

ISSN 0507-4088 (Print)

ISSN 2411-2097 (Online)



Д.И.ИВАНОВСКИЙ

# ВОПРОСЫ ВИРУСОЛОГИИ

PROBLEMS OF VIROLOGY

4

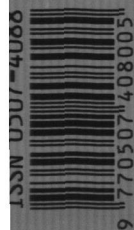
Том 60 • 2015



издательство  
"МЕДИЦИНА"

[www.medlit.ru](http://www.medlit.ru)

Volume 60 • Issue 4 • 2015



ISSN 0507-4088  
9 770507 408005

**РОССИЙСКАЯ  
АКАДЕМИЯ  
НАУК**

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

ЛР № 010215 от 29.04.97

Почтовый адрес:

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

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

Зав. редакцией **Т. М. Курушина**

Тел. +7-495-678-63-95

E-mail: [vopr.virusol@idm.msk.ru](mailto:vopr.virusol@idm.msk.ru)

[www.medlit.ru](http://www.medlit.ru)

**ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ**

Тел./факс +7-495-678-64-84

E-mail: [info@idm.msk.ru](mailto:info@idm.msk.ru)

[www.medlit.ru](http://www.medlit.ru)

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

Редактор **Е.П. Мороз**

Художественный редактор

**А. В. Минаичев**

Технический редактор

**Т. В. Нечаева**

Корректор **А. В. Малахова**

Переводчик **С. К. Чаморовский**

Верстка **Е. М. Архипова**

Сдано в набор 18.05.2015.

Подписано в печать 24.06.2015.

Формат 60 × 88%.

Печать офсетная.

Печ. л. 6,00.

Усл. печ. л. 5,88.

Уч.-изд. л. 6,36.

Заказ 438.

Отпечатано в типографии ООО

"Подольская Периодика",

142110, г. Подольск, ул. Кирова, 15

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

Т. 60. №4 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.

# 4

## 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.)

**Белоусова Р.В.** (д.в.н., проф.)

**Галегов Г.А.** (д.б.н., проф.)

**Гендон Ю.З.** (д.м.н., проф.)

**Гулюкин М.И.** (д.в.н., проф., 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.)

**Юминов Н.В.** (д.м.н., доцент)



## РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

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

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

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

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

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

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

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., 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)

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, M.Sc.; Frederick, USA)

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

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

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

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

Oxford J. (DSc; London, UK)

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

Roggendorf M. (MD, Essen, Germany)

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

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

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

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

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

Vainionpää R. (Docent; Turku, Finland)

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

Webby R. (PhD, Memphis, USA)

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

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

RUSSIAN ACADEMY OF SCIENCES

# VOPROSY VIRUSOLOGII

(PROBLEMS OF VIROLOGY)

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

## Volume 60 • 4 • 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)

**Glinkikh 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

## СОДЕРЖАНИЕ

### ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Контаров Н.А., Ермакова А.А., Гребенкина Н.С., Юминова Н.В., Зверев В.В.** Изучение противовирусной активности полиэлектролитов в отношении вируса гриппа. . . . . 5
- Наровлянский А.Н., Иванова А.М., Шевлягина Н.В., Диденко Л.В., Боровая Т.Г., Измest'ева А.В., Санин А.В., Пронин А.В., Ершов Ф.И.** Эффективность применения полипренилфосфатов в экспериментальной модели генитального герпеса. . . . . 9
- Баринский И.Ф., Гребенникова Т.В., Альховский С.В., Кочергин-Никитский К.С., Сергеев О.В., Гривенча С.В., Раев С.А.** Молекулярно-генетическая характеристика вируса, выделенного от больных острым энцефаломиелитом человека и множественным склерозом. . . . . 14
- Садикалиева С.О., Султанкулова К.Т., Шораяева К.А., Строчков В.М., Червякова О.В., Зайцев В.Л., Табынов К.К., Сандыбаев Н.Т., Сансызбай А.Р., Егоров А.Ю.** Генетическая стабильность HA-, NA- и NS-генов рекомбинантного векторного вируса FLU-NS1-124-Omp16 (H5N1), экспрессирующего бруцеллезный ген. . . . . 18
- Осидак Л.В., Гончар В.В., Волощук Л.В., Головачева Е.Г., Куликова Н.А., Дондурей Е.А., Афанасьева О.И., Суховецкая В.Ф., Милькин К.К., Образцова Е.В., Мухкатина А.Л., Коновалова Н.И., Писарева М.М., Гончарова Е.С., Галкина С.Н., Дринецкий В.П., Го А.** Клинико-лабораторная характеристика гриппа A(H1N1pdm 2009) у детей и взрослых в период 2009-2013 гг. в Санкт-Петербурге. . . . . 23
- Лаповок И.А., Лага В.Ю., Казеннова Е.В., Васильев А.В., Дзисюк Н.В., Утегенова А.К., Абишев А.Т., Тукеев М.С., Бобкова М.Р.** Молекулярно-эпидемиологический анализ ВИЧ-1 в Казахстане в 2009-2013 гг. . . . . 29
- Сейбиль В.Б., Малышкина Л.П., Агеева О.Т., Косолапова Е.И., Множина Е.Г., Грошенкова Е.В., Кривцов Н.В., Гурьянова Н.И., Дальцаева М.К., Фомина Н.С.** Коллективный иммунитет к полиомиелиту у населения отдельных регионов России. . . . . 37
- Дешева Ю.А., Смолоногина Т.А., Руденко Л.Г.** Доклиническое изучение реассортантного вакцинного штамма вируса гриппа A/17/перепел/Гонконг/97/84 (H9N2). . . . . 40
- Боравлева Е.Ю., Чвала И.А., Ломкина Н.Ф., Репин П.И., Мудрак Н.С., Руденко Л.Г., Гамбарян А.С., Дрыгин В.В.** Испытание апатогенного вируса гриппа H5N3 в качестве живой ветеринарной вакцины. . . . . 44

## CONTENTS

### ORIGINAL RESEARCH

- Kontarov N.A., Ermakova A.A., Grebionkina N.S., Yuminova N.V., Zverev V.V.** The study of the antiviral activity of polyelectrolytes with respect to the influenza virus. . . . . 5
- Narovlyansky A.N., Ivanova A.M., Shevlyagina N.V., Didenko L.V., Borovaya T.G., Izmest'eva A.V., Sanin A.V., Pronin A.V., Ershov F.I.** Efficacy of polyprenyl phosphates in the experimental genital herpes model. . . . . 9
- Barinsky I.F., Grebennikova T.V., Alkhovsky S.V., Kochergin-Nikitsky K.S., Sergeev O. V., Gribenchka S.V., Raev S.A.** Molecular genetic characteristics of the virus isolated from patients with human acute encephalomyelitis and multiple sclerosis. . . . . 14
- Sadikaliyeva S.O., Sultankulova K.T., Shorayeva K.A., Strochkov V.M., Chervyakova O. V., Zaitsev V.L., Tabynov K.K., Sandybayev N.T., Sansyzbay A.R., Egorov A.Yu.** Genetic stability of the HA, NA, and NS genes of the recombinant vector virus Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) expressing the brucellar gene. . . . . 18
- Osidak L.V., Gonchar V.V., Voloshuk L.V., Golovacheva E.G., Culikova N.A., Dondurey E.A., Afanasjeva O.I., Suhovezkaia V.F., Milkint K.K., Obratsova E.V., Mushkatina A.L., Konovalova N. I., Pisareva M.M., Goncharova E.S., Galkina S.N., Drinevsky V.P., Go A.** Clinical and laboratory presentation of the influenza A (H1N1pdm 2009) in children and adults during the period of 2009-2013 in St. Petersburg. . . . . 23
- Lapovok I.A., Laga V.Y., Kazennova E.V., Vasilyev A.V., Dzissyuk N.V., Utegenova A. K., Abishev A.T., Tukeev M.S., Bobkova M.R.** Molecular epidemiological analysis of HIV-1 in Kazakhstan in 2009-2013. . . . . 29
- Seybil V.B., Malyshkina L.P., Ageeva O.T., Kosolapova E.I., Mnozhina E.G., Groshenkova E.V., Krivtsov N.V., Gurianova N.I., Daltsaeva M.K., Fomina N.S.** Collective immunity against poliomyelitis among the population of several regions of Russia. . . . . 37
- Desheva Yu.A., Smolonogina T.A., Rudenko L.G.** A pre-clinical trial of the reassortant influenza virus vaccine strain A/17/Quail/Hong Kong/97/84 (H9N2). . . . . 40
- Boravleva E.Y., Chvala I.A., Lomakina N.F., Repin P.I., Mudrak N.S., Rudenko L.G., Gambaryan A.S., Drygin V.V.** Testing of apathogenic influenza virus H5N3 as a poultry live vaccine. . . . . 44

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

# ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015  
УДК 615.281.8.03:578.832.11.036.8

Контаров Н. А., Ермакова А. А., Гребенкина Н. С., Юминова Н. В., Зверев В. В.

