом ИФН-α. Повышая способность клеток-продуцентов к выработке эндогенных ИФН, ИФН-α тем самым потенцировал интерферогенез с помощью индуктора.

В целом комбинированная схема введения препаратов приводит к аддитивному эффекту действия препаратов на систему ИФН. В результате количество больных, ответивших на терапию полной ремиссией, увеличивается по сравнению с получавшими монотерапию ИФН в 5 раз.

Комбинированная сочетанная терапия ИФН-α и ИИ может быть применима также для лечения больных с хроническим гепатитом С, не ответивших на начальный курс монотерапии ИФН-α. Ее использование приводит к устойчивому ответу у 28% больных.

Обобщая представленные данные, можно заключить, что при остром течении вирусных гепатитов ИИ сокращают вирусную нагрузку, способствуют элиминации вирусов в первые 2–3 нед лечения, ускоряют процессы нормализации клинико-биохимических показателей. Лечение хронических гепатитов ИИ, особенно вызываемых HCV или микст-инфекциями, в случае удовлетворительного ближайшего эффекта требует дальнейшего курсового применения ИИ по крайней мере в течение года [5, 9].

Применение ИИ при ВИЧ-инфекции

В течение длительного времени единственным средством лечения ВИЧ-инфекции были аналоги нуклеозидов, ингибиторы фермента ревертазы (Азидотимидин®, Ставудин®). Затем появились препараты, относящиеся к классу ингибиторов протеаз (Норвир®, Криксиван®). Однако все эти препараты не обеспечивали желаемого результата – полной элиминации возбудителя. В настоящее время продолжается поиск наиболее эффективной комбинированной терапии по различным схемам (3–4 препарата одновременно) с применением аналогов нуклеозидов, ингибиторов вирусспецифических ферментов и цитокинов. Показано, что такая комплексная терапия часто сопровождается развитием липодистрофии,

серьезными нарушениями обмена жиров и углеводов и длительной персистенцией вируса в лимфатических узлах. Вместе с тем выявлены неудачи такого лечения, связанные с формированием резистентных штаммов [16].

Перспективным, особенно в стадии оппортунистических инфекций, может быть применение иммунокорректоров, в частности ИИ [10, 16]. Пока единственным разрешенным для клинического применения ИИ при ВИЧ-инфекции является препарат Циклоферон®. Хорошая переносимость терапии ИИ у всех пациентов и отсутствие побочных действий создали предпосылки для применения этих препаратов у ВИЧ-инфицированных пациентов.

Полученные данные свидетельствуют об эффективности применения ИИ для лечения ВИЧ инфицированных взрослых и детей в комплексной терапии с традиционными этиотропными средствами.

Показано, что применение таблетированной формы Циклоферона® при длительном (6 мес) непрерывном лечении у ВИЧ-инфицированных лиц в разных стадиях заболевания снижало токсичность традиционных методов лечения ВИЧ-инфекций.

В целом результаты многолетнего наблюдения больных ВИЧ-инфекцией, получавших длительную терапию ИИ в своеобразном режиме для профилактики прогрессирования заболевания позволили выявить следующие закономерности:

1. Использование ИИ в терапии ВИЧ-инфекции сопровождается стабилизацией клинических проявлений заболевания, улучшением состояния больных, а также нормализацией гематологических и иммунологических показателей.

2. При монотерапии ИИ оказывают иммуномодулирующее и противовирусное действие. Они способствуют восстановлению CD3-, CD4- и CD8-лимфоцитов, функциональной активности лимфоидных и гранулоцитарных клеток в ранних стадиях ВИЧ-инфекции (1Б, 2В, 3А) в тех случаях, когда нет значительного снижения числа CD4⁺-клеток (250–500), и, что особенно важно, снижению вирусной нагрузки нередко до неопределяемых значений (< 200 копий РНК ВИЧ в 1 мл).

3. ИИ хорошо сочетаются со всеми основными лекарственными препаратами для лечения ВИЧ-инфекции. Особенно перспективным представляется сочетание использования ИИ с ингибиторами протеаз и обратной транскриптазы (Азидотимидин®, Дидеоксифторидин®, Дидеоксиинозин®, Ацикловир® и др.) и противоретровирусными средствами, когда имеются признаки активной репликации ВИЧ – высокие показатели вирусной нагрузки.

4. ИИ могут использоваться (курсами) у больных с выраженной иммуносупрессией в промежутках после окончания противовирусной (противоопухолевой) терапии с целью улучшения гематологических и иммунологических показателей, повышения качества жизни больных.

5. Терапия ИИ предупреждает развитие оппортунистических инфекций.

Заключение

ИИ дают те же эффекты, что и ИФН. Они оказывают иммуномодулирующее действие и прекрасно сочетаются с экзогенными ИФН и другими противовирусными препаратами. При таком комбинированном

использовании препаратов в ряде случаев наблюдается аддитивный и даже синергидный эффект.

Обобщая накопленный к настоящему времени опыт, можно сделать следующее заключение об основных достоинствах ИИ:

1. При использовании ИИ синтезируется эндогенный ИФН, который в отличие от наиболее широко используемых в настоящее время рекомбинантных ИФН не обладает антигенностью.

2. Экзогенный ИФН стимулирует неспецифическую цитотоксичность иммуноцитов и вызывает экспрессию молекул НЛА в популяциях этих клеток, что может явиться причиной аутоиммунного ответа. При использовании ИИ такой опасности нет, поскольку синтез ИФН сбалансирован и контролируется механизмами, надежно обеспечивающими защиту организма от избытка ИФН.

3. Однократное введение ИИ обеспечивает относительно длительную циркуляцию ИФН на терапевтическом уровне, тогда как для достижения подобных концентраций при применении экзогенных ИФН требуется многократное введение значительных доз препаратов.

4. ИИ обладают уникальной способностью включать синтез ИФН в определенных популяциях клеток и органов, что дает явные преимущества перед поликлональной стимуляцией иммуноцитов экзогенными препаратами ИФН.

5. Важным свойством ИИ является создание в организме длительной антивирусной резистентности, которая не может быть объяснена только индукцией эндогенного ИФН. Этот феномен нуждается в дальнейшем изучении.

В целом ИИ, обладая выраженными противовирусными и иммуномодулирующими свойствами, используются в настоящее время как эффективные средства предупреждения и лечения целого ряда заболеваний. Тот факт, что различающиеся по своей химической природе ИИ действуют на разные этапы репродукции вирусов и различные звенья врожденного и приобретенного иммунитета, объясняет расширяющиеся масштабы применения этой группы препаратов в медицинской практике.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ершов Ф.И., Киселев О.И. *Интерфероны и их индукторы*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2005.
2. Randall R.E., Goodbourn S. Interferons and viruses: an interplay between induction, signaling, antiviral responses and viral countermeasures. *J. Gen. Virol.* 2008; 89 (pt 1): 1–47.
3. Ершов Ф.И. *Антивирусные препараты: справочник*. 2-е изд., М.: ГЭОТАР-Медиа; 2006.
4. Ершов Ф.И., Романцов М.Г. *Антивирусные средства в педиатрии*. М.: Русский врач; 2005.
5. Ершов Ф.И., Романцов М.Г. *Лекарственные средства, применяемые при вирусных заболеваниях: Руководство для врачей*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2007.
6. Киселев О.И., Ершов Ф.И., Быков А.Т., Покровский В.И. *Пандемия гриппа 2009/2010: противовирусная терапия и тактика лечения*. Санкт-Петербург-Москва-Сочи: А-Принт; 2010.
7. Исаков В.А., Романцов М.Г., Каболова И.В., Ерофеева М.К., Водейко Л.П., Смагина А.Н. Эффективность Циклоферона® в терапии и профилактике гриппа и ОРЗ. *РМЖ. Болезни дыхательных путей*. 2011; 23: 1420. Available at: http://www.rmj.ru/articles_7894.htm
8. Макасова В.Л., Васильева И.А., Ерофеева М.К. Применение препарата Кагоцел для лечения и профилактики гриппа и других острых респираторных вирусных инфекций. *Медлайн*

- экспресс. 2009; 1: 42-5. Available at: http://www.kagocel.ru/upload/Doc_7_420.pdf
9. Ершов Ф.И., Наровлянский А.Н. Интерфероны и индукторы интерферонов. В кн.: Хантов Р.М., Атауллаханов Р.И., ред. Иммуноterapia: руководство для врачей. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2011: 80–98.
 10. Романцов М.Г., Коваленко А.Л. Индуктор интерферона – Циклоферон: итоги и перспективы клинического применения. Санкт-Петербург: 2007. Available at: <http://medi.ru/doc/a210202.htm>
 11. Ершов Ф.И., Наровлянский А.Н., ред. Интерферон-2011: сборник научных статей. М.: 2012.
 12. Шульженко А.Е., Зуйкова И.Н. Иммуноterapia герпес-вирусных инфекций. В кн.: Хантов Р.М., Атауллаханов Р.И., ред. Иммуноterapia: руководство для врачей. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2011: 398–407.
 13. Марченко Л.А. Генитальный герпес: патогенез, диагностика, лечение. В кн.: Хантов Р.М., Атауллаханов Р.И., ред. Иммуноterapia: руководство для врачей. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2011: 408–42.
 14. Силина Л.В., Бабичева Т.В. Рецидивирующий герпес гениталий. В кн.: Хантов Р.М., Атауллаханов Р.И., ред. Иммуноterapia: руководство для врачей. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2011: 434–50.
 15. Романцов М.Г., Сологуб Т.В., Гуренкова Н.Н., Коваленко С.Н., Шульдяков А.А., Коваленко А.Л. «Тройная терапия» хронического вирусного гепатита С у пациентов с генотипом 1b. Available at: <http://www.cycloferon.ru/vrachi/terapiya/razdelitel3/v-18/>
 16. Покровский В.В., Ермак Т.Н., Беляева В.В., Юрин О.Г. ВИЧ-инфекция: клиника, диагностика и лечение. М.: Медицина; 2000.
 6. Kiselev O.I., Ershov F.I., Bykov A.T., Pokrovskiy V.I. An Influenza Pandemic 2009/2010: Antiviral Therapy and Treatment Strategy. St. Petersburg-Moscow–Sochi: A-Print; 2010. (in Russian)
 7. Isakov V.A., Romantsov M.G., Kabolova I.V., Erofeeva M.K., Vodeyko L.P., Smagina A.N. Efficiency Cycloferon® in the treatment and prevention of influenza and acute respiratory diseases. *RMZh. Bolezni Dykhatel'nykh Putey.* 2011; 23: 1420. Available at: http://www.rmj.ru/articles_7894.htm (in Russian)
 8. Maksakova V.L., Vasil'eva I.A., Erofeeva M.K. Use of the Kagocel preparation for the treatment and prevention of influenza and other acute respiratory viral infections. *Medlayn-ekspress.* 2009; 1: 42–5. Available at: http://www.kagocel.ru/upload/Doc_7_420.pdf (in Russian)
 9. Ershov F.I., Narovlyansky A.N. Interferons and interferon inducers. In: Khaitov R.M., Ataullakhanov R.I., eds. *Immunotherapy: A Guide for Physicians [Immunoterapiya: Rukovodstvo dlya Vrachey]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2011: 80–98. (in Russian)
 10. Romantsov M.G., Kovalenko A.L. Interferon inducer – Cycloferon: results and perspectives of clinical use. St. Petersburg: 2007. Available at: <http://medi.ru/doc/a210202.htm>. (in Russian)
 11. Ershov F.I., Narovlyanskiy A.N., eds. *Interferon-2011: a Collection of Research Papers [Interferon-2011: Sbornik Nauchnykh Statey]*. Moscow: 2012. (in Russian)
 12. Shul'zhenko A.E., Zuykova I.N. Immunotherapy of herpes virus infections. In: Khaitov R.M., Ataullakhanov R.I., eds. *Immunotherapy: A Guide for Physicians [Immunoterapiya: Rukovodstvo dlya Vrachey]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2011: 398–407. (in Russian)
 13. Marchenko L.A. Genital herpes: pathogenesis, diagnosis, treatment. In: Khaitov R.M., Ataullakhanov R.I., eds. *Immunotherapy: A Guide for Physicians [Immunoterapiya: Rukovodstvo dlya Vrachey]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2011: 408–42. (in Russian)
 14. Silina L.V., Babicheva T.V. Recurrent genital herpes. In: Khaitov R.M., Ataullakhanov R.I., eds. *Immunotherapy: A Guide for Physicians [Immunoterapiya: Rukovodstvo dlya Vrachey]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2011: 434–50. (in Russian)
 15. Romantsov M.G., Sologub T.V., Gurenkova N.N., Kovalenko S.N., Shul'dyakov A. A., Kovalenko A.L. “Triple therapy” of chronic hepatitis C patients with genotype 1b. Available at: <http://www.cycloferon.ru/vrachi/terapiya/razdelitel3/v-18/> (in Russian)
 16. Pokrovskiy V.V., Ermak T.N., Belyaeva V.V., Yurin O.G. HIV Infection: *Clinical Features, Diagnosis and Treatment [ВИЧ-инфекция: Клиника, Диагностика, Лечение]*. М.: Meditsina; 2000. (in Russian)

REFERENCES

Поступила 26.12.13
Received 26.12.13

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015
УДК 616-006.04-022:578.825.13]-7

Гончарова Е.В., Сеньюта Н.Б., Смирнова К.В., Щербак Л.Н., Гурцевич В.Э.

Вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ) в России: инфицированность населения и анализ вариантов гена *LMP1* у больных ВЭБ-ассоциированными патологиями и здоровых лиц

ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» РАН, 115478, г. Москва

Широко распространенный среди населения планеты вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ) является этиологическим агентом для ряда злокачественных новообразований человека. Один из кодируемых вирусом онкобелков, латентный мембранный белок 1 (*LMP1*), через активацию комплекса сигнальных путей участвует в процессах immortalization и трансформации клеток. Целью настоящего исследования стало изучение инфицированности ВЭБ российской популяции и анализ полиморфизма *LMP1* у больных с доброкачественными и злокачественными ВЭБ-ассоциированными заболеваниями и здоровых вирусоносителей. Исследования показали, что процент инфицированных лиц к 5–9 годам достигает практически максимальных значений. При этом с возрастом титры вирусспецифических антител снижаются при высоком проценте инфицированных лиц и вновь повышаются в группах лиц пожилого возраста. Анализ нуклеотидных последовательностей гена *LMP1*, транслированных в аминокислотные последовательности, неожиданно выявил не только у здоровых лиц, но и у больных всеми формами ВЭБ-ассоциированных заболеваний доминирование низкодивергентного варианта B95.8/A. Высокодивергентные варианты Ch1 и Med+, содержащие делецию 10 аминокислот (а.к.), и характеризующиеся повышенной трансформирующей активностью, чаще обнаруживали в образцах опухолевой ткани, чем в образцах крови/смывов полости рта тех же больных. Обнаружение высокотрансформирующего варианта Ch1 в образцах крови здоровых лиц свидетельствует о том, что этот аналог китайского варианта Cao может персистировать в любой популяции и не обязательно связан с возникновением ВЭБ-ассоциированных патологий.

Ключевые слова: вирус Эпштейна–Барр; вирусспецифические антитела; латентный мембранный белок 1 (*LMP1*); полиморфизм *LMP1*.

Для цитирования: Вопросы вирусологии. 2015; 60(2): 11–17.

Goncharova E.V., Senyuta N.B., Smirnova K.V., Shcherbak L.N., Gurtsevich V.E

Epstein-Barr virus (EBV) in Russia: infection of the population and analysis of the *LMP1* gene variants in patients with EBV-associated pathologies and healthy individuals

Federal State Budgetary Scientific Institution «N.N.Blokhin Cancer Research Center», 115478, Moscow, Russia

The Epstein–Barr virus, widespread herpesvirus among the population of the planet, is also the etiologic agent for a number of malignancies. One of the oncoproteins encoded by the virus, the latent membrane protein 1 (*LMP1*), through activation of the complex signaling pathways is involved in the processes of cell immortalization and transformation. The goal of this work was to study the level of the EBV infection in Russian population and *LMP1* polymorphism in patients with benign and malignant EBV-associated diseases and healthy virus carriers. Studies have shown that by the age of 5–9 years the percentage of the infected persons and the level of antibody titers reaches almost the maximum values. With the age, virus specific antibody titers are decreased (with a high percentage of infected persons) and increased again in groups of older persons. The analysis of the nucleotide sequences of the gene *LMP1* translated in amino acid (aa) sequences unexpectedly revealed the dominance a low divergent variant *LMP1* B95.8A not only in healthy individuals but also in patients with all forms of EBV-associated diseases. Highly divergent variants Ch1 and Med +, containing a deletion of 10 aa, and characterized by elevated transforming activity more often were detected in the tumor tissue samples than in the blood samples/mouth washes of the same patients. Detection of highly transforming variant *LMP1* Ch1 in blood samples of healthy individuals indicates that this analog of Chinese variant Cao may persist in any population and is not necessarily associated with the occurrence of the EBV-associated disorders.

Key words: Epstein-Barr virus; virus specific antibodies; latent membrane protein 1 (*LMP1*); *LMP1* polymorphism.

Citation: *Voprosy virusologii*. 2015; 60 (2): 11–17. (In Russ.)

For correspondence: Elena Goncharova, candidate of biological Sciences; e-mail: goncharova@dna-tech.ru

Введение

Вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ), относящийся к семейству *Herpesviridae*, подсемейству *Gammapherpesvirinae*, роду *Lymphocryptovirus*, обладает уникаль-

ными биологическими свойствами. Им инфицировано практически все население планеты, не вызывая у инфицированных лиц каких-либо клинических проявлений; ВЭБ – признанный этиологический

Для корреспонденции: Гончарова Елена Васильевна, канд. биол наук; e-mail: goncharova@dna-tech.ru

агент для ряда доброкачественных и злокачественных заболеваний. Еще одна особенность вируса состоит в географической и этнической избирательности проявления им своих онкогенных потенций. Так, наиболее высокая заболеваемость раком носоглотки отмечается в южных провинциях Китая и странах Юго-Восточной Азии, несколько реже – в арабских странах Северной Африки и на Аляске. Ассоциированные с ВЭБ случаи лимфомы Беркитта часто встречаются у детей в Экваториальной Африке и крайне редко – в других регионах мира. Что касается лимфомы Ходжкина, в различных странах уровни заболеваемости этой патологией не совпадают с уровнями ВЭБ-ассоциированных случаев болезни. Последние чаще всего регистрируют в Африке и Южной Америке и несколько реже в Европе, США и Китае [1]. В России встречаются различные типы ВЭБ-ассоциированных патологий, но они не носят эпидемический характер.

ВЭБ обладает геномом в виде двуцепочечной ДНК, состоящей приблизительно из 172 тысяч пар нуклеотидов, которые кодируют около 90 генов. Во время латентной инфекции у ВЭБ экспрессируется ограниченный набор генов, включая гены, кодирующие 2 неполиаденилированные РНК (EBER-1 и EBER-2), 6 ядерных белков (EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3A, -3B и -3C, лидерный белок (EBNA-LP), а также 3 интегральных мембранных белка (LMP-1, LMP-2A и -2B) [2]. В течение продуктивного цикла инфекции экспрессируется большое число предранних, ранних и поздних генов [1,3].

Многочисленные исследования свидетельствуют о том, что один из генов латентной инфекции ВЭБ, латентный мембранный белок 1 (LMP1), принимает активное участие в развитии ВЭБ-ассоциированных заболеваний. Экспрессия этого гена приводит к трансформации клеток крысиных фибробластов и В-лимфоцитов человека *in vitro*, а у трансгенных мышей он играет ключевую роль в развитии лимфом [4, 5]. LMP1 часто экспрессирован в индуцированных ВЭБ неоплазиях, включая лимфому Ходжкина и рак носоглотки. Свойства LMP1 во многом определяются его высоким сходством с членами семейства рецепторов факторов некроза опухоли (TNRF1 и CD40), что позволяет ему через взаимодействие с различными клеточными молекулами и внутриклеточными сигнальными каскадами осуществлять трансформирующее и другие воздействия на клетку [6, 7]. В этот процесс вовлечены 3 трансактивирующие области LMP1, локализованные в его С-концевом цитоплазматическом домене (STAR1, STAR2 и STAR3). Подобно TNF-рецептору эти области взаимодействуют с клеточными адаптерными молекулами TRAF-2, -3, -5, -6 и TRADD, а также с рецептором, взаимодействующим с протеинкиназой RIP, BS69 и белками Янус-киназы, вызывая активацию различных транскрипционных факторов [8–10]. Кроме того, LMP1 вызывает активацию с-Jun N-терминальной киназы (AP-1), фосфоинозитол-3-киназы (PI3-K), канонического и неканонического путей активации транскрипционного ядерного фактора NF- κ B, а также приводит к индукции p42/p44 митогенактивируемой протеинкиназы (МАРК) сигнального пути и p38 МАРК. Показано, что LMP1 подавляет (как правило, опосредованно) экспрессию ряда ключевых опухолевых супрессоров (p53,

RASSF1A). Он также нарушает работу проверочных точек клеточного цикла G1-S, обеспечивая выживание поврежденных клеток, индуцирует экспрессию провоспалительных цитокинов, наделяет инфицированные клетки резистентностью к апоптозу, вызывает эпителиально-мезенхимальный переход (EMT), усиливает подвижность клеток, их инвазию и метастазирование, селективно подавляет либо активирует экспрессию ряда клеточных микро-РНК и т. д. [11–13]. Функциональной мультипотентностью, вероятно, и объясняется трансформирующая и онкогенная потенция LMP1, проявляемая им в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

Молекулярный анализ образцов LMP1 различного географического происхождения, выявил его полиморфизм, часто отражающий его неодинаковую биологическую активность. Начало положил вариант LMP1 китайского происхождения Caо, в котором в отличие от прототипного варианта LMP1-B95.8 в С-терминальной области обнаружена делеция 10 аминокислот (а.к.), три 11-аминокислотных повтора и многочисленные точечные мутации [6]. Этот вариант обладает способностью трансформировать различные культуры клеток грызунов и оказался высокотуморогенным для мышей с выраженным комбинированным иммунодефицитом (SCID). Он также играет ключевую роль в иммортализации В-лимфоцитов и кератиноцитов человека *in vitro* [4, 14]. Высокотрансформирующие варианты LMP1, подобно китайскому варианту Caо, были также выделены от больных раком носоглотки (РНГ) на Тайване (C15) и в Средиземноморье (T510) [15,16].

Известно, что С-терминальная область LMP1 характеризуется варьирующим набором точечных мутаций, ведущих к замене отдельных аминокислот, образованием делеций, повторов и в случае конфекции двумя различными штаммами ВЭБ – гомологичными рекомбинациями [17]. Некоторые мутации С-терминального домена оказывают влияние на иммуногенность и время полужизни LMP1, усиливая его трансформирующее воздействие на клетку. Определенные мутации, локализованные в трансмембранном домене LMP1, приводят к значительному снижению цитотоксического действия этого белка на клетку, что, вероятно, влияет на его трансформирующий потенциал [8, 18, 19].

С целью систематизации вариантов LMP1 были предложены классификации, базирующиеся на совокупности ключевых а.к.-замен в С-терминальной области по отношению к той же области прототипного варианта LMP1-B95.8. Из наиболее известных классификаций следует назвать классификацию R. Edwards и соавт. [18], описавших наиболее типичные замены для отдельных областей мира, названия которых (Alaskan, China 1 (Ch1), China 2 (Ch2), China 3 (Ch3), Mediterranean + (Med+), Mediterranean - (Med-), New York City (NC)) отражают их географическое происхождение [18]. Известна также классификация D. Walling и соавт. [17], основанная на анализе числа а.к.-замен с каждой стороны от повтора 33 пар оснований (п.о.). При этом обнаружено, что по сравнению с LMP1 прототипного штамма B95.8 Caо-делецированные варианты LMP1 (LMP1-Caо, LMP1-1510) демонстрировали усиленную туморогенность и сниженную иммуногенность в различных тестах *in vivo* и *in vitro* [19–21]. Поскольку высокоту-

морогенные LMP1-Сао и LMP1-1510 содержат многочисленные мутации (делеции, аминокислотные замены и вставки), т. е. являются высокодивергентными, вполне справедливо было предположить, что некоторые из секвенсных вариаций в молекуле LMP1 формируют мутационные горячие точки, которые могут вносить свой вклад в ВЭБ-ассоциированный канцерогенез. В этом плане привлекают внимание варианты China 1 и Med+ (аналоги варианта Сао), обладающие делецией 10 а.к., с которой связывают их усиленный трансформирующий потенциал [8].

Каждый представитель из 6 перечисленных вариантов LMP1 был детально охарактеризован по его способностям трансформировать клетки млекопитающих (Rat-1), активировать целый спектр сигнальных путей, включая транскрипционный фактор NF- κ B, а также связывать один из клеточных белков из семейства E3-убиквитинлигаз (HOS/ β -TrCP) [22, 23]. При этом варианты с незначительным полиморфизмом (3-4 а.к. замены) по отношению к LMP1-B95.8, например, LMP1 B95.8/A по классификации D. Walling и соавт. [17], относят к низкодивергентным, а высоко полиморфные, т. е. варианты с большим числом а.к. замен, делеций и вставок – к высокодивергентным. К числу последних можно, вероятно, причислить все шесть указанных выше вариантов LMP1 по классификации R. Edwards и соавт., хотя варианты China 1 и Med+ благодаря содержащейся в них делеции 10 а.к. выделяются по своей трансформирующей и функциональной активности.

Целью настоящего исследования было изучение инфицированности ВЭБ российской популяции и анализ полиморфизма вирусного онкогена *LMP1* у больных доброкачественными и злокачественными ВЭБ-ассоциированными заболеваниями, а также у здоровых вирусносителей.

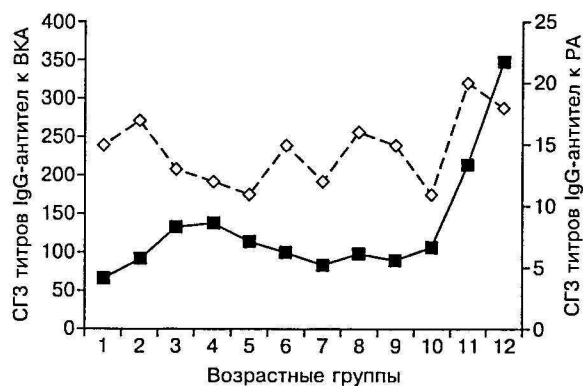
Материалы и методы

Группы больных и образцы ДНК

Объектом для изучения были образцы опухолевой ткани, лимфоцитов периферической крови, а также эпителиальных клеток смывов полости рта (ПР) от российских больных лимфомой Ходжкина (ЛХ) – 14 случаев, неходжкинскими лимфомами (НХЛ) – 12 случаев, РНГ – 23 случая, РЖ (рак желудка) – 12 случаев и инфекционным мононуклеозом (ИМ) – 10 случаев, а в качестве контроля образцы лимфоцитов периферической крови доноров крови/здоровых лиц (22 образца). Данное исследование, в которое указанные больные включены с их согласия в результате случайной выборки, было одобрено Комитетом по этике при ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН.

Экстракция ДНК и секвенсный анализ ПЦР-продуктов

Экстракция ДНК. Из собранного для исследования биологического материала ДНК выделяли методом фенол-хлороформной депротенинизации. Подтверждение наличия ДНК в выделенных образцах проводили методом Real Time PCR, используя следующую пару праймеров к области гена GAPDH: 5'-AGT CCA GTG AGC TTC CCG TTC AGC-3'; 5'-TGG TAT CGT GGA AGG ACT CAT GAC-3'. Для детекции продуктов амплификации использовали интеркалирующий краситель SYBR Green I (в разведении 1: 75,000) и после окончания ПЦР про-



Динамика титров антител к вирусу Эпштейна-Барр в различных возрастных группах населения России (на примере населения Москвы)

1 – 0–0,5 года (45); 2 – 0,6–2 года (16); 3 – 3–4 года (25); 4 – 5–9 лет (40); 5 – 10–14 лет (35); 6 – 15–19 лет (72); 7 – 20–24 года (95); 8 – 25–34 года (80); 9 – 35–44 года (66); 10 – 45–54 года (51); 11 – 55–69 лет (12); 12 – 70+ лет (49).

водили плавление продуктов амплификации. Амплификация была выполнена при следующем температурном режиме: денатурация при 94°C – 2 мин, затем 50 циклов: 94°C – 20 сек, 64°C – 20 сек, 72°C – 10 сек. Реакцию проводили в 96-луночных планшетах, используя iQ5 Real Time PCR detection system (“Bio-Rad Laboratories”, Калифорния, США).

Секвенсный анализ. Для удобства секвенирования ген *LMP1* из изучаемого материала амплифицировали по частям, разделяя его последовательности на 2 (N- и C-фрагменты) или 3 части (N-, C1 и C2 фрагменты). Амплификацию проводили в 2 этапа: первый этап с внешними праймерами, второй – с внутренними. Условия выполнения реакции и использованные реактивы подробно описаны ранее [24].

После амплификации фрагментов гена *LMP1* их секвенировали в двух направлениях. ПЦР продукт предварительно очищали на мини-колонках фирмы «QIAGEN», используя соответствующие реактивы этой же фирмы. На реакцию брали примерно 100–200 нг ПЦР продукта, концентрацию ДНК оценивали визуально в агарозном геле.

Секвенирование ДНК проводили с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ДНК ABI PRISM 3100-Avant. Данных секвенирования обрабатывали с помощью программ Chromas 230 и Vector NTI.

При использованных методиках число амплифицированных и подвергнутых изучению изолятов гена *LMP1* было следующим: от 14 больных ЛХ: 9 из опухолевой ткани и 2 из образцов крови/смывов ПР; от 12 больных НХЛ: 6 из опухолевой ткани и 5 из образцов крови/смывов ПР; от 23 больных РНГ: 22 из опухолевой ткани и 20 из образцов смывов ПР; от 12 больных РЖ: 9 из опухолевой ткани и 8 из смывов ПР. Исследованию подлежали ампликоны *LMP1*, полученные из всех 10 образцов крови больных ИМ и 22 образцов крови доноров/здоровых лиц. Негативные результаты амплификации, полученные при тестировании ДНК на присутствие *LMP1*, по-видимому, отражают низкое содержание в этих образцах клеток, инфицированных ВЭБ.

Варианты LMP1 у больных ВЭБ-ассоциированной патологией и у здоровых лиц

Число изолятов LMP1, амплифицированных из тестируемых тканей	Варианты LMP1 по классификациям R. Edwards и соавт. [18] и K. Sandvey и соавт. [20]						
	B95.8/ группа A	China 1	China 2	Med+	Med-	NC	"вне варианта"
Лимфоциты периферической крови доноров/здоровых лиц (n=22) и больных ИМ (n = 10)							
Доноры крови/здоровые лица n%	15 68,2	4 18,2	0 0,0	0 0,0	1 4,5	2 9,1	0 0,0
Больные ИМ n%	5 50,0	0 0,0	0 0,0	0 0,0	2 20,0	1 10	2 20,0
Больные ЛХ (n = 14)							
Опухоль (л.у.) n%	4 44,4	1 11,1	0 0,0	0 0,0	2 22,2	2 22,2	0
Кровь /смыв ПР n%	1 50,0	0 0,0	0 0,0	0 0,0	0 0,0	1 50	0
Больные НХЛ (n = 12)							
Опухоль (л.у.) n%	3 50,0	1 16,7	0 0,0	1 16,7	0 0,0	1 16,6	0 0,0
Кровь/смыв n%	2 40,0	0 0,0	0 0,0	0 0,0	0 0,0	2 40,0	1 20,0
Больные РНГ (n = 23)							
Опухоль n%	6 27,3	2 9,1	0 0,00	9 40,9	2 9,1	1 4,5	2 9,1
Смыв ПР n%	6 30,0	0 0,0	0 0,0	6 30,0	4 20,0	3 15,0	1 5,0
Больные РЖ (n = 12)							
Опухоль n%	3 30,0	1 10,0	2 20,0	1 10,0	1 10,0	2 20,0	0 00,0
Смыв ПР n%	6 75,0	0 0,0	2 25,0	0 0,0	0 0,0	0 0,0	0 0,0
Итого ...	49	8	3	17	11	14	6
Всего ...	108						

Примечание. л.у. – лимфатический узел (опухолевый конгломерат).

Определение антител к ВЭБ

Титры IgG-антител к вирусному капсидному (ВКА) и раннему (РА) антигенам ВЭБ определяли в плазме больных и доноров крови методом непрямой иммунофлюоресценции, условия постановки которой и учет получаемых результатов были описаны ранее [25]. Титры антител представляли в виде их среднегеометрических значений (СГЗ).