## Изучение противовирусной активности полиэлектролитов в отношении вируса гриппа

ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова», 105064, г. Москва

Полиэлектролиты (ПЭ) оказывают повреждающее действие на вторичную структуру белков и ферментов, а некоторые ПЭ обладают выраженной иммуностимулирующей активностью в отношении Т- и В-лимфоцитов. Однако на данный момент практически ничего не известно о влиянии используемых в работе ПЭ на вирусные белки и вирусную оболочку. Подробное изучение механизмов противовирусного действия различных ПЭ позволит сформировать научно-практическую базу для создания противовирусных химиопрепаратов на полиэлектролитной основе. В данных исследованиях впервые изучено влияние ПЭ полистиролсульфоната (ПСС) с различными степенями полимеризации и полиаллиламина (ПАА) с молекулярной массой 6 и 8 кДа на инфекционность различных штаммов вирусов гриппа. Показано выраженное вирусингибирующее действие ПСС со степенью полимеризации 8 (ПСС-8) и ПАА (6 кДа) на вирус гриппа, характеризующееся достоверным снижением инфекционного титра вирусов. Определен диапазон нетоксических концентраций для ПСС-8 – 1–40 мМ и ПАА (6 кДа) – 1–40 мкМ с  $IC_{50}$ , равной  $3,8 \pm 0,19$  мМ и  $1,8 \pm 0,09$  мкМ соответственно. Впервые для оценки воздействия ПЭ на структурно-функциональные состояния вирусной мембраны были использованы мономолекулярные монослои, являющиеся моделями клеточных мембран.

Ключевые слова: *полиэлектролиты; полистиролсульфонат; полиаллиламин; грипп; химиотерапия.*

Для цитирования: Вопросы вирусологии. 2015; 60(4): 5–9.

Kontarov N.A., Ermakova A.A., Grebionkina N.S., Yuminova N.V., Zverev V.V.

### The study of the antiviral activity of polyelectrolytes with respect to the influenza virus

I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, 105064, Moscow, Russia

It is well known that polyelectrolytes (PE) have a damaging effect on the secondary structure of the proteins and enzymes. It is also known that some PEs exert an immunostimulating action on T- and B-lymphocytes. However, currently, almost nothing is known about the impact of the PE of the viral proteins and viral envelope. Therefore, a detailed study of the mechanisms of the antiviral action of various polyelectrolytes would create the scientific-practical base for the construction of the antiviral drugs on the polyelectrolyte basis. In these works, for the first time the influence of PE polystyrene sulfonate (PSS) with varying degrees of polymerization and polyallylamine (PAA) and with molecular mass 6 and 8 kDa on the infectivity of different strains of the influenza virus was studied. It was shown that the expressed antiviral action PSS with degree of polymerization 8 (ETS-8) and PAA (6 kDa) against the influenza viruses was characterized by a significant reduction in the infectious titer of the virus. It was determined that the span of the nontoxic concentrations for the ETS-8 was 1–40 mM; for PAA (6 kDa), 1–40  $\mu$ M, with  $IC_{50} = 3.8 \pm 0.19$  mM and  $1.8 \pm 0.09$   $\mu$ M, respectively. For the first time the impact of the PE on the structural-functional state of the viral membrane was assessed on the basis of monomolecular monolayers used as models of cell membranes.

Key words: *polyelectrolytes; polystyrene sulfonate; polyallylamine; flu; chemotherapy.*

Citation: *Voprosy virusologii. 2015; 60(4): 5–9. (In Russ.)*

For correspondence: Nikolay Kontarov, MD, PhD; e-mail: kontarov@mail.ru

Received 19.03.14

### Введение

Грипп и острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ), несмотря на определенные успехи в вакцино- и химиопрофилактике, остаются одной из самых актуальных медицинских и социально-экономических проблем. В России на грипп и ОРВИ ежегодно приходится до 90% всей регистрируемой инфекционной заболеваемости (до 30 млн больных, из них 45–60% детей). Экономический ущерб, причиняемый гриппом и ОРВИ, составляет около 86% от экономических

потерь, наносимых инфекционными болезнями. В течение 2005–2009 гг. выявлены изменения в эпидемиологии гриппа животных. По-прежнему встречаются случаи заболевания людей, вирус распространился географически на новые страны. Так, особую актуальность приобретает грипп птиц. Грипп птиц – высококонтагиозная вирусная инфекция, которая может поражать все виды пернатых. Для птиц грипп является энтеральной инфекцией, при которой поражаются паренхиматозные органы, особенно селезенка и лег-

Для корреспонденции: Контаров Николай Александрович, канд. биол.наук, ст. науч. сотр. лаб. детских вирусных инфекций; e-mail: kontarov@mail.ru



кие. К настоящему времени известно, что носителями вируса гриппа птиц H5N1 могут быть практически все известные дикие птицы водного и околородного комплекса. В значительно меньшей степени среди птиц на данный момент циркулирует серотип H7N7 (вирус чумы птиц), последняя эпизоотия была зарегистрирована в 2003 г. в Голландии среди домашней птицы. Этим вирусом было заражено 88 человек, работавших на птицефермах, у которых диагностировали лишь конъюнктивит. Домашние птицы, особенно куры и утки, высоковосприимчивы к штаммам вируса гриппа серотипа H5N1, которые приводят к летальности до 100%. За период с января 2004 г. по август 2009 г. в мире зарегистрировано 237 случаев птичьего гриппа у людей, вызванных вирусом А/H5N1, из них 137 (58%) закончились летальным исходом [1].

В связи с этим разработка новых химиопрепаратов, основой которых являются полиэлектролиты (ПЭ), будет способствовать повышению эффективности методов лечения вирусных инфекций, вызванных различными представителями оболочечных вирусов, за счет комплексного, одновременного воздействия ПЭ на антигенные белки и вирусную мембрану, приводящего к инактивации вируса [1].

Известно, что ряд веществ оказывает повреждающее действие на вторичную структуру белков и ферментов [2–4]. Одними из таких веществ являются ПЭ – полимеры, в состав молекул которых входят группы, способные в растворе к ионизации. Также известно, что ПЭ оказывают повреждающее действие на вторичную структуру белков и ферментов. Некоторые ПЭ обладают выраженной иммуностимулирующей активностью в отношении Т- и В-лимфоцитов [5]. Однако на данный момент практически ничего не известно о влиянии ПЭ на вирусные белки и вирусную оболочку. В ряде работ [6, 7] указывается на наличие у определенных ПЭ антимикробной активности и вирусингибирующего действия на вирус простого герпеса 1-го типа, но отсутствует подробное описание механизмов наблюдаемых явлений.

В наших исследованиях впервые изучено влияние ПЭ полистиролсульфоната (ПСС) с различными степенями полимеризации и полиаллиламина (ПАА) с молекулярной массой 6 и 8 кДа на инфекционность различных штаммов вирусов гриппа. Показано выраженное вирусингибирующее действие ПСС со степенью полимеризации 8 (ПСС-8) и ПАА (6 кДа) на вирусы гриппа, характеризующееся достоверным снижением инфекционного титра вирусов. Определен диапазон нетоксических концентраций для ПСС-8 - 1 - 40 мМ и ПАА (6 кДа) - 1 - 40 мкМ с  $IC_{50}$ , равной 3,8 ± 0,19 мМ и 1,8 ± 0,09 мкМ соответственно. Для оценки воздействия ПЭ на структурно-функциональное состояние вирусной мембраны были использованы мономолекулярные монослои, являющиеся моделями клеточных мембран.

#### Материалы и методы

**Вирусы.** В работе использовали очищенные штаммы вируса гриппа А/ВЧП/Вейбридж (H7N7), А/Маллард Пенсильвания/10218/84 (H5N2), А/NIBRG-14(H5N1) с исходным инфекционным титром 4,5 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл.

**ПЭ.** Растворы ПСС со степенями полимеризации 8, 31, 77, 170, 360 и 430 («Sigma», США) готовили на 10 мМ калий-фосфатном буфере pH 9,0, содержащем 0,5 мМ ЭДТА. Раствор ПАА с молекулярной массой

6 и 8 кДа («Sigma», США) готовили на 10 мМ калий-фосфатном буфере pH 9,0, содержащем 0,5 мМ ЭДТА. Концентрацию ПЭ в растворе рассчитывали относительно заряженных групп, конечная концентрация ПЭ составляла 1 - 80 мМ для ПСС и 1 - 80 мкМ для ПАА.

**Титрование вирусов.** С целью определения цитопатического действия (ЦПД) вирусы гриппа титровали в перевиваемой культуре клеток линии MDCK (состав поддерживающей среды: питательная среда RPMI-1640 (ФГУП «НПО «Микроген»», РФ), ТРСК – трипсин (три-тозил-1-фенилаланилхлорэтилкетон) в конечной концентрации 2 мкг/мл, пенициллин – стрептомицин («Gibco», США), 10% фетальная бычья сыворотка («Gibco», США)), концентрация клеток составляла примерно 2·10<sup>6</sup> кл/мл, инфекционный титр по ЦПД рассчитывали по методу Рида – Менча в модификации Томпсона [8]. ПЭ добавляли в поддерживающую среду через 30 мин после инфицирования клеточного монослоя. Исследование кинетики снижения инфекционного титра проводили в течение 7 сут. Множественность заражения для всех штаммов вирусов составляла 0,01 ТЦД<sub>50</sub>/кл.

**Цитотоксичность препаратов.** Цитотоксичность действия полимеров оценивали по жизнеспособности клеток, которую определяли с помощью МТТ-теста (колориметрический тест определения митохондриальных дегидрогеназ) [9]. В 96-луночные планшеты рассеивали по 2,5·10<sup>4</sup> клеток линии MDCK в лунку в питательной среде RPMI-1640. Через 1 сут ее удаляли и добавляли питательную среду без сыворотки с исследуемыми ПЭ (конечная концентрация от 1 до 80 мМ для ПСС и от 1 до 80 мкМ для ПАА) или без них. После 1,5 ч инкубации клеток при 37°C инкубационную среду удаляли и вносили свежую среду. В каждую лунку добавляли 0,5 мг/мл МТТ-реагента (3-(4,5-диметилтиазолил) -2,5-дифенилтетразолия бромид) («Sigma», США) в фосфатно-буферном растворе и инкубировали 2 ч 40 мин при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. О количестве жизнеспособных клеток судили по изменению величины оптической плотности на спектрофотометре Zenith 200st (Англия) при длине волны 570 нм.

**Оценка выживаемости клеток.** Выживаемость клеток оценивали с использованием трипанового синего. Клеточную суспензию вносили по 2,5·10<sup>4</sup> клеток линии MDCK в лунку планшета в питательной среде без сыворотки и инкубировали с ПЭ (конечная концентрация 1 - 80 мМ для ПСС и 1 - 80 мкМ для ПАА (6 кДа)) или без них при 37°C в течение 30, 60 или 90 мин. Затем клетки окрашивали 0,2% трипановым синим и через 5 мин подсчитывали количество живых (с интактной мембраной) и неживых (с поврежденной мембраной и потому окрашенных) клеток, используя камеру Горяева.

**Определение  $IC_{50}$ .** С целью определения  $IC_{50}$  ПЭ использовали ПАА (6 Да) и ПСС-8 в диапазоне конечных концентраций 1 - 40 мкМ и 1 - 40 мМ соответственно.  $IC_{50}$  определяли как концентрацию ПЭ, при которой инфекционный титр вируса по ЦПД уменьшался на 50% от исходного.

**Получение фосфолипидных монослоев.** Для получения монослоев из фосфатидилхолина («Sigma», США) с конечной концентрацией фосфатидилхолина 10 мг/мл использовали оригинальную установку, состоящую из тefлоновой ванны Ленгмюра размером



Рис. 1. Жизнеспособность клеток линии MDCK по данным МТТ-теста (оценка активности митохондриальных дегидрогеназ) после добавления различных концентраций PSS-8 ( $p < 0,005$ ).

200 x 200 x 1 мм, весов Ленгмюра, неподвижного и снимающего барьера.

При движении снимающего барьера монослой оказывает определенное давление на тефлоновую пластинку весов, которая передается через торсионную нить на ИК-датчик (Россия).

Напряжение с ИК-датчика и электропривода (координатора барьера) вводится в компьютер. Установка обеспечивает точность измерения поверхностного давления  $F = 0,05$  мН/м.

**Статистическая обработка.** Статистическую обработку результатов осуществляли с применением методов параметрической статистики и однофакторного дисперсионного анализа, используя пакет программ Statistica 6,0.

### Результаты и обсуждение

**Исследование токсичности используемых полиэлектролитов.** В исследованиях С. В. Артюшенко и соавт. [1] было показано, что наименьшим токсическим эффектом обладал PSS со степенью полимеризации 8 и ПАА с молекулярной массой больше 10 кДа. Токсичность полиэлектролитов PSS со степенью полимеризации 8, ПАА с молекулярной массой 6 и 8 кДа в зависимости от концентрации оценивали по данным о выживаемости и жизнеспособности клеток линии MDCK. Жизнеспособность клеток оценивали по результатам МТТ-теста, а выживаемость – путем подсчета клеток, окрашенных трипановым синим, в камере Горяева. На основе данных о жизнеспособности клеток линии MDCK был определен нетоксический диапазон концентраций для PSS всех степеней

полимеризации, который составил 1 - 40 мМ (рис. 1, данные приведены для PSS-8).

Оценка жизнеспособности клеток после взаимодействия с ПАА с молекулярной массой 6 и 8 кДа показала, что для ПАА (6 кДа) характерен такой же нетоксический диапазон 1 - 40 мкМ (рис. 2), в то время как ПАА (8 кДа) оказывал выраженный токсический эффект на клетки уже при концентрации 30 мкМ (см. рис. 2).

Из полученных данных можно заключить, что наибольший процент выживших клеток после взаимодействия с PSS с различными степенями полимеризации и ПАА (6 кДа) наблюдается при концентрациях 1 - 40 мМ для PSS и 1 - 40 мкМ для ПАА (6 кДа).

ПАА (8 кДа) обладал высокой токсичностью при более низких концентрациях (начиная с 30 мкМ), чем ПАА (6 кДа), и поэтому не использовался в последующих исследованиях (рис. 3).

Дальнейшим этапом исследований было изучение вирусингибирующего действия указанных ПЭ на вирус гриппа.

**Изучение влияния ПЭ на инфекционность вируса гриппа.** В последние годы проведено много исследований, посвященных изучению взаимодействия различных ПЭ с белками и ферментами. В отношении изучения влияния ПЭ на вирусные белки на данный момент практически ничего не известно.

Чтобы восполнить этот пробел, в представленной работе было впервые подробно изучено взаимодействие PSS и ПАА (6 кДа) с поверхностными белками вируса гриппа. Используемые в работе ПЭ выбраны не случайным образом. Известно, что ПЭ, имеющие неполярный остов и соответственно высокую гидрофобность, способны к разрушению структуры белка, в то время как ПЭ с полярным остовом, наоборот, защищают белковые структуры от повреждения [7]. Одним из таких веществ является, например, декстрансульфат.