Статистический анализ

Точный тест Фишера использовали для сравнения достоверности различий между процентом содержанием вариантов LMP1 в аналогичных биологических образцах в соответствующих группах больных и здоровых лиц. Значения $p < 0,05$ указывало на наличие существенных различий.

Результаты и обсуждение

О степени распространения ВЭБ в России можно косвенно судить по инфицированности этим вирусом различных возрастных групп населения Москвы. Как известно, детей до полугода после рождения от инфекции защищают материнские антитела, а их первичное заражение ВЭБ происходит в возрасте от 2 до 9 лет, что отражено на рисунке. При этом СГЗ титров антител к ВКА и процент инфицированных лиц к 5–9 годам достигают практически максимальных значений. С возрастом СГЗ титров вирусспецифических антител к этому же антигену незначительно снижаются

при высоком проценте инфицированных лиц (от 85,7 до 100%). Исключение составили лица в двух группах старше 55 лет, у которых при 100% инфицированности вирусом СГЗ титров антител к ВКА превысили соответствующие значения у лиц среднего возраста в 2–3 раза, что, вероятно, объясняется снижением у пожилых лиц иммунного статуса. Динамика СГЗ титров антител к РА по сути дела повторяет таковую к ВКА.

Секвенсный анализ нуклеотидных последовательностей гена LMP1, амплифицированного из ДНК лимфоцитов периферической крови здоровых лиц (доноров/здоровых вирусносителей), транслированных в аминокислотные последовательности, выявил доминирование у них низкодивергентного варианта B95.8/A (68,2%, 15/22) (табл. 1). У больных ИМ, доброкачественным лимфопролиферативным заболеванием, LMP1 B95.8/A также обнаруживали в высоком проценте случаев (50,0, 5/10). Интересно отметить, что высокая частота выявления указанного варианта LMP1 отмечена не только для здоровых лиц и больных ИМ, но и для больных с ВЭБ-ассоциированными опухолями, причем указанную закономерность наблюдали как для опухолевой ткани, так и для лимфоцитов периферической крови и/или эпителиальных клеток ПР (см. табл. 1). Наиболее высокий процент содержания варианта LMP1 B95.8/A в опухолевой ткани был обнаружен у больных НХЛ (50, 3/6), а в смывах ПР – у больных РЖ

Таблица 2

Варианты LMP1 из тестируемых образцов биологического материала больных РНГ

Код больного	Биопсия опухоли	Лимфоциты крови	Клетки смывов полости рта
Больные с совпадающими вариантами LMP1 в тестируемых образцах			
M2	B95.8/A	B95.8/A	B95.8/A
M23	B95.8/A	B95.8/A	B95.8/A
M27	Med+	н.а.	Med+
M28	Med+	Med+	Med+
M33	Med+	н.а.	Med+
M37	Med-	Med-	Med-
Lg115	B95.8/A	н.а.	B95.8/A
Больные с несовпадающими вариантами LMP1 в тестируемых образцах			
M6	B95.8/A	NC	NC
M7	Med+	Med-	Med-
M8	Ch1	B95.8/A	Med-
M11	NC	Med-	н.а.
M12	Med-	Med-	NC
M16	Med+	н.а.	B95.8/A
M20	Med-	NC	н.а.
M29	Med+	Med-	Med+
M42	Med+	Med-	Med+
M49	OC	Med+	Med-
Lg116	Ch1	н.а.	B95.8/A
Lg117	Med+	н.а.	B95.8/A
M47	B95.8/A	B95.8/A	BB

Примечание. н.а. – LMP1 не был амплифицирован; BB – «вне варианта».

(75,0, 6/8). В то же время высокодивергентные варианты LMP1 Ch1 и Med+, содержащие делецию 10 а.к. и характеризующиеся повышенной трансформирующей активностью, хоть и в невысоком проценте случаев, выявляли исключительно в образцах опухолевой ткани у тех же больных. Так, для больных ЛХ этот показатель был равен 11,1% (1/9), для больных НХЛ – 33,3% (2/6), для больных РНГ – 50,0% (11/22) и для больных РЖ – 22,2% (2/9). Эти результаты позволяют теоретически предположить, что ВЭБ-ассоциированные патологии могут возникать лишь у лиц, являющихся носителями вариантов LMP1 Ch1 и Med+. Однако обнаружение высоко-туморогенного варианта LMP1 Ch1 в 18,2% (4/22) образцов крови здоровых лиц опровергает такую возможность. Полученные данные свидетельствуют о персистенции среди населения России штаммов ВЭБ, подобных делетированному варианту Sao, которые содержат ген, обладающий выраженным трансформирующим потенциалом. Полученные данные совпадают с результатами других исследователей, указывающими на отсутствие вариантов LMP1, специфически ассоциированных с возникновением ВЭБ-ассоциированных патологий [26].

Важно отметить, что при анализе образцов LMP1, полученных от больных ИМ (2 образца), НХЛ (1 образец) и РНГ (3 образца) обнаружены аминокислотные последовательности, которые отличались друг от

друга и от известных вариантов, вследствие чего были обозначены нами как образцы «вне варианта» (BB) [27]. Примечателен и факт отсутствия в тестируемых группах больных и здоровых лиц варианта LMP1 Alaska и обнаружение широко распространенного в Китае варианта LMP1 Ch2 в опухолевой ткани и смыве ПР только у больных РЖ [18]. Имели ли какое-либо отношение к Китаю и его жителям эти больные, осталось неизвестным.

Несовпадающие варианты LMP1, обнаруживаемые в образцах опухоли и крови/смывов ПР, на примере больных РНГ представлены в табл. 2. Этот феномен можно, по-видимому, объяснить разными условиями и характером экспрессии ВЭБ в разных клетках-мишенях. В лимфоцитах периферической крови (В-клетках памяти) вирус персистирует в виде эписомальной ДНК, когда экспрессируется минимальное число вирусных генов, при этом вирус в В-клетках лишь изредка подвергается литической репликации. Эпителиальные же клетки ПР, как правило, подвергаются литической репликации, что сопровождается экспрессией целого спектра вирусных генов и формированием вирусных частиц. Для опухолевых клеток характерен скорее 2-й тип латентности с экспрессией ограниченного числа генов. Известно также, что в организме вирусносителя, как правило, постоянно происходит передача вирусных штаммов между полостью рта и периферической кровью. В полости же рта различные штаммы вируса сохраняются в течение продолжительного времени [28]. Таким образом, клеточное и органное происхождение вируса, вероятно, определяет тип вируса и вариант его онгена LMP1.

Несмотря на генетическую гетерогенность российских вариантов вирусного онкогена LMP1, амплифицируемых из тестируемых образцов больных и здоровых лиц, для них характерно наличие общих мутаций. Среди точечных нуклеотидных и дедуктивных а.к.-последовательностей LMP1 абсолютно преобладающими являются замены изолейцина на лейцин в 85-м положении (I85L), фенилаланина на тирозин в 106-м положении (F106Y), глутаминовой кислоты на глутамин в 328-м положении (E328Q) и серина на треонин в 366-м положении (S366T). Функциональное значение а.к.-замен в 85-й и 106-й позициях, специфических для высокотуморогенного варианта LMP1 Sao, показано в работе T. Nitta и соавт. [29]. В частности, ими было обнаружено, что мутантный вариант LMP1 B95.8, содержащий эти а.к.-замены, обладает пониженной способностью вызывать смерть клеток, но в случае наличия только одной замены, цитолитический эффект отменяется полностью или частично. В других исследованиях наличие перечисленных выше мутаций (I85L, F106Y, E328Q, S366T) также связывают со снижением цитотоксичности и усилением трансформирующей активности белка LMP1 [27, 30]. Встречающаяся замена метионина на изолейцин в 129-м положении (M129I) является критичной как для функциональной активности LMP1, так и для самого вируса. Эта замена отменяет негативную регуляцию сигнальных функций LMP1, при этом вирус не может завершить полноценный литический цикл [30]. Обнаруженная нами мутация S366T имеет, по-видимому, принципиальное значение, так как присутствует во всех образцах LMP1, описанных в

ЛИТЕРАТУРА

большинстве опубликованных работ. Ее возможная роль сводится к прямому усилению трансформирующих свойств *LMP1* по не известному пока механизму вследствие инактивации криптического сайта связывания HOS/ β -TrCP [23].

Важно также отметить, что в российских изолятах *LMP1* мутация в 212-м положении (G212S) полностью отсутствует, тогда как в других регионах мира она встречается довольно часто [31]. В то же время показано, что совокупность замен в 212, 366 и 350-м (S350A) положениях приводит к неспособности *LMP1* связывать HOS белки (SCF HOS/ β -TrCP) и, таким образом, подвергаться убиквитинированию [23]. Не подвергшийся убиквитинированию *LMP1* в результате его накопления в клетке дает выраженный трансформирующий эффект благодаря нарастающей активации под его воздействием сигнального пути NF κ B [32]. Другие обнаруженные нами точечные мутации (D210E, G352S, W39C, L93V, A96T, I122L, S239M) ранее не были описаны, при этом некоторые из них локализируются вблизи функциональных доменов *LMP1* и, возможно, могут оказывать влияние на свойства этой молекулы.

На основании анализа полученных результатов и данных литературы можно предположить наличие двух самостоятельных направлений генетического дрейфа гена *LMP1*. Одно направление, по-видимому, свойственно не претерпевшим серьезных мутационных перестроек так называемым низкодивергентным образцам гена, относящимся к варианту B95.8/A и характеризующимся наличием «молчащей» замены Т на С в 356-м кодоне *LMP1*, что соответствует 168–253-му положению генома ВЭБ [27,33]. Низкий уровень дивергентности у вариантов типа B95.8/A подтверждается и отсутствием делеции а.к. в 276–280-м положении, представляющей *box1*-область для распознавания Jak3 [34]. Данная делеция, относящаяся также к числу Сао-подобных, обнаружена нами во многих российских образцах *LMP1*, но ее роль остается неизвестной. Другое направление, вероятно, имеет место у представителей высокодивергентных образцов *LMP1*, относящихся к вариантам Ch1, Ch2, Med+, Med- и NC и содержащих альтернативную «молчащую» замену А на Т в 342-м кодоне, где А замещен на Т в 168–295-м нуклеотиде. При этом ни один из образцов *LMP1* в двух сравниваемых группах не содержал одновременно обе указанные «молчащие» замены. Следует, однако, отметить, что общий тренд генетической перестройки гена во времени, по-видимому, направлен в сторону накопления мутационных изменений и усиления его трансформирующего потенциала.

Таким образом, результаты нашего исследования, проведенного, хотя и на небольшом клиническом материале, дают достаточно четкое представление об инфицированности населения страны ВЭБ и полиморфизме его главного онкогена *LMP1* у больных с различными ВЭБ-ассоциированными патологиями и здоровых лиц. Расширение таких исследований с использованием большего числа наблюдений, особенно в различных географических и климатических регионах, несомненно позволит уточнить представленные данные и дополнить существующие представления о канцерогенезе, ассоциированном с ВЭБ.

- Young L.S., Rickinson A.B. Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat. Rev. Cancer*. 2004; 4(10): 757–68.
- Young L.S., Murray P.G. Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours. *Oncogene*. 2003; 22(33): 5108–21.
- Rickinson A. Epstein-Barr virus. *Virus Res*. 2002; 82(1-2): 109–13.
- Kaye K.M., Izumi K.M., Kieff E. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 1993; 90(19): 9150–54.
- Moorthy R.K., Thorley-Lawson D.A. All three domains of the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein LMP-1 are required for transformation of rat-1 fibroblasts. *J. Virol.* 1993; 67(3): 1638–46.
- Dirmeier U., Neuhierl B., Kilger E., Reischbach G., Sandberg M.L., Hammerschmidt W. Latent membrane protein 1 is critical for efficient growth transformation of human B cells by Epstein-Barr virus. *Cancer Res*. 2003; 63(11): 2982–9.
- Eliopoulos A.G., Young L.S. LMP1 structure and signal transduction. *Semin. Cancer Biol.* 2001; 11(6): 435–44.
- Hu L.F., Zabarovsky E.R., Chen F., Cao S.L., Ernberg I., Klein G. et al. Isolation and sequencing of the Epstein-Barr virus BNLF-1 gene (*LMP1*) from a Chinese nasopharyngeal carcinoma. *J. Gen. Virol.* 1991; 72 (10): 2399–409.
- Hu L.F., Chen F., Zheng X., Ernberg I., Cao S.L., Christensson B. et al. Clonability and tumorigenicity of human epithelial cells expressing the EBV encoded membrane protein LMP1. *Oncogene*. 1993; 8(6): 1575–83.
- Смирнова К.В., Дидук С.В., Гурцевич В.Э. Функциональный анализ вариантов латентного мембранного белка 1 (*LMP1*) вируса Эпштейна-Барр у больных лимфопролиферативными заболеваниями. *Биомедицинская химия*. 2011; 57(1): 114–26.
- Dawson C.W., Port R.J., Young L.S. The role of the EBV-encoded latent membrane proteins LMP1 and LMP2 in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma (NPC). *Semin. Cancer Biol.* 2012; 22(2): 144–53.
- Horikawa T., Yoshizaki T., Kondo S., Furukawa M., Kaizaki Y., Pagano J.S. Epstein-Barr Virus latent membrane protein 1 induces Snail and epithelial-mesenchymal transition in metastatic nasopharyngeal carcinoma. *Br. J. Cancer*. 2011; 104(7): 1160–67.
- Kung C.P., Meckes D.G., Jr., Raab-Traub N. Epstein-Barr virus LMP1 activates EGFR, STAT3, and ERK through effects on PKCdelta. *J. Virol.* 2011; 85(9): 4399–08.
- Fahraeus R., Rymo L., Rhim J.S., Klein G. Morphological transformation of human keratinocytes expressing the LMP gene of Epstein-Barr virus. *Nature*. 1990; 345(6274): 447–9.
- Chen M.L., Tsai C.N., Liang C.L., Shu C.H., Huang C.R., Sulitzeanu D. et al. Cloning and characterization of the latent membrane protein (LMP) of a specific Epstein-Barr virus variant derived from the nasopharyngeal carcinoma in the Taiwanese population. *Oncogene*. 1992; 7(11): 2131–40.
- Miller W.E., Cheshire J.L., Baldwin A.S.Jr., Raab-Traub N. The NPC derived C15 LMP1 protein confers enhanced activation of NF-kappa B and induction of the EGFR in epithelial cells. *Oncogene*. 1998; 16(14): 1869–77.
- Walling D.M., Shebib N., Weaver S.C., Nichols C.M., Webster-Cyriaque J. The molecular epidemiology and evolution of Epstein-Barr virus: sequence variation and genetic recombination in the latent membrane protein-1 gene. *J. Infect. Dis.* 1999; 179(4): 763–74.
- Edwards R.H., Seillier-Moiseiwitsch F., Raab-Traub N. Signature amino acid changes in latent membrane protein 1 distinguish Epstein-Barr virus strains. *Virology*. 1999; 261(1): 79–95.
- Nitta T., Chiba A., Yamamoto N., Yamaoka S. Lack of cytotoxic property in a variant of Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 isolated from nasopharyngeal carcinoma. *Cell. Signal*. 2004; 16(9): 1071–81.
- Sandvej K., Munch M., Hamilton-Dutoit S. Mutations in the Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (BNLF-1) gene in spontaneous lymphoblastoid cell lines: effect on in vitro transformation associated parameters and tumorigenicity in SCID and nude mice. *Clin. Mol. Pathol.* 1996; 49(5): 290–7.
- Zhou X.G., Sandvej K., Li P.J., Ji X.L., Yan Q.H., Zhang X.P. et al. Epstein-Barr virus gene polymorphisms in Chinese Hodgkin's disease cases and healthy donors: identification of three distinct virus variants. *J. Gen. Virol.* 2001; 82(Pt 5): 1157–67.
- Mainou B.A., Raab-Traub N. LMP1 strain variants: biological and molecular properties. *J. Virol.* 2006; 80(13): 6458–68.
- Tang W., Pavlish O.A., Spiegelman V.S., Parkhitko A.A., Fuchs S.Y. Interaction of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 with SCFHOS/beta-TrCP E3 ubiquitin ligase regulates extent of NF-kappaB activation. *J. Biol. Chem.* 2003; 278(49): 48942–9.
- Hahn P., Novikova E., Scherback L., Janik C., Pavlish O., Arkhipov V. et al. The LMP1 gene isolated from Russian nasopharyngeal carcinoma has no 30-bp deletion. *Int. J. Cancer* 2001; 91(6): 815–21.

25. Gurtsevitch V., Ruiz R., Stepina V., Plachov I., Le Riverend E., Glazkova T. et al. Epstein-Barr viral serology in nasopharyngeal carcinoma patients in the USSR and Cuba, and its value for differential diagnosis of the disease. *Int. J. Cancer*. 1986; 37(3): 375–81.
26. Cui Y., Wang Y., Liu X., Chao Y., Xing X., Zhao C. et al. Genotypic analysis of Epstein-Barr virus isolates associated with nasopharyngeal carcinoma in Northern China. *Intervirology*. 2011; 54(3): 131–8.
27. Павлиш О.А., Дидук С.В., Смирнова К.В., Щербак Л.Н., Гончарова Е.В., Шалгинских Н.А. и др. Мутации гена LMP1 вируса Эпштейна–Барр у российских больных лимфоидной патологией и здоровых лиц. *Вопросы вирусологии*. 2008; 53(1): 10–6.
28. Sitki-Green D., Covington M., Raab-Traub N. Compartmentalization and transmission of multiple Epstein-Barr virus strains in asymptomatic carriers. *J. Virol*. 2003; 77(3): 1840–7.
29. Nitta T., Chiba A., Yamamoto N., Yamaoka S. Lack of cytotoxic property in a variant of Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 isolated from nasopharyngeal carcinoma. *Cell Signal*. 2004; 16(9): 1071–81.
30. Faumont N., Chanut A., Benard A., Cogne N., Delsol G., Feuillard J. et al. Comparative analysis of oncogenic properties and nuclear factor-kappaB activity of latent membrane protein 1 natural variants from Hodgkin's lymphoma's Reed-Sternberg cells and normal B-lymphocytes. *Haematologica*. 2009; 94(3): 355–63.
31. Nagamine M., Takahara M., Kishibe K., Nagato T., Ishii H., Bando N. et al. Sequence variations of Epstein-Barr virus LMP1 gene in nasal NK/T-cell lymphoma. *Virus Genes*. 2007; 34(1): 47–54.
32. Дидук С.В., Смирнова К.В., Павлиш О.А., Гурцевич В.Э. Роль функционально значимых мутаций гена LMP1 вируса Эпштейна–Барр в активации клеточных сигнальных путей. *Биохимия*. 2008; 73(10): 1414–21.
33. Sandvej K., Gratama J.W., Munch M., Zhou X.G., Bolhuis R.L., Andresen B.S. et al. Sequence analysis of the Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein-1 gene and promoter region: identification of four variants among wild-type EBV isolates. *Blood*. 1997; 90(1): 323–30.
34. Gires O., Kohlhober F., Kilger E., Baumann M., Kieser A., Kaiser C. et al. Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus interacts with JAK3 and activates STAT proteins. *EMBO J*. 1999; 18(11): 3064–73.
14. Fahraeus R., Rymo L., Rhim J.S., Klein G. Morphological transformation of human keratinocytes expressing the LMP gene of Epstein-Barr virus. *Nature*. 1990; 345(6274): 447–9.
15. Chen M.L., Tsai C.N., Liang C.L., Shu C.H., Huang C.R., Sulitzeanu D. et al. Cloning and characterization of the latent membrane protein (LMP) of a specific Epstein-Barr virus variant derived from the nasopharyngeal carcinoma in the Taiwanese population. *Oncogene*. 1992; 7(11): 2131–40.
16. Miller W.E., Cheshire J.L., Baldwin A.S.Jr., Raab-Traub N. The NPC derived C15 LMP1 protein confers enhanced activation of NF-kappa B and induction of the EGFR in epithelial cells. *Oncogene*. 1998; 16(14): 1869–77.
17. Walling D.M., Shebib N., Weaver S.C., Nichols C.M., Flaitz C.M., Webster-Cyriaque J. The molecular epidemiology and evolution of Epstein-Barr virus: sequence variation and genetic recombination in the latent membrane protein-1 gene. *J. Infect. Dis*. 1999; 179(4): 763–74.
18. Edwards R.H., Seillier-Moisewitsch F., Raab-Traub N. Signature amino acid changes in latent membrane protein 1 distinguish Epstein-Barr virus strains. *Virology*. 1999; 261(1): 79–95.
19. Nitta T., Chiba A., Yamamoto N., Yamaoka S. Lack of cytotoxic property in a variant of Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 isolated from nasopharyngeal carcinoma. *Cell Signal*. 2004; 16(9): 1071–81.
20. Sandvej K., Munch M., Hamilton-Dutoit S. Mutations in the Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (BNLF-1) gene in spontaneous lymphoblastoid cell lines: effect on in vitro transformation associated parameters and tumorigenicity in SCID and nude mice. *Clin. Mol. Pathol*. 1996; 49(5): 290–7.
21. Zhou X.G., Sandvej K., Li P.J., Ji X.L., Yan Q.H., Zhang X.P. et al. Epstein-Barr virus gene polymorphisms in Chinese Hodgkin's disease cases and healthy donors: identification of three distinct virus variants. *J. Gen. Virol*. 2001; 82(Pt 5): 1157–67.
22. Mainou B.A., Raab-Traub N. LMP1 strain variants: biological and molecular properties. *J. Virol*. 2006; 80(13): 6458–68.
23. Tang W., Pavlish O.A., Spiegelman V.S., Parkhitko A.A., Fuchs S.Y. Interaction of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 with SCFHOS/beta-TrCP E3 ubiquitin ligase regulates extent of NF-kappaB activation. *J. Biol. Chem*. 2003; 278(49): 48942–9.
24. Hahn P., Novikova E., Scherback L., Janik C., Pavlish O., Arkhipov V. et al. The LMP1 gene isolated from Russian nasopharyngeal carcinoma has no 30-bp deletion. *Int. J. Cancer* 2001; 91(6): 815–21.
25. Gurtsevitch V., Ruiz R., Stepina V., Plachov I., Le Riverend E., Glazkova T. et al. Epstein-Barr viral serology in nasopharyngeal carcinoma patients in the USSR and Cuba, and its value for differential diagnosis of the disease. *Int. J. Cancer*. 1986; 37(3): 375–81.

REFERENCES

1. Young L.S., Rickinson A.B. Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat. Rev. Cancer*. 2004; 4(10): 757–68.
2. Young L.S., Murray P.G. Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours. *Oncogene*. 2003; 22(33): 5108–21.
3. Rickinson A. Epstein-Barr virus. *Virus Res*. 2002; 82(1-2): 109–13.
4. Kaye K.M., Izumi K.M., Kieff E. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 1993; 90(19): 9150–54.
5. Moorthy R.K., Thorley-Lawson D.A. All three domains of the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein LMP-1 are required for transformation of rat-1 fibroblasts. *J. Virol*. 1993; 67(3): 1638–46.
6. Dirmeier U., Neuhierl B., Kilger E., Reisbach G., Sandberg M.L., Hammerschmidt W. Latent membrane protein 1 is critical for efficient growth transformation of human B cells by Epstein-Barr virus. *Cancer Res*. 2003; 63(11): 2982–9.
7. Eliopoulos A.G., Young L.S. LMP1 structure and signal transduction. *Semin. Cancer Biol*. 2001; 11(6): 435–44.
8. Hu L.F., Zabarovsky E.R., Chen F., Cao S.L., Ernberg I., Klein G. et al. Isolation and sequencing of the Epstein-Barr virus BNLF-1 gene (LMP1) from a Chinese nasopharyngeal carcinoma. *J. Gen. Virol*. 1991; 72 (10): 2399–409.
9. Hu L.F., Chen F., Zheng X., Ernberg I., Cao S.L., Christensson B. et al. Clonability and tumorigenicity of human epithelial cells expressing the EBV encoded membrane protein LMP1. *Oncogene*. 1993; 8(6): 1575–83.
10. Smirnova K.V., Diduk S.V., Gurtsevich V.E. Functional analysis of Epstein-Barr virus latent membrane proteins (LMP1) in patients with lymphoproliferative disorders. *Biomeditsinskaya Khimiya*. 2011; 57(1): 114–26. (in Russian)
11. Dawson C.W., Port R.J., Young L.S. The role of the EBV-encoded latent membrane proteins LMP1 and LMP2 in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma (NPC). *Semin. Cancer Biol*. 2012; 22(2): 144–53.
12. Horikawa T., Yoshizaki T., Kondo S., Furukawa M., Kaizaki Y., Pagano J.S. Epstein-Barr Virus latent membrane protein 1 induces Snail and epithelial-mesenchymal transition in metastatic nasopharyngeal carcinoma. *Br. J. Cancer*. 2011; 104(7): 1160–67.
13. Kung C.P., Meckes D.G., Jr., Raab-Traub N. Epstein-Barr virus LMP1 activates EGFR, STAT3, and ERK through effects on PKCdelta. *J. Virol*. 2011; 85(9): 4399–08.
30. Faumont N., Chanut A., Benard A., Cogne N., Delsol G., Feuillard J. et al. Comparative analysis of oncogenic properties and nuclear factor-kappaB activity of latent membrane protein 1 natural variants from Hodgkin's lymphoma's Reed-Sternberg cells and normal B-lymphocytes. *Haematologica*. 2009; 94(3): 355–63.
31. Nagamine M., Takahara M., Kishibe K., Nagato T., Ishii H., Bando N. et al. Sequence variations of Epstein-Barr virus LMP1 gene in nasal NK/T-cell lymphoma. *Virus Genes*. 2007; 34(1): 47–54.
32. Diduk S.V., Smirnova K.V., Pavlish O.A., Gurtsevich V.E. Functionally significant mutations in the Epstein-Barr virus LMP1 gene and their role in activation of cell signaling pathways. *Biokhimiya*. 2008; 73(10): 1134–9. (in Russian)
33. Sandvej K., Gratama J.W., Munch M., Zhou X.G., Bolhuis R.L., Andresen B.S. et al. Sequence analysis of the Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein-1 gene and promoter region: identification of four variants among wild-type EBV isolates. *Blood*. 1997; 90(1): 323–30.
34. Gires O., Kohlhober F., Kilger E., Baumann M., Kieser A., Kaiser C. et al. Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus interacts with JAK3 and activates STAT proteins. *EMBO J*. 1999; 18(11): 3064–73.

Хисматуллина Н.А.^{1,3}, Гулюкин А.М.^{2,1}, Гулюкин М.И.², Иванов А.В.¹, Сабирова В.В.¹, Южаков А.Г.²,
Александрова Н.М.^{3,1}, Самерханов И.И.¹, Алипер Т.И.^{4,2}

Два случая гидрофобии в Республике Татарстан: прижизненная и постмортальная лабораторная диагностика

¹ФГБУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», Минсельхоз России, 420075, г. Казань;

²Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко, 109428,

г. Москва; ³Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420008, г. Казань;

⁴Институт вирусологии им. Д.И. Иванова ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва

Представлены результаты прижизненной и постмортальной лабораторной диагностики двух случаев гидрофобии в Республике Татарстан: пострадавших от укуса волком в 2002 г. и укушенного бродячей собакой на о. Гоа в Индии в 2013 г.

При исследовании отпечатков с роговицы глаза пострадавшей от укуса волком по методу флюоресцирующих антител (МФА) положительный результат установлен за 6 сут до смерти больной. Полученные результаты подтверждены постмортально исследованием различных отделов головного мозга и слюнных желез по МФА, методом иммуноферментного анализа (ИФА), световой микроскопией и биопробой.

При исследованиях проб роговицы глаза пострадавшего от укуса бродячей собаки по МФА, слюны по методу ИФА выявлен антиген вируса бешенства, а также в слюне и слезной жидкости - геном вируса бешенства в гнездовой полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией за 9 сут до смерти больного. Результаты прижизненной диагностики больного гидрофобией подтверждены постмортально при исследовании различных отделов головного мозга по МФА, методом ИФА и биопробой.

Положительные результаты по прижизненной и постмортальной диагностике подтверждают клинически поставленный диагноз гидрофобии.

Результаты анализа последовательности нуклеотидов фрагмента гена G вируса бешенства размером 238 н.о. указали на незначительное отличие изучаемого изолята (2 rabies) от от RABV AY956319, составляющее 1,68%, отличие от вакцинных штаммов «Внуково-32» на 10,5% и SAD B19 на 10,9%, относящихся к вирусам бешенства 1-го генотипа; значительное отличие от лиссаподобных вирусов 2, 4, 5 и 6-го генотипов, составляющее 21–32,7%. Полученные результаты свидетельствуют о филогенетической близости изучаемого изолята (2 rabies) со штаммом RABV AY956319 вируса бешенства, относящегося к 1-му генотипу.

Ключевые слова: гидрофобия; прижизненная и постмортальная диагностика; метод флюоресцирующих антител; иммуноферментный анализ; полимеразная цепная реакция; секвенирование; филогенетический анализ.

Для цитирования: Вопросы вирусологии. 2015; 60(2): 18–24.

Khismatullina N.A.^{1,3}, Gulyukin A.M.^{2,1}, Gulyukin M.I.², Ivanov A.V.¹, Sabirova V.V.¹, Yuzhakov A.G.²,
Alexandrova N.M.^{3,1}, Samerkhanov I.I.¹, Aliper T.I.⁴

Two cases of hydrophobia in the Republic of Tatarstan: *in vivo* and *postmortem* laboratory diagnosis

¹Federal Centre for Toxicological, Radiation and Biological Safety, 420075, Kazan, Russia; ²All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine, 109428, Moscow, Russia; ³Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, 420008, Kazan, Russia; ⁴The D.I. Ivanovsky Institute of Virology Federal State Budgetary Institution "Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya" of the Ministry of Health of the Russian Federation, 123098, Moscow, Russia

The results of rabies *in vivo* and *postmortem* laboratory detection in two cases registered in the Republic of Tatarstan are reported: a victim bitten by a wolf in 2002 and another one bitten by a stray dog on Goa Island, India, in 2013. In the patient bitten by a wolf cornea imprints studies using the method of fluorescent antibodies (MFA) showed rabies-positive result 6 days before the patient's death.

The results were confirmed by *postmortem* examination of different parts of the brain and salivary glands using the MFA, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), optical microscopy, and bioassay methods.

In the patient bitten by a stray dog the rabies virus specific antigen was detected by eye cornea studies using the MFA method and saliva studies using the ELISA. The rabies virus genome was also isolated from saliva and tear fluid using nested reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 9 days before the patient's death. The *in vivo* studies results were consistent with the *postmortem* study of different parts of the brain using the MFA, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), optical microscopy, and bioassay methods.

All the infection-positive results of both *in vivo* and *postmortem* studies were consistent with the clinical studies, i.e. rabies diagnosis was confirmed.

The analysis of the rabies virus gene G fragment nucleotide sequence of 238 nd length showed a slight difference between the studied isolates (2 rabies) and the RABV AY956319 (1.68%), difference by 10.5% from the Vnuково-32 vaccine strains and by 10.9 % from the SAD B19 rabies strain, respectively (rabies viruses of 1st genotype). It was also significantly different from the lissaviruses of 2, 4, 5, and 6 genotypes (21.0-32.7%). The obtained results indicate phylogenetic closeness of the studied isolates (2 rabies) with the RABV AY956319 rabies virus strain belonging to the 1st genotype.

Key words: hydrophobia; *in vivo* and *postmortem* diagnosis; fluorescent antibody method; enzyme-linked immunosorbent assay; polymerase chain reaction; sequencing; phylogenetic analysis.

Citation: Voprosy virusologii. 2015; 60 (2): 18–24. (In Russ.)

For correspondence: Nailya Khismatullina, Sc.D, Prof.; e-mail: nailaanvar@gmail.com

Введение

Ситуация по уровню заболеваемости бешенством в России характеризуется как крайне неблагоприятная [1-3]. За последние 20 лет в России регистрируется самая высокая смертность среди развитых стран [4]. За 2008–2011 гг. зарегистрирован 61 случай гидрофобии [5]. Ежегодно в стране антирабическую помощь получают от 250 до 450 тыс. человек.

В Республике Татарстан (РТ) эпизоотическая обстановка по бешенству остается напряженной [6]. По данным Управления Роспотребнадзора по РТ, в РТ за последние 15 лет за медицинской помощью из числа пострадавших в разные годы обратились 11 990–16 065 человек, а показатель на 100 тысяч населения – 319,4–424,5. По данным Управления Роспотребнадзора по РТ только за 4 мес текущего года за медицинской помощью обратились около 4 тыс. татарстанцев, пострадавших от укусов различных животных, из них 45% подверглись нападению безнадзорных собак [7].