В настоящей работе было изучено влияние данных ПЭ на инфекционность вируса гриппа. После взаимодействия PSS и ПАА (6 кДа) с вирусами гриппа наблюдалось снижение инфекционного титра в среднем на 3 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл. По результатам оценки ЦПД вируса гриппа в культуре клеток MDCK после взаимодействия с 30 мМ PSS со степенями полимеризации 8, 31, 77, 170, 360 и 430, наиболее выраженным вирусингибирующим действием обладает PSS-8. Взаимодействие вируса гриппа и PSS с другими степенями полимеризации не приводило к достоверному снижению инфекционного титра вируса. ПАА (6

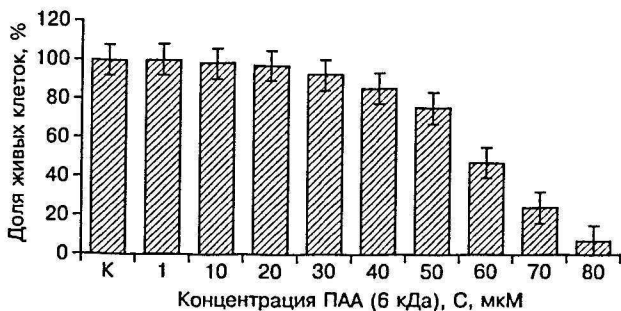


Рис. 2. Жизнеспособность клеток линии MDCK по данным МТТ-теста (оценка активности митохондриальных дегидрогеназ) после добавления различных концентраций ПАА (6 кДа) ( $p < 0,005$ ).



Рис. 3. Жизнеспособность клеток линии MDCK по данным МТТ-теста (оценка активности митохондриальных дегидрогеназ) после добавления различных концентраций ПАА (8 кДа) ( $p < 0,005$ ).

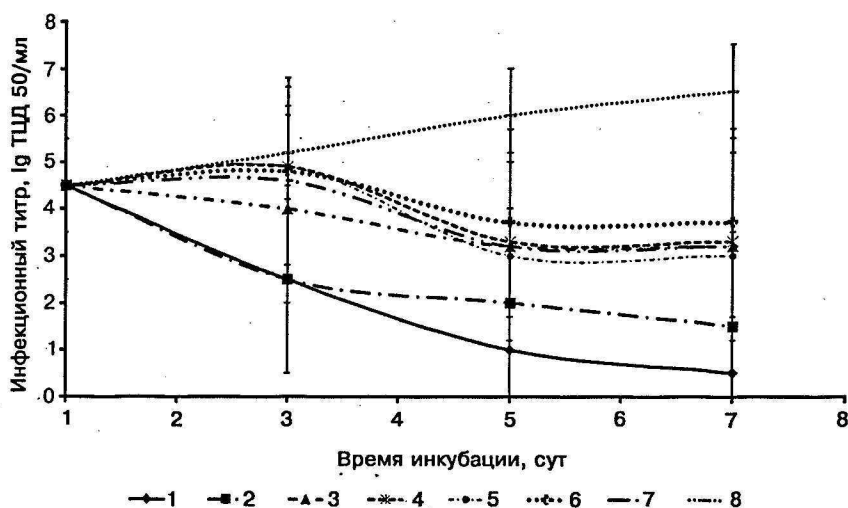


Рис. 4. Кинетика снижения инфекционного титра вируса гриппа.

1 – добавление к вирусу 30 мкМ ПАА (6 кДа); 2 – добавление к вирусу 30 мМ ПСС-8; 3 – добавление к вирусу 30 мМ ПСС-31; 4 – добавление к вирусу 30 мМ ПСС-77; 5 – добавление к вирусу 30 мМ ПСС-170; 6 – добавление к вирусу 30 мМ ПСС-360; 7 – добавление к вирусу 30 мМ ПСС-430, 8 – контроль вируса.

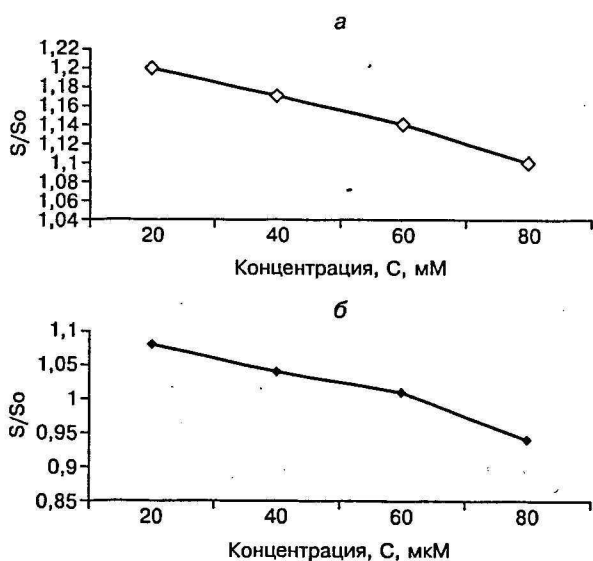


Рис. 5. Зависимость  $S/S_0$  (отношение площади фосфолипидного монослоя при добавлении соответствующей концентрации ПЭ к исходной площади монослоя) от концентрации ПЭ: а – добавление ПСС-8; б – добавление ПАА (6 кДа).

кДа) в концентрации 30 мкМ обладал еще большей противовирусной активностью (рис. 4). Отсутствие противовирусной активности у ПСС со степенями полимеризации больше 8 связано с уменьшением

#### Определение $IC_{50}$ для ПСС-8 и ПАА (6 кДа)

Штамм вирусов гриппа	$IC_{50}$ , мМ (для ПСС-8), мкМ (для ПАА)	
	ПСС-8	ПАА (6 кДа)
А/ВЧП/Вейбридж (H7N7)	$4,0 \pm 0,5$	$2,0 \pm 0,5$
А/Маллард Пенсильвания/10218/84 (H5N2)	$3,8 \pm 0,3$	$1,8 \pm 0,4$
А/NIIBRG-14 (H5N1)	$3,7 \pm 0,5$	$1,65 \pm 0,2$

подвижности данных ПЭ при связывании с противоионами поддерживающей среды клеточных культур.

#### Изучение ингибирования нейраминидазы полиэлектролитов ПСС-8 и ПАА.

Причиной снижения инфекционности является не только повреждение вторичной структуры гемагглютинина вируса гриппа, но и повреждение нейраминидазы, проявляющееся ингибированием ее ферментативной активности. В связи с этим было необходимо количественно оценить минимальную ингибирующую концентрацию  $IC_{50}$  (см. таблицу).

Полученные результаты свидетельствуют о достаточно эффективном ингибировании нейраминидазной активности ПСС-8 и ПАА (6 кДа). Определение наличия ингибирования нейраминидазы после взаимодействия с данными ПЭ указывало на необходимость выявления и типа ингибирования нейраминидазной активности.

Взаимодействие ПЭ с фосфолипидными монослоями. На рис. 5 показана зависимость относительной площади, приходящейся на одну молекулу фосфолипида, от концентрации ПЭ. Из полученных зависимостей видно увеличение степени конденсации монослоя при повышении концентрации ПЭ. Данный процесс сопровождается увеличением вязкости монослоя, что в свою очередь может приводить к изменению структурно-функционального состояния монослоев. Проецируя полученные результаты на мембрану вируса гриппа, можно предположить невозможность процесса слияния вируса с клетками, несмотря на наличие рецепторных взаимодействий, так как проникновение вируса в клетки может произойти только после слияния их мембран.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Артошенко С.В. Изучение механизмов ингибирующего действия полиэлектролитов в отношении парамиксо- и ортомиксовирусов (корь и грипп): Дисс. ... канд. биол. наук. М.; 2011.
2. Halder J., Deqiang A., Luis A., Chen J., Kabanov A.M. *Polymeric coatings that inactivate both influenza virus and pathogenic bacteria*. Cambridge: Departments of Chemistry, Biology, and Biological Engineering, and Center for Cancer Research, Massachusetts Institute of Technology; 2006.
3. Slita A.V., Kasyanenko N.A., Nazarova O.V., Gavrilova I., Eroplina E.M., Sirotkin A.K. et al. DNA-polycation complexes: effect of polycation structure on physico-chemical and biological properties. *J. Biotechnol.* 2007; 127(4): 679–93.
4. Stoll S., Chodanovski P. Polyelectrolyte adsorption on an oppositely charged spherical particle. Chain rigidity effects. *Macromolecules.* 2002; 35: 9556–62.
5. Хайтов Р.М., Некрасов А.В., Лыткина И.Н., Иванова А.С., Пинегин Б.В. О влиянии вакцинопрофилактики на уровни заболеваемости гриппа и ОРЗ. *Журнал микробиологии.* 1996; 3: 40–3.
6. Изумрудов В.А., Зезин А.В., Кабанова В.А. Кинетика макромолекулярного обмена в растворах комплексов белков с полиэлектролитами. *Доклады Академии наук.* 1986; 291(5): 1150–3.
7. Изумрудов В.А., Нуркова Т.Ю., Зезин А.В., Кабанова В.А. Влияние длины цепи полианионов на направление и кинетику межполиэлектролитных реакций обмена. *Высокомолекулярные соединения.* 1987; 29: 474–8.
8. Thompson W.R. Use of moving averages and interpolation to esti-

mate median-effective dose; fundamental formulas, estimation of error, and relation to other methods. *Bacteriol. Rev.* 1947; 11(2): 115–45.

9. Niks M., Otto M. Towards an optimized MTT assay. *J. Immunol. Methods.* 1990; 130(1): 149–51.

#### REFERENCES

1. Artyushenko S.V. Study of Mechanisms of the Inhibitory Effect of Polyelectrolytes in Respect of Paramiko - and Orthomyxoviruses (Measles and Influenza): Diss. Moscow; 2011. (in Russian)
2. Haldar J., Deqiang A., Luis A., Chen J., Kabanov A.M. *Polymeric coatings that inactivate both influenza virus and pathogenic bacteria.* Cambridge: Departments of Chemistry, Biology, and Biological Engineering, and Center for Cancer Research, Massachusetts Institute of Technology; 2006.
3. Slita A.V., Kasyanenko N.A., Nazarova O.V., Gavrilova I., Eroпкина E.M., Sirotkin A.K. et al. DNA-polycation complexes: effect of polycation structure on physico-chemical and biological properties. *J. Biotechnol.* 2007; 127(4): 679–93.
4. Stoll S., Chodanovski P. Polyelectrolyte adsorption on an oppositely

charged spherical particle. Chain rigidity effects. *Macromolecules.* 2002; 35: 9556–62.

5. Khaitov R.M., Nekrasov A.V., Lytkina I.N., Ivanova A.S., Pinegin B.V. Impact of vaccination on the incidence of influenza and ARI. *Zhurnal mikrobiologii.* 1996; 3: 40–3. (in Russian)

6. Izumrudov V.A., Zevin A.V., Kabanova V.A. Kinetics of macromolecular exchange in solutions of protein complexes with polyelectrolytes. *Doklady Akademii nauk.* 1986; 291(5): 1150–3. (in Russian)

7. Izumrudov V.A., Nurkova T.Yu., Zevin A.V., Kabanova V.A. The impact of chain length of poliaminov the direction and the kinetics megapolisskyline reactions exchange. *Vysokomolekulyarnye soedineniya.* 1987; 29: 474–8. (in Russian)

8. Thompson W.R. Use of moving averages and interpolation to estimate median-effective dose; fundamental formulas, estimation of error, and relation to other methods. *Bacteriol. Rev.* 1947; 11(2): 115–45.

9. Niks M., Otto M. Towards an optimized MTT assay. *J. Immunol. Methods.* 1990; 130(1): 149–51.

Поступила 19.03.14

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 615.281.8.03:616.98:578.825.11]-031:611.63.65

*Наровлянский А. Н., Иванова А. М., Шевлягина Н. В., Диденко Л. В., Боровая Т. Г., Измest'ева А. В., Санин А. В., Пронин А. В., Ершов Ф. И.*

## Эффективность применения полипренилфосфатов в экспериментальной модели генитального герпеса

ФГБУ «ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва

В экспериментальной модели генитального герпеса (простой герпес 2-го типа (ВПГ-2)) у самок морских свинок изучена активность инфекционного процесса при первичном герпесе у животных, леченных полипренилфосфатами (ППФ), а также у животных, получавших ППФ вместе с ацикловиром (АЦ). Исследованы морфофункциональные особенности яичников морских свинок контрольных и экспериментальных (получавших при первичной инфекции лечение) групп в стадии обострения рецидивирующего генитального герпеса. Показано, что в случае комплексного применения ППФ и АЦ существенно изменяется симптоматика заболевания и наблюдается снижение активности инфекционного процесса, сокращение его продолжительности и выраженное позитивное отдаленное влияние на морфофизиологию яичников.

Ключевые слова: рецидивирующий генитальный герпес; полипренилфосфаты; ацикловир; яичники морских свинок.

Для цитирования: Вопросы вирусологии. 2015; 60(4): 9–13.

*Narovlyansky A.N., Ivanova A.M., Shevlyagina N.V., Didenko L.V., Borovaya T.G., Izmet'eva A.V., Sanin A.V., Pronin A.V., Ershov F.I.*

### Efficacy of polyprenyl phosphates in the experimental genital herpes model

Federal State Budgetary Institution "Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya", 123098, Moscow, Russia

An experimental model of the primary genital herpes (herpes simplex type 2, HSV-2) in the female guinea pigs was suggested to study the infectious process activity of polyprenyl phosphates (PPP) and PPP+acyclovir (AC) complex treatment. The morphofunctional features of the guinea pig ovaries were studied in the control and experimental groups (the latter were inoculated with PPP and/or AC as a primary infection treatment) at the stage of the recurrent genital herpes aggravation. It was shown that in the case of combined PPP +AC use significant changes in the disease symptoms were observed, as well as a decrease in the infectious process activity and duration, and positive remote effect on the ovarian morphophysiology.

Key words: recurrent genital herpes; polyprenyl phosphates; acyclovir; guinea pig ovary.

Citation: *Voprosy virusologii.* 2015; 60(4): 9–13. (In Russ.)

For correspondence: Aleksandr Narovlyansky, MD, PhD, DSc, prof.; e-mail: narovl@yandex.ru

Received 20.08.13

Для корреспонденции: Наровлянский Александр Наумович, д-р мед. наук, проф.; e-mail: narovl@yandex.ru



Полипренолы (ПП) активно участвуют в синтезе углеводсодержащих биополимеров, стабилизации и поддержании электрохимического градиента клеточных мембран, процессах окислительного метаболизма и др. [1, 2]. С непосредственным участием ПП и их фосфатов (ППФ) индуцируется и реализуется ряд важнейших эффектов: антивирусный, иммуномодулирующий, цитокининдуцирующий и пр. [3, 4]. В НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи разработан и проходит клинические исследования препарат на основе ППФ хвоя Фортепреп [5, 6]. Экспериментально показана активность Фортепрепа против вирусов простого герпеса 1, 2 и 3-го типов, гриппа, кори, свинки, гепатитов, западного энцефаломиелита лошадей, бешенства, иммунодефицита человека, клещевого энцефалита, желтой лихорадки, энцефаломиелита Тейлера и др. [5, 7–10]. Механизм действия и терапевтический эффект препаратов на основе ППФ изучены недостаточно, что сдерживает их применение в клинической практике.

Базовым препаратом для лечения поражений, вызываемых вирусом герпеса, служит ацикловир (АЦ). Цель настоящего исследования состояла в изучении эффективности ППФ при экспериментальной острой (ОГТИ) и рецидивирующей генитальной герпесвирусной инфекции (РГТИ).

#### Материалы и методы

**Животные.** Морские свинки (самки) массой 400–450 г получены из питомника «Андреевка» Научного центра биомедицинских технологий РАМН.

**Вирус.** ВПГ 2-го типа (ВПГ-2, штамм «ВН») получен из НИИ вирусологии им. Д.И.Ивановского. Вирус размножали в культуре клеток Vero, титр соответствовал  $10^{4,7}$  бляшкообразующих единиц (БОЕ) в 0,1 мл. Животных заражали путем внутривагинального введения 20 мкл вирусосодержащего материала.