С 1951 по 2013 г. в РТ зарегистрированы 48 человек, больных гидрофобией. При анализе случаев гидрофобии в РТ установили, что основными причинами заболеваний людей гидрофобией, укушенных бешеными животными, являются несвоевременное обращение пострадавших за медицинской помощью, нарушение схемы иммунизации, отказ от назначенного курса вакцинации, нарушение режима труда и отдыха в период проведения антирабических прививок.

В 2002 г. в РТ зарегистрирован случай гидрофобии.

Б о л ь н а я Б., 49 лет, поступила в Казанскую инфекционную больницу (КИБ) № 1 из Центральной районной больницы (ЦРБ) Муслумовского района РТ с предположительным диагнозом гидрофобии. В с. Тархан волк был застрелен, материал от трупа волка был направлен на ветэкспертизу, которая дала положительный результат на бешенство.

В 2013 г. в Зеленодольском районе РТ зарегистрирован случай гидрофобии. Б о л ь н о й Г. поступил в Республиканскую клиническую инфекционную больницу 26.12.2013 на 9-е сутки болезни с признаками гидрофобии. Находясь в Индии на о. Гоа, был укушен бездомной собакой в правую голень 25.10.2013, за антирабической помощью не обратился.

Как известно, предварительный диагноз ставят с учетом эпидемиологических и клинических показателей, окончательный диагноз – на основании данных лабораторных исследований [5]. Лабораторную диагностику бешенства в основном проводят постмортально. В зарубежной и отечественной литературе имеются сообщения о применении метода флюоресцирующих антител (МФА) для прижизненной диагностики бешенства при исследовании отпечатков роговицы глаз у экспериментально зараженных животных [8, 9], а также у больных гидрофобией [10, 11]. Имеются сообщения о применении МФА на основе моноклональных антител к нуклеопротеину вируса бешенства [12, 13], что повышает результативность МФА.

Прижизненная диагностика бешенства включает исследование отпечатков роговицы, биоптатов кожи, мозга, выделение вируса из слюны, слезной и спинномозговой жидкости путем интрацеребрального заражения новорожденных мышей.

По данным многих авторов, прижизненная диагностика гидрофобии необходима для дифференциации от схожих с клиникой заболеваний: столбняка, белой горячки, отравления атропином, стрихнином, истерии. Бульбарные формы бешенства дифференцируют от ботулизма, полиомиелита, летаргического энцефалита, а паралитические от полиомиелита и инфекционного полиневрита.

Научно-практический интерес представляют также исследования генома изолятов вируса бешенства методом полимеразно-цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с последующим секвенированием продуктов ОТ-ПЦР, что позволяет выявлять межштамбовые различия и проводить дифференциацию эпизоотических изолятов вируса бешенства с вакцинными штаммами рабического вируса [14].

Цель исследований – провести анализ прижизненной и постмортальной лабораторной диагностики двух случаев гидрофобии в РТ: пострадавших от укуса волком в 2002 г. и укушенного бродячей собакой на о. Гоа в Индии в 2013 г., а также филогенетический анализ фрагмента гена, который кодирует гликопротеин вируса, выделенного из мозга пострадавшего Г. от укуса бродячей собаки в сравнении с вирусами 1, 2, 4, 5 и 6-го генотипов.

Материалы и методы

В работе использовали слюну, слезную жидкость, отпечатки с роговицы пострадавших Б. и Г. от укусов волка и бродячей собаки, а также различные отделы головного мозга и слюнные железы умерших от гидрофобии. Исследовали также сыворотки крови людей, пострадавших от укусов животных. Лабораторные исследования проводили прямым МФА по ГОСТу 26075-84 с использованием «Флюоресцирующего антирабического глобулина» ТУ 9388-027-00492374-2007, а также сэндвич-вариантом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием «Набора препаратов для диагностики бешенства методом ИФА» ТУ 9388-025-00492374-2007, разработанных в ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» (Казань) и утвержденных Россельхознадзором 3.03.2008. Применяли также световую микроскопию (окраска по Селлерсу), непрямой вариант ИФА с использованием кроличьих иммуноглобулинов против глобулинов человека, меченных пероксидазой, производства ИЭМ им. Гамалеи РАМН (Москва), и гнездовую ОТ-ПЦР. ОТ-ПЦР проводили с помощью Thermo Scientific Maxima Reverse (Ferments). В работе использовали маркер молекулярного веса 100-3000 пар оснований (Ferments).

Нуклеотидную последовательность полученных ампликонов определяли с применением праймеров, которые использовали в ОТ-ПЦР, и набора BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, США). Анализ полученных нуклеотидных последовательностей проводили с помощью пакетов программ BioEdit (version 7.0.0. Copyright © 1997–2004) и программы SeqMan из пакета программ Lasergene (version 7.1.0. (44) Copyright © 1993–2006).

Выравнивание последовательностей выполняли, используя алгоритм neighbor joining (NJ).

Для сравнительного анализа использовали нуклеотидные последовательности гена *G* штаммов вируса бешенства 1, 2, 4, 5 и 6-го генотипов из базы данных GenBank: 1-й генотип – RABVAY956319 (RABV), выделенный из слюны реципиента, получившего донорский орган, импортированный из Индии (Pfeffer S., Panning M., Drosten C. Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine. 2005), SADB19; 2-й генотип 0406SEN; 4-й генотип 86132SA, 94286SA; 5-й генотип 03002FRA, 8918FRA, RV9-1; 6-й генотип 9018HOL, RV1333 (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Результаты и обсуждение

Жительница поселка «Русский Шуган» Муслумовского района РТ в 4 ч утра по пути на ферму подверглась нападению бешеным волком в момент, когда она услышала шаги и обернулась лицом к животному. Укушенная бешеным волком, в тяжелом состоянии по по-



Рис. 1. Прижизненное обнаружение антигена вируса бешенства в роговице пациентки Б. методом флюоресцирующих антител.

Объектив 100, гомаль 1,7.

воду нанесенных волком множественных рваных ран в волосистой части головы, подбородочной области, кистей рук, нижних конечностей и обильного кровотечения обратилась в ЦРБ Муслумовского района, откуда поступила в КИБ с предположительным диагнозом гидрофобии.

В день поступления больной Б. в КИБ произвели забор материала на следующие исследования: крови в объеме 5 мл из вены – на содержание антител к вирусу бешенства, отпечатков с роговицы глаза и слюны – на обнаружение антигена вируса бешенства.

В результате лабораторных исследований, проведенных прямым МФА отпечатков с роговицы глаза пострадавшей, в нескольких полях зрения обнаружили специфический антиген вируса бешенства в виде типичных отчетливо выраженных ярких желто-зеленых гранул разной формы и величины с интенсивностью свечения в три креста (рис. 1).

В контрольных препаратах подобных образований не отметили.

Активность сыворотки крови больной Б. составила в непрямом ИФА 1:10 ($K_{cn} = 2,3$). Низкое содержание специфических к вирусу бешенства антител в сыворотке крови пострадавшей в период разгара болезни (за 6 дней до смерти) связано, по-видимому, с образованием комплексов антител с вирусом, циркулирующим в организме пострадавшей, что еще более снизило определяемый уровень антирабических антител, вырабатываемых на комбинированное введение антирабического иммуноглобулина и вакцины.

Постмортальный анализ различных отделов головного мозга прямым МФА дал положительный результат по обнаружению специфического антигена вируса бешенства, оцениваемый в крестах: в аммоновом роге – множество специфических комплексов-включений (+++); коре больших полушарий, мозжечке и продолговатом мозге – единичное количество ярко светящихся комплексов-включений (+++).

Методом ИФА в суспензиях различных отделов головного мозга и слюнных железах обнаружили специфический антиген вируса бешенства в титрах: в аммоновом роге – 1:160, $K_{cn} = 2,2$; продолговатом

мозге – 1:80, $K_{cn} = 2,2$; мозжечке – 1:80, $K_{cn} = 2,2$; коре больших полушарий – 1:40, $K_{cn} = 3,1$; слюнных железах – 1:20, $K_{cn} = 2,1$.

Световой микроскопией на отпечатках с аммонова рога, продолговатого мозга, мозжечка и коры больших полушарий обнаружили тельца Бабеша–Негри, являющиеся патогномоничными для бешенства (рис. 2).

В цитоплазме гибнущих немногочисленных нейронов обнаружили единичные или по 2–3 образования телец Бабеша–Негри округлой или овальной формы, разного размера.

Для постановки биопробы использовали белых мышей-сосунков по ГОСТу 26075-84. Интрацеребральное заражение белых мышей суспензиями мозга и слюнных желез дало положительный результат на 14–17-е сутки после заражения с характерными клиническими признаками (взъерошенность шерсти, горбатость спины, паралич и др.). Результаты биопробы подтверждены положительными результатами по МФА отпечатков мозга белых мышей.

Необходимо отметить, что пострадавшая получила в первые 48 ч комбинированное введение антирабического иммуноглобулина и антирабической вакцины. Однако у нее остро развилась развернутая клиника гидрофобии с прогрессированием основных психоневрологических симптомов в течение 7 сут. Гидрофобия и аэрофобия носили умеренный характер, доминировали психические расстройства и быстрое развитие парезов конечностей. Инкубационный период составил 26 сут. Гидрофобия у данной больной установлена клинически и подтверждена результатами лабораторных исследований при жизни и постмортально [11]. По данным А.А. Мовсесянца и Т.А. Бектимирова (2002), одной из причин заболевания и смерти людей от гидрофобии являются случаи позднего обращения пострадавших [15].

Таким образом, проведенными лабораторными исследованиями по МФА, ИФА и световой микроскопией, а также биопробой на белых мышах получены положительные результаты по обнаружению специфического антигена вируса бешенства и в отпечатках с роговицы глаза пострадавшей, а также в различных отделах головного мозга и слюнных желез. Полученные результаты подтверждают клинически поставленный диагноз гидрофобии. При этом иммунофлюоресцентное исследование отпечатков с роговицы глаза пострадавшей показало положительный результат за 6 сут до смерти больной.

В тот же день, когда была покусана бешеным волком

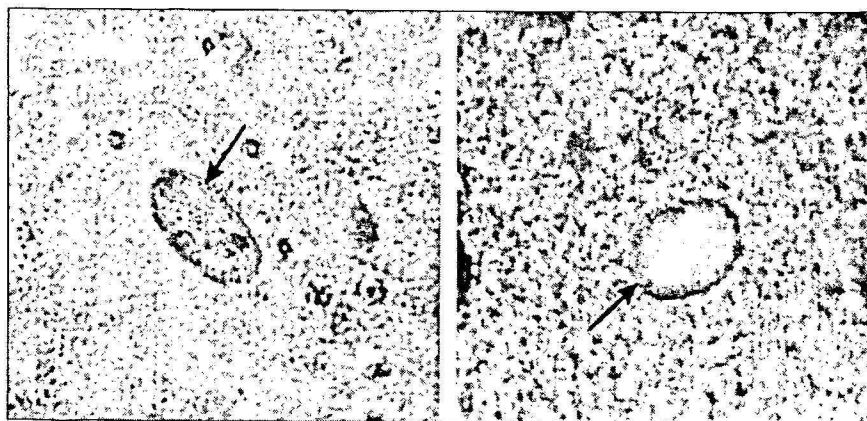


Рис. 2. Уличное бешенство, мозг человека. Включение в цитоплазме дегенерированного нейрона – типичное тельце Бабеша–Негри с базофильной внутренней зернистостью.

Окраска по Селлерсу. Ув. 2400.

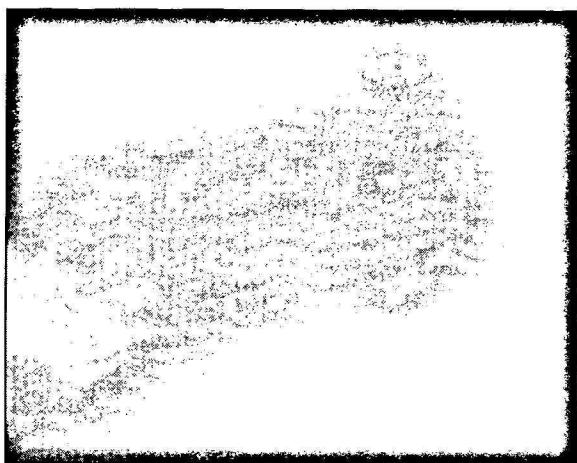


Рис. 3. Прижизненное обнаружение антигена вируса бешенства в роговице пациента Г. методом флюоресцирующих антител.

Объектив 100, гомаль 1,7.

больная Б., поступили сообщения из Азнакаевского района, что в трех селах (Боланлы Буляк, Масыгутово, Тархан), граничащих с Муслимовским районом, бешеный волк покусал еще 8 человек и 8 человек имели ослонения при контакте с данным животным. Таким образом, число пострадавших составило 16. Всем им был назначен лечебно-профилактический курс антирабической прививок с использованием культуральной антирабической вакцины из штамма «Внуково-32» (производство ИПВЭ им. М.П.Чумакова РАМН, Москва). По истечении полного курса лечебно-профилактических прививок 12 сывороток крови от пострадавших были исследованы на определение уровня специфических антител методом ИФА и в реакции нейтрализации (РН).

Сыворотки крови были титрованы в РН на белых мышцах с использованием стандартного вируса бешенства, штамм CVS, взятого в концентрации от 15 до 500 LD₅₀/0,03 мл.

Установили прямую корреляцию результатов ИФА и РН ($r = 0,9; p < 0,05$). При этом по чувствительности и скорости получения результатов ИФА (6–7 ч) превосходит РН на мышцах (14 сут). Титры антител в сыворотках крови пострадавших в ИФА варьировали от 1:200 до 1:3200, в РН – от 1:163 до 1:397, что свидетельствовало о защите пострадавших от бешенства. О перспективности

применения метода ИФА для контроля эффективности вакцинопрофилактики бешенства людей и животных указывают многие отечественные и зарубежные авторы [16–21].

Таким образом, гидрофобия у больной Б., укушенной волком, подтверждена результатами лабораторных исследований: обнаружением специфического антигена вируса бешенства в отпечатках с роговицы глаза пострадавшей по МФА за 6 сут до ее смерти и постмортально в различных отделах головного мозга и слонных железах по МФА, ИФА и световой микроскопией, а также выделением возбудителя болезни биопробой на белых мышцах. Заболевание и смерть от гидрофобии больной Б. стали следствием множественных, глубоких укусов опасной локализации (голова, лицо, шея, кисть руки), нанесенных бешеным волком.

В 2013 г. в Зеленодольском районе РТ зарегистрирован случай гидрофобии. Больной Г. поступил в Республиканскую клиническую инфекционную больницу 26.12.2013 на 9-е сутки болезни с признаками гидрофобии: нарушением поведения, возбуждением, чувством беспокойства, затрудненным дыханием. Находясь в Индии на о. Гоа, был укушен бездомной собакой в правую голень 25.10.2013, за антирабической помощью не обратился.

27.12.2013 провели лабораторные исследования проб, взятых от больного Г., на наличие антигена вируса бешенства прямым МФА по ГОСТу 26075-84, а также сэндвич-вариантом ИФА с использованием диагностических наборов препаратов, разработанных в ФГБУ «ФЦТРБ – ВНИВИ» (Казань), а также гнездовой ОТ-ПЦР.

В результате исследований прямым МФА отпечатков с роговицы глаза пострадавшего в нескольких полях зрения обнаружили специфический антиген вируса бешенства в виде типичных, отчетливо выраженных ярких желто-зеленых гранул разной формы и величины с интенсивностью свечения в три креста (рис. 3).

В контрольных препаратах подобных образований не обнаружили. При исследовании пробы слюны больного Г. методом ИФА выявили антиген вируса бешенства с титром 1:16, K_{стп} = 2,2. Методом гнездовой ОТ-ПЦР в пробах слюны и слезы пациента Г. определили геном вируса бешенства (рис. 4, 5).

Таким образом, лабораторными методами прижизненно был поставлен диагноз гидрофобии.

04.01.2014 больной Г. в коме скончался. Инкубационный период у заболевшего составил 55 дней. Смерть больного наступила на 18-е сутки болезни.

Постмортальный анализ различных отделов головного мозга (аммонов рог, продолговатый мозг, мозжечок и кора больших полушарий) прямым МФА дал положительный результат по обнаружению специфического антигена вируса бешенства, оцениваемый в три креста (рис. 6).

Таким образом, проведенными лабораторными исследованиями по МФА, ИФА и гнездовой ОТ-ПЦР, а также биопробой на белых мышцах получены положительные результаты по обнаружению специфического, антигена вируса бешенства в отпечатках с роговицы глаза пострадавшего, а также различных отделах головного мозга. При этом исследованиями отпечатков с роговицы глаза больного Г. по МФА, слюны по

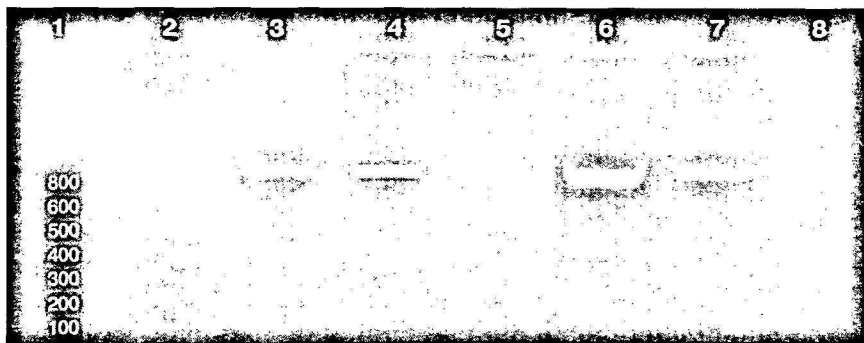


Рис. 4. Электрофореграмма продуктов первичной амплификации (фрагмент 755 п.н.).

1 – маркер молекулярного веса 100–1000 пар оснований (Fragments); 2 – слезная жидкость здорового человека; 3 – слезная жидкость больного Г. с клиническими проявлениями гидрофобии; 4 – вирус бешенства, производственный штамм «Овечий» ГНКИ; 5 – слюна здорового человека; 6 – стандартный вирус бешенства CVS; 7 – слюна больного Г. с клиническими проявлениями гидрофобии; 8 – отрицательный контрольный образец.

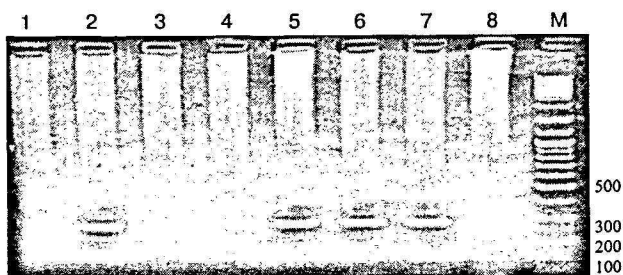


Рис. 5. Электрофореграмма продуктов второго этапа амплификации (фрагмент 259 п.н.).

1 – отрицательный контрольный образец; 2 – слезная жидкость больного Г. с клиническими проявлениями гидрофобии; 3 – слезная жидкость здорового человека; 4 – слюна здорового человека; 5 – вирус бешенства, производственный штамм «Овечий» ГНКИ; 6 – стандартный вирус бешенства CVS; 7 – слюна больного Г. с клиническими проявлениями гидрофобии; 8 – слюна здорового человека; М – маркер молекулярного веса 100–3000 пар оснований (Ferments)

ИФА, а также слюны и слезы методом ОТ-ПЦР положительный диагноз поставлен за 9 сут до смерти пострадавшего. Полученные результаты подтверждают клинически поставленный диагноз гидрофобии.

Необходимо отметить, что второй случай гидрофобии, зарегистрированный в РТ, являлся завозным. Заражение человека произошло в Индии на о. Гоа.

Смерть пострадавшего Г. от укуса бездомной собаки была следствием необращения больного за антирабической помощью. В связи с этим необходимо усилить работу по пропаганде населения об опасности гидрофобии и профилактике этого заболевания. Как известно из практики рабиологи, своевременно начатые и правильно проведенные прививки практически гарантируют то, что даже укушенный явно бешеным животным не заболит бешенством [22].

Возникновению случаев гидрофобии способствуют объективные (неправильная или несвоевременная обработка укушенной раны, несообщение медицинским работником о случае укуса в органы Госсанэпиднадзора, неназначение лечения, дефекты в назначении, неправильное хранение и транспортировка антирабических препаратов и т. п.) и субъективные (скрытие укусов животными, несвоевременное обращение за медицинской помощью, отказы от антирабического лечения, нарушение режима труда и отдыха в процессе вакцинации и т. п.) факторы [23].

По данным Роспотребнадзора, только за 2007–2011 гг.

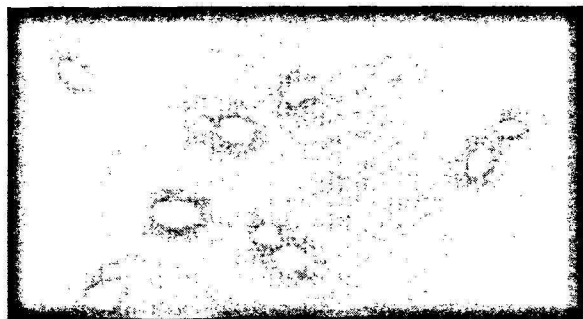


Рис. 6. Постморальное обнаружение антигена вируса бешенства в отпечатке головного мозга у пациента Г. методом флуоресцирующих антител.

Объектив 100, гомаль 1,7.

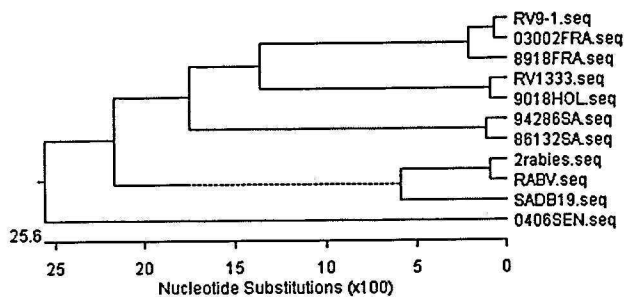


Рис. 7. Филогенетическое древо, полученное методами NJ и ML для изолята (2 rabies), который выделен от человека, укушенного бродячей собакой на о. Гоа в Индии, и штаммов генотипов: 1-й генотип – RABV, SADB19, 2-й генотип – 0406SEN, 4-й генотип – 86132SA, 94286SA, 5-й генотип – 03002FRA, 8918FRA, RV9-1; 6-й генотип – 9018HOL, RV1333.

в стране зарегистрировано 64 случая гидрофобии, среди которых 74% людей погибли из-за необращения за медицинской помощью, 14% самовольно прекратили лечение или нарушили схему вакцинации, 4% погибли по вине медицинских работников, в 6% смерть наступила на фоне правильно назначенного лечения, в 2% лечение оказалось неэффективным. Факты необращения людей за антирабической помощью даже при опасной локализации укусов свидетельствуют о снижении уровня санпросветработы с населением.

Если виной объективных факторов являются медицинские работники, и их устранение должно решаться путем подготовки и контроля работы лечебно-профилактических учреждений со стороны Госсанэпиднадзора, то субъективные могут быть устранены только при наличии санитарной грамотности всего населения, и в первую очередь потенциально уязвимых контингентов. Санитарной пропагандой вопросов профилактики бешенства должны заниматься все медицинские работники как в очагах бешенства, так и при их отсутствии, поскольку вне зависимости от бешенства укусы людей животными отмечаются всегда [23].

Международным таксономическим комитетом вирус бешенства отнесен к семейству *Rabdoviridae*, рода *Lyssavirus*. Род *Lissavirus* включает вирус бешенства и подобные вирусу бешенства (лиссаподобные) вирусы. На основе различий гликопротеидного компонента, выявляемых в РН, а также современными исследованиями, в группе вируса бешенства выделяют 12 генотипов [24]. 1-й генотип представлен абсолютным большинством уличных и фиксированных штаммов вируса бешенства из разных частей света (rabies virus), в том числе классическим стандартным – CVS. 2–7-й генотипы включают лиссаподобные rabies-related (non-rabies) вирусы: Lagos bat virus (2-й генотип), Mokola virus (3-й генотип), Davenhage virus (4-й генотип), European bat lyssavirus 1 (EBLV1) и 2 (EBLV2) (5-й и 6-й генотипы соответственно) и Australian bat lyssavirus (ABLV-pb и ABLV-ib) (7-й генотип). К последующим генотипам отнесли следующие вирусы: Aravan Virus – Kyrgystan (ARAV-KG); Irkut virus – Russia (IRKV-RU); Khujand virus – Tajikistan (KHUV-T); West Caucasian bat virus – Russia (WCBV-RU) и Shimoni bat virus (SHIBV).

В антигенном отношении представители различных генотипов имеют отличия. При классическом бешенстве выделяют штаммы усиленные, ослабленные, географические варианты и др. [25].

В ходе исследований фрагмента гена G вируса бешенства, выделенного от человека Г. методом neighbor joining (NJ) и maximum likelihood (ML) программы MegAlign

CTCGGACGAGATCGAACATCTTGTGGAGGAGTTGGTCAAGAAAAGAGAGGAGTGT
CTGGATGCACTGGAGTCCATCATGACCACCAAGTCGGTGGAGTTTCAGACGTCTCAGCC
ACTTGAGAAAACCTGTCCCTGGGTTCCGAAAAGGCATACACCATATTCAACAAAACCTT
GATGGAAGCAGATGCCATTACAAGTCAGTCCGAACCTGGAATGAGATCATCCCCTCC
AAAGGG

Рис. 8. Нуклеотидная последовательность фрагмента гена G вируса бешенства размером 238 н.о. изолята, выделенного от человека, укушенного бродячей собакой на о. Гоа в Индии.

из пакета программ Lasergene (version 7.1.0.(44) Copyright © 1993-2006), построена филогенетическая дендрограмма (рис. 7). Ген G изучаемого изолята (2 rabies) сравнивали со штаммами различных генотипов, взятых из базы данных GenBank: 1-й генотип – RABV, SAD B19; 2-й генотип 0406SEN; 4-й генотип 86132SA, 94286SA; 5-й генотип 03002FRA, 8918FRA, RV9-1; 6-й генотип 9018HOL, RV1333 (рис. 8).

Для выявления нуклеотидных замен использовали данные NCBI и программы BioEdit. При сравнении нуклеотидных последовательностей образца на заданном участке гена гликопротеина (G) размером 238 н.о. и вируса бешенства 1-го генотипа, RABV AY956319, установили четыре нуклеотидные замены, что соответствует 1,68% отличий.

При сравнении фрагмента гена изучаемого образца и вакцинного штамма SAD B19 выявили 26 нуклеотидных замен, что соответствует 10,9% отличий. Штамм SAD B19 используют при производстве антирабической вакцины «Фуксорал» для оральной иммунизации животных против бешенства.

При сравнении исследуемого образца со штаммом «Внуково-32» обнаружили 25 нуклеотидных замен, что соответствует 10,5% отличий. Штамм «Внуково-32» вируса бешенства используют при производстве антирабической вакцины «Рабивак» для иммунизации человека.

Кроме того, две замены нуклеотидов в позиции 890 (гуанина на аденин) и 1072 (цитозина на аденин) исследуемого образца в сравнении с вакцинными штаммами привели к двум заменам аминокислот: аргинина на лизин и лейцина на изолейцин соответственно. Те же замены наблюдали и в нуклеотидной последовательности штамма RABV AY956319 вируса бешенства, что свидетельствует о филогенетической близости изолята вируса бешенства, который выделен от человека, укушенного бродячей собакой на о. Гоа в Индии с указанным штаммом.

Мы также установили, что нуклеотидная последовательность изучаемого изолята отличается на 32,7% от изолята 0406SEN лиссаподобного вируса, относящегося ко 2-му генотипу *Lagos bat*. При сравнении нуклеотидных последовательностей исследуемого образца и изолятов 94286SA и 86132SA лиссаподобных вирусов 4-го генотипа *Duvenhage* выявили примерно 27,7% отличий.

Исследуемый изолят по нуклеотидной последовательности от изолятов 03002FRA, RV 9-1 и 8918FRA летучих мышей лиссаподобных вирусов 5-го генотипа (*EBLV 1*) отличается на 21–21,8%, от изолятов RV1333 и 9018HOL летучих мышей лиссаподобных вирусов 6-го генотипа (*EBLV 2*) – примерно на 23,5%.

Таким образом, в результате анализа последовательности нуклеотидов фрагмента гена G вируса бешенства размером 238 н.о. установили незначительное отличие изучаемого изолята (2 rabies) от RABV AY956319, составляющее 1,68%; отличие от вакцинных штаммов «Внуково-32» на 10,5% и SAD B19 на 10,9%, они относятся к вирусам бешенства 1-го генотипа; значительное отличие от лиссаподобных вирусов 2, 4, 5 и 6-го геноти-

пов, составляющее 21–32,7%. Полученные результаты свидетельствуют о филогенетической близости изучаемого изолята (2 rabies) с штаммом RABV AY956319 вируса бешенства, относящегося к 1-му генотипу.

На предложенный набор синтетических олигонуклеотидных праймеров для выявления РНК вируса бешенства и способ выявления РНК вируса бешенства с помощью синтетических олигонуклеотидных прай-

меров в ОТ-ПЦР подана заявка на патентование изобретений в ФГБУ ФИПС [26].

Выводы

1. Гидрофобия у больной Б., укушенной волком, установлена при жизни пострадавшей: обнаружением специфического антигена вируса бешенства в отпечатках с роговицы глаза по МФА за 6 сут до ее смерти и подтверждена постмортально: в различных отделах головного мозга и слюнных железах выявлен рабический антиген по МФА, ИФА и световой микроскопией, а также выделением возбудителя болезни биопробой на белых мышцах.

2. Инкубационный период у заболевшей Б. составил 27 дней. Смерть больной наступила на 7-е сутки болезни. Заболевание и смерть от гидрофобии больной Б. стали следствием множественных, глубоких укусов опасной локализации (голова, лицо, шея, кисть руки), нанесенных бешеным волком.

3. Гидрофобия у больного Г., укушенного бродячей собакой на о. Гоа в Индии, установлена при жизни пострадавшего обнаружением специфического антигена вируса бешенства в отпечатках с роговицы глаза по МФА, слюне по ИФА, а также генома вируса бешенства в слюне и слезной жидкости в ОТ-ПЦР за 9 сут до смерти больного и подтверждена постмортально – в различных отделах головного мозга по МФА, ИФА, а также выделением возбудителя болезни биопробой на белых мышцах. Полученные результаты подтверждают клинически поставленный диагноз гидрофобии.

3. Инкубационный период у заболевшего Г. составил 55 дней. Смерть больного наступила на 18-е сутки болезни. Заболевание и смерть от гидрофобии больного Г. стали следствием необращения пострадавшего за антирабической помощью. В связи с этим необходимо усилить в целом по стране санитарную пропаганду среди населения об опасности бешенства и мерах его профилактики.

4. Анализ последовательности нуклеотидов фрагмента гена G вируса бешенства размером 238 н.о. показал на незначительное отличие изучаемого изолята (2 rabies) от RABV AY956319, составляющее 1,68%, отличие от вакцинных штаммов «Внуково-32» на 10,5% и SAD B19 на 10,9%, они относятся к вирусам бешенства 1-го генотипа; значительное отличие от лиссаподобных вирусов 2, 4, 5 и 6-го генотипов, составляющее 21–32,7%. Полученные результаты свидетельствуют о филогенетической близости изучаемого изолята (2 rabies) со штаммом RABV AY956319 вируса бешенства, относящегося к 1-му генотипу.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гулюкин М.И., Ведерников В.А. Ситуация уже кризисная. *Ветеринарная жизнь*. 2008; 12: 6–8.
2. Ведерников В.А., Гулюкин М.И., Рождественский И.К. и др. ред. *Обзор эпизоотической ситуации по бешенству в Российской Федерации в 2007 году и I полугодии 2008 г.* М.; 2008.
3. Львов Д.К., ред. *Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных.* М.: Медицинское информационное агентство., 2013.

- Gribencha S.V., Lvov D.K. Рабдовирусы. В кн.: *Медицинская вирусология*. М.: МИА, 2008: 586–94.
- Санитарно-эпидемиологические правила «Профилактика бешенства среди людей», утверждены постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 06.05.2010 г. № 54. М.; 2010.
- Иванов А.В., Хисматуллина Н.А., Гулюкин А.М. Эпизоотологический и иммунологический надзор за бешенством. *Ветеринарный врач*. 2010; 4 (17): 3–6.
- ИА Татар-информ Татарстан лидирует в ПФО по количеству случаев заболеваний бешенством животных – Росотребнадзор. 2014. Available at: <http://news.mail.ru/inregions/volgaregion/16/society/18435445/?frommail=1>
- Ковалев Н.А., Шашенко А.С. Иммунофлуоресцентное исследование отпечатков роговицы при бешенстве. *Ветеринария*. 1970; 9: 44–6.
- Zimmermann In. Zur Brauchbarkeit des Cornea testes bei der Tollwut diagnose. *Berl. Munch. Tierarztl. Eachr*. 1971; 84 (9): 172–4.
- Laurent D.A. et al. A Reliable Diagnosis of Human Rabies Based on Analysis of Skin Biopsy Specimens. *Clin. Infect. Dis*. 2008; 47: 1410–17.
- Баширова Д.К., Хисматуллина Н.А., Шафеев М.Ш., Шакиров Т.Н., Убасев А.Г. и др. Прижизненная клинико-лабораторная диагностика гидрофобии. *Казанский медицинский журнал*. 2007; 88 (5): 449–52.
- Тимиргалеев Р.В. *Усовершенствование методов идентификации вируса бешенства и выявления антирабических антител*: Автореф. дисс. ... канд. вет. наук. Казань; 2006.
- Грибенча С.В., Козлов А.Ю., Костина Л.В., Елаков А.Л., Лосич М.А., Цибезов В.В., Забережный А.Д., Алппер Т.И. Получение моноклональных антител к нуклеопротеину вируса бешенства. *Вопросы вирусологии*. 2013; 5: 38–43.
- Wakeley P.R., Johnson N., McElhinney L.M. Development of a real-time, TaqMan reverse Transcription-PCR assay for detection and differentiation of Lyssavirus genotypes 1, 5 and 6. *J. Clin. Microbiol*. 2005; 43 (6): 2786–92.
- Мовсесянц А.А., Бектемиров Т.А. Гидрофобия у людей, леченных специфическими иммунопрепаратами. *Ветеринарная патология*. 2002; 1: 40.
- Ботвинкин А.Д., Селимов М.А., Згурская Т.Н. Обнаружение антител к вирусу бешенства в сыворотке крови людей с помощью иммуноферментного метода. *Вопросы вирусологии*. 1986; 31 (3): 333–4.
- Хисматуллина Н.А. *Разработка и усовершенствование лабораторных методов диагностики бешенства*: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Казань; 1989.
- Хисматуллина Н.А., Юсупов Р.Х., Селимов М.А., Янбарисова С.Р. Разработка средств и методов иммунологического мониторинга при бешенстве. *Вопросы вирусологии*. 2001; 5: 45–8.
- Гулюкин А.М. Значимость современных методов лабораторной диагностики и идентификации возбудителя бешенства для иммунологического мониторинга данного зооноза. *Вопросы вирусологии*. 2014; 3: 5–10.
- Nicholson K.G., Prestage K. Enzyme-linked immunosorbent Assay: A Peaped Reproducible. Test for the Measurement of Rabies Antibody. *J. Med. Virol*. 1982: 43–9.
- Cliquet F., Sagne L., Schereffler J. L. & Aubert M.F.A.. ELISA tests for rabies antibody titration in orally vaccinated foxes sampled in the fields. *Vaccine*. 2000; 18: 3272–9.
- Селимов М.А. *Бешенство*. М: Медицина. 1978.
- Иванов А.В., Хисматуллина Н.А., Юсупов Р.Х., Морозов В.В., Хисамутдинов Ф.Ф., Чернов А.Н. и др. *Эпизоотолого-эпидемиологический надзор за бешенством. Методическое руководство*. Казань: ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»; 2007.
- King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J., eds. *Virus Taxonomy. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. International Union of Microbiological Societies. Virology Division*. Amsterdam: ELSEVIER ACADEMIC PRESS; 2011.
- Иванов А.В., Хисматуллина Н.А., Чернов А.Н., Гулюкин А.М. *Бешенство: Этиология, Эпизоотология. Диагностика. Учебно-методическое пособие в иллюстрациях*. М.: «Колос»; 2010.
- Набор синтетических олигонуклеотидных праймеров для выявления РНК вируса бешенства и способ выявления РНК вируса бешенства с помощью синтетических олигонуклеотидных праймеров в полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Заявка на патентование изобретения в ФГУ ФИПС Per. № 2014139999.
- Vedernikov V.A., Gulyukin M.I., Rozhdvestvskiy I.K. et al. *A Rabies Epizooty Survey in the Russian Federation in 2007 and 1st half of 2008 [Obzor Epizooticheskoy Situatsii po Beshenstvu v Rossiyskoy Federatsii v 2007 godu i Pougodii 2008 g.]*. Moscow; 2008. (in Russian)
- L'vov D.K., ed. *Guidelines on virology. Viruses and Human and Animal Viral Infections*. Moscow: 2013. (in Russian)
- Gribencha S.V., Lvov D.K. The rabdoviruses. In: *Medical Virology [Meditsinskaya Virusologiya]*. Moscow: MIA; 2008: 586–94. (in Russian)
- Sanitation and epidemiological regulations «Human rabies prevention» approved by decree of the Russian Federation chief public health physician of 06.05.2010. № 54. Moscow; 2010. (in Russian)
- Ivanov A.V., Khismatullina N.A., Gulyukin A.M. Rabies epizootological and immunological survey. *Veterinarnyy Vrach*. 2010; 4 (17): 3–6. (in Russian)
- IA Tatar-inform. Tatarstan Leader in the PFD in the number of cases of Rabies in animals-CPS. 2014. Available at: <http://news.mail.ru/inregions/volgaregion/16/society/18435445/?frommail=1> (in Russian)
- Kovalev N.A., Shashenko A.S. Immunofluorescent studies of corneal imprints at rabies. *Veterinariya*. 1970; 9: 44–6. (in Russian)
- Zimmermann In. Zur Brauchbarkeit des Cornea testes bei der Tollwut diagnose. *Berl. Munch. Tierarztl. Eachr*. 1971; 84 (9): 172–4.
- Laurent D.A. et al. A Reliable Diagnosis of Human Rabies Based on Analysis of Skin Biopsy Specimens. *Clin. Infect. Dis*. 2008; 47: 1410–7.
- Bashirova D.K., Khismatullina N.A., Shafeev M.Sh., Shakirov T.N., Ubasev A.G. et al. In vivo clinical and laboratory diagnosis hydrophobia. *Kazanskiy Meditsinsky Zhurnal*. 2007; 88 (5): 449–52. (in Russian)
- Timirgaleev R.V. *Improving the methods for rabies virus and antibodies detection*: Diss. Kazan'; 2006. (in Russian)
- Gribencha S.V., Kozlov A.Yu., Kostina L.V., Yelakov A.L., Losich A.L., Tsibezov V.V. Zaberezhnyy A.D., Aliper T. I. Production of monoclonal antibodies against rabies virus nucleoprotein. *Voprosy Virusologii*. 2013, 5: 38–43. (in Russian)
- Wakeley P.R., Johnson N., McElhinney L.M. Development of a real-time, TaqMan reverse Transcription-PCR assay for detection and differentiation of Lyssavirus genotypes 1, 5 and 6. *J. Clin. Microbiol*. 2005; 43 (6): 2786–92.
- Movsesyants A.A., Bektemirov T.A. Rabies in human treated with specific immune drugs. *Veterinarnaya Patologiya*. 2002; 1: 40. (in Russian)
- Botvinkin A.D., Selimov M.A., Zgurskaya T.N. Detection of rabies virus antibodies in human blood serum using ELISA method. *Voprosy Virusologii*. 1986; 31 (3): 333–4. (in Russian)
- Khismatullina N.A. *Development and improvement of laboratory methods for diagnosis of rabies. Development and improvement of laboratory methods for diagnosis of rabies*: Diss. Kazan'; 1989. (in Russian)
- Khismatullina N.A., Yusupov R.Kh., Selimov M.A., Yanbarisova S.R. Developing methods and means for rabies immunological survey. *Voprosy Virusologii*. 2001; 5: 45–8. (in Russian)
- Gulyukin A.M. Significance of modern methods of rabies pathogen laboratory diagnosis and identification for rabies immunological monitoring. *Voprosy Virusologii*. 2014; 3: 5–10. (in Russian)
- Nicholson K.G., Prestage K. Enzyme-linked immunosorbent Assay: A Peaped Reproducible. Test for the Measurement of Rabies Antibody. *J. Med. Virol*. 1982: 43–9.
- Cliquet F., Sagne L., Schereffler J. L. & Aubert M.F.A.. ELISA tests for rabies antibody titration in orally vaccinated foxes sampled in the fields. *Vaccine*. 2000; 18: 3272–9.
- Selimov M.A. *Rabies [Beshenstvo]*. Moscow: Meditsina; 1978. (in Russian)
- Ivanov A.V., Khismatullina N.A., Yusupov R.Kh., Morozov V.V., Khisamutdinov F.F., Chernov A.N. et al. *Rabies epizootological and epidemiological survey. Guidelines*. Kazan': FGU "FISTPB-VNI-VI"; 2007. (in Russian)
- King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J., eds. *Virus Taxonomy. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. International Union of Microbiological Societies. Virology Division*. Amsterdam: ELSEVIER ACADEMIC PRESS; 2011.
- Ivanov A.V., Khismatullina N.A., Chernov A.N., Gulyukin A.M. *Rabies: Etiology, Epizootology. Diagnosis. Illustrated manual [Beshenstvo: Etiologiya, Epizootologiya. Diagnostika. Uchebno-metodicheskoe posobie v illustratsiyakh]*. Moscow: «Kolos»; 2010. (in Russian)
- Ivanov A.V., Khismatullina N.A., Chernov A.N., Gulyukin A.M. A kit of synthetic oligonucleotide primers for detection of rabies virus RNA and RNA detection method of rabies virus using synthetic oligonucleotide primers in a polymerase chain reaction reverse transcription (RT-PCR). Application for patenting inventions in FIPS Identification N 2014139999. (in Russian)

REFERENCES

- Gulyukin M.I., Vedernikov V.A. The situation is already critical. *Veterinarnaya zhizn*. 2008; 12: 6–8. (in Russian)

Поступила 25.09.14

Received 25.09.14

Кузнецова С.А., Исакова-Сивак И.Н., Кузнецова В.А., Петухова Г.Д., Лосев И.В., Донина С.А., Руденко Л.Г.,
Найхин А.Н.

Влияние точечных мутаций в генах полимеразного комплекса вируса гриппа А/PR/8/34 (H1N1) на иммунный ответ мышей

ФГБУ «НИИ экспериментальной медицины» СЗО РАН, 197376, г. Санкт-Петербург

Вакцинные штаммы для живых гриппозных вакцин (ЖГВ) холодоадаптированы и имеют температурочувствительный и ослабленный фенотип за счет наличия специфических мутаций во внутренних генах от донора аттенуации. В данной работе мы использовали мутантные штаммы патогенного вируса А/Puerto Rico/8/34 (H1N1), содержащие *ts*-мутации в генах *PB1* (K265N, V591I), *PB2* (V478L) и *PA* (L28P, V341L) отдельно или в различных комбинациях, с целью оценить вклад этих мутаций в формирование иммунного ответа. Последовательное внесение тестируемых мутаций приводит к ступенчатому снижению уровней вирусспецифических антител в сыворотке крови и в меньшей степени – мукозальных антител. Мы продемонстрировали сильную положительную корреляцию между аттенуацией вируса (титр вируса в легких) и титрами антител. *Ts*-мутации в *PB1*, *PB2* и *PA* генах участвуют главным образом в модуляции гуморального иммунитета и незначительно влияют на формирование клеточного адаптивного иммунного ответа.

Ключевые слова: живая гриппозная вакцина; гены полимеразного комплекса; иммунный ответ.
Для цитирования: Вопросы вирусологии. 2015; 60(2): 25–30.

Kuznetsova S.A., Isakova-Sivak I.N., Kuznetsova V.A., Petukhova G.D., Losev I.V., Donina S.A.,
Rudenko L.G., Naikhin A.N.

Effect of Point Mutations in the Polymerase Genes of the Influenza A/PR/8/34 (H1N1) Virus on the Immune Response in a Mouse Model

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

The vaccine strains for live attenuated influenza vaccines (LAIVs) have cold-adapted, temperature-sensitive, and attenuated phenotypes, which are guaranteed by the presence of specific mutations from the master donor virus in their internal genes. In this study, we used mutant viruses of the pathogenic A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) that contained *ts*-mutations in *PB1* (K265N, V591I), *PB2* (V478L), and *PA* (L28P, V341L) genes along and/or in different combinations to evaluate the impact of these mutations in the immune responses. Sequential addition of tested mutations resulted in the stepwise decrease in virus-specific serum and, to a lesser extent, mucosal antibody levels. We demonstrated strong positive correlation between virus attenuation (virus titer in lung) and antibody titers. The *ts*-mutations in *PB1*, *PB2*, and *PA* genes are mostly involved in the modulation of the humoral immunity, but also have a moderate effect on the cellular adaptive immune response.

Key words: live attenuated influenza vaccine; polymerase complex genes; immune response.
Citation: Voprosy virusologii. 2015; 60 (2): 25–30. (In Russ.)

For correspondence: Svetlana Kuznetsova, candidate of biological Sciences; e-mail: kuznetsova4872@yahoo.co.uk

Введение

В инфекционной иммунологии важным и перспективным направлением является изучение зависимости формирования постинфекционного и поствакцинального иммунного ответа от генотипических особенностей возбудителя и хозяина. Применительно к противогриппозной вакцинации, в том числе противогриппозной, наибольшую актуальность приобретает исследование вопроса о связи естественных и искусственно приобретенных мутаций в генах вакцинных штаммов с количественными и качественными характеристиками поствакцинального адаптивного иммунитета [1, 2].

В настоящее время важными и наиболее эффективными методами профилактики гриппа являются живые (ЖГВ) и инактивированные гриппозные вакцины (ИГВ). Принцип приготовления ЖГВ типа А основан на включении в вакцинный штамм с помощью реассортации генов поверхностных белков от дикого актуального вируса и генов внутренних белков от донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) в России или А/

Энн Арбор/6/60 (H2N2) в США. Первые обеспечивают достаточную иммуногенность вакцинных кандидатов, а вторые – аттенуацию, что гарантирует безвредность живой вакцины.

Ведущую роль в аттенуации вирусов гриппа играют гены полимеразного комплекса [3, 4]. В процессе приготовления донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2), основанного на длительном пассировании дикого вируса при пониженной температуре, были приобретены стабильные мутации в полимеразных генах, которые приводят к неспособности вируса репродуцироваться в нижних отделах респираторного тракта привитых. Однако данные мутации отсутствуют в генах длительно циркулирующих вирусов гриппа А(H1N1) и А(H3N2), к которым и формируется иммунологическая память населения. В этой связи возникла необходимость изучить влияние отдельных точечных мутаций в генах *PB1*, *PB2* и *PA* на полноценность развития адаптивного противовирусного иммунного ответа. В данной работе представлены результаты исследований мутантных штаммов модельного патогенного вируса гриппа А/

PR/8/34 (H1N1), содержащие отдельные точечные мутации и/или их комбинации в генах *PB1* (K265N, V591I), *PB2* (V478L) и *PA* (L28P, V341L), с целью изучения индивидуального влияния этих мутаций на формирование системного гуморального и Т-клеточного иммунитета.

Материалы и методы

Вирусы. Все мутантные штаммы патогенного вируса A/PR/8/34 (H1N1) получены методом обратной генетики. Использовали плазмидные векторы с двунаправленным считыванием, в которые были клонированы все гены вируса A/PR/8/34 (H1N1). Точечный мутагенез осуществляли при помощи коммерческого набора QuikChange XL sitedirected mutagenesis kit («Stratagen», Калифорния, США), следуя рекомендациям производителя. Штаммы получали путем трансфекции клеток линии НЕК-293Т набором из 8 плазмид, несущих все гены соответствующего мутанта. Полученные штаммы, содержащие мутации *PB1* (K265N, V591I), *PB2* (V478L), *PA* (L28P, V341L) отдельно и/или в различных комбинациях, полностью секвенировали с помощью коммерческого набора реагентов BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit («Applied Biosystems») и автоматического капиллярного секвенатора 3130x1 Genetic Analyzer («Applied Biosystems»). Температурочувствительность (ts-фенотип) мутантных штаммов оценивали методом бляшкообразования в культуре клеток MDCK при оптимальной и повышенной температурах (33, 37 и 38°C). Для определения инфекционности и патогенности полученных штаммов мышей линии СВА инфицировали интраназально различными дозами этих вирусов. На 3-й день после инфицирования наличие вируса проверяли в нижних отделах дыхательного тракта титрованием 10% суспензии гомогенатов тканей в развивающихся куриных эмбрионах с последующим определением 50% инфекционной дозы (МИД₅₀) по методу Рида и Менча. Оставшихся животных наблюдали в течение 14 дней, осуществляя осмотр, взвешивание и подсчет выживших животных с последующим определением 50% летальной дозы (МЛД₅₀) по методу Рида и Менча.

Иммуногенность вирусов. Мышей линии СВА иммунизировали однократно под наркозом интраназально тестируемыми мутантными штаммами в дозе 100 МИД₅₀. Контрольные животные получали физиологический раствор. Содержание противовирусных антител в сыворотках крови лабораторных животных определяли с помощью реакции торможения гемагглютинации (РТГА) и иммуноферментного анализа (ИФА) на 28-й день после заражения. РТГА выполняли по общепринятой методике с использованием 1% суспензии куриных эритроцитов и 4 ГАЕ на 50 мкл патогенного штамма A/PR/8/34 (H1N1). С помощью ИФА определяли содержание IgG-, IgA- и IgM-антител к цельному вирусу A/PR/8/34 (H1N1), очищенному на градиенте плотности сахарозы и сорбированному на пластике в концентрации 16 ГАЕ/50 мкл. За титр антител принимали последнее разведение образцов, оптическая плотность которых в 2 и более раз превышала среднее значение оптической плотности контрольных проб, содержащих физиологический раствор вместо образцов сывороток крови. Распределение субпопуляций Т-лимфоцитов в селезенках мышей на 7-й и 28-й дни после заражения определяли методом иммунофенотипирования при помощи проточного цитофлюориметра Navios («BeckmanCoulter») и комбинации моноклональных антител, конъюгированных с флюорохромами: FITC anti-CD4, PC 5,5 anti-CD8 («BeckmanCoulter», США), APC anti-CD62L, PE anti-CD44 («BD PharMingen», США).

Статистическая обработка данных. При анализе

полученных результатов определяли средние величины и стандартные отклонения ($M \pm CO$). Статистическую достоверность различий оценивали с использованием компьютерной программы с проведением U-теста Манна–Уитни.

Результаты

В данной работе использовали вирусы, полученные методом обратной генетики, на основе штамма A/PR/8/34 (H1N1), который был выбран благодаря своей высокой вирулентности и иммуногенности для мышей. Тестируемые штаммы содержат мутации в генах полимеразного комплекса (отдельно или в различных комбинациях), соответствующие ts-мутациям донора аттенуации ЖГВ A/Ленинград/134/17/57 (H2N2). Как видно из табл. 1, данные мутантные штаммы значительно различаются по своей способности инфицировать нижние дыхательные пути мышей и вирулентности. Уровни репродукции вирусов в легких *in vivo* находились в обратной зависимости от степени температурочувствительности *in vitro* в культуре клеток MDCK. Наибольшие титры вируса в легких и, наоборот, низкие значения (МЛД₅₀) отмечены у штаммов с отсутствием ts-фенотипа (non-ts) и штамма со слабо выраженным ts-фенотипом (ts+). В совокупности это свидетельствует об их высокой патогенности для мышей. Самыми аттенуированными являются штаммы с хорошо выраженным ts-фенотипом (ts++ и ts+++), что опосредовано двумя аминокислотными заменами в *PB1* (K265N) и *PB2* (V478L), тремя заменами в *PB1* (K265N, V591I) и *PB2* (V478L) или полным набором тестируемых мутаций в генах *PB1*, *PB2* и *PA*.

Для определения иммуногенности мышей линии СВА иммунизировали интраназально тестируемыми вирусами в дозе 100 МИД₅₀. Как видно из табл. 2, комбинированное внесение тестируемых мутаций в генах *PB1*, *PB2* и *PA* приводит к значительному и статистически достоверному снижению продукции антигемагглютинирующих и вирусспецифических IgG- и IgA-антител (по данным РТГА и ИФА соответственно) в сыворотках крови мышей по сравнению с патогенным вирусом A/PR/8/34 (H1N1). Следует отметить, что мутации в *PB1*-гене отдельно практически не изменяют продукцию противовирусных антител, а в комбинации с мутациями в *PA*-гене незначительно ее снижают. При этом единичная аминокислотная замена в *PB2*-гене приводит к более выраженному изменению продукции антител, а в комбинации с мутациями в *PB1*-и/или *PA*-генах было обнаружено дополнительное градуированное снижение системного гуморального иммунного ответа. Продукция противовирусных IgM-антител была менее выражена и практически не изменялась по сравнению с контрольным штаммом (данные не приведены). Дополнительно было показано, что только сочетание мутаций в *PB1*- и *PB2*- или в *PB1*; *PB2*- и *PA*-генах приводит к достоверному снижению общего количества вирусспецифических антител Ig(G+A+M) в смывах верхних дыхательных путей по сравнению с патогенным вирусом (среднегеометрические титры (СГТ) – 1,55, 0,85 и 16,74 соответственно).

Таким образом, мутантные штаммы с аминокислотными заменами в *PB1*- и *PB2*- генах отдельно или с комбинированными заменами в *PB1*- или *PA*-генах были слабоаттенуированными и одновременно обладали высокой иммуногенностью. В то же время замена одной или двух аминокислот в *PB1*-гене в сочетании с заменой в *PB2*-гене приводила к значительному увеличению аттенуации и снижению иммуногенности. Следует отметить, что исключение двух мутаций в *PA*-гене из полного набора тестируемых мутаций приводит

Вирусологические характеристики мутантных штаммов вируса гриппа А/PR/8/34 (H1N1)

Штамм*	Наличие (+) или отсутствие (-) мутаций в генах полимеразного комплекса				Инфекционный титр вируса в культуре ткани MDCK, (\log_{10} БОЕ/мл \pm ССО**, при температуре			Тs-фенотип***	Титр вируса в легких, \log_{10} \pm ССО	МЛД ₅₀
	PB1		PB2	PA	33°C	37°C	38°C			
	K265N (a)	V591I (b)	V478L	L28P V341L						
PR8-wt	-	-	-	-	8,7 \pm 0,0	8,8 \pm 0,0	8,7 \pm 0,3	non-ts	6,68 \pm 0,40	3,6
PB1+PB2+PA	+	+	+	+	8,4 \pm 0,1	5,7 \pm 0,4	3,7 \pm 0,0	ts+++	1,78 \pm 0,51	\geq 6,5
PB1	+	+	-	-	9,1 \pm 0,2	8,5 \pm 0,2	7,9 \pm 0,2	non-ts	5,73 \pm 0,46	4,2
PB1+PA	+	+	-	+	8,6 \pm 0,2	8,1 \pm 0,1	7,2 \pm 0,7	non-ts	3,36 \pm 1,2	4,2
PB2	-	-	+	-	8,5 \pm 0,4	7,7 \pm 0,1	6,4 \pm 0,0	ts+	4,30 \pm 1,01	4,5
PB1a+PB2	+	-	+	-	9,0 \pm 0,1	7,2 \pm 0,2	4,3 \pm 0,5	ts++	2,58 \pm 1,70	5,8
PB1+PB2	+	+	+	-	8,8 \pm 0,2	6,5 \pm 0,1	3,9 \pm 0,4	ts+++	2,10 \pm 1,11	\geq 6,5

Примечание. * – обозначение мутантного штамма соответствует наличию в полимеразных генах вируса А/PR/8/34 (H1N1) мутаций, уникальных для донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2); ** ССО – среднее стандартное отклонение; *** – non-ts – температуроустойчивый; ts+ – температурочувствительный, разница титров при 33 и 38°C составляет 2,0–3,0 \log_{10} БОЕ, при 33 и 37°C может быть $<$ 2,0 \log_{10} БОЕ; ts++ – температурочувствительный, разница титров при 33°C и 38°C составляет 3,0–4,0 \log_{10} БОЕ, при 33°C и 37°C – может быть $<$ 2,0 \log_{10} БОЕ; ts+++ – температурочувствительный, разница титров при 33 и 38°C \geq 4,0 \log_{10} БОЕ; при 33 и 37°C \geq 2,0 \log_{10} БОЕ.

к увеличению продукции противовирусных антител в сыворотке крови, при этом сохраняется достаточно высокая степень аттенуации. Исследование выявило положительную корреляцию между титром вируса в легких и уровнями продукции антигемагглютинирующих антител ($r = 0,890$) и вирусспецифических IgG- и IgA-антител ($r = 0,878$ и $r = 0,925$ соответственно) в сыворотках крови лабораторных животных. В целом полученные результаты свидетельствовали о сопряженности аминокислотных замен в генах полимеразного комплекса вируса гриппа А с развитием гуморального иммунного ответа.

При контроле эффективности противовирусных вакцин и прогнозе развития и течения инфекционных заболеваний в целом значительную ценность представляет оценка динамики изменения субпопуляционного состава Т-клеток. Фенотипический анализ уровня экспрессии CD62L- и CD44-маркеров на поверхности CD4⁺- и CD8⁺-клеток выявил незначительные изменения пропорции субпопуляций Т-лимфоцитов. При сравнении влияния тестируемых мутантных штаммов на распределение субпопуляций Т-лимфоцитов в селезенке мышей учитывали кратность изменения полученных показателей по отношению к таковым в контрольной группе животных, получавших физиологический раствор (см. рисунок). На 7-й день после

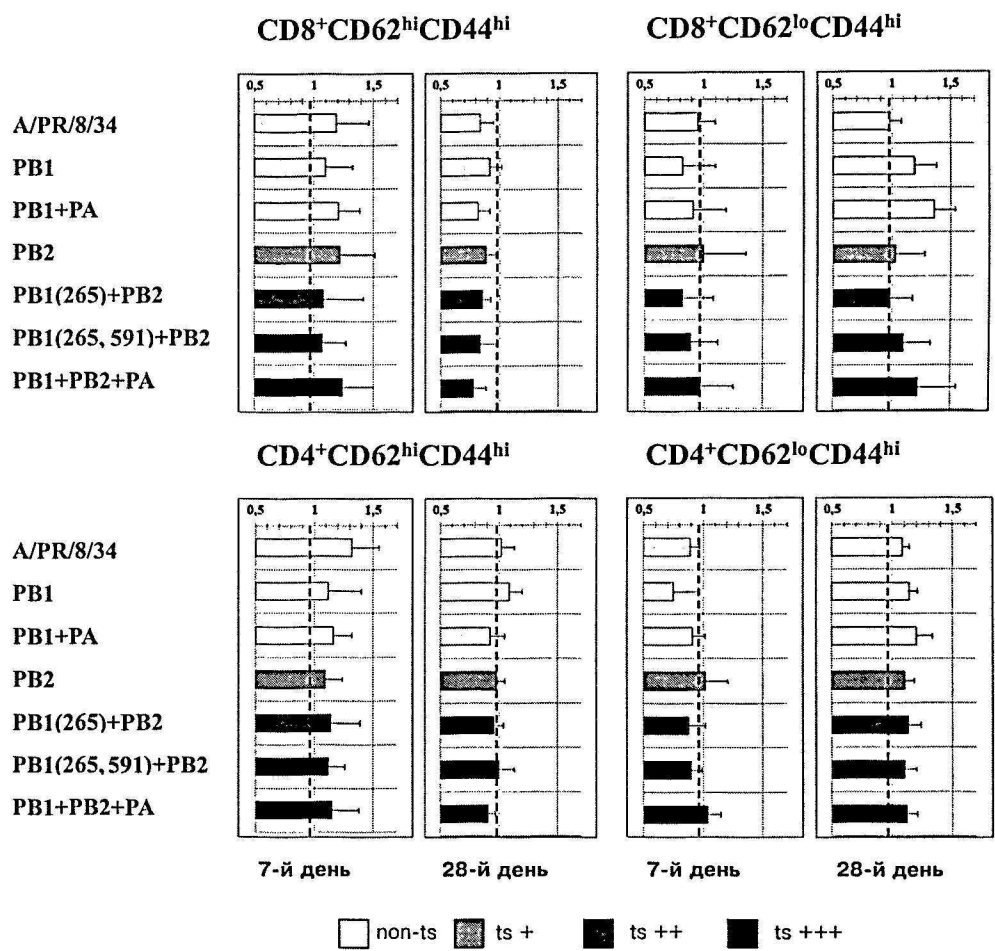
инфекции было показано достоверное различие между кратностью изменения CD4⁺CD62L^{lo}CD44^{hi} клеток, индуцированной патогенным А/PR/8/34 и вирусом, содержащим весь набор тестируемых мутаций в PB1-, PB2- и PA-генах (0,89 \pm 0,08 и 1,04 \pm 0,11 соответственно). Наоборот, на 28-й день кратность изменения CD8⁺CD62L^{lo}CD44^{hi}-клеток, вызванная патогенным вирусом, достоверно отличалась от индуцированной вирусами, содержащими мутации в PB1-гене отдельно или в комбинации с PA (0,98 \pm 0,10, 1,19 \pm 0,19 и 1,36 \pm 0,18 соответственно). Была обнаружена некоторая положительная корреляция между титром вируса в легких на 3-й день после инфекции и кратностью изменения количества CD4⁺CD62L^{hi}CD44^{hi} Т-клеток по отношению к контрольной группе на 7-й и 28-й дни ($r = 0,626$ и $r = 0,707$), в то время как корреляция между уровнем аттенуации и изменением количества CD8⁺CD62L^{hi}CD44^{hi} Т-клеток на 28-й день практически отсутствовала ($r = 0,435$). Изменения количества CD4⁺CD62L^{hi}CD44^{hi} Т-клеток относительно контроля на 28-й день положительно коррелировали с уровнями противовирусных IgG и IgA антител в сыворотках крови мышей ($r = 0,847$ и $r = 0,702$), в случае CD8⁺CD62L^{hi}CD44^{hi} Т-клеток подобная корреляция была гораздо менее выраженной ($r = 0,606$ и $r = 0,497$).

Таблица 2

Иммуногенность мутантных штаммов вируса гриппа А/PR/8/34 (H1N1) – продукция сывороточных антител

Штамм	Наличие (+) или отсутствие (-) мутаций в генах полимеразного комплекса				Обратные титры вирусспецифических антител, (\log_{10} \pm ССО) в сыворотках крови мышей на 28-й день после инфекции		
	PB1		PB2	PA	РТГА	ИФА	
	K265N (a)	V591I (b)	V478L	L28P, V341L		IgG	IgA
PR8-wt	-	-	-	-	7,17 \pm 0,56	12,52 \pm 0,64	10,19 \pm 1,02
PB1+PB2+PA	+	+	+	+	3,87 \pm 0,31***	9,10 \pm 1,25***	6,35 \pm 0,75***
PB1	+	+	-	-	7,16 \pm 0,75	12,82 \pm 0,87	9,93 \pm 1,13
PB1+PA	+	+	-	+	6,43 \pm 0,51	11,31 \pm 0,80*	9,11 \pm 0,55*
PB2	-	-	+	-	5,75 \pm 0,99*	11,31 \pm 1,13	8,86 \pm 0,60*
PB1(a)+PB2	+	-	+	-	3,69 \pm 1,21**	9,69 \pm 1,34***	8,48 \pm 1,93
PB1+PB2	+	+	+	-	4,95 \pm 1,04**	10,51 \pm 1,00**	7,63 \pm 1,81**

Примечание. Различия между средними величинами обратных титров противовирусных антител, индуцированных патогенным вирусом гриппа А/PR/8/34 (H1N1) и мутантными штаммами, статистически достоверны при: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.



Влияние мутантных штаммов на распределение субпопуляций Т-лимфоцитов в селезенке мышей на 7-й и 28-й дни после инфекции. Фенотипический анализ уровня экспрессии CD62L и CD44 маркеров на поверхности CD4+ и CD8+ Т-клеток методом проточной цитофлюориметрии с последующим учетом кратности изменения полученных показателей по отношению к таковым в контрольной группе животных, получавших физиологический раствор.

Полученные результаты в целом указывают на влияние индивидуальных и/или комбинаторных аминокислотных замен в *PB1*, *PB2* и *PA*-генах вируса гриппа А, соответствующих таковым в генах А/Ленинград/134/17/57 (H2N2), на аттенуацию и иммуногенность мутантных штаммов. При этом была отмечена значительная роль тестируемых мутаций в процессе формирования системного гуморального иммунного ответа и зависимость амплитуды этого ответа от степени аттенуации мутантных штаммов. В то же время влияние этих мутаций на перераспределение пропорции клеточных субпопуляций Т-лимфоцитов было незначительным и скорее всего непосредственно не зависело от аттенуирующих свойств вируса.