**Препараты.** Фортепреп – 0,4% раствор ППФ (производитель ООО «ГамаВетФарм», Россия) и препарат сравнения зовиракс (АЦ) – лиофилизированный порошок во флаконах по 250 мг (производитель «GlaxoSmithKline»).

**Дизайн исследования.** Животных разделили на 5 групп (3 экспериментальные и 2 контрольные) по 5 особей в каждой. Морских свинок экспериментальных групп начинали лечить с момента появления первых симптомов заболевания (на 3–4-й день после заражения ВПГ-2). 1-я группа – группа контроля вируса; животных инфицировали ВПГ-2, лечение не проводили. 2-я группа – экспериментальная; заболевших животных лечили ППФ (внутримышечно, 4 мг/кг, 1 раз в сутки, 10 дней). 3-я группа – экспериментальная; заболевших животных лечили ППФ (внутримышечно, 4 мг/кг, 1 раз в сутки, 10 дней) и АЦ (внутрибрюшинно, 2,5 мг/кг, 1 раз в сутки, 10 дней). 4-я группа – экспериментальная; заболевших животных лечили АЦ (внутрибрюшинно, 2,5 мг/кг, 1 раз в сутки, 10 дней). 5-я группа – контрольная группа здоровых животных (в таблице не приводится).

**Оценка эффективности лечения.** Морских свинок ежедневно осматривали с целью выявления у них клинических признаков проявления ОГТИ. На 3–4-й день после заражения у животных выявляли специфические телментальные (лат. *tegumentalis* – покровный) очаги поражения слизистой оболочки поверхности наружных половых органов, преддверия вла-

галища, влагалища. В периоде разгара клинических проявлений заболевания у подопытных свинок регистрировали следующие признаки заболевания: отек и гиперемия уретры и наружных половых органов; везикулярную сыпь, экзантему, папулы, пустулы; эрозивные и эрозивно-язвенные очаги поражения, герпетические корочки; выделения из влагалища; нарушение резорбции влагалищного содержимого слизистой оболочкой влагалища. Указанные симптомы ОГТИ оценивали в баллах в виде как отдельных симптомов, так и симптомокомплекса, исходя из оценки: 1 признак – 1 балл. Эффективность лечения оценивали по изменению специфических проявлений клинических признаков заболевания, локализованных на гениталиях самок.

**Гистологические исследования.** Изучали морфофункциональные особенности яичников морских свинок экспериментальных 2-й и 3-й групп в стадии обострения РГТИ. Обострение РГТИ моделировали через 1 год после разрешения первого эпизода ОГТИ, вызванного внутривагинальным введением вируса. Обострение инициировали однократным (10 мин) УФ-облучением животных по методу Stanberg [11]. В период обострения инфекции животных усыпляли парами хлороформа, вскрывали и одновременно забирала яичники для гистологического исследования.

**Методы гистологического анализа.** Для светоптического исследования яичники фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, обезживали в спиртах восходящей концентрации, заливали в парафин, готовили серийные гистологические срезы толщиной 4 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином и анализировали в световом микроскопе Axiostar plus («Zeiss»). В основу морфометрического анализа положена классификация овариальных фолликулов на примордиальные, допустные, полостные и преовуляторные. Для обозначения фолликулов с морфологически сохранной структурной оболочкой и половых клеток использовали термин «здоровый», принятый в современной литературе. Морфометрический анализ был основан на методических рекомендациях С. Б. Стефанова [12] и результатах исследований Н. В. Шевлягиной и соавт. [13, 14] и заключался в маркировании и подсчете фолликулов на компьютерных изображениях серийных срезов яичников. Функциональное состояние яичников морских свинок оценивали по изменениям фолликулогенеза (как основного физиологического процесса гонад) и морфологического статуса стромы яичников, представленной интерстициальной соединительной тканью, сосудами, внутрияичниковой сетью.

**Статистика.** Расчет среднего квадратического отклонения каждой варианты в отдельной группе и оценку достоверности различий средних величин проводили с использованием критерия Стьюдента.

#### Результаты и обсуждение

При изучении эффективности ППФ против герпетической инфекции (ВПГ-2) определяли изменение клинической картины заболевания у животных, леченных только ППФ, и у животных, получавших этот препарат в комплексе с АЦ. В целом, как видно из таблицы, степень клинических проявлений у всех животных, леченных ППФ и/или АЦ (2, 3 и 4-я группы), оставалась в той или иной мере ниже этого показателя в контрольной, не получавшей

Количество объективных признаков (симптомов) заболевания у морских свинок, зараженных ВПГ-2 и получавших ППФ и/или АЦ с целью лечения

День наблюдения (от момента заражения)	Количество клинических признаков (симптомов), выявленных у морских свинок*			
	1-я группа	2-я группа	3-я группа	4-я группа
	контроль вируса	ППФ	ППФ + АЦ	АЦ
3-й	2,3 ± 0,29	1,2 ± 0,73	0,6 ± 0,25	1,5 ± 0,41
4-й	3,8 ± 0,25	1,8 ± 0,66	1,6 ± 0,45	2,0 ± 0,50
5-й	4,8 ± 0,48	4,2 ± 0,79	3,0 ± 0,98	4,0 ± 0,29
6-й	4,8 ± 0,58	4,4 ± 0,37	3,8 ± 0,68	4,3 ± 0,65
7-й	4,5 ± 0,75	3,6 ± 0,68	3,4 ± 0,46	2,5 ± 0,50
8-й	4,5 ± 0,71	3,2 ± 0,24	2,2 ± 0,25	2,5 ± 0,63
9-й	3,3 ± 1,32	3,6 ± 0,39	0,4 ± 0,39	3,3 ± 1,32
10-й	1,8 ± 1,6	3,0 ± 0,39	0	3,8 ± 1,32
11-й	2,8 ± 0,86	3,0 ± 0,24	0,2 ± 0,2	3,8 ± 1,03
14-й	0	0,6 ± 0,39	0,8 ± 0,25	3,5 ± 1,19
18-й	1,0 ± 0,58	0,8 ± 0,38	0	0

Примечание. \* — среднее арифметическое значение определяемого показателя (количество симптомов) в группах с указанием стандартной ошибки средних.

лечение группе (1-я) до 8-го дня наблюдения включительно. При этом максимальное число характерных для герпесвирусной инфекции симптоматических признаков у животных в группах, получавших лечение, проявлялось на 6-й день после заражения (4,4, 3,8 и 4,3 соответственно), тогда как у животных в контрольной группе (1-я) признаки (симптомы) заболевания проявлялись в большей степени уже в первые дни заболевания и после достижения максимальных (4,8) значений к 5-му дню присутствовали у них до 8-го дня наблюдения. Следует отметить, что динамика развития инфекционного процесса у животных сформированных экспериментальных групп различалась. В частности, при индивидуальном использовании АЦ для лечения животных (4-я) динамика развития инфекционного процесса характеризовалась снижением и подъемом числа симптоматических признаков до 14-го дня наблюдения и далее и двумя пиками активности процесса (на 5 – 6-й и 10 – 11-й дни). В

случае индивидуального применения ППФ число объективных симптомов болезни у животных после достижения максимальных значений (4,4 на 6-й день) снижалось постепенно, несколько превышая этот показатель в контрольной группе с 8-го до 14-го дня болезни. Особое внимание обращает на себя динамика проявления симптомов заболевания, вызванного ВПГ-2, в группе животных, леченных одновременно ППФ и АЦ (3-я группа). Клинические признаки инфекции в этой группе проявлялись постепенно, в течение всего периода заболевания оставались ниже контрольных показателей, а достигнув максимального (3,8) значения на 6-й день с момента манифестации заболевания, сразу же проявляли тенденцию к снижению. На 10-й день болезни объективные симптомы заболевания у животных этой группы отсутствовали. На основании изложенного выше мы предполагаем, что в случае совместного применения ППФ и АЦ (3-я группа) эффект подавления инфекционного процесса у экспериментальных животных инициируется препаратом АЦ, а фактором, определяющим динамику подавления инфекционного процесса и соответственно исход заболевания, является ППФ.