Обсуждение

Ежегодная потребность в создании ЖГВ и эффективность их применения требуют постоянного совершенствования новых вакцинных кандидатов. Оптимизация соотношений между аттенуирующими свойствами, гарантирующими безопасность, и иммуногенностью, которая обеспечивает собственно защиту организма, будет неизбежно способствовать улучшению качества ЖГВ. Ранее нами и другими авторами было показано снижение продукции анти-

гемагглютинирующих антител в сыворотках крови, индуцированной ЖГВ, по сравнению с исходным патогенным вирусом, из которого вакцинные штаммы были приготовлены [5–8]. Поскольку подобные потери иммуногенности вакцинного штамма не могут быть связаны с генами, кодирующими поверхностные белки, так как они приобретены от дикого вируса, возникло предположение о связи данного процесса с генами, перенесенными от донора аттенуации. В первую очередь это касается генов полимеразного комплекса, которые обеспечивают аттенуацию вакцинного штамма [3]. В настоящее время охарактеризованы генетически стабильные мутации холодоадаптированного донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и А/Энн Арбор/6/60 (H2N2) [4, 9, 10]. Для изучения вопроса о влиянии на иммуногенность этих мутаций в отдельности или в совокупности были получены обратногогенетические штаммы вируса гриппа А/PR/8/34 (H1N1) с разными комбинациями *ts*-мутаций в *PB1*-, *PB2*- и *PA*-генах, соответствующие таковым в генах А/Ленинград/134/17/57 (H2N2). В последнее время особое внимание уделяется вопросу об улучшении и упрощении создания ЖГВ с помощью обратной генетики [11–14]. Уход от реассортационного способа достижения аттенуации вакцинных штаммов позволит

непосредственно переносить в гены дикого вируса набор необходимых ts-мутаций, соответствующий мутациям в генах донора аттенуации.

В данной работе было показано, что мутантные штаммы, содержащие разное количество и/или сочетание аминокислотных замен в полимеразных генах, демонстрируют широкий спектр выраженности как аттенуирующих, так и иммуногенных свойств. При этом, с одной стороны, каждая из тестируемых мутаций вносит свой вклад в изменение свойств вируса, а с другой, амплитуда этих изменений варьирует и зависит не только и не столько от количества аминокислотных замен, но и от их комбинированного действия. Так, исключение 1 мутации в *PB2*-гене (V478L), 3 мутаций в *PB2*(V478L) и *PA* (L28P, V341L) или 4 мутаций в *PB1* (K265N, V591I) и *PA* (L28P, V341L) приводит к увеличению иммуногенности в той или иной степени по сравнению с максимально аттенуированным штаммом, содержащим полный набор тестируемых мутаций. Однако указанные выше штаммы сохраняли патогенные свойства, которые мало отличались от таковых вируса A/PR/8/34 (H1N1)wt. Наоборот, исключение 2 мутаций в *PA*-гене из полного набора тестируемых мутаций приводит к увеличению продукции противовирусных антител в сыворотке крови, при этом сохраняется достаточно высокая степень аттенуации. В целом, полученные нами результаты хорошо согласуются с данными литературы относительно роли отдельных мутаций в генах полимеразного комплекса, соответствующих ts-мутациям донора аттенуации A/Энн Арбор/6/60 (H2N2), который используется при создании ЖГВ в США, в формировании системного гуморального иммунитета [8, 15, 16].

Холодоадаптированные вакцинные кандидаты, полученные с помощью реассортации генов по общепринятой формуле 2/6 на основе донора A/Ленинград/134/17/57 (H2N2) в России или A/Энн Арбор/6/60 (H2N2) в США и объединяющие в себе HA и NA от современного эпидемического вируса и 6 генов внутренних белков донора аттенуации, оказываются лишены антигенных дрейфовых изменений, которые происходят в последних. В результате многие иммунодоминантные эпитопы внутренних белков новых дрейфовых вариантов вирусов гриппа А и реассортантов вакцинных штаммов существенно различаются [17–19], что в свою очередь может влиять на формирование адаптивного иммунного ответа.

Вакцинация с использованием ЖГВ, в отличие от ИГВ, моделирует естественную инфекцию и вызывает не только выраженный системный гуморальный иммунный ответ, но и одновременно обеспечивает защиту, опосредованную мукозальными антителами и Т-лимфоцитами [20]. Секреторные антитела играют ключевую роль в резистентности к инфекции, в то время как сывороточные антитела защищают нижние отделы респираторного тракта. Наряду с гуморальным иммунитетом, обеспечивающим основную защиту при гомотипической инфекции, при гетеротипической инфекции большое значение имеет иммунитет, опосредованный Т-лимфоцитами [1]. Проведенное исследование выявило неоднозначное влияние мутаций в генах полимеразного комплекса вируса гриппа А на индукцию разных звеньев иммунной системы. Наиболее выраженное действие ts-мутации в *PB1*-, *PB2*- и *PA*-генах оказывают на продукцию системных противовирусных антител классов А и G, причем в этом случае сочетание мутаций приводит к синергизму. Продукция противовирусных антител класса М в сыворотках крови, индуцированная мутантными штаммами, изменялась незначительно по сравнению

с контрольным патогенным вирусом и не зависела от количества и места локализации аминокислотных замен. Достоверные изменения продукции локальных антител в смывах верхних дыхательных путей были вызваны только двумя тестируемыми штаммами, которые содержали комбинации мутаций в *PB1*- и *PB2*-генах или в *PB1*-, *PB2*- и *PA*-генах. Примечательно, что в данной работе мы не обнаружили какой-либо четкой связи между наличием или композиционным сочетанием тестируемых мутаций и интенсивностью стимуляции Т-лимфоцитов. Динамические изменения пропорциональных соотношений субпопуляций наивных, эффекторных и Т-клеток памяти, индуцированных патогенным вирусом A/PR/8/34 (H1N1) и всеми тестируемыми мутантными штаммами, различались очень незначительно. Это дает основание предположить, что наличие точечных мутаций в генах, кодирующих белки полимеразного комплекса вируса гриппа А, не отражается на формировании адаптивного иммунного ответа, опосредованного CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитами. Однако с полной уверенностью об этом можно будет судить после дополнительных исследований, направленных на изучение функциональной активности вирусспецифических субпопуляций этих лимфоцитов.

Таким образом, проведенное исследование демонстрирует индивидуальное и сочетанное влияние ts-мутаций в *PB1*-, *PB2*- и *PA*-генах вируса гриппа А на обеспечение низкой реактогенности вакцинных кандидатов, с одной стороны, и на индукцию различных звеньев противовирусного иммунитета – с другой. Полученные результаты представляют платформу для дальнейшего поиска оптимальных соотношений между факторами, гарантирующими безвредность и одновременно высокую иммуногенность живой вакцины, что в свою очередь позволит значительно эффективнее защитить население в случае пандемии.

Работа была поддержана грантом РФФИ №12-04-31364 мол_а.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kreijtz J.H., Fouchier R.A., Rimmelzwaan G.F. Immune responses to influenza virus infection. *Virus Res.* 2011; 162(1–2): 19–30.
2. Программа фундаментальных научных исследований государственных академий на 2013–2020 года (Распоряжение Правительства Российской Федерации от 3 декабря 2012 N2237-р), подраздел 205 «Получение новых знаний о механизмах постинфекционной и поствакцинальной иммунологии». М.; 2012.
3. Киселева И.В., Ларионова Н.В., Voeten J.T.M., Teley L.C., Drieszen-van der Crujisen S.K., Heldens J.G. и др. Ведущая роль генов полимеразного комплекса в аттенуации доноров отечественной живой гриппозной вакцины А и В. *Журнал микробиологии, эпидемиологии, иммунологии.* 2010; 6: 41–7.
4. Isakova-Sivak I., Chen L.M., Matsuoka Y., Voeten J.T., Kiseleva I., Heldens J.G. et al. Genetic bases of the temperature-sensitive phenotype of A master donor virus used in live attenuated influenza vaccines: A/Leningrad/134/17/57(H2N2). *Virology.* 2011; 412 (2): 297–305.
5. Донина С.А., Найхин А.Н., Петухова Г.Д., Баранцева И.Б., Чиркова Т.В., Григорьева Е.П. и др. Системный гуморальный и клеточный иммунный ответ при экспериментальной гриппозной инфекции и вакцинации. *Медицинская иммунология.* 2006; 8 (1): 31–6.
6. Петухова Г.Д., Найхин А.Н., Баранцева И.Б., Донина С.А., Чиркова Т.В., Григорьева Е.П. и др. Локальный гуморальный и клеточный иммунный ответ мышей при гриппозной инфекции и вакцинации. *Медицинская иммунология.* 2006; 8 (4): 511–6.
7. Petukhova G., Chirkova T., Donina S., Korenkov D., Naykhin A., Rudenko L. Comparative studies of local antibody and cellular immune responses to influenza infection and vaccination with live attenuated influenza vaccine (LAIV) utilizing a mouse nasal-associated lymphoid tissue (NALT) separation method. *Vaccine.* 2009; 27(19): 2580–87.

8. Znou B., Li Y., Speer S. Engineering temperature sensitive live attenuated influenza vaccines from emerging viruses. *Vaccine*. 2012; 30(24): 3691–702.
9. Jin H., Zhou H., Lu B., Kembler G. Imparting temperature sensitivity and attenuation in ferrets to A/Puerto/Rico/8/34 influenza virus by transferring the genetic signature for temperature sensitivity from cold-adapted A/Ann Arbor/6/60. *J. Virol.* 2004; 78(2): 995–8.
10. He W., Wang W., Han H., Wang L., Zhang G., Gao B. Molecular basis of live-attenuated influenza virus. *PLoS ONE*. 2013; 8 (3): e60413.
11. Gabriel G., Garn H., Wegmann M., Renz H., Herwing A., Klenk H.-D. et al. The potential of a protease activation mutant of a highly pathogenic avian influenza virus for a pandemic live vaccine. *Vaccine*. 2008; 26(7): 956–65.
12. Jin H., Lu B., Zhou H., Ma C., Zhao J., Yang C. et al. Multiple amino acid residues confer temperature sensitivity to human influenza virus vaccine strains (FluMist) derived from cold-adapted A/Ann Arbor/6/60. *Virology*. 2003; 306: 18–24.
13. Mueller S., Coleman J.R., Papamichail D., Ward C.B., Nimnual A., Fitcher B. et al. Live attenuated influenza virus vaccines by computer-aided rational design. *Nat. Biotechnol.* 2010; 28 (7): 723–6.
14. Solorzano A., Ye J., Perez D.R. Alternative live-attenuated influenza vaccines based on modifications in the polymerase genes protect against epidemic and pandemic flu. *J. Virology*. 2010; 84(9): 4587–96.
15. Subbarao E.K., Kawaoka Y., Murphy B.R. Rescue of an influenza A virus wild-type PB2 gene and a mutant derivative bearing a site-specific temperature and attenuating mutation. *J. Virology*. 1993; 67: 7223–8.
16. Subbarao E.K., Park E. J.U, Lawson C.M., Chen A.Y., Murphy B.R. Sequential addition of temperature-sensitive missense mutations into the PB2 gene of influenza A transfectant viruses can effect an increase in temperature sensitivity and attenuation and permits the rational design of a genetically engineered live influenza A virus vaccine. *J. Virology*. 1995; 69(10): 5969–77.
17. Boon A.C., de Mutsert G., Graus Y.M., Fouchier R.A., Sintercolaas K., Osterhaus A.D. Sequence variation in a newly identified HLA-B35-restricted epitope in the influenza A virus nucleoprotein associated with escape from Cytotoxic T lymphocytes. *J. Virology*. 2002; 76(5): 2567–72.
18. Rimmelzwaan G.F., Boon A.C., Voeten J.T., Berkhoff E.C., Fouchier R.A., Osterhaus A.D. Sequence variation in the influenza A virus nucleoprotein associated with escape from Cytotoxic T lymphocytes. *Virus Res*. 2004; 103 (1–2): 97–100.
19. Voeten J.T., Bestebroer T.M., Nieuwkoop N.J., Fouchier R.A., Osterhaus A.D. Antigenic drift in the influenza A virus (H3N2) nucleoprotein and escape from recognition by Cytotoxic T lymphocytes. *J. Virology*. 2000; 74 (15): 6800–7.
20. Cox R.J., Brokstad K.A., Ogra E.P. Influenza virus: immunity and vaccination strategies. Comparison of the immune response to inactivated and live, attenuated influenza vaccines. *Scand. J. Immunol.* 2004; 59(1): 1–15.
5. Donina S.A., Naykhin A.N., Petukhova G.D., Barantseva I.B., Chirkova T.V., Grigor'eva E.P. et al. Systemic humoral and cellular immune response in an experimental influenza infection or vaccination. *Meitsinskaya Immunologiya*. 2006; 8 (1): 31–6. (in Russian)
6. Petukhova G.D., Naykhin A.N., Barantseva I.B., Donina S.A., Chirkova T.V., Grigor'eva E.P., et al. The local humoral and cellular immune response of mice with influenza infection and vaccination. *Meitsinskaya Immunologiya*. 2006; 8 (4): 511–6. (in Russian)
7. Petukhova G., Chirkova T., Donina S., Korenkov D., Naykhin A., Rudenko L. Comparative studies of local antibody and cellular immune responses to influenza infection and vaccination with live attenuated influenza vaccine (LAIV) utilizing a mouse nasal-associated lymphoid tissue (NALT) separation method. *Vaccine*. 2009; 27(19): 2580–87.
8. Znou B., Li Y., Speer S. Engineering temperature sensitive live attenuated influenza vaccines from emerging viruses. *Vaccine*. 2012; 30(24): 3691–702.
9. Jin H., Zhou H., Lu B., Kembler G. Imparting temperature sensitivity and attenuation in ferrets to A/Puerto/Rico/8/34 influenza virus by transferring the genetic signature for temperature sensitivity from cold-adapted A/Ann Arbor/6/60. *J. Virol.* 2004; 78(2): 995–8.
10. He W., Wang W., Han H., Wang L., Zhang G., Gao B. Molecular basis of live-attenuated influenza virus. *PLoS ONE*. 2013; 8 (3): e60413.
11. Gabriel G., Garn H., Wegmann M., Renz H., Herwing A., Klenk H.-D. et al. The potential of a protease activation mutant of a highly pathogenic avian influenza virus for a pandemic live vaccine. *Vaccine*. 2008; 26(7): 956–65.
12. Jin H., Lu B., Zhou H., Ma C., Zhao J., Yang C. et al. Multiple amino acid residues confer temperature sensitivity to human influenza virus vaccine strains (FluMist) derived from cold-adapted A/Ann Arbor/6/60. *Virology*. 2003; 306: 18–24.
13. Mueller S., Coleman J.R., Papamichail D., Ward C.B., Nimnual A., Fitcher B. et al. Live attenuated influenza virus vaccines by computer-aided rational design. *Nat. Biotechnol.* 2010; 28 (7): 723–6.
14. Solorzano A., Ye J., Perez D.R. Alternative live-attenuated influenza vaccines based on modifications in the polymerase genes protect against epidemic and pandemic flu. *J. Virology*. 2010; 84(9): 4587–96.
15. Subbarao E.K., Kawaoka Y., Murphy B.R. Rescue of an influenza A virus wild-type PB2 gene and a mutant derivative bearing a site-specific temperature and attenuating mutation. *J. Virology*. 1993; 67: 7223–8.
16. Subbarao E.K., Park E. J.U, Lawson C.M., Chen A.Y., Murphy B.R. Sequential addition of temperature-sensitive missense mutations into the PB2 gene of influenza A transfectant viruses can effect an increase in temperature sensitivity and attenuation and permits the rational design of a genetically engineered live influenza A virus vaccine. *J. Virology*. 1995; 69(10): 5969–77.
17. Boon A.C., de Mutsert G., Graus Y.M., Fouchier R.A., Sintercolaas K., Osterhaus A.D. Sequence variation in a newly identified HLA-B35-restricted epitope in the influenza A virus nucleoprotein associated with escape from Cytotoxic T lymphocytes. *J. Virology*. 2002; 76(5): 2567–72.
18. Rimmelzwaan G.F., Boon A.C., Voeten J.T., Berkhoff E.C., Fouchier R.A., Osterhaus A.D. Sequence variation in the influenza A virus nucleoprotein associated with escape from Cytotoxic T lymphocytes. *Virus Res*. 2004; 103 (1–2): 97–100.
19. Voeten J.T., Bestebroer T.M., Nieuwkoop N.J., Fouchier R.A., Osterhaus A.D. Antigenic drift in the influenza A virus (H3N2) nucleoprotein and escape from recognition by Cytotoxic T lymphocytes. *J. Virology*. 2000; 74 (15): 6800–7.
20. Cox R.J., Brokstad K.A., Ogra E.P. Influenza virus: immunity and vaccination strategies. Comparison of the immune response to inactivated and live, attenuated influenza vaccines. *Scand. J. Immunol.* 2004; 59(1): 1–15.

REFERENCES

1. Kreijtz J.H., Fouchier R.A., Rimmelzwaan G.F. Immune responses to influenza virus infection. *Virus Res*. 2011; 162(1–2): 19–30.
2. Program of fundamental research of the state academies for 2013–2020 years (Decree of the Russian Federation dated December 3, 2012 N2237-p), subsection 205 “Obtaining of new knowledge about the mechanisms of post-infection and post-vaccinal immunology” Moscow; 2012. (in Russian)
3. Kiseleva I.V., Larionova N.V., Voeten J.T., Teley L.C., Drieszen-van-der-Crujjsen S.K., Heldens J.G. et al. Leading role of genes coding polymerase complex in attenuation of domestic donor viruses for A and B live influenza vaccine. *Zhurnal Mikrobiologii Epidemiologii Immunobiologii*. 2010; 6: 41–7. (in Russian)
4. Isakova-Sivak I., Chen L.M., Matsuoka Y., Voeten J.T., Kiseleva I., Heldens J.G. et al. Genetic bases of the temperature-sensitive phenotype of A master donor virus used in live attenuated influenza vaccines: A/Leningrad/134/17/57(H2N2). *Virology*. 2011; 412 (2): 297–305.
18. Rimmelzwaan G.F., Boon A.C., Voeten J.T., Berkhoff E.C., Fouchier R.A., Osterhaus A.D. Sequence variation in the influenza A virus nucleoprotein associated with escape from Cytotoxic T lymphocytes. *Virus Res*. 2004; 103 (1–2): 97–100.
19. Voeten J.T., Bestebroer T.M., Nieuwkoop N.J., Fouchier R.A., Osterhaus A.D. Antigenic drift in the influenza A virus (H3N2) nucleoprotein and escape from recognition by Cytotoxic T lymphocytes. *J. Virology*. 2000; 74 (15): 6800–7.
20. Cox R.J., Brokstad K.A., Ogra E.P. Influenza virus: immunity and vaccination strategies. Comparison of the immune response to inactivated and live, attenuated influenza vaccines. *Scand. J. Immunol.* 2004; 59(1): 1–15.

Поступила 22.02.14
Received 22.02.14

Селимова Л.М.^{1,2}, Серебровская Л.В.^{1,2}, Иванова Л.А.², Кравченко А.В.², Буравцова Е.В.²

Показатели CD4-клеток и вирусной нагрузки у пациентов, инфицированных вирусом иммунодефицита человека 1-го типа (ВИЧ-1)

¹ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского» Минздрава России, 123098, г. Москва; ²ФГБУ «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, 105275, г. Москва

Изучены особенности показателей количества CD4 Т-лимфоцитов и вирусной РНК в плазме пациентов с ВИЧ-инфекцией. Была выявлена 22% корреляция между снижением количества CD4-клеток и повышением уровня вирусной нагрузки (ВН) у пациентов, находящихся в стадии 3 ВИЧ инфекции и не получающих АРВТ. При длительном наблюдении у пациентов с этой стадией инфекции медиана значения ВН увеличивалась как при повышении, так и при понижении количества CD4-клеток. К концу наблюдения существенно увеличился процент пациентов с ВН > 3,3 лг копий/мл. У пациентов со стадией 4 ВИЧ-инфекции, не получающих АРВТ, была отмечена 43% корреляция между сроком инфицирования и количеством CD4-клеток. У большинства пациентов, получающих АРВТ, в стадиях 3 и 4 ВИЧ-инфекции наблюдалось существенное увеличение количества CD4-клеток. В стадии 3 наилучшие показатели зарегистрированы у пациентов с исходным значением CD4 > 400 кл/мкл.

Ключевые слова: ВИЧ инфекция; CD4 Т-лимфоциты; вирусная нагрузка; антиретровирусная терапия.

Для цитирования: Вопросы вирусологии. 2015; 60(2): 31–34.

Selimova L.M.^{1,2}, Serebrovskaya L.V.^{1,2}, Ivanova L.A.², Kravchenko A.V.², Buravtsova E.V.²

Parameters of the CD4-Cell count and viral load in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infected patients

¹The D.I. Ivanovsky Institute of Virology" Federal State Budgetary Institution "Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya" of the Ministry of Health of the Russian Federation, 123098, Moscow, Russia; ²Central Research Institute of Epidemiology, Federal Supervision Service for the of Consumer Rights Protection and People's Welfare, 105275, Moscow

In this work the specific features of parameters of plasma CD4 T-lymphocytes count and level virus RNA in the HIV-infected patients were studied. 22% correlation between reduction of CD4 cell count and an increase in virus RNA level was observed in persons that did not receive antiretroviral treatment during the third HIV-infection phase. During this phase of infection patients exhibited a growth of the median value of virus load in cases of both rise as decline in CD4 cell count during long observation period. In addition, towards the end of the observation period, the percentage of patients with virus load >3.3 lg copies/ml considerably expanded. 43% correlation between CD4 cell count and duration of the HIV-infection was detected during the fourth infection phase in persons that did not receive antiretroviral treatment. Most of the patients in the third and the fourth infection phases had essential CD4 cell count growth during antiretroviral treatment. Best values were observed in patients with the initial value of CD4 >400 cells/μl belonging to the third HIV-infection phase.

Key words: HIV- infection; CD4 T-lymphocytes; viral load; antiretroviral treatment.

Citation: *Voprosy virusologii*. 2015; 60 (2): 31–34. (In Russ.)

For correspondence: Lyudmila Selimova, Doctor of Biological Sciences; e-mail: lselim@mail.ru

Основным критерием оценки течения ВИЧ-инфекции после постановки диагноза является определение количества CD4 Т-лимфоцитов (CD4-клетки) и вирусной РНК или вирусной нагрузки (ВН) в периферической крови пациентов [1]. Эти показатели позволяют контролировать уровень повреждения иммунной системы пациента, служат лабораторными критериями характеристики особенностей течения ВИЧ-инфекции, определения стадии болезни и необходимы для своевременного назначения высокоактивной антиретровирусной терапии (АРВТ) и контроля ее эффективности [2].

В процессе развития ВИЧ-инфекции динамика изменения количества CD4-клеток и уровня ВН в крови имеет противоположный характер, они индивидуальны для каждого пациента и определяются генетическими особенностями вируса и пациента [3]. Как они взаимосвязаны между собой и в какой мере изменения одного из них влекут за собой изменения другого в настоящее

время до конца не изучено [4]. Поэтому всестороннее исследование этой проблемы с целью составления универсальной модели оценки указанных выше парных данных и использования их для прогнозирования особенностей течения болезни является очень важным.

При анализе результатов возникает вопрос не только о степени корреляции между показателями CD4-клеток и ВН в целом, падении уровня CD4-клеток и подъема ВН при диспансерном наблюдении отдельных пациентов, но и об особенностях восстановления иммунной функции организма при АРВТ. Последняя при лабораторном анализе оценивается в первую очередь по увеличению количества CD4-клеток и падению ВН [5].

В связи с этим целью нашего исследования было изучить особенности взаимоотношения между показателями количества CD4-клеток и ВН у пациентов в Российской Федерации, обратившихся в Специализированный научно-исследовательский отдел эпидемиологии и про-

филактики СПИДа (СНИО ЭП СПИД). Более 90% включенных в исследование пациентов были инфицированы подтипом А ВИЧ-1. При диспансерном наблюдении мы планировали получить представление об уровне вирусной продукции в организме при определенных показателях иммунной системы, а в процессе АРВТ – проанализировать уровень и особенности изменения количества CD4-клеток.

Материалы и методы

Был проведен анализ данных, полученных на случайной выборке показателей количества CD4-клеток и ВН в крови пациентов с ВИЧ-инфекцией, обращавшихся в СНИО ЭП СПИД. Случайную выборку по двум указанным критериям проводили для параллельных образцов крови, полученных от пациентов одновременно, за период 2008–2011 гг. В исследование было включено 908 парных анализов от 317 пациентов (177 мужчин и 140 женщин), средний возраст которых составил $33,5 \pm 12,8$ года, из них 77% – лица, зарегистрированные на территории Центрального федерального округа. Сроки инфицирования колебались от 1 до 14 лет.

Пациенты были разделены на 2 группы. В 1-ю группу вошли 242 пациента (134 мужчины и 108 женщин), не получающих АРВТ. Из них 54 пациента (30 женщин и 24 мужчины) прошли не менее 3 последовательных парных анализов в течение 1,5–2-х лет, остальные – 1 парный анализ или 2 последовательных парных анализа. Во 2-ю группу вошли 75 пациентов (43 мужчины и 32 женщины), находящихся на лечении. У пациентов этой группы было выполнено не менее 3 последовательных парных анализов в течение 2 лет. 1-я группа включала 490 парных анализов, 2-я – 460.

Количество CD4-клеток определяли методом проточной цитометрии на цитофлюориметрах EPICS XL и FACS Calibur с использованием моноклональных антител CD45/CD3/CD4 («Beckman Coulter» и «Becton Dickinson»), частиц FlowCount и пробирок TRUCount для абсолютного счета. ВН определяли с помощью коммерческой тест-системы ПЦР в реальном времени (RT-PCR; Amplicor HIV Monitor Assay, «Roche Diagnostics», Натли, Нью-Джерси, США).

Статистический анализ проводили с использованием программы BioStat 2009 для Windows («AnalystSoft Inc») при получении данных описательной статистики, и программы Prism v.4 («GraphPad Software, Inc») при определении коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r_s).

Результаты и обсуждение

В табл. 1 представлены данные о количестве CD4-клеток и ВН у пациентов, не получающих АРВТ, по стадиям ВИЧ-инфекции, а также доли пациентов, соответствующих 5 категориям по уровню ВН. Как видно из этой таблицы, медиана количества CD4-клеток практически одинакова в стадиях 2 и 3 инфекции и более чем в 2 раза ниже в стадии 4. Относительно уровня ВН в стадии 2 инфекции у большинства пациентов (56,6%) она колебалась в пределах $> 3,3 \leq 4,0$ Ig, у 22,2% – в пределах $> 2,7 \leq 3,3$ Ig копий/мл. Следует отметить, что в данной группе было всего 9 парных анализов. При изучении более представительной группы результаты могут быть иными. Среди пациентов, находящихся в стадии 3 ВИЧ-инфекции, наибольшее количество пациентов (34,9%) имели ВН нагрузку $> 3,3 \leq 4,0$ Ig копий/мл, 31,8% – $> 4,0 \leq 4,6$ Ig копий/мл и 25,6% – $> 4,6$ Ig копий/мл. В стадии 4 инфекции наблюдалась тенденция к увеличению общего уровня ВН, что выразилось в увеличении доли пациентов, входящих в 2

Таблица 1

Показатели количества CD4-лимфоцитов и уровня ВН у пациентов, не получающих АРВТ, по стадиям ВИЧ-инфекции, и доли пациентов с разными уровнями ВН

Показатель	Медиана	Разброс	ВН, %*				
			1	2	3	4	5
Стадия 2 (9)							
CD4*, кл/мкл	384	319–544					
ВН, Ig копий/мл	3,6	3,1–4,9	0	22,2	56,6	11,1	11,1
Стадия 3(429)							
CD4*, кл/мкл	406	116–1559					
ВН, Ig копий/мл	2,4–6,1 4,1	1,9	5,8	34,9	31,8	25,6	
Стадия 4(32)							
CD4*, кл/мкл	186	23–495					
ВН, Ig копий/мл	4,5	3,3–6,1	0	0	18,7	46,9	34,4

Примечание. Здесь и в табл. 2: * – % пациентов с ВН категорий 1–5: $\leq 2,7$, $> 2,7 \leq 3,3$, $> 3,3 \leq 4,0$, $> 4,0 \leq 4,6$ и $> 4,6$ Ig копий/мл соответственно; в скобках указано количество парных анализов.

последние категории по ВН, – 46,9% с $> 4,0 \leq 4,6$ Ig копий/мл и 34,4% с $> 4,6$ Ig копий/мл. При определении коэффициента ранговой корреляции Спирмена в парах показателей количество CD4-клеток – уровень ВН, возраст пациентов – количество CD4-клеток или уровень ВН, срок инфицирования – количество CD4-клеток были получены следующие результаты. Для стадии 2 инфекции корреляция не была обнаружена ни в одной из пар значений. Для стадии 4 инфекции 43% корреляция была выявлена только в паре срок инфицирования – количество CD4-клеток ($r_s = -0,43$, $p < 0,05$). Для стадии 3 инфекции была отмечена корреляция в парах количество CD4-клеток – уровень ВН ($r_s = -0,22$, $p < 0,0001$), возраст – количество CD4-клеток ($r_s = -0,1$, $p < 0,05$), срок инфицирования – количество CD4-клеток ($r_s = -0,2$, $p < 0,0001$), т. е. корреляция со-

Таблица 2

ВН у пациентов с различным количеством CD4-клеток, находящихся в стадии 3 ВИЧ-инфекции и не получающих АРВТ, и доли пациентов с разными уровнями ВН

Показатель	Медиана	Разброс	ВН, %*				
			1	2	3	4	5
CD4 > 500 кл/мкл (103)							
CD4*, кл/мкл	605	501–1559					
ВН, Ig копий/мл	3,9	2,4–5,8	2,9	10,7	39,8	31,1	15,5
CD4 401–500 кл/мкл (85)							
CD4*, кл/мкл	447	401–498					
ВН, Ig копий/мл	4,2	2,4–5,8	3,5	7,1	24,7	47,1	17,6
CD4 301–400 кл/мкл (173)							
CD4*, кл/мкл	355	301–400					
ВН, Ig копий/мл	4,1	2,5–6,0	1,2	3,4	40,5	25,4	29,5
CD4 201–300 кл/мкл (59)							
CD4*, кл/мкл	269	206–300					
ВН, Ig копий/мл	4,4	2,9–6,1	0	1,7	23,7	32,2	42,4
CD4 100–200 кл/мкл (9)							
CD4*, кл/мкл	156	116–197					
ВН, Ig копий/мл	3,9	3,1–5,4	0	11,1	44,4	11,1	33,4

Таблица 3

Изменение количества CD4-клеток и уровня ВН при длительном наблюдении пациентов, находящихся в стадии 3 ВИЧ-инфекции и не получающих АРВТ

Показатель	Медиана	Разброс	ВН, %*				
			1	2	3	4	5
CD4 подъем (11)							
CD4*, кл/мкл	395/477	269–683/284–730					
ВН, Ig копий/мл	3,8/4,0	2,6–4,4/3,3–4,8	9/0	27,3/0	18,2/45,4	45,5/36,4	0/18,2
CD4 падение							
≤ 50 кл/мкл (14)							
CD4*, кл/мкл	443/427	285–887/274–865					
ВН, Ig копий/мл	4,0/4,1	3,3–5,6/3,3–6,0	0/0	7,1/14,3	42,8/21,4	35,7/42,8	14,3/21,4
51–100 кл/мкл (7)							
CD4*, кл/мкл	450/361	358–867/274–804					
ВН, Ig копий/мл	4,2/4,5	3,6–4,6/3,7–5,0	0/0	0/0	14,3/28,6	85,7/28,6	0/42,8
101–200 кл/мкл (11)							
CD4*, кл/мкл	491/313	273–684/105–519					
ВН, Ig копий/мл	4,3/4,6	3,3–5,6/3,5–6,0	0/0	0/0	36,4/18,2	45,4/36,4	8,2/45,4
> 200 кл/мкл (11)							
CD4*, кл/мкл	670/403	285–887/274–865					
ВН, Ig копий/мл	4,2/4,4	3,2–5,1/3,5–5,4	0/0	9/0	36,4/27,3	36,4/45,4	18,2/27,3

Примечание. * – см. табл. 1; в скобках указано количество пациентов; косая линия разделяет значения в исходной и конечной точках наблюдения.

ставила 22, 10, и 20%, соответственно. Наибольший интерес вызывают данные о 22% корреляции между количеством CD4-клеток и уровнем ВН. По общепринятой интерпретации это слабая корреляция, но она имеется. В подобных исследованиях ее практически не обнаруживали [6]. В связи с этим важно было провести более глубокий анализ данных, изучив особенности этих показателей в группах больных, разделенных на 5 уровней по количеству CD4-клеток. Такой анализ можно было предпринять только с наиболее представительной группой пациентов, находящихся в стадии 3 ВИЧ-инфекции. Результаты представлены в табл. 2. Как видно из таблицы, в процессе снижения количества CD4-клеток прослеживается явная тенденция к снижению суммарной доли пациентов с ВН > до 3,3 Ig копий/мл и увеличению суммарной доли пациентов с ВН более 3,3 Ig копий/мл. Для уровней CD4 > 500, 401–500, 301–400 и 201–300 кл/мкл с ВН до 3,3 Ig копий/мл это 13,6, 10,6, 4,6 и 1,7%, соответственно и с ВН > 3,3 Ig копий/мл – 86,4, 89,4, 95,4% и 98,3%, соответственно. Исключением является группа пациентов с наименее низким показателем CD4-клеток (100–200 кл/мкл). Эта группа была малочисленной, что не позволяло делать определенные выводы. Как правило, пациенты с такими иммунологическими показателями начинают принимать антиретровирусные препараты.

Таким образом, полученный нами 22% уровень корреляции по значениям CD4-клеток и ВН для пациентов со стадией 3 инфекции можно считать практически достоверным.

В данной группе пациентов, находящихся на диспансерном наблюдении и не получающих АРВТ, удалось выделить подгруппу наблюдающихся регулярно в течение 1–2 лет и имеющих не менее трех последовательных парных показателей. С использованием этих данных мы попытались провести анализ уровня снижения количества CD4 Т-лимфоцитов и увеличения уровня ВН в указанной подгруппе. Подгруппу составили 54

пациента, в возрасте 26–51 год (медиана 32 года) со стадией 3 инфекции, и сроком инфицирования от 2 до 12 лет (медиана 4) года, 33 пациента (из них 20 женщин) непрерывно наблюдались 1 год и 21 пациент (из них 10 женщин) – 2 года. Результаты представлены в табл. 3. Изменения количества CD4-клеток и уровня ВН определяли за весь период наблюдения для каждого пациента. Затем проводили статистическую обработку данных по отдельным категориям в зависимости от уменьшения количества CD4-клеток. Видно, что во всех категориях в ходе наблюдения падение уровня CD4-клеток сопровождалось изменением уровня ВН. К концу наблюдения существенно увеличивался процент пациентов с ВН > 3,3 Ig копий/мл, причем не только при уменьшении, но и при повышении количества CD4-клеток. Следует отметить, что у пациентов, у которых наблюдалось повышение уровня CD4 Т-клеток, медианы значений ВН были ниже, чем в других группах, как в начале, так и в конце наблюдения. Подобные пациенты могут служить моделью для изучения особенностей регуляции иммунной системы при ВИЧ-инфекции на уровне маркеров активации (CD38, HLA-DR, CD25, CD62L и др.).

Таблица 4

Увеличение количества CD4-клеток в процессе АРВТ

Показатель	Исходное значение CD4, кл/мкл	Изменение CD4 в процессе лечения через:			
		6 мес	12 мес	18 мес	24 мес
Стадия 3(43)*					
CD4 100–200 кл/мкл (15,2%)**					
Медиана	143	+77	+69	+119	+166
Разброс	118–180	0–246	5–366	57–505	116–408
CD4 201–300 кл/мкл (50,3%)**					
Медиана	243	+118	+130	+114	+128
Разброс	205–300	0–298	35–324	10–423	3–708
CD4 301–400 кл/мкл (15,2%)**					
Медиана	346	+73	+197	+72	+84
Разброс	311–386	0–245	47–606	3–196	9–261
CD4 > 400 кл/мкл (19,3%)**					
Медиана	488	+77	+97	+188	+261
Разброс	407–692	-57–307	7–437	51–253	143–315
Стадия 4(20)*					
CD4 ≤ 100 кл/мкл (25%)**					
Медиана	83	+121	+117	+163	+158
Разброс	47–96	38–192	84–234	132–407	59–235
CD4 > 100 кл/мкл (75%)**					
Медиана	151	+52	+62	+52	+99
Разброс	101–216	-22–229	13–313	22–330	18–379

Примечание. * – количество пациентов; ** – доля пациентов с соответствующим исходным уровнем CD4.

Во 2-ю группу вошли пациенты, получающие АРВТ в течение 24 мес. Комплексную химиотерапию проводили в соответствии с рекомендациями, принятыми в Российской Федерации [2]. Применяемые в настоящее время схемы АРВТ для лечения лиц с ВИЧ-инфекцией позволяют добиться практически полного снижения уровня вирусной РНК, обнаруживаемой в периферической крови, даже при исходно высоком уровне ВН на фоне низкого иммунологического показателя. В исследование были включены только пациенты, у которых было не менее 3 последовательных парных анализов и ВН через 3–6 мес после начала терапии и в течение всего срока наблюдения составляла ≤ 50 Ig копий/мл. К ним относились 46 пациентов (из них 19 женщин) в возрасте 24–54 лет (медиана 33 года) со стадией 3 ВИЧ-инфекции сроком заражения 2–10 лет (медиана 5), у которых ВН до лечения колебалась в пределах 3,1–6,0 Ig копий/мл (медиана 4,3 Ig), и 20 пациентов (из них 7 женщин) в возрасте 28–57 лет (медиана 36 лет), со стадией 4 инфекции и сроком инфицирования 2–10 лет (медиана 6 лет), у которых ВН до лечения изменялась от 3,4 до 6,1 Ig копий/мл (медиана 4,6 Ig копий/мл). Результаты изменения медианы количества CD4-клеток у пациентов, разделенных по исходному уровню CD4-клеток на категории, представлены в табл. 4. Из таблицы видно, что у пациентов всех категорий в процессе лечения наблюдался рост количества CD4 T-клеток, который был наиболее выраженным при исходном уровне CD4 > 400 кл/мкл. Наблюдаемые колебания количества клеток, наиболее существенные у пациентов стадии 4 инфекции могут быть связаны с различными факторами. Это, возможно, генетические особенности вируса и индивидуальные характеристики пациентов, а также клинические особенности течения болезни у отдельных пациентов.

Пациенты, у которых при лечении на фоне отсутствия ВН наблюдалось снижение количества CD4-клеток (дискордантный ответ), были описаны в литературе давно [7]. Одним из основных факторов такого эффекта при АРВТ [8] является коинфекция вирусом гепатита С (ВГС). В нашем исследовании было выявлено 6 таких пациентов, находящихся в стадии 3 ВИЧ-инфекции, из них 3 мужчины и 3 женщины: 1 пациент 38 лет (7 лет инфицирования), 1 пациентка 35 лет (инфицирована 4 года), 2 пациента (1 мужчина и 1 женщина) в возрасте 33 лет (инфицированы 8 лет), 1 пациент 31 года (инфицирован 8 лет) и 1 пациентка 29 лет (инфицирована 3 года). У 5 первых пациентов обнаружена коинфекция ВГС. Медиана снижения количества CD4-клеток в этой группе за 24 мес наблюдения составила 200 кл/мкл. Полагают, что это может быть связано также с возрастом [9], полом и сроком инфицирования [10]. Исходя из этого можно предположить, что срок инфицирования более 7 лет и коинфекция ВГС могут быть факторами, способствующими отсутствию восстановления иммунного показателя. Однако, чтобы делать достоверные выводы, необходимо наличие большего количества таких пациентов.

На основании полученных данных можно сформулировать следующее заключение. У пациентов, находящихся в стадии 3 ВИЧ-инфекции, не получающих АРВТ, нами была выявлена 22% корреляция между снижением количества CD4-клеток и ростом уровня ВН, 10% корреляция между снижением количества CD4-клеток и увеличением возраста пациентов и 20% корреляция между снижением уровня CD4-клеток и увеличением срока инфицирования. При длительном наблюдении у пациентов с этой стадией инфекции медиана значения ВН увеличивалась как при повышении, так и при понижении количества CD4-клеток. У пациентов со стадией 4 ВИЧ-инфекции, не получающих АРВТ, отмечена 43% корреляция между сроком инфицирования и количеством CD4-клеток. У большинства пациентов со стадиями 3 и 4 инфекции, получающих АРВТ, наблюдалось существенное увеличение количества CD4-клеток. В стадии 3 ВИЧ-инфекции наилучшие показатели наблюдались у пациентов с исходным значением CD4 > 400 кл/мкл. В стадии 4 ВИЧ-инфекции оно не зависело от исходного количества CD4-клеток.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 3–9 см. REFERENCES)

2. Покровский В.В., ред. *ВИЧ-инфекция и СПИД: Клинические рекомендации*. 2-е изд. М.: Медицина; 2009.
10. Шмагель Н.Г., Шмагель К.В., Черешнев В.А. Клинические аспекты иммунологической неэффективности высокоактивной антиретровирусной терапии. *Инфекционные болезни*. 2011; 9 (1): 5–10.

REFERENCES

1. Mellors J.W., Margolick J.B., Phair J.P., Rinaldo C.R., Detels R., Jacobson L.P. et al. Prognostic value of HIV-1 RNA, CD4 cell count, and CD4 Cell count slope for progression to AIDS and death in untreated HIV-1 infection. *J. A. M. A.* 2007; 297 (21): 2349–50.
2. Pokrovsky V.V., ed. HIV infection and AIDS: Clinical guidelines [ТТЧ-инфекция и СПИД: Клинические Рекомендации]. 2 ed. Moscow: Meditsina; 2009. (in Russian)
3. Kaslow R.A., Dorak T., Tang J.J. Influence of host genetic variation on susceptibility to HIV type 1 infection. *J. Infect. Dis.* 2005; 191 Suppl 1: S68–77.
4. Phillips A.N., Lampe F.C., Smith C.J., Geretti A.M., Rodger A., Lodwick R.K., Cambiano V. et al. Ongoing changes in HIV RNA levels during untreated HIV infection: implications for CD4 cell count depletion. *AIDS*. 2010; 24 (10): 1561–7.
5. Zhou J., Sirisanthana T., Kiertiburanakul S., Chen Y.M., Han N., Lim P.L. et al. Trends in CD4 counts in HIV-infected patients with HIV viral load monitoring while on combination antiretroviral treatment: results from The TREAT Asia HIV Observational Database. *BMC Infect. Dis.* 2010; 10: 361–70.
6. Rodriguez B., Sethi A.K., Cheruvu V.K., Mackay W., Bosch R.J., Kitahata M. et al. Predictive value of plasma HIV RNA level on rate of CD4 T-cell decline in untreated HIV infection. *J. A. M. A.* 2006; 296 (12): 1498–506.
7. Kaufmann G.R., Furrer H., Ledergerber B., Perrin L., Opravil M., Vernazza P. et al. Characteristics, determinants, and clinical relevance of CD4 T cell recovery to <500 cells/microL in HIV type 1-infected individuals receiving potent antiretroviral therapy. *Clin. Infect. Dis.* 2005; 41 (3): 361–72.
8. Rockstroh J.K., Mocroft A., Soriano V., Tural C., Losso M.H., Horban A. et al. Influence of hepatitis C virus infection on HIV-1 disease progression and response to highly active antiretroviral therapy. *J. Infect. Dis.* 2005; 192 (6): 992–1002.
9. Viard J.P., Mocroft A., Chiesi A., Kirk O., Ruge B., Panos G. et al. Influence of age on CD4 cell recovery in human immunodeficiency virus-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy: evidence from the EuroSIDA study. *J. Infect. Dis.* 2001; 183 (8): 1290–4.
10. Shmagel N.G., Shmagel K.V., Chereshev V.A. Clinical aspects of inefficiency of highly active antiretroviral therapy. *Infektsionnye Bolezni*. 2011; 9 (1): 5–10. (in Russian)

Поступила 26.09.13

Received 26.09.13

Шибнев В.А., Гараев Т.М., Финогонова М.П., Калнина Л.Б., Носик Д.Н.

Противовирусное действие водных экстрактов березового гриба *Inonotus obliquus* на вирус иммунодефицита человека

Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва

Фракции водного и водно-спиртового экстрактов березового гриба *Inonotus obliquus* дают противовирусный эффект в отношении вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1). Противовирусные свойства низкотоксичных экстрактов проявлялись в концентрации 5,0 мкг/мл при одновременном внесении с вирусом в культуру лимфобластоидных клеток МТ-4. Полученные экстракты березового гриба могут быть применены для создания новых противовирусных препаратов, ингибиторов репликации ВИЧ-1 при использовании как в виде индивидуального лекарства, так и в составе комплексной терапии.

Ключевые слова: противовирусная активность; ВИЧ-1; культура клеток; *Inonotus obliquus*.
Для цитирования: *Вопросы вирусологии*. 2015; 60(2): 35–38.

Shibnev V.A., Garaev T.M., Finogenova M.P., Kalnina L.B., Nosik D.N.

Antiviral activity of aqueous extracts of the birch fungus *Inonotus obliquus* on the human immunodeficiency virus

The D.I. Ivanovsky Institute of Virology Federal State Budgetary Institution "Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya" of the Ministry of Health of the Russian Federation, 123098, Moscow, Russia

Fractions of aqueous and water-alcohol extracts of the birch fungus *Inonotus obliquus* have antiviral effect against the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). Antiviral properties of low toxic extracts were manifested in the concentration of 5.0 µg/ml upon simultaneous application with the virus in the lymphoblastoid cells culture MT-4. The extract of the birch fungus can be used for development of new antiviral drugs, inhibitors of HIV-1 replication when used both in the form of individual drugs and as a part of complex therapy.

Key words: antiviral activity; HIV-1; cell culture; *Inonotus obliquus*.

Citation: *Voprosy virusologii*. 2015; 60 (2): 35–38. (In Russ.)

For correspondence: Timur Garaev, e-mail: gtim@fmradi.ru

Мир грибов является уникальным источником биологически активных соединений, которые нашли широкое применение в современной медицине. Это связано прежде всего с тем, что они представляют собой промежуточную живую форму между животным и растительным миром [1]. Многие десятилетия внимание медицины и биологической химии привлекают грибы трутовики, в частности чага, которая относится к классу базидиомицетов типа фунги, *Inonotus obliquus*.

О биологических свойствах низкотоксичных водных экстрактов *I. obliquus* и применении их в медицине известно многое [2]. Однако и по сей день до конца не ясно, что представляют собой эти экстракты с точки зрения их химического состава. На данный момент установлено, что водный экстракт *I. obliquus* включает растворимые хромогены, производные полифенолов, оксифенилкарбоновые кислоты, а также структурно сложную гуминовую кислоту, которая, возможно, появляется в процессе взаимодействия ферментной системы *I. obliquus* с лигнином древесины березы. Не исключено, что вся эта гамма низкотоксичных фенолсодержащих соединений возникает в результате мягкой деструкции в процессе водного выделения или длительного хранения экстракта.

Ранее нами было обнаружено, что вещества водного экстракта *I. obliquus* обладают ярко выраженной противовирусной активностью в отношении вирусов гриппа А/Н1N1, А/Н1N1/dm2009, А/Н3N2 и А/Н5N1. Более того, была обнаружена высокая степень активности и против вирусов герпеса [3] и гепатита С [4].

Такая «неразборчивость» водных экстрактов *I. obliquus*

в отношении вирусов с различной структурной организацией может указывать на неселективный характер взаимодействия с вирусом или, возможно, с клеточной мембраной. Взаимодействие экстрактов *I. obliquus* с клеткой может приводить к цитопротекторному действию.

Было интересно выяснить, насколько эффективны водные экстракты *I. obliquus* из поверхностного слоя гриба в отношении процессов ингибирования репликации вируса иммунодефицита человека (ВИЧ). Параллельно с нашими исследованиями в НПО «ВЕКТОР» было проведено обстоятельное изучение ряда базидиальных грибов, в том числе *I. obliquus*, и была показана активность против ряда вирусов [5]. Нас же интересовали фракции из минимально тонкого поверхностного слоя гриба. Мы исходили из следующей предпосылки. Известно, что *I. obliquus* как гриб-паразит живет 15–20 лет в экологической системе леса, которая включает растительные вирусы, споры, различные другие микроорганизмы и токсины, и, следовательно, поверхностный слой тела гриба *I. obliquus* может иметь специфическую и неспецифическую защиту от них. Поэтому если и есть в *I. obliquus* вещества, защищающие этот гриб, они должны находиться в его тонком поверхностном слое, соприкасающемся с окружающей его средой. Более того, поверхностный слой тела гриба в перспективе представлял особый интерес для хроматографического исследования химического состава.

Поиск новых антиретровирусных средств сегодня очень актуален. Быстро возникающая резистентность

вируса к применяемым препаратам, а также их высокая токсичность требуют постоянного расширения лекарственного арсенала [6, 7]. Поэтому исследование антиретровирусных возможностей водных фракций *I. obliquus* нам представлялось перспективным направлением поиска.

Целью настоящей работы было изучение активности экстрактов березового гриба *I. obliquus* в отношении ВИЧ типа I (ВИЧ-1).

Материалы и методы

Клетки. В работе были использованы переливаемые лимфобластоидные клетки человека МТ-4, полученные из коллекции культур клеток человека ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава России. Клетки культивировали в среде RPMI 1640 (производства ФГБУ «НИИ полиомиелита и вирусных энцефалитов» РАМН) с 10% сыворотки эмбрионов коров (производства ФГБУ «НИИ полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П.Чумакова» РАМН), 5 мМ L-глутамин, 100 мкг/мл гентамицина в виде суспензии в атмосфере, содержащей 5% CO₂, при 37°C и 98% влажности.

Вирусы. В качестве источника вируса использовали штамм ВИЧ-1_{899А} из коллекции штаммов ВИЧ ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского».

Препараты. В качестве антиретровирусного референс-препарата использовали препарат ретровир (азидотимидин) производства «GlaxoSmithKline» (Великобритания).

Получение фракций гриба. Для получения фракции, наиболее богатой полифенилкарбонными кислотами, с гриба был снят тонкий слой поверхности (1–2 мм), после чего материал механически измельчали. В 100 мл воды экстрагировали 3 г полученного порошка при перемешивании быстросходной мешалкой в течение 2 сут при 20°C. Затем раствор центрифугировали при 5000 об/мин в течение 1 ч, фильтровали через фильтр (Filtrak № 91, Германия) для отделения очень мелких дисперсных частиц. Воду упаривали в вакууме при температуре не выше 45°C и получали фракцию I. Аналогичным способом была проведена экстракция 70% спиртом (фракция II). Эти две фракции оказались очень близкими по времени удержания на биогеде Р-2 и положению пятен веществ в условиях тонкослойной хроматографии.

Для сравнения были получены водный экстракт *I. obliquus*, включающий значительное количество деструктивной целлюлозы и лигнина (фракция III), а также образец, полученный экстракцией 12% аммиаком (фракция IV).

Структура исследования. Оценку цитотоксического действия препаратов проводили на модели лимфобластоидных клеток в пластиковой 96-луночной панели («Costar», США). К клеткам добавляли исследуемый препарат в различных концентрациях. Клетки инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ при 98% влажности 6 дней до момента учета результатов с помощью метилтетразолиевого теста (МТТ). Токсичность различных концентраций препарата выражали в процентном отношении к принятому за 100% контролю интактных клеток.

Противовирусную активность препаратов в отношении ВИЧ оценивали на модели лимфобластоидных клеток в пластиковой 96-луночной панели. К клеткам

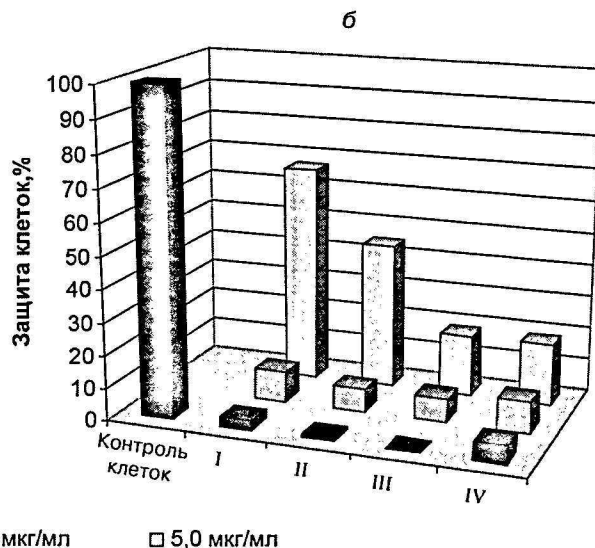
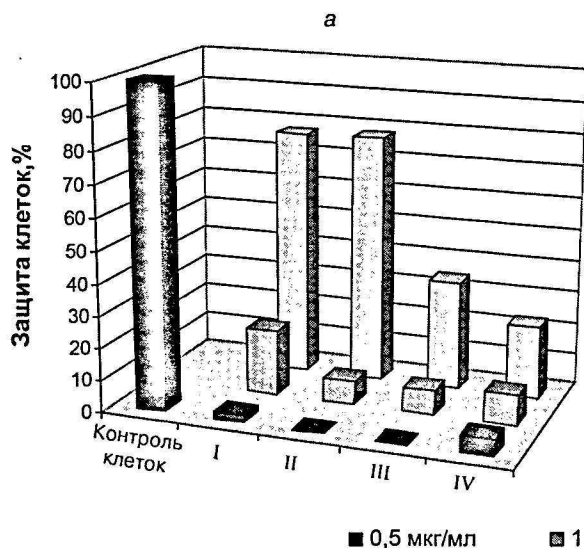
Исследование цитотоксического и противовирусного действия экстрактов *I. obliquus* в отношении ВИЧ-1 на модели клеток

Условия опыта	Множественность инфекции, ТЦИД ₅₀ /кл.	Концентрация, мкг/мл	Без вируса (токсичность)	ВИЧ-инфекция		
			жизнеспособность клеток, %*	цитопатический эффект вируса**	Защита клеток, %***	
Фракция I	0,01	0,5	100,0	+++	2,0	
		1,0	98,9	+++	20,5	
		5,0	95,0	+ -	77,3	
		0,1	0,5	99,1	++++	3,0
		1,0	99,7	+++	9,5	
Фракция II	0,01	5,0	96,9	+	66,9	
		0,5	94,3	++++	0	
		1,0	98,9	+++	7,5	
		5,0	94,1	-	77,9	
		0,1	0,5	94,8	++++	1,0
Фракция III	0,01	1,0	97,2	++++	7,0	
		5,0	95,4	++	44,9	
		0,5	100,0	++++	0,0	
		1,0	99,2	++++	7,7	
		5,0	98,7	++	34,2	
Фракция IV	0,01	0,1	94,9	++++	0,0	
		1,0	92,7	+++	7,2	
		5,0	96,3	+++	18,8	
		0,5	95,4	++++	5,0	
		1,0	93,2	++++	9,6	
Ретровир	0,01	5,0	96,4	+++	22,7	
		0,1	95,4	++++	5,7	
		1,0	94,6	++++	9,5	
		5,0	95,5	+++	18,8	
		0,003	100,0	++	57,0	
Контроль клеток	-	0,03	99,5	-	93,0	
		0,3	98,0	-	100,0	
		0,1	100,0	+++	38,0	
		0,03	100,0	++	82,0	
		0,3	98,0	-	100,0	
Контроль вируса	0,01	-	-	++++	-	
		0,1	-	-	++++	-

Примечание. * – жизнеспособность клеток по отношению к интактному контролю клеток; ** – цитопатический эффект вируса (6-е сутки); *** – по данным МТТ.

добавляли исследуемые образцы экстрактов и инфицировали вирусом в дозе 0,01 или 0,1 ТЦИД₅₀/кл. Культуры клеток инкубировали при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ при 98% влажности 6 дней. Исследование репродукции ВИЧ проводили путем оценки вирусиндуцированного цитопатического действия в культурах клеток. Степень деструкции оценивали под световым микроскопом по общепринятой четырехкрестовой системе соответственно количеству погибших клеток в каждой из трех лунок.

Учет результатов проводили посредством окрашивания клеток с использованием тетразолиевого красителя



Исследование противовирусного действия экстрактов *I. obliquus* в отношении ВИЧ-1 на модели клеток при вирусной нагрузке 0,01 (а) и 0,1 ТЦИД₅₀/кл. (б).

Римскими цифрами обозначены фракции.

(МТТ) со спектрофотометрией при длине волны 630 нм. Степень защиты клеток от цитодеструктивного действия вируса определяли по формуле, описанной ранее [8].

Результаты и обсуждение

Для исследования цитотоксического действия полученных фракций их добавляли в культуральную среду неинфицированных клеток в концентрации 0,5, 1,0, 4, 5,0 мг/мл. Обнаружено, что в этих дозах экстракты не оказывали цитотоксического действия на клетки культуры МТ-4 (см. таблицу). Исследование противовирусной активности полученных фракций (см. таблицу) показало, что все они обладали противовирусной активностью в отношении ВИЧ-1. Наибольшая активность отмечена у фракций I и II в концентрации 5 мг/мл (77,3 и 77,9% защиты клеток соответственно). Увеличение вирусной нагрузки в 10 раз несколько снижало этот эффект (см. рисунок, а, б). При этом для фракции II увеличение концентрации вируса было более чувствительным, чем для фракции I (66,9 и 44,9% соответственно). Фракции III и IV давали значительно меньший противовирусный эффект. Низкую активность фракции III можно объяснить тем, что для экстракта была использована деструктивная целлюлоза из центрального тела гриба. Вероятно, в глубине тела гриба концентрация противовирусных веществ значительно ниже, чем на поверхности. В случае фракции IV недостаток противовирусной активности, видимо, связан со слабыми экстрагируемыми свойствами аммиачного раствора, который недостаточно полно извлекает противовирусную субстанцию из поверхности гриба. Следует отметить, что противовирусные свойства препаратов *I. obliquus* оказывали ярко выраженное цитостатическое (антипролиферативное) действие на клетки. Возможно, данное обстоятельство связано с интенсивностью вирусной репродукции в этих клетках и отчасти объясняет неспецифическое антивирусное действие экстрактов гриба. В качестве референс-препарата был использован азидотимидин в составе коммерческого препарата ретровир. Таким образом, вещества, полученные из фракций I–IV из *I. obliquus* обладали противовирусной активностью в отношении ВИЧ-1 *in vitro* и

были нетоксичны для клеток. Данные экстракты березового гриба могут быть применены для создания новых противовирусных препаратов, ингибиторов репликации ВИЧ-1 при использовании как в виде индивидуального лекарственного средства, так и в составе высокоактивной антиретровирусной терапии, применяемой сейчас для лечения ВИЧ-инфицированных больных.

ЛИТЕРАТУРА

- Горленко М.В., Соколов Д.В. ред. Грибы. В кн.: Федоров А.А., ред. *Жизнь растений*. М.: Просвещение; 1976; т. 2: 235–47.
- Shashkina M.Ya., Shashkin P.N., Sergeev A.V. et al. Chemical and medicobiological properties of chaga. *Pharm. Chem. J.* 2006; 40(10): 560–568.
- Носик Н.Н., Полковников М.В., Кондрашина Н.Г. Гагаев Т.М., Финогенова М.П., Шибнев В.А. Противогерпетические свойства экстрактов Чаги (*Inonotus obliquus*). В кн.: *Материалы Ежегодного Всероссийского конгресса по инфекционным болезням*. Москва; 2013; 11: 289.
- Шибнев В.А., Мишин Д.В., Гагаев Т.М. и др. Противовирусная активность экстрактов гриба *Inonotus Obliquus* в отношении инфекции, вызванной вирусом гепатита С в культурах клеток. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2011; 151(5): 547–51.
- Гашникова Н.М., Теплякова Т.В., Проняева Т.Р., Пучкова Л.И., Косогова Т.А., Сергеев А.Н. Результаты исследований по выявлению анти-ВИЧ активности экстрактов из высших базидиальных грибов. *Иммунопатология, аллергология, инфектология*. 2009; 2: 170–1.
- Галегов Г.А. Синтетические ингибиторы протеазы ВИЧ и новые возможности лекарственной терапии ВИЧ-инфекции и СПИДа. *Вопросы вирусологии*. 1997; 6: 284–6.
- Носик Д.Н., Носик Н.Н. *ВИЧ-инфекция: профессиональный риск и экстренная профилактика*. М.: НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН; 2004.
- Носик Д.Н., Лялина И.К., Калинин Л.Б., Лобач О.А., Чатаева М.С., Роснецов Л.В. Антиретровирусный препарат фуллевир. *Вопросы вирусологии*. 2009; 54(5): 41–3.

REFERENCES

- Gorlenko M.V., Sokolov D.V., eds. Mushrooms. In: *Fedorov A.A., ed. Plant Life [Zhizn' Rasteniy]*. Moscow: Prosveshchenie; 1976; Vol. 2: 235–47. (in Russian)
- Shashkina M.Ya., Shashkin P.N., Sergeev A.V. et al. Chemical and medicobiological properties of chaga. *Pharm. Chem. J.* 2006; 40(10): 560–8.

3. Nosik N.N., Polkovnikova M.V., Kondrashina N.G. Garaev T.V., Finogenova V.P., Shibaev V.A. Antihyperthetical properties of extracts Chaga (Inonotus Obliquus). In: *Materials of V Annual All-Russian Congress on Infectious Diseases [Ezhegodnyy Vserossiyskiy kongress po infektsionnym boleznyam]*. Moscow; 2013; 11: 289. (in Russian)
4. Shibnev V.A., Mishin D.V., Garaev T.M., Finigenova N.P., Botikov A.G., Deryabin P.G. Antiviral activity of extracts of the fungus Inonotus Obliquus against infection by the hepatitis C virus in cell cultures. *Byulleten' Eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2011; 151 (5): 549–51. (in Russian)
5. Gashnikova N.M., Teplyakova T.V., Pronyaeva T.R., Puchkova L.I., Kosogova T.A., Sergeev A.N. The results of research to identify the anti-HIV activity of extracts from higher basidiomycetes. *Immunopatologiya, Allergologiya, Infektologiya*. 2009; 2: 170–1. (in Russian)
6. Galegov G.A. Synthetic HIV protease inhibitors and new opportunities of drug therapy of HIV infection and AIDS. *Voprosy virusologii*. 1997; 6: 284–6. (in Russian)
7. Nosik D.N., Nosik N.N. HIV-infection: An Occupational Hazard Prevention and Emergency [VICh-infekciya: professional'nyy risk i Ekstrennaya Profilaktika]. Moscow; NTSSSK im. A.N. Bakuleva RAMN; 2004. (in Russian)
8. Nosik D.N., Lyalina I.K., Kalnina L.B., Lobach O.A., Chataeva M.S., Rasnetsov L.D. Antiretroviral drug fulevir. *Voprosy virusologii*. 2009; 54(5): 41–3. (in Russian)

Поступила 21.11.13

Received 21.11.13

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 616.98:578.891]-092.12-078

Михайлов М.И.¹, Мамедов М.К.², Дадашева А.Э.³

Вирусологические показатели повышенной эпидемической опасности у лиц с высоким риском парентерального инфицирования вирусом гепатита С

¹ФГБУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова» РАН, 142782, г. Москва; ²Национальный центр онкологии Минздрава Азербайджанской Республики, AZ1012, г. Баку; ³Республиканский центр по борьбе со СПИД Минздрава Азербайджанской Республики, AZ1022, г. Баку

Авторы определили присутствие РНК вируса гепатита С (ВГС) и ее концентрацию в содержащих антитела к ВГС сыворотках крови, полученных у лиц из пяти различных групп с высоким риском парентерального инфицирования (ГВРПИ) и группы клинически здоровых лиц, инфицированных ВГС.

Доля реконвалесцентов после острого гепатита С, сохраняющих антитела к ВГС, среди лиц из ГВРПИ оказалась меньше, чем среди инфицированных клинически здоровых лиц. Кроме того, средняя доля сывороток с более высокой вирусной нагрузкой, полученных у лиц из ГВРПИ, оказалась почти в 2 раза больше доли таких сывороток, полученных у инфицированных клинически здоровых лиц.

Ключевые слова: вирус гепатита С; группы с высоким риском парентерального инфицирования.

Для цитирования: *Вопросы вирусологии*. 2015; 60(2): 38–40.