На втором этапе исследования (через год после первичного эпизода инфекции и соответственно проведенного лечения указанными препаратами) оценивали морфофункциональный статус яичников морских свинок 2-й и 3-й групп в стадии обострения УФ-индуцированной РГТИ. Контролем служили яичники инфицированных нелеченных животных в стадии обострения (1-я группа) и яичники здоровых неинфицированных морских свинок (5-я группа). Результаты наружного осмотра и сравнительного гистологического анализа яичников морских свинок 2-й группы, получавших ППФ, позволили говорить о намечающейся положительной тенденции в течении обострения по сравнению с нелечеными морскими свинками (1-я группа). У всех пяти морских свинок 2-й группы балльная оценка специфических признаков в области наружных гениталий не превышала 2 баллов, отсутствовали эрозивные изменения кожи и слизистой оболочки. В яичниках двух из пяти свинок регистрировалась достоверно более высокая сохранность общей популяции здоровых фолликулов (по сравнению с яичниками ин-

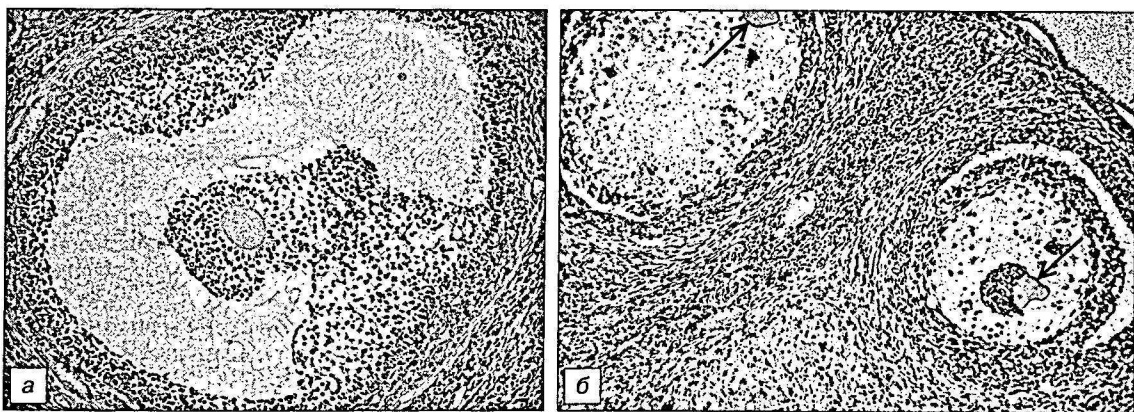


Рис. 1. Полостные фолликулы: здоровый преовуляторный фолликул в яичнике морской свинки 3-й группы (а); полостные фолликулы в яичнике морской свинки 1-й группы: лейкоцитарная инфильтрация оболочек, погибающие овоциты (стрелки) (б).

Ув.: а – об. 40 × ок. 10; б – об. 20 × ок. 10. Здесь и на рис. 2 окраска (а и б) гематоксилином и эозином.

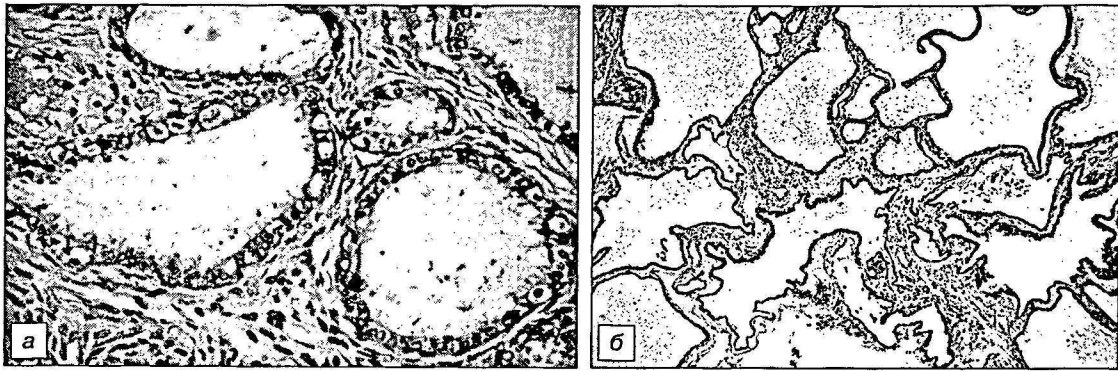


Рис. 2. Внутряичниковая сеть: общий вид канальцев внутряичниковой сети у морской свинки 3-й группы (отсутствие реактивного расширения канальцев) (а); реактивное расширение канальцев внутряичниковой сети у морской свинки 1-й группы с многокамерным кистообразованием (б).

Ув.: а – об. 100 × ок. 10; б – об. 10 × ок. 10.

фицированных нелеченых животных 1-й группы), присутствовали отдельные полостные фолликулы без признаков лейкоцитарной инфильтрации оболочек, характерной для полостных фолликулов животных 1-й группы, отсутствовали признаки интерстициального отека, реактивного расширения канальцев внутряичниковой сети (по сравнению с кистозно-измененной сетью в яичниках животных 1-й группы). В яичнике одной морской свинки обнаружено свежесформированное желтое тело – свидетельство завершеного фолликулогенеза и состоявшейся овуляции. У остальных трех свинок 2-й группы зарегистрированы кистообразование из полостных фолликулов с лейкоцитарной инфильтрацией оболочек, умеренно выраженные признаки интерстициального отека, реактивное расширение сосудов и канальцев внутряичниковой сети.

Особый интерес представили результаты гистологического анализа яичников морских свинок, получивших при первом эпизоде генитальной герпесвирусной инфекции комплексное лечение ППФ и АЦ (3-я группа). Как и во 2-й группе (ППФ), балльная оценка изменений наружных гениталий в период обострения РГГИ у всех животных не превышала 1–2 баллов, эрозивные изменения кожи и слизистой оболочки наружных гениталий отсутствовали. Общая численность здоровых фолликулов в яичниках всех животных, хотя и была ниже среднего показателя в яичниках неинфицированных здоровых животных (5-я группа), однако превышала этот показатель в яичниках инфицированных нелеченых морских свинок (1-я группа), а также животных, получавших только ППФ (2-я группа). В яичниках трех свинок 3-й группы, помимо полостных фолликулов без признаков лейкоцитарной инфильтрации оболочек, находились здоровые преовуляторные фолликулы (рис. 1, а, б), у двух животных – свежесформированные желтые тела. В строме яичников всех морских свинок 3-й группы отсутствовали гистологические признаки отека и воспаления, реактивного расширения внутряичниковой сети (рис. 2, а, б). В совокупности это указывает на достаточно выраженный положительный эффект сочетанного применения ППФ и АЦ при лечении первого эпизода генитальной герпесвирусной инфекции.

Таким образом, на основании полученных резуль-

татов наружного осмотра животных экспериментальных 2-й и 3-й групп и гистологического анализа их яичников можно говорить об определенном позитивном эффекте применения противовирусных препаратов. Это наглядно подтверждают значительно менее выраженные специфические проявления в области входных ворот инфекции по сравнению с нелечеными животными в комплексе с положительной динамикой морфофункциональных показателей яичников, отмеченной у части животных этих групп в период обострения РГГИ 1 год спустя. Наиболее позитивный прогноз в плане возможных обострений РГГИ, очевидно, дает сочетанное применение ППФ и АЦ в лечении первого эпизода инфекции. Об этом свидетельствуют выявленные гистологические показатели физиологической сохранности фолликулогенеза, отсутствия воспаления и реактивных изменений внутряичниковой сети в яичниках более чем у половины животных 3-й группы по сравнению с животными, получавшими только ППФ. Разница в реакции яичников животных в пределах каждой из рассмотренных экспериментальных групп, по всей вероятности, связана с индивидуальными особенностями организма животных, в первую очередь с состоянием их иммунной системы и региональных защитных механизмов.