Mikhaylov M.I.¹, Mamedov M.K.², Dadasheva A.E.³

Viral indicators of the increased epidemiological hazard of subjects from high risk groups of hepatitis C virus parenteral infection

¹Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis, 142782, Moscow, Russia; ²National Center of Oncology, Ministry of Healthcare of the Azerbaijan Republic, AZ1012, Baku, Azerbaijan Republic; ³Republican Center of the Struggle Against AIDS, Ministry of Healthcare of the Azerbaijan Republic, AZ1022, Baku, Azerbaijan Republic

The author detected RNA of the hepatitis C virus (HCV) and estimated its concentration in sera of subjects from groups with high risk of parenteral infection (GHRPI) and clinically healthy subjects infected with the hepatitis C virus (HCV). The results show that the share of the acute hepatitis C reconvalescents with antibodies to HCV among people from GHRPI appeared to be smaller than among infected healthy subjects. The average fraction of sera with high virus load from subjects in GHRPI was nearly two times higher than the fraction number of such sera received from infected clinically healthy subjects.

Key words: hepatitis C virus; groups with high risk of parenteral infection.

Citation: *Voprosy virusologii*. 2015; 60 (2): 38–40. (In Russ.)

For correspondence: Mikhail Mikhaylov, MD, PhD, DSc, Prof., corresponding member of RAS; e-mail: michmich2@yandex.ru

Введение

Инфекция, вызванная вирусом гепатита С (ГС), в эпидемиологическом отношении причисляется к строгим антропонозам, а сам вирус ГС (ВГС) сохраняется в природе лишь за счет его непрерывной циркуляции среди людей, которая на современном этапе развития общества и медицины осуществляется в основном

посредством парентерального (гемоконтактного) механизма инфицирования [1, 2]. Именно поэтому особое значение в поддержании вызванного ВГС эпидемического процесса сегодня придают достаточно многочисленным группам с высоким риском парентерального инфицирования (ГВРПИ) ВГС (лица с ВИЧ-инфекцией, больные туберкулезом легких (ТБЛ), гемобластоза-

Для корреспонденции: Михайлов Михаил Иванович, д-р мед. наук проф., член-корр. РАН, акад. РАЕН; e-mail: michmich2@yandex.ru

Таблица 1

Частота выявления РНК ВГС в сыворотках крови лиц из разных ГВРПИ и клинически здоровых взрослых жителей Баку, содержащих антитела к ВГС (anti-HCV)

Пациенты	Количество сывороток	
	с anti-HCV	с РНК ВГС*
ВИЧ-инфекция	647	642 (99,2)
ТБЛ	73	69 (94,5)
ГБ	87	84 (96,6)
ХПН	84	75 (89,3)
Потребители инъекционных наркотиков	213	206 (96,7)
Всего..	1104	1076 (97,5)
Клинически здоровые лица	61	47 (77,0)

Примечание. * – процент высчитан от количества сывороток, в которых выявили anti-HCV. Здесь и в табл. 2: в скобках указан процент.

В зависимости от уровня РНК ВГС все исследованные сыворотки разделили на две группы: сыворотки с относительно более высокой вирусной нагрузкой, содержащие вирусную РНК в концентрации 500 000 копий в 1 мл и выше, и сыворотки с относительно более низкой вирусной нагрузкой, в которых РНК ВГС содержалась в концентрации до 500 000 копий в 1 мл. В каждой из ГВРПИ и группе серопозитивных клинически здоровых лиц определили соотношение количества сывороток с высокой и низкой вирусной нагрузкой.

Результаты статистически обрабатывали непараметрическим методом, используя критерий χ^2 для таблиц сопряженности 2×2 , при помощи компьютерной программы Statistica 6.0.

Результаты и обсуждение

Результаты исследования содержащих anti-HCV сывороток лиц из разных ГВРПИ и клинически здоровых, инфицированных ВГС лиц, жителей Баку, проведенного с целью выявления РНК ВГС, сведены в табл. 1.

Судя по показателям, представленным в табл. 1, РНК ВГС выявили не во всех сыворотках, содержащих anti-HCV, среди исследованных сывороток присутствовали сыворотки, не содержащие вирусную РНК. Мы полагаем, что эти сыворотки принадлежали реконвалесцентам ОГС.

Отметим, что процентная доля таких реконвалесцентов, которым принадлежали эти сыворотки, среди инфицированных ВГС клинически здоровых лиц значительно превышала аналогичный показатель среди лиц из ГВРПИ.

В частности, в серопозитивных сыворотках, полученных у клинически здоровых лиц, вирусную РНК не обнаружили в $23,0 \pm 5,4\%$, что хорошо согласовывалось с данными о средней частоте спонтанного выздоровления больных ОГС [8]. В то же время в серопозитивных сыворотках, полученных у лиц из ГВРПИ, вирусная РНК отсутствовала в среднем в $2,5 \pm 0,4\%$.

Иначе говоря, приведенные выше показатели указывали на то, что доля реконвалесцентов ОГС среди инфицированных ВГС клинически здоровых лиц почти в 10 раз превышала долю таких реконвалесцентов среди лиц из ГВРПИ, причем различие между этими показателями сохраняло статистически устойчивый характер в интервале $p < 0,001$.

Это означало, что ВГС-инфекция у лиц из ГВРПИ характеризовалась более низкой частотой спонтанного выздоровления этих лиц и, соответственно, более высокой частотой хронизации острой инфекции.

Трактуя причины этой особенности инфекции у лиц

ми (ГБ), с хронической почечной недостаточностью (ХПН), находящиеся на гемодиализе, потребители инъекционных наркотиков). Лица из этих групп, будучи инфицированы ВГС, в совокупности формируют своеобразные коллективные резервуары длительного сохранения ВГС, из которых последний регулярно проникает в общую популяцию населения, поддерживая эпидемические процессы в обществе на уровне, характерном для начала XXI века [3, 4].

Степень эпидемической опасности ГВРПИ для общей популяции населения можно оценить, исходя из двух показателей. Первый из них отражает общую численность лиц, относящихся к оцениваемой ГВРПИ в составе конкретной популяции населения. Второй показатель – степень инфицированности этой ГВРПИ выражается как частота выявления антител к ВГС (anti-HCV) среди лиц, принадлежащих к каждой из этих групп [5].

Однако показатель серопозитивности отдельно взятой группы лиц, будучи интегративным показателем степени ее инфицированности, отражает долю в ней не только лиц с репродуктивной инфекцией, способных играть роль источников инфекции, но и лиц, ранее перенесших острый ГС (ОГС), к моменту исследования выздоровевших, соответственно, «освободившихся» от ВГС и уже не представляющих опасности для окружающих. Между тем доля таких лиц, являющихся реконвалесцентами ОГС и имеющих в крови лишь anti-HCV, согласно результатам наблюдений, проведенных в разных странах мира, может составлять от 20 до 30% [2].

Учитывая, что эти показатели являются усредненными, пока неясно, насколько объективно они отражают соотношение между относящимися к ГВРПИ лицами с текущей инфекцией и лицами, перенесшими эту инфекцию в прошлом и оставшимися серопозитивными, тем более что течение ВГС-инфекции у этих лиц отличается определенными клинико-патогенетическими особенностями [6].

Последнее обстоятельство побудило нас поставить перед собой следующую цель – оценить в пределах нескольких ГВРПИ среднее соотношение лиц с репродуктивной ВГС-инфекцией и серопозитивных лиц, не имеющих в крови ВГС, поэтому не играющих какой-либо роли в распространении вируса.

Материалы и методы

В исследование были вовлечены лица из пяти различных ГВРПИ, живущие в Баку, в том числе 1320 с субклинической ВИЧ-инфекцией, 600 с ТБЛ, 440 с ГБ, 434 находящаяся на гемодиализе с ХПН, 425 потребителей инъекционных наркотиков, а также 1541 клинически здоровых лиц из числа взрослых жителей Баку. Все эти лица серологически обследованы на наличие у них в крови anti-HCV [7].

Сыворотки этих лиц, в которых обнаружены anti-HCV, исследовали с помощью полимеразной цепной реакции на основе коммерческих наборов «АмплиСенс® HCV-FL», предназначенных для выявления РНК ВГС. На основе полученных результатов определили частоту выявления РНК ВГС в серопозитивных сыворотках лиц из ГВРПИ и серопозитивных клинически здоровых лиц.

Далее с помощью таблицы случайных чисел отобрали часть сывороток лиц из ГВРПИ, в которых выявили вирусную РНК. Эти сыворотки, как и все сыворотки, полученные у серопозитивных клинически здоровых лиц и содержащие РНК ВГС, повторно исследовали для определения в них концентрации РНК ВГС. Это исследование провели с помощью коммерческих наборов «АмплиСенс® HCV-Монитор-FL», предназначенных для определения вирусной нагрузки в крови.

Таблица 2

Соотношение количества содержащих РНК ВГС сывороток с высокой и низкой вирусной нагрузкой, полученных у лиц из разных ГВРПИ и клинически здоровых лиц

Пациенты	Количество сывороток, содержащих РНК ВГС		
	всего	с высокой вирусной нагрузкой	с низкой вирусной нагрузкой
ВИЧ-инфекция	20	18 (90,0)	2 (10,0)
ТБЛ	20	14 (70,0)	6 (30,0)
ГБ	20	15 (75,0)	5 (25,0)
ХПН	20	11 (55,0)	9 (45,0)
Потребители инъекционных наркотиков	20	15 (75,0)	5 (25,0)
Всего...	100	73 (73,0)	27 (27,0)
Клинически здоровые лица	61	23 (37,7)	38 (62,3)

из ГВРПИ, мы полагали, что в ее основе скорее всего лежала свойственная представителям большинства ГВРПИ иммунокомпрометация, которая препятствует формированию полноценного иммунного ответа, способного обеспечивать освобождение организма от вируса и тем самым предотвращать хронизацию острой ВГС-инфекции [9].

Результаты определения соотношения между количеством сывороток с высокой и низкой вирусной нагрузкой среди сывороток, полученных у лиц из разных ГВРПИ и у инфицированных клинически здоровых лиц, отражены в табл. 2.

Судя по показателям, представленным в табл. 2, высокая нагрузка чаще всего имела место в сыворотках ВИЧ-инфицированных лиц, а наиболее редко – в сыворотках больных ХПН, находившихся на гемодиализе.

Вместе с тем в среднем процентная доля полученных у лиц из ГВРПИ сывороток с высокой вирусной нагрузкой оказалась почти в 2 раза выше процентной доли сывороток с высокой вирусной нагрузкой, полученных у инфицированных ВГС клинически здоровых лиц, причем разница между этими показателями носила статистически устойчивый характер в интервале $p < 0,01$. Последнее позволило полагать, что ВГС-инфекция у лиц из ГВРПИ чаще, чем у других категорий инфицированных лиц, протекала с высокой вирусной нагрузкой.

Таким образом, результаты, полученные в проведенном нами исследовании, позволили полагать, что отличительными особенностями, характеризующими процесс естественной эволюции ВГС-инфекции у лиц из ГВРПИ являются, с одной стороны, более низкая частота спонтанного выздоровления и, соответственно, более высокая частота хронизации острой инфекции, с другой – относительно более высокая вирусная нагрузка.

В заключение надо отметить, что эти особенности, дополняющие патогенетические характеристики ВГС-инфекции у лиц из ГВРПИ, одновременно демонстрируют более высокую степень эпидемической опасности этих лиц, поскольку лица с хронической инфекцией дольше остаются источниками инфекции, а на-

личие у них более высокой вирусной нагрузки повышает их потенциал в качестве распространения инфекции в своем близком окружении.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шахгильдян И.В., Михайлов М.И., Онищенко Г.Г. *Парентеральные вирусные гепатиты*. М.: ГОУ ВУНМЦ МЗ Российской Федерации; 2003.
2. Karayiannis P., Main J., Thomas H., eds. *Hepatitis C virus*. London: International medical press; 2009.
3. Дадашева А.Э., Мамедов М.К., Михайлов М.И. О двух типах групп с высоким риском инфицирования вирусами гепатитов В и С: эпидемиологическое и клиническое значение. *В мире вирусных гепатитов*. 2011; 1: 12–4.
4. Рагимов А.А. *Трансфузиология: Национальное руководство*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2012.
5. Дадашева А.Э., Мамедов М.К. Оценка потенциальной эпидемиологической опасности различных групп с высоким риском инфицирования вирусами гепатитов В и С. *Биомедицина*. 2011; 4: 3–11.
6. Мамедов М.К., Дадашева А.Э., Михайлов М.И. Патогенетическая характеристика гепатитов В и С у лиц из групп с высоким риском парентерального инфицирования. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2012; 1: 55–8.
7. Мамедов М.К., Дадашева А.Э., Михайлов М.И. Субклинические инфекции, вызванные вирусами гепатитов В и С среди лиц из разных групп с высоким риском парентерального инфицирования этими вирусами. *Вестник службы крови России*. 2011; 4: 34–6.
8. Юшук Н.Д., Климова Е.А. Гепатит С. В кн.: Юшук Н.Д., Венгерова Ю.Я., ред. *Инфекционные болезни: Национальное руководство*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2009: 650–64.
9. Михайлов М.И., Дадашева А.Э., Мамедов М.К. Иммунокомпрометация лиц из групп с высоким риском парентерального инфицирования вирусами гепатитов В и С: причины и патогенетическое значение. *Журнал инфектологии*. 2012; 1: 19–22.

REFERENCES

1. Shakhgildyan I.V., Mikhaylov M.I., Onishenko G.G. *Parenteral Viral Hepatitis [Parentepal'nye virusnye gepatity]*. Moscow: GOU VUNMITS MZ Rossiyskoy Federatsii; 2003.
2. Karayiannis P., Main J., Thomas H., eds. *Hepatitis C virus*. London: International medical press; 2009.
3. Dadasheva A.E., Mamedov M.K., Mikhaylov M.I. About two types of groups with high risk of infection with hepatitis B and C viruses: epidemiological and clinical value. *V Mire Virusnykh Gepatitov*. 2011; 1: 12–4. (in Russian)
4. Ragimov A.A. *Transfusion: National Manual [Transfuziologiya: Nacional'noe rukovodstvo]*. M.: GEOTAR-Media; 2012.
5. Dadasheva A.E., Mamedov M.K. Assessment of potential epidemiological hazard of various groups with high risk of infection with hepatitis B and C viruses. *Biomeditsina*. 2011; 4: 3–11.
6. Mamedov M.K., Dadasheva A.E., Mikhaylov M.I. Pathogenetic characteristic of hepatitis B and C at persons from groups with high risk of parenteral infection. *Epidemiologiya i Vaktsinoprofilaktika*. 2012; 1: 55–8. (in Russian)
7. Mamedov M.K., Dadasheva A.E., Mikhaylov M.I. Subclinical infections caused by hepatitis B and C viruses among persons from different groups with high risk of parenteral infection with these viruses. *Vestnik Sluzhby Krovi Rossii*. 2011; 4: 34–6. (in Russian)
8. Yushchuk N.D., Klimova E.A. Hepatitis C. In: Yushchuk N.D., Vengerov Yu.Ya., eds. *Infectious Diseases: National Manual [Infektsionnye bolezni: Natsionalnoe rukovodstvo]*. M.: GEOTAR-Media; 2009: 650–64. (in Russian)
9. Mikhaylov M.I., Dadasheva A.E., Mamedov M.K. Immunocompro-metation of persons from groups with high risk of parenteral infection with hepatitis B and C viruses: reasons and pathogenetic significance. *Zhurnal infektologii*. 2012; 1: 19–22.

Поступила 06.12.13

Received 06.12.13

Закутский Н.И., Балышева В.И., Хухорова И.Ю., Юрков С.Г.

Инфекционные и иммуногенные свойства вируса лихорадки долины Рифт в зависимости от уровня пассажей и условий хранения

ГНУ ВНИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии, 601120, г. Покров

Статья посвящена изучению влияния некоторых факторов на иммунобиологические свойства, в частности пассирования в суспензии перевиваемых клеток ВНК-21/13 и хранения при различных температурах, штамм 1974-ВНИИВВиМ вируса лихорадки долины Рифт (ЛДР). Определены границы уровня пассажей и оптимальные условия хранения, максимально обеспечивающие инфекционную, иммуногенную активность и протективность аттенуированного штамма 1974-ВНИИВВиМ вируса ЛДР. Установлено, что выращивание вируса ЛДР в суспензии клеток ВНК-21/13 в течение 20 последовательных пассажей и хранение при -50°C в течение 1–2 лет не снижало его инфекционных, иммуногенных и протективных свойств. Показано также, что этот вирус без снижения инфекционной и иммуногенной активности можно хранить при следующих температурных режимах: $4\text{--}6^{\circ}\text{C}$ – 1 мес., $-10\text{--}12^{\circ}\text{C}$ – 4 мес., -20°C – 6 мес., -50°C – до 2 лет.

Ключевые слова: лихорадка долины Рифт; вирус; уровень пассажей; температура хранения; инфекционность; иммуногенность; протективность.

Для цитирования: Вопросы вирусологии. 2015;60(2): 41–43.

Zakutskiy N.I., Balysheva V.I., Khukhorova I.Ju., Yurkov S.G.

Infectious, immunogenic, and protective characteristics of the Rift Valley fever virus depending on the passage level and storage conditions

The report discusses the research into the impact of some factors, especially the passage in a suspension of continuous cells ВНК-21/13 and storage at different temperatures, upon immunobiological characteristics of the Rift Valley fever (RVF) virus strain 1974-VNIIVViM. The limits for the passage levels and optimal storage conditions providing maximal infectious and immunogenic activity, as well as protection of the attenuated RVF strain 1974-VNIIVViM, were determined. It was found that the RVF virus growth in ВНК-21/23 cell suspension in the course of 20 consecutive passages and storage at -50°C for 1 to 2 years did not reduce any infectious, immunogenic or protective characteristics of the virus. It was also shown that the RVF virus strain 1974-VNIIVViM could be stored at the following temperature ranges: 1 month at 4 to 6°C , 4 months at -10 to -12°C , 6 months at -20°C , and up to 2 years at -50°C .

Key words: Rift Valley fever (RVF); virus; passage level; storage temperature; infectivity; immunogenicity; protection.

Citation: *Voprosy virusologii*. 2015; 60(2): 41–43. (In Russ.)

For correspondence: Nikolay Zakutsky, Doctor of Veterinary Sciences; e-mail: zaknikiv43@yandex.ru

Введение

Изучение иммунобиологических свойств вирусов в зависимости от уровня пассажей в культуре клеток в процессе культивирования и условий хранения имеет существенное значение при разработке вакцинных препаратов. Это обусловлено тем, что при длительном пассировании вируса, особенно в гетерологичной культуре клеток, происходят изменения его иммунобиологических свойств [1–6]. Например, у морских свинок, с одной и той же дозой вакцины против ящура, изготовленной из вируса разных пассажей, отмечали неодинаковый уровень иммуногенности препаратов. Значительное увеличение числа пассажей вируса приводило к снижению иммуногенной активности вакцины [3]. Результаты изучения в процессе пассирования инфекционной активности вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота (ИРТ КРС) показали, что он не изменял своих культуральных свойств в течение 20 последовательных пассажей в культуре клеток MDBK (инфекционная активность была в пределах $7,5\text{--}8,0 \text{ lg TЦД}_{50}/\text{см}^3$), тогда как на уровне 30-го пассажа в этой культуре клеток титр его не превышал $7,0 \text{ lg TЦД}_{50}/\text{см}^3$. Аналогичные данные получены при изучении иммуногенности вируса в зависимости от уровня пассажей [2].

При производстве вакцинных и диагностических препаратов приготовленные матричные и производственные раскладки вируса хранят при определенных температурных режимах, предварительно изучив условия, обеспечивающие стабильность его свойств. Большинство вирусов длительно хранятся в нативном виде при низких температурах не выше -40°C . При разработке промышленной технологии выращивания вирусов в клеточных культурах с целью изготовления вакцинных препаратов необходимым условием является изучение допустимого предела их пассажей и оптимального режима хранения для обеспечения стабильности иммунобиологических свойств [1, 2, 5].

В связи с тем, что в доступной литературе отсутствуют данные относительно вируса лихорадки долины Рифт (ЛДР) в этом аспекте целью настоящей работы было изучение влияния уровня пассажей в культуре клеток ВНК-21/13 и условий хранения вакцинного штамма 1974-ВНИИВВиМ вируса ЛДР на его инфекционную, иммуногенную активность и протективность.

Материалы и методы

В опытах использовали аттенуированный штамм 1974-ВНИИВВиМ вируса ЛДР, прошедший 3 и 10 пассажей в культуре клеток ВНК-21/13 (титр $6,5$ и $7,5 \text{ lg TЦД}_{50}/\text{см}^3$),

эпизоотический штамм Энтеббе вируса ЛДР ($5,5 \lg \text{micLD}_{50}/\text{cm}^3$), суспензионную сублинию клеток почки новорожденного сирийского хомячка (ВНК-21/13) на уровне не более 30 пассажей, питательную среду Игла MEM в модификации для суспензионного культивирования, содержащую двойной набор аминокислот и витаминов группы В с 10 % сыворотки крови КРС, раствор глютамина, антибиотики (пенициллин, стрептомицин, канамицин) в рекомендуемых дозах.

Клетки и вирус культивировали суспензионным методом с использованием роллерной установки и био-реакторов (ферментеров) вместимостью 20 литров. Выращивание вируса в суспензии клеток ВНК-21/13 на роллерной установке осуществляли по разработанной методике в течение 20 последовательных пассажей с отбором проб на уровне 5, 10, 15 и 20-го пассажей для определения инфекционной, иммуногенной и протективной активности.

Вирус ЛДР, выращенный в течение 10 пассажей в культуре клеток ВНК-21/13 в ферментерах, с инфекционной активностью $7,5 \lg \text{TЦД}_{50}/\text{cm}^3$ хранили при разных температурных режимах.

Инфекционность вируса определяли титрованием в культуре клеток ВНК-21/13. Поскольку существует корреляция при выявлении антител в реакции нейтрализации и при иммуноферментном анализе (ИФА), иммуногенную активность вируса оценивали по титру вирусспецифических антител в сыворотках крови мышей в ИФА (минимальный защитный уровень 1:125–1:625). Протективную активность вируса на разных уровнях пассажей и при температуре хранения 4–6 и -50°C определяли на взрослых белых мышах (10 особей) путем его введения внутримышечно по $0,2 \text{ cm}^3$ каждому животному. Контрольное заражение мышей проводили эпизоотическим штаммом Энтеббе внутримышечно в дозе $10\,000 \text{ LD}_{50}$ через 28 сут после прививки.

Результаты и обсуждение

При изучении влияния уровня пассажей на инфекционность, иммуногенность и протективность вирус ЛДР культивировали в клетках ВНК-21/13, которые поддерживали в суспензионной культуре отъемно-доливным способом. Исходная (посевная) концентрация клеток составляла $0,5 \cdot 10^6 \text{ кл}/\text{cm}^3$, жизнеспособность – 92–97%.

В процессе культивирования вируса величину pH в необходимом диапазоне поддерживали путем добавления бикарбоната натрия. Для оценки стабильности иммунобиологических свойств вируса через каждые 5 пассажей определяли инфекционную и иммуногенную активность вирусного материала. В результате установлено, что инфекционная активность вируса ЛДР, прошедшего 5, 10, 15 и 20 пассажей в перевиваемой культуре клеток ВНК-21/13, практически не изменялась ($7,0$ – $7,25 \lg \text{TЦД}_{50}/\text{cm}^3$). Более высокие титры вирусспецифических антител (1:3125–1:15625) регистрировали в сыворотках крови мышей, привитых вирусом 10–20 пассажей. При этом все исследованные образцы вирусосодержащего материала на уровне 5, 10, 15 и 20 пассажей обеспечивали защиту от вирулентного вируса не менее 85 % привитых мышей, в то время как все не привитые (контрольные) животные пали.

В ходе оценки влияния температурного режима на иммунобиологические свойства вируса ЛДР его выращивание осуществляли по разработанной технологии в суспензии клеток ВНК-21/13 в ферментерах вместимостью 20 л. Стабильность инфекционных и иммуногенных свойств вируса, полученного на уровне 10-го пассажа с активностью $7,5 \lg \text{TЦД}_{50}/\text{cm}^3$, изучали при разных температурах и сроках хранения. Для этого све-

жеприготовленный вирусосодержащий материал (инфекционная активность $7,5 \lg \text{TЦД}_{50}/\text{cm}^3$, иммуногенность по результатам ИФА – 1:15 625) разливали в пенициллиновые флаконы ($5,0 \text{ cm}^3$) и хранили при положительных (37 , 18 – 20 ; 4 – 6°C) и отрицательных (-10 – 12 , -20 , -50°C) температурах. В запланированные сроки определяли инфекционную активность хранившегося при различных температурных режимах вируса ЛДР и уровень иммуногенности в ИФА по титру вирусспецифических антител в сыворотке крови привитых этим вирусом мышей. В ряде случаев оценивали протективные свойства образцов испытуемого вируса, хранившегося при 4 – 6 и -50°C .

Исследования показали, что при 37°C инфекционная активность вируса через сутки снижалась на $0,5 \lg \text{TЦД}_{50}/\text{cm}^3$, на 3-и сутки – на $1,0 \lg \text{TЦД}_{50}/\text{cm}^3$, а через 7 сут – на $2,5 \lg \text{TЦД}_{50}/\text{cm}^3$. В то же время вирус сохранял исходную иммуногенную активность (1:15 625) в течение 3 сут, а начиная с 4-х суток эта величина снижалась до 1:3125 и находилась на этом уровне до 7-х суток.

В условиях комнатной температуры (18 – 20°C) через 1 мес инфекционная активность вируса снижалась на $0,6 \lg \text{TЦД}_{50}/\text{cm}^3$, после 2 мес хранения – на $1,5 \lg \text{TЦД}_{50}/\text{cm}^3$ от исходной величины. Титр специфических антител в ИФА был в пределах 1:125–1:625.

При 4 – 6°C хранения в течение 1 мес инфекционный титр данного возбудителя практически не изменялся и составлял $7,25 \lg \text{TЦД}_{50}/\text{cm}^3$ (титр специфических антител в ИФА – 1:15 625), через 3 мес – $6,85 \lg \text{TЦД}_{50}/\text{cm}^3$ (титр в ИФА – 1:3125), через 4 мес его активность не превышала $6,25 \lg \text{TЦД}_{50}/\text{cm}^3$ (титр в ИФА – 1:625–1:3125).

Температура -10 – 12°C практически не влияла на инфекционную и иммуногенную активность вируса в течение первых 2 мес ($7,50$ – $7,25 \lg \text{TЦД}_{50}/\text{cm}^3$ и 1:3125–1:15 625 в ИФА), тогда как дальнейшее хранение при этих условиях в течение 4 мес сопровождалось снижением титра вируса более чем на $1,0 \lg \text{TЦД}_{50}/\text{cm}^3$ (титр в ИФА – 1:625–1:3125).

Температура -20°C обеспечивала сохранность вируса без снижения инфекционной и иммуногенной активности в течение 6 мес. Титр вирусспецифических антител в сыворотках крови мышей, привитых образцами вакцины, изготовленной из этого материала, имел исходную величину.

При -50°C инфекционная активность вируса в течение 1 года оставалась без изменений, а через 2 года хранения его титр снижался не более чем на $0,7 \lg \text{TЦД}_{50}/\text{cm}^3$ при сохранении исходной иммуногенной активности. Проверка протективной активности образцов вирусной вакцины показала, что оба материала, хранившиеся в течение 1 и 2 лет, обеспечивали защиту 85–100% привитых мышей после введения вирулентного вируса.

Полученные результаты дают основание утверждать, что штамм «1974-ВНИИВВиМ» вируса ЛДР без снижения инфекционной и иммуногенной активности можно хранить при следующих температурных режимах: 4 – 6°C – 1 мес., -10 – 12°C – 4 мес., -20°C – 6 мес., -50°C – до 2 лет. В последнем случае вирус сохранял до 2 лет и протективные свойства.

Заключение

Изучены инфекционные, иммуногенные и протективные свойства аттенуированного штамма 1974-ВНИИВВиМ вируса ЛДР в зависимости от уровня пассажей в суспензионной культуре клеток ВНК-21/13 и условий хранения. Результаты свидетельствуют о том, что этот вирус, выращенный в суспензии клеток ВНК-21/13 в течение 20 пассажей, не изменял инфекционные, иммуногенные и протективные свойства. Установлено, что вирус ЛДР при 4 – 6 и -10 – 12°C сохранял инфекци-

онную активность в течение 2 мес, а иммуногенную – в течение 4 мес. Температура -20°C обеспечивала сохранность вируса без снижения инфекционной и иммуногенной активности в течение 6 мес. Вирус, хранившийся при -50°C в течение 1 и 2 лет, не изменял инфекционных, иммуногенных и протективных свойств.

Полученные данные могут быть использованы при разработке вакцинных и диагностических препаратов из штамма 1974-ВНИИВВиМ вируса ЛДР, а также в процессе их производства.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балышев В.М., Жуков А.Н., Грачев Д.В., Саттаров И.Т., Болгова М.В. *Аттенуированный штамм вируса оспы коз. Патент РФ № 2325437*, 1996.
2. Колян Ф.И. *Разработка и совершенствование технологии изготовления инактивированной вакцины против инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота*: Дисс. ... д-ра вет. наук. Покров; 1998.
3. Колян Ф.И. *Моделирование иммунного ответа и анализ факторов эпизоотического процесса*: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Щелково; 2012.
4. Румянцева Е.А., Балышев В.М., Жуков А.Н., Ногина И.В., Сафонов Г.А. *Аттенуированный штамм вируса болезни Найроби. Патент РФ № 2348692*, 2006.
5. Сергеев В.А. *Культивирование и репродукция вирусов животных*. М.: Колос; 1976.

6. Pepin M., Bouloy M., Bird B.H., Kemp A., Paweska J. Rift Valley fever virus (Bunyavi ridae : Plebovirus): an update on pathogenesis, molecular epidemiology, vectors, diagnostics and prevention. *Vet. Res.* 2010; 41(6): 61.

REFERENCES

1. Balyshev V.M., Zhukov A.N., Grachev D.V., Sattarov I.T., Bolgova M.V. *The attenuated virus strain Goatpox. Patent RF N 2325437*, 1996. (in Russian)
2. Zakutskiy N.I. *Development and improvement of technology for production of inactivated vaccine against infectious bovine rhinotracheitis*: Diss. Pokrov; 1998. (in Russian)
3. Kolyan F.I. *Modeling and analysis of immune response factors epizootic process*. Diss. Shchelkovo; 2012. (in Russian)
4. Rumyantseva E.A., Balyshev V.M., Zhukov A.N., Nogina I.V., Safonov G.A. *Attenuating disease virus strain Nairobi; Patent RF N 2348692*, 2006. (in Russian)
5. Sergeev V.A. *Cultivation and reproduction of animal viruses [Kul'tivirovanie i reproduktiya virusov zhivotnykh]*. M.: Kolos; 1976. (in Russian)
6. Pepin M., Bouloy M., Bird B.H., Kemp A., Paweska J. Rift Valley fever virus (Bunyavi ridae : Plebovirus): an update on pathogenesis, molecular epidemiology, vectors, diagnostics and prevention. *Vet. Res.* 2010; 41 (6): 61.

Поступила 19.02.14

Received 19.02.14

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 578.842.083.2

Балышева В.И.¹, Прудникова Е.Ю.¹, Гальбек Т.В.², Балышев В.М.¹

Перевиваемая сублиния клеток A₄C₂/9K и ее использование в исследованиях с вирусом африканской чумы свиней

¹ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии» Россельхозакадемии, 601120, г. Покров; ²ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии» Россельхозакадемии, 109428, г. Москва

Получена новая высокочувствительная к вирусу африканской чумы свиней (АЧС) перевиваемая сублиния клеток A₄C₂/9K. Все испытуемые штаммы этого вируса, выделенные в Российской Федерации в 2008 – 2013 гг., размножались в этой культуре клеток с проявлением гемадсорбции (Гад) и накапливались в титре до 6,5 lg ГАЕ₅₀/см³. Культуру клеток A₄C₂/9K можно применять для выделения, определения инфекционной активности и серотиповой принадлежности вируса АЧС. Культуральные варианты штамма Ставрополь 01/08 вируса АЧС 24-го и 33-го пассажей в культуре клеток A₄C₂/9K утратили патогенность для свиней.

Ключевые слова: африканская чума свиней; вирус; культура клеток; гемадсорбция; антитела; вирулентность; иммуногенность.

Для цитирования: Вопросы вирусологии. 2015; 60(2): 43–47.

Balysheva V.I.¹, Prudnikova E.Yu.¹, Galnbek T.V.², Balyshev V.M.¹

Continuous cell subline A₄C₂/9K and its application to the african swine fever virus study

¹ National Research Institute for Veterinary Virology and Microbiology of Russia, Russian Academy of Agricultural Sciences, 601120, Pokrov, Russia; ² All-Russia Scientific Research Institute for Experimental Veterinary Medicine, 109428, Moscow, Russia

A new continuous cell subline A₄C₂/9K highly sensitive to the african swine fever virus (ASFV) was prepared. All the tested ASFV strains isolated in the Russian Federation in 2008-2013 proliferated in this cell culture exhibiting hemadsorption and accumulated at a titer of up to 6.5 lg HAU₅₀/cm³. The cell culture A₄C₂/9K can be used for ASFV isolation or determination of its infectious activity and serotype identity. The culture versions of the ASFV strain Stavropol 01/08 at passages 24 and 33 in the cell culture A₄C₂/9K lost their pathogenicity for pigs.

Key words: african swine fever; virus; cell culture; hemadsorption; antibody; virulence; immunogenicity.

Citation: *Voprosy virusologii*. 2015; 60 (2): 43–47. (In Russ.)

For correspondence: Vera Balysheva, MD, PhD, ScD, Prof.; e-mail: balyvi@rambler.ru

Для корреспонденции: Балышева Вера Ивановна, д-р биол. наук, проф.; e-mail: balyvi@rambler.ru

Африканская чума свиней (АЧС) является одной из наиболее опасных и трудно контролируемых болезней свиней. Заболевание наносит свиноводству огромный экономический ущерб, связанный с убоем всех животных в эпизоотическом очаге и первой угрожаемой зоне, проведением жестких ветеринарно-санитарных и карантинных мероприятий, ограничивающих производственные связи хозяйств [1].

Особенно острой проблема АЧС для России стала в 2007 г. после заноса болезни из Грузии в Чеченскую Республику, а оттуда и в другие регионы страны [2]. По данным Россельхознадзора, в 2013 г. зарегистрировано 199 вспышек АЧС в 15 субъектах Центрального, Северо-Западного, Южного, Северо-Кавказского и Приволжского федеральных округов (ФО) [3] Российской Федерации.

В связи с особенностями биологических свойств возбудителя средства специфической профилактики АЧС не разработаны, поэтому быстрая лабораторная диагностика имеет решающее значение в борьбе с болезнью. Выделение вируса АЧС из образцов патматериала проводят в культурах клеток костного мозга свиней (КМС) и лейкоцитов свиней (ЛС), в которых вирус размножается с проявлением гемадсорбции (ГАд), характеризующейся образованием вокруг инфицированных клеток короны красного цвета из эритроцитов свиней [4, 5]. Однако жизнеспособность таких культур клеток зависит от свиней-доноров, что затрудняет стандартизацию получаемого сырья.

Перспективными для культивирования вируса АЧС являются перевиваемые линии клеток, обеспечивающие получение однородного вирусосодержащего материала в больших объемах, который применяется при изучении биологических, молекулярно-генетических свойств вируса, а также используется в качестве лабораторной модели для исследования эволюции вируса АЧС [6–10].

Однако вирус АЧС размножается в перевиваемых культурах клеток только после адаптации без проявления ГАд, что не позволяет использовать их при проведении рутинных вирусологических и диагностических исследований.

В связи с изложенным целью наших исследований было получение новой высокочувствительной к вирусу АЧС перевиваемой культуры клеток и определение области ее применения при работе с этим возбудителем.

В качестве исходной культуры клеток использовали перевиваемую гибридную линию клеток СПЭВ ТК со спленоцитами свиньи (A_4C_2), полученную в 1996 г. в ГНУ ВИЭВ РАСХН (Москва) Л.П. Дьяконовым с соавт. [11]. Как показали наши исследования, после предварительной адаптации вирус АЧС размножается в этой культуре клеток с проявлением специфической ГАд [12].

Материалы и методы

Вирусы. Использовали эпизоотические штаммы вируса АЧС в виде вирусосодержащей крови Ставрополь 01/08, Североморск 01/11, Волгоград-Калач 2012, Тверь-Завидово 2012, Ярославль 2013, Родезия серотипа 8; Лиссабон-57 (Л-57) – серотипа 1; Конго-49 (К-49), МНИ серотипа 2; культуральный аттенуированный штамм ФК-135 – серотипа 4. Инфекционная активность полученных из музея микроорганизмов штаммов вируса АЧС составляла $6,0 - 7,5 \text{ lg ГАЕ}_{50}/\text{см}^3$.

Культура клеток. Первичные культуры клеток КМС и ЛС, выращенные на пластиковых культуральных флаконах и планшетах, получали в Лаборатории биотехнологии ВНИИВВиМ.

Гибридную линию A_4C_2 получали из коллекции культур клеток ГНУ ВИЭВ РАСХН.

Животные. Клинически здоровых подсвинков крупной белой породы и породы мини-пиги 2,5–4-месячного возраста получали из Сектора подготовки подопытных животных ВНИИВВиМ. Свиней кормили и содержали в соответствии с существующими требованиями.

Среды и сыворотки. Использовали среду Игла (MEM), фетальную сыворотку крупного рогатого скота (КРС) фирм «Sigma» (США) и «Hy Clone» (США), сыворотки крови КРС и свиней фирмы «Биолот».

Инфекционный титр вируса АЧС определяли общепринятым методом в культуре клеток КМС и ЛС. Результаты титрования оценивали по феномену ГАд и выражали в $\text{lg ГАЕ}_{50}/\text{см}^3$.

Вирус АЧС культивировали в односуточной культуре клеток $A_4C_2/9к$, выращенной в среде Игла MEM с 10% сыворотки крови свиньи. Перед заражением из культуральных сосудов удаляли ростовую среду и вносили вирус с множественностью заражения $0,1 \text{ ГАЕ}_{50}/\text{кл}$. Адсорбцию вируса проводили при $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ в течение 60 мин. Затем в культуральные сосуды вносили поддерживающую среду Игла MEM с 2% сыворотки крови свиньи. Инфицированную культуру клеток инкубировали при $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ в течение 6–8 сут.

Типовую принадлежность вируса АЧС определяли в реакции задержки гемадсорбции (РЗГАд) согласно Методическим положениям по типизации вируса африканской чумы свиней в реакции задержки гемадсорбции [13].

Патогенность испытуемых материалов определяли на подсвинках, которых внутримышечно инфицировали культуральным вирусом в дозе $4,5 - 6,0 \text{ lg ГАЕ}_{50}$.

Иммуногенные свойства аттенуированных вариантов вируса АЧС изучали на подсвинках, иммунизированных культуральным вирусом двукратно с интервалом 14 сут. На 28–30-е сутки после первого введения животных заражали вирулентным штаммом Ставрополь 01/08 в дозе 100 ЛД_{50} . За животными вели клиническое наблюдение с ежедневной термометрией.

Накопление вирусспецифических антигенов и антител у иммунизированных подсвинков определяли в реакциях прямой и непрямой иммунофлюоресценции и путем твердофазного иммуноферментного анализа (ТФ ИФА) согласно ГОСТу 28573–90 [5].

Результаты и обсуждение

Как было показано нами ранее, штамм Ставрополь 01/08 вируса АЧС на уровне 12–14 пассажей был адаптирован к перевиваемым культурам клеток A_4C_2 , ПСГК-60, ППК-666 и CV-1. Максимальное накопление вируса наблюдалось в культурах клеток A_4C_2 и ПСГК-60 и составляло $4,75 - 5,25 \text{ lg ГАЕ}_{50}/\text{см}^3$. При культивировании вируса АЧС в культуре клеток A_4C_2 с 0,5% взвеси эритроцитов свиньи в цельных материалах наблюдали специфическую ГАд. В то же время в других перевиваемых культурах клеток при аналогичных условиях культивирования ГАд не обнаруживали [12].

В связи с этим были проведены исследования, посвященные направленной модификации культуры клеток A_4C_2 с целью повышения ее продуктивности в отношении вируса АЧС. В морфологических исследованиях было установлено, что перевиваемая культура клеток A_4C_2 состоит из двух видов клеток – эпителиоподобных и лимфоцитоподобных, которые содержатся в монослое примерно в равных количествах. Однако при проведении последовательных пассажей в монослое начинали преобладать эпителиоподобные клетки, тогда как лимфоцитоподобные клетки, в которых вирус АЧС репродуцировался с проявлением специфической

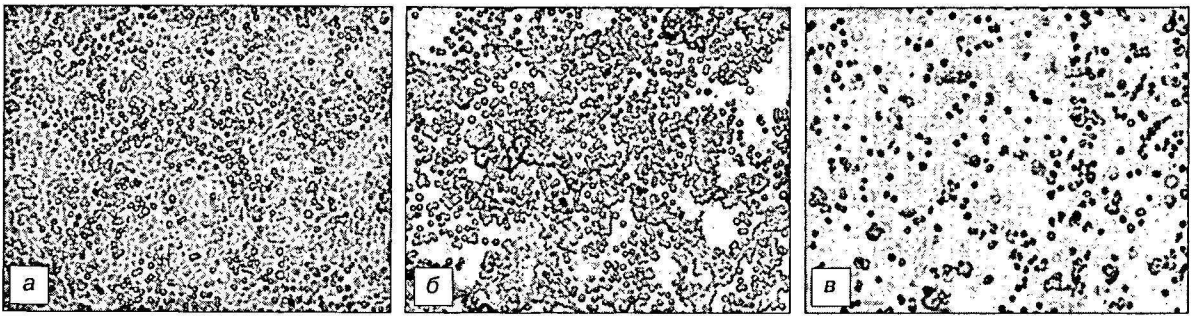


Рис. 1. Цитопатогенное действие штамма Ставрополь 01/08 вируса АЧС в перевиваемой субкультуре клеток $A_4C_2/9k$. а – контрольная культура клеток; б – инфицированная культура клеток, 3-й день после заражения; в – инфицированная культура клеток, 7-й день после заражения. Световая микроскопия. Ув. 100.

ГАд, накапливались преимущественно в культуральной жидкости.

При проведении селективных пассажей перевиваемую культуру клеток A_4C_2 адаптировали к росту в питательной среде с сывороткой крови свиньи. Учитывая способность лимфоцитоподобных клеток переходить в процессе культивирования в суспензию по мере зарастания монослоя, их количество в популяции увеличивали путем осаждения центрифугированием. Концентрацию клеток доводили до посадочной 80–100 тыс. кл/см³ и культивировали в течение 7 последовательных пассажей в питательной среде Игла MEM с 10% фетальной сыворотки КРС. В результате количество лимфоцитоподобных клеток в монослое увеличивалось до 75–85% по сравнению с исходной популяцией. Затем в течение 10 последовательных пассажей проводили адаптацию культуры клеток A_4C_2 к выращиванию со свиной сывороткой. С этой целью в ростовую среду вносили свиную сыворотку, постепенно увеличивая ее содержание с 1 до 10%, т. е. до полной замены фетальной сыворотки КРС. С 9-го пассажа культура клеток A_4C_2 размножалась в среде Игла MEM с сывороткой крови свиньи.

В течение 15 последовательных пассажей (срок наблюдения) культура клеток сохраняла свои основные цитоморфологические свойства. Клетки при пересеве с коэффициентами 1:3–1:5 формировали на 2–3-и сутки монослой, который сохранялся в течение 10–14 сут. Полученная субкультура перевиваемой культуры клеток депонирована в коллекции клеточных культур ГНУ ВИЭВ Россельхозакадемии за № 87 с названием $A_4C_2/9k$.

Штамм Ставрополь 01/08 вируса АЧС без предварительной адаптации размножался в культуре клеток $A_4C_2/9k$ с проявлением цитопатогенного действия, которое характеризовалось отслоением клеток от субстрата и образованием «кокон» в монослое. Максимальные деструктивные изменения наблюдали через 6–7 сут после

заражения, при этом титр вируса составлял $6,50 \pm 0,22 \lg \text{ГAE}_{50}/\text{см}^3$ (рис. 1).

При внесении в культуральную среду 0,5% взвеси эритроцитов свиней в субкультуре клеток $A_4C_2/9k$ через 24–48 часов на поверхности инфицированных клеток наблюдали ГАД, которая характеризовалась многослойным прикреплением к ним эритроцитов свиней (рис. 2).

Представлялось целесообразным изучить чувствительность перевиваемой субкультуры клеток $A_4C_2/9k$ к другим штаммам вируса АЧС, а также возможность ее использования для определения инфекционной активности вируса.

С этой целью перевиваемую субкультуру клеток $A_4C_2/9k$ инфицировали вирусосодержащей кровью, а также 20 % суспензией селезенки, печени и смеси лимфатических узлов (подчелюстных, желудочных, порталных, мезентериальных), полученными от свиней, зараженных штаммами Североморск 2010, Волгоград-Калач 2012, Тверь-Завидово 2012, Ярославль 2013 вируса АЧС, выделенными в различных регионах РФ. Инфицирование культуры клеток проводили с адсорбцией вируса на клетках в течение 60 мин при $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

В культуре клеток $A_4C_2/9k$, инфицированной вирусосодержащей кровью и суспензией органов и тканей, через 24–72 ч наблюдали специфическую ГАД на инфицированных клетках. Аналогично этому ГАД наблюдали и в культуре клеток ЛС, использованной в качестве контроля.

Эти данные указывают на то, что все испытываемые штаммы вируса АЧС, выделенные в РФ в 2008–2013 гг., размножались в перевиваемой субкультуре клеток $A_4C_2/9k$ без предварительной адаптации с проявлением специфической ГАД.

Сравнительное титрование вируса АЧС в виде вирусосодержащей крови (штаммы Ставрополь 01/08, Североморск 2010, Волгоград-Калач 2012, Тверь-Завидово

2012, а также Конго-49 и ФК-135 в перевиваемой субкультуре клеток $A_4C_2/9k$ и первичной культуре клеток КМС показало, что титр вируса АЧС, определяемый в субкультуре клеток $A_4C_2/9k$, составлял $5,0\text{--}6,5 \lg \text{ГAE}_{50}/\text{см}^3$. Это на $0,75\text{--}1,25 \lg$ было ниже, чем в культуре клеток КМС. Результаты опыта представлены в табл. 1.

Коэффициент корреляции титра вируса АЧС, определяемого в перевиваемой субкультуре клеток $A_4C_2/9k$ и культуре клеток КМС составлял 0,93.

Для определения типовой при-

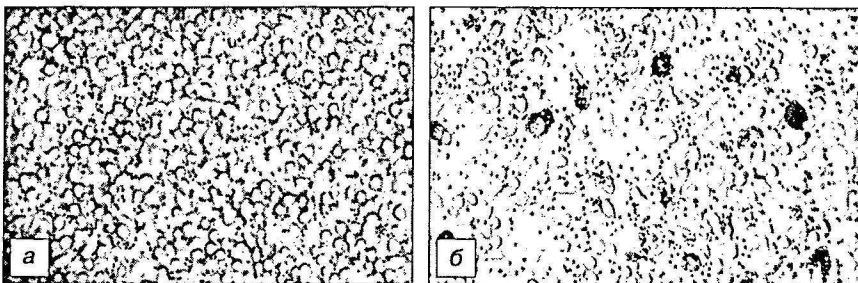


Рис. 2. Реакция ГАД в перевиваемой субкультуре клеток $A_4C_2/9k$. а – контрольная культура клеток; б – инфицированная культура клеток. Световая микроскопия. Ув. 200.

Таблица 1
Результаты определения инфекционной активности вируса АЧС в вирусосодержащей крови в культурах клеток А₄С₂/9к и КМС (n = 3–5)

Штаммы вируса АЧС	А ₄ С ₂ /9к		КМС	
	наличие ГАД	титр вируса, lg ГАЕ ₅₀ /см ₃	наличие ГАД	титр вируса, lg ГАЕ ₅₀ /см ³
Ставрополь 01/08	+	6,0 ± 0,19	+	7,2 ± 0,17
Североморск 2010	+	6,5 ± 0,17	+	7,7 ± 0,19
Волгоград-Калач 2012	+	5,0 ± 0,14	+	6,0 ± 0,22
Тверь-Завидово 2012	+	5,2 ± 0,12	+	6,4 ± 0,12
Конго-49	+	6,0 ± 0,21	+	7,0 ± 0,19
ФК-135	+	6,0 ± 0,24	+	7,25 ± 0,28

надлежасти гемадсорбирующих штаммов вируса АЧС применяют РЗГАд. Она основана на торможении феномена ГАД, индуцированной вирусом АЧС в культуре клеток ЛС или КМС гомологичной типовой гипериммунной сывороткой. Получение таких культур от свиней трудоемко и связано с убоем доноров костномозговой ткани. Поэтому нами была изучена возможность использования с этой целью перевиваемой сублинии клеток А₄С₂/9к. При постановке реакции использовали специфические РЗГАд-сыворотки серотипов 1, 2, 3, 4 и 8, которые получали из коллекции микроорганизмов института. Результаты опытов приведены в табл. 2.

Как видно из табл. 2, штаммы Ставрополь 01/08, Волгоград-Калач 2012, Тверь-Завидово 2012, Родезия по результатам РЗГАд относятся к серотипу 8, а штаммы Л-57, МНИ и ФК-135 – к серотипам 1, 2 и 4 соответственно. Аналогичные результаты получены при постановке РЗГАд в культуре клеток КМС. Эти данные подтверждают, что циркулирующий в РФ вирус АЧС относится к серотипу 8.

На следующем этапе исследований была изучена патогенность культуральных вариантов штамма Ставрополь 01/08 вируса АЧС различных пассажных уровней в культуре клеток А₄С₂/9к. Культуральный вариант штамма Ставрополь 01/08 14-го пассажа сохранял вирулентные свойства. Инфицированные этим материалом подсыпики погибали от АЧС с признаками острой формы болезни. При патолого-анатомическом вскрытии у них наблюда-

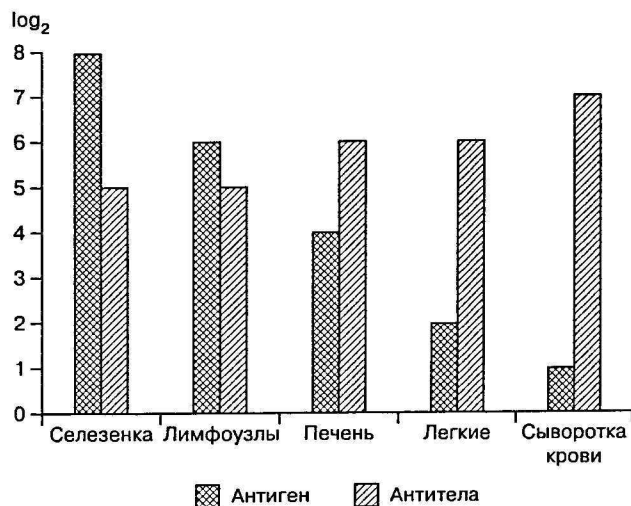


Рис. 3. Накопление антител и антигена вируса АЧС и антител к нему в органах подсыпики, инфицированной культуральным штаммом Ставрополь 01/08 33-го пассажа в сублинии клеток А₄С₂/9к.

ли геморрагический синдром в органах и тканях, отек легких, гиперплазию селезенки и лимфатических узлов. Накопление вируса в крови павших животных составляло 7,0–7,5 lg ГАЕ₅₀/см³.

Культуральные варианты 24-го и 33-го пассажей утратили патогенность для свиней: у инфицированных подсыпинок отмечали только повышение температуры тела до 40,5–40,7°C в течение 3–6 сут. В пробах крови, полученных от этих животных, вирус АЧС выявляли в культуре клеток А₄С₂/9к в низких титрах – до 2,5 lg ГАЕ₅₀/см³.

На 28-е сутки один из трех подсыпинок иммунизированных культуральным вариантом штамма Ставрополь 01/08 33-го пассажа в культуре клеток А₄С₂/9к, был обескровлен. Патологоанатомических изменений, характерных для АЧС, у него не обнаружено. Однако в легких наблюдали единичные очаговые кровоизлияния.

Методом ТФ ИФА установлено, что наиболее высокое накопление специфических антигенов вируса АЧС выявлено в селезенке (1:256) и низкое – в легких (1:4) (рис. 3). В реакции прямой иммунофлюоресценции антигены вируса АЧС обнаруживали только в лимфатических узлах.

Накопление вирусспецифических антител в сыворотке крови, суспензиях селезенки, печени, легких, лимфатических узлов в реакции непрямой иммунофлюоресценции составляло 1:32–1:64.

Двукратная иммунизация подсыпинок аттенуированными вариантами вируса 24-го и 33-го пассажей в перевиваемой сублинии клеток А₄С₂/9к не защищала их от контрольного заражения вирулентным вирусом АЧС штамма Ставрополь 01/08 в дозе 3,0 lg ЛД₅₀. Привитые животные погибали от АЧС с признаками острой формы болезни.

Заключение

Установлена высокая чувствительность перевиваемой сублинии клеток А₄С₂/9к к вирусу АЧС, в которой он размножается с проявлением специфической ГАД и накапливается до 6,5 lg ГАЕ₅₀/см³.

Перевиваемую сублинию клеток А₄С₂/9к можно использовать для выделения, определения инфекционной активности и серотиповой принадлежности вируса АЧС, а также получения аттенуированных вариантов вируса.

Таблица 2
Определение типовой принадлежности вируса АЧС в РЗГАд в культуре клеток А₄С₂/9к

Штамм вируса АЧС	Контроль вируса	Типовые референс-сыворотки серотипов					Серотип вируса
		1	2	3	4	8	
Ставрополь 01/08	+	+	+	+	+	-	8
Волгоград-Калач 2012	+	+	+	+	+	-	8
Тверь-Завидово 2012	+	+	+	+	+	-	8
Родезия	+	+	+	+	+	-	8
Л-57	+	-	+	+	+	+	1
МНИ	+	+	-	+	+	+	2
ФК-135	+	+	+	+	-	+	4

Примечание. «+» – наличие ГАД; «-» – отсутствие ГАД.

ЛИТЕРАТУРА

1. Инструкция о мероприятиях по предупреждению и ликвидации африканской чумы свиней. М.; 1980.
2. Куриннов В.В., Колбасов Д.В., Цыбанов С.Ж., Васильев А.П., Шендрик А.Г., Балышев В.М. и др. Африканская чума свиней – главная проблема для свиноводства России. *Жизнь без опасностей. Здоровье. Профилактика. Долголетие*. 2010; 3: 8–7.
3. Эпизоотическая ситуация по АЧС на территории Российской Федерации в 2013 г. Официальный сайт Россельхознадзора: 2013. Available at: <http://www.fsvps.ru/news/7210.html>.
4. Коваленко Я.Р. *Африканская чума свиней*. М.: Колос; 1972.
5. *ГОСТ 28573–90. Методы лабораторной диагностики африканской чумы свиней*. М.; 1990.
6. Селянинов Ю.О., Балышев В.М., Цыбанов С.Ж. Вирус африканской чумы свиней: физическое картирование генома штаммов. *Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук*. 2000; 5: 75–6.
7. Almendral J.M., Blasco R., Ley V., Beloso A., Talaver A., Vinuela E. Restriction site map of African swine fever virus DNA. *Virology*. 1984; 133: 258–70.
8. Carrascosa A.L., Bustos M.J., de Leon P. Methods for Growing and Titrating African Swine Fever Virus: Field and Laboratory Samples. *Curr. Protoc. Cell Biol.* 2011; 53: 26.14.1–26.14.25.
9. Carrascosa A.L., Bustos M.J., Nogal M.L., Gonzalez de Buitrago G., Revilla Y. Apoptosis induced in an early step of African swine virus entry into Vero cell does not require virus replication. *Virology*. 2002; 294: 372–82.
10. Tabares E., Olivares I., Santurde C., Garcia M.J., Martine E., Camero M.E. African swine fever virus DNA: deletion and addition during adaptation to growth in monkey kidney cells. *Arch. Virol.* 1987; 97: 333–46.
11. Дьяконов Л.П., Гальнбек Т.В., Щекалова И.В. Внутривидовая гибридная культура клеток СПЭВ ТК×лимфоциты свиньи. *Сельскохозяйственная биология*. 1996; 2: 25–30.
12. Прудникова Е.Ю., Балышев В.М., Юрков С.Г., Гальнбек Т.В., Балышева В.И. Адаптация вируса африканской чумы свиней к перевиваемым культурам клеток. *Научный журнал КубГАУ Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского аграрного университета*. 2012; 80 (06). Available at: <http://ej.kubagro.ru/2012/06/pdf/32.pdf>.
13. Балышев В.М., Болгова М.В., Черятников Л.Л., Калантаенко Ю.Ф., Юрков С.Г. *Методические положения по типизации вируса африканской чумы свиней в реакции задержки гемадсорбции*. ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии. Покров, 2010.
2. Kurinnov V.V., Kolbasov D.V., Tsybanov S.Zh., Vasilyev A.P., Shendrik A.G., Balyshv V.M. et al. African swine fever – a major problem for pig production of Russia. *Zhizn' bez opasnostey. Zdorov'e. Profilaktika. Dolgoletie*. 2010; 3: 82–7. (in Russian)
3. Epidemiological situation on ASF in the Russian Federation in 2013. Rossel'khozndzor/Official site of Rosselkhozndzor. Available at: <http://www.fsvps.ru/news/7210.html> (in Russian)
4. Kovalenko Ya.R. *African Swine Fever [Afrikanskaya Chuma Sviney]*. Moscow: Kolos; 1972. (in Russian)
5. State Standart 28573–90. *The methods of laboratory diagnostic of African swine fever*. Moscow, 1990. (in Russian)
6. Selyaninov Yu.O., Balyshv V.M., Tsybanov S.Zh. African swine fever virus: the physical mapping of strains genome. *Vestnik Rossiyskoy Akademii Sel'skokhozyaystvennykh Nauk*. 2000; 5: 75–6. (in Russian)
7. Almendral J.M., Blasco R., Ley V., Beloso A., Talaver A., Vinuela E. Restriction site map of African swine fever virus DNA. *Virology*. 1984; 133: 258–70.
8. Carrascosa A.L., Bustos M.J., Leon P. Methods for Growing and Titrating African Swine Fever Virus: Field and Laboratory Samples. *Curr. Protoc. Cell Biol.* 2011; 53: 26.14.1–26.14.25.
9. Carrascosa A.L., Bustos M.J., Nogal M.L., Gonzalez de Buitrago G., Revilla Y. Apoptosis induced in an early step of African swine virus entry into Vero cell does not require virus replication. *Virology*. 2002; 294: 372–82.
10. Tabares E., Olivares I., Santurde C., Garcia M.J., Martine E., Camero M.E. African swine fever virus DNA: deletion and addition during adaptation to growth in monkey kidney cells. *Arch. Virol.* 1987; 97: 333–46.
11. Dyakonov L.P., Galnbek T.V., Shchekalova I.V. Intraspecific hybrid cell culture SPEV TK- × porcine lymphocytes. *Sel'skokhozyaystvennaya Biologiya*. 1996; 2: 25–30. (in Russian)
12. Prudnikova E.Yu., Balyshv V.M., Yurkov S.G., Galnbek T.V., Balyshva V.I. Adaptation of African swine fever virus in continuous cell cultures. *Nauchnyy zhurnal KubGAU. Politematicheskii setevoy elektronnyy nauchnyy zhurnal Kubanskogo agrarnogo universiteta*. 2012; 80 (06): Available at: <http://ej.kubagro.ru/2012/06/pdf/32.pdf> (in Russian)
13. Balyshv V.M., Bolgova M.V., Cheryatnikov L.L., Kalantaenko Yu.F., Yurkov S.G. Methodical provisions for typing of African swine fever virus in hemadsorption delay test. *State Scientific Institution All-Russian Research Institute for Veterinary and Microbiology, Russian Academy of Agricultural [Metodicheskie polozheniya po tipizatsii virusa afrikanskoy chumy sviney v reaktsii zaderzhki gemadsorbtsii]*. GNU VNIIVViM Rossel'khozakademii. Pokrov, 2010. (in Russian).

REFERENCES

1. Instructions on activities for the prevention and elimination of African swine fever. Moscow, 1980. (in Russian)

Поступила 15.04.14

Received 15.04.14

ЮБИЛЕЙ

Валентина Васильевна Малиновская (к 80-летию со дня рождения)

Исполнилось 80 лет известному отечественному вирусологу профессору Малиновской Валентине Васильевне.

Малиновская Валентина Васильевна родилась в Москве 31 января 1935 г. В 1953 г. поступила на биолого-почвенный факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, который окончила в 1958 г. По распределению была направлена в Центральный НИИ дезинфекции и дератизации, где работала в должности зоолога до 1962 г. С 1962 по 1971 г. работала в НИИ им. Д.И. Ивановского сначала в должности старшего лаборанта, а затем младшего научного сотрудника. В 1970 г. успешно защитила диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук «Изучение активности лизосомальных ферментов при нейровирусных инфекциях», став высококвалифицированным вирусологом.

С 1971 г. по настоящее время В.В. Малиновская работает в ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. В 1985 г. она блестяще защитила концептуальную докторскую диссертацию «Возрастные особенности системы интерферона», а в 1992 г. утверждена в звании профессора. С 1990 г. В.В. Малиновская руководит лабораторией «Онтогенез и коррекция системы интерферона».

Под ее руководством и при ее непосредственном участии разрабатывается новое направление, связанное с изучением возрастных особенностей системы интерферона. Развитие этого направления было начато ею в 70-х годах прошлого столетия под руководством акад. В.Д. Соловьева, продолжено в лаборатории онтогенеза и коррекции системы интерферона. Это направление стало приоритетным для нашей страны.

Разработанный В.В. Малиновской комплексный подход к изучению этой проблемы позволил установить ряд механизмов сниженной противоинойфекционной защиты в раннем периоде онтогенеза, обосновать их взаимосвязь с несовершенством функционирования системы интерферона. В результате этих исследований была научно доказана необходимость восстановления функциональной активности системы интерферона и разработаны принципы решения указанной проблемы. Итогом многолетней работы В.В. Малиновской было создание для педиатрической и акушерской практики препарата, нормализующего функционирование системы интерферона. Его был создан комплексный противовирусный и иммуномодулирующий препарат Виферон, в состав которого входят интерферон человеческого рекомбинантный альфа-2, антиоксиданты (альфа-токоферола ацетат и аскорбиновая кислота), получивший признание и нашедший широкое применение в медицинской практике при лечении распространенных и социально значимых инфекций.

Обладая прекрасными организаторскими способностями, глубокими научными знаниями и предвидением проф. В.В. Малиновская организовала и провела широкие доклинические испытания и доказала целесообразность использования этого препарата. Проведенные исследования позволили четко и научно обосновать применение Виферона в комплексной терапии хронических вирусных гепатитов у детей,



в комплексной терапии новорожденных детей, в том числе и недоношенных, при различных внутриутробных инфекциях, инфекционных поражениях ЦНС, а также у беременных женщин с урогенитальными инфекциями, бронхолегочной патологией. Применение препарата в комплексной терапии инфекционно-воспалительных заболеваний позволяет снизить тяжесть течения инфекционной патологии и смертность новорожденных. В дальнейшем было доказано, что этот препарат высокоэффективен не только в педиатрической практике, но и у взрослых при различных формах патологии. Важным преимуществом препарата Виферон является отсутствие побочных эффектов, характерных для инъекционных форм препаратов интерферона.

В.В. Малиновская – автор открытия «Закономерность нарушений спектра интерферонов в крови у детей при бронхиальной астме». Эти научные исследования легли в основу разработки новых подходов к терапии бронхиальной

астмы у детей.

Под руководством В.В. Малиновской разработана и успешно применяется программа лечения часто и длительно болеющих детей и взрослых. Выдающееся достижение проф. Малиновской В.В. – широкое внедрение препарата в клиническую практику.

В 2001 г. В.В. Малиновская удостоена премии Правительства Российской Федерации «За разработку технологии получения субстанции интерферона альфа-2 человеческого рекомбинантного, готовых лекарственных средств на его основе и внедрение их в медицинскую практику».

В 2006 г. В.В. Малиновской присуждена премия лучшим врачам «Призвание» за вклад в развитие медицины, внесенный представителями фундаментальной науки и немедицинских профессий.

В 2013 г. В.В. Малиновская удостоена премии Правительства Российской Федерации в области науки и техники «За создание высокоэффективных биотехнологических платформ, разработку инновационных технологий и организацию промышленного производства терапевтических рекомбинантных белков на их основе». Ей присвоено высокое звание заслуженного деятеля науки Российской Федерации.

В.В. Малиновская уделяет много внимания подготовке высококвалифицированных научных кадров. Ею создана научная школа, под ее руководством защищены более 35 кандидатских и 11 докторских диссертаций. В настоящее время В.В. Малиновская демонстрирует высокий уровень творческой активности, выступая с лекциями и докладами, она – автор более 350 научных работ и монографий.

Валентину Васильевну Малиновскую отличают необыкновенное человеколюбие, доброта, умение общаться с людьми, уважение к людям.

Редколлегия журнала «Вопросы вирусологии», коллектив сотрудников ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России сердечно поздравляют В.В. Малиновскую с 80-летним юбилеем и желают ей новых творческих успехов и здоровья.