#### Заключение

Полученные данные показали, что ППФ эффективен при экспериментальном генитальном герпесе, особенно при совместном применении с АЦ. Результатом комплексного лечения первичного эпизода инфекции (ОГГИ) ППФ и АЦ является значительное снижение активности инфекционного процесса и сокращение его продолжительности. Указанное сочетание препаратов, использованное при лечении первичного эпизода инфекции, оказывает и более выраженное позитивное отдаленное влияние на морфофизиологию яичников: при индуцированном обострении РГГИ у большинства животных наблюдается сохранение физиологического течения фолликулогенеза и отсутствие воспалительных реактивных изменений в строме яичников.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Hemming F.W. Ch. 4. Glycosyl Phosphopolyprenols. In: H. Wiegandt, ed. *Glycolipids*. Amsterdam – Netherlands: Elsevier Science Publishers B.V.; 1985; 10: 261–305.



2. Григорьева Н.Я., Моисеенков А.М. Физиологическая активность полиизопреноидов. *Химико-фармацевтический журнал*. 1989; 23(2): 144.
3. Blanc M., Hsieh W.Y., Robertson K.A., Watterson S., Shui G., Paul Lacaze P. et al. Host defense against viral infection involves interferon mediated down-regulation of sterol biosynthesis. *PLOS Biol.* 2011; 9 (3): 1–19. Available at: <http://www.plosbiology.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pbio.1000598> (accessed 08 Mar 2011).
4. Наровлянский А.Н., Васильев А.Н., Савойская С.Л., Иванова А.М., Измest'eva A.B., Данилов Л.Л. и др. Система изопреноидов: роль в противовирусном иммунитете. *Ведомости научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2007; 3: 66–78.
5. Danilov L.L., Maltsev S.D., Deyeva A.V., Narovlyansky A.N., Sanin A.V., Ozherelkov S.V. et al. Phosprenyl: a novel drug with antiviral and immunomodulatory activity. Mini-review. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. 1996; 44(5–6): 395–400.
6. Санин А.В., Ганшина И.В., Судына Г.Ф., Санина В.Ю., Коженикова Т.Н., Пронин А.В. и др. Фосфорилированные полипренолы – новый класс соединений с противовоспалительной и бронхолитической активностью. *Инфекция и иммунитет*. 2011; 1(4): 355–60.
7. Ожерелков С. В., Белоусова Р. В., Данилов Л. Л., Деева А. В., Мальцев С. Д., Наровлянский А. Н. и др. Препарат фоспренил подавляет размножение вирусов диарей и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота в чувствительных культурах клеток. *Вопросы вирусологии*. 2001; 5: 43–5.
8. Наровлянский А.Н., Березина Л.К., Веткова Л.Г., Степанова Т.Н., Савойская С.Л., Зубашев И.К. и др. Лечение герпесвирусных инфекций с помощью препаратов полипренолов. *Ветеринарная Клиника*. 2005; 2: 16–20.
9. Васильев А.Н., Ожерелков С.В., Козлов В.В., Пронин А.В., Санин А.В., Парфенова Т.М. и др. Противовирусная и иммуномодулирующая активность полипренилфосфатов при вирусных инфекциях. *Антибиотики и химиотерапия*. 2008; 53(3–4): 3–8.
10. Наровлянский А.Н., Дерябин П.Г., Седов А.М., Санин А.В., Пронин А.В. Противовирусная активность полипренилфосфатов при экспериментальной инфекции, вызванной вирусом гепатита С in vitro. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2012; 5: 80–4.
11. Stanberry L.R., Kern E.R., Richards J.T., Abbott T.M., Overall J.C. Jr. Genital herpes in guinea pigs: pathogenesis of the primary infection and description of recurrent disease. *J. Infect. Dis.* 1982; 146(3): 397–404.
12. Стефанов С.Б. Окулярная вставка для полных стереологических измерений микроскопических объектов. *Цитология*. 1974; 16(1): 1439–41.
13. Шевлягина Н.В. *Морфологическая характеристика яичников морских свинок в экспериментальной модели рецидивирующего генитального герпеса*: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. М.; 2008.
14. Шевлягина Н.В., Иванова А.М., Боровая Т.Г., Диденко Л.В., Березина Л.К., Наровлянский А.Н. и др. Морфо-функциональные изменения яичников морских свинок в экспериментальной модели хронической герпес-вирусной инфекции. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2008; 8: 254–60.

## REFERENCES

1. Hemming F.W. Ch. 4. Glycosyl Phosphopolyrenols. In: H. Wiegandt, ed. *Glycolipids*. Amsterdam – Netherlands: Elsevier Science Publishers B.V.; 1985; 10: 261–305.
2. Grigor'eva N.Ya., Moiseenkov A.M. Physiological activity of polyisoprenoids. *Химико-фармацевтический журнал*. 1989; 23(2): 144. (in Russian)
3. Blanc M., Hsieh W.Y., Robertson K.A., Watterson S., Shui G., Paul Lacaze P. et al. Host defense against viral infection involves interferon mediated down-regulation of sterol biosynthesis. *PLOS Biol.* 2011; 9 (3): 1–19. Available at: <http://www.plosbiology.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pbio.1000598> (accessed 08 Mar 2011).
4. Narovlyanskiy A.N., Vasil'ev A.N., Savoyskaya S.L., Ivanova A.M., Izmet'seva A.V., Danilov L.L. et al. Isoprenoid system: its role in antiviral immunity. *Vedomosti nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya*. 2007; 3: 66–78. (in Russian)
5. Sanin A.V., Ganshina I.V., Sud'ina G.F., Sanina V.Yu., Kozhevnikova T.N., Pronin A.V. et al. Phosphorylated polyrenols - A new class of compounds with anti-inflammatory and bronchodilatory activity. *Infektsiya i immunitet*. 2011; 1(4): 355–60. (in Russian)
7. Ozherelkov S.V., Belousova R.V., Danilov L.L., Deyeva A.V., Mal'tsev S.D., Narovlyanskiy A.N. et al. Phosprenyl inhibits the proliferation of the bovine virus diarrhea and the infectious bovine rhinotracheitis virus in susceptible cell cultures. *Voprosy virusologii*. 2001; 5: 43–5. (in Russian)
8. Narovlyanskiy A.N., Berezina L.K., Vetkova L.G., Stepanova T.N., Savoyskaya S.L., Zubashev I.K. et al. Treatment of herpesvirus infections by means of polyrenols. *Veterinarnaya Klinika*. 2005; 2: 16–20. (in Russian)
9. Vasil'ev A.N., Ozherelkov S.V., Kozlov V.V., Pronin A.V., Sanin A.V., Parfenova T.M. et al. Antiviral and immunomodulatory activity of Polyprényl phosphates during viral infections. *Antibiotiki i khimioterapiya*. 2008; 53(3–4): 3–8. (in Russian)
10. Narovlyanskiy A.N., Deryabin P.G., Sedov A.M., Sanin A.V., Pronin A.V. Antiviral activity of Polyprényl phosphates during experimental infection with the hepatitis C virus in vitro. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2012; 5: 80–4. (in Russian)
11. Stanberry L.R., Kern E.R., Richards J.T., Abbott T.M., Overall J.C. Jr. Genital herpes in guinea pigs: pathogenesis of the primary infection and description of recurrent disease. *J. Infect. Dis.* 1982; 146(3): 397–404.
12. Stefanov S.B. Ocular insert for total stereological measurements of microscopic objects. *Tsitologiya*. 1974; 16(1): 1439–41. (in Russian)
13. Shevlyagina N.V. Morphological Characteristics of the Ovaries of Guinea Pigs in an Experimental Model of Recurrent Genital Herpes. Diss. Moscow; 2008. (in Russian)
14. Shevlyagina N.V., Ivanova A.M., Borovaya T.G., Didenko L.V., Berezina L.K., Narovlyanskiy A.N. et al. Morphological and functional changes in the ovaries of guinea pigs in an experimental model of chronic herpes virus infection. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2008; 8: 254–60. (in Russian)

Поступила 20.08.13



Баринский И. Ф., Гребенникова Т. В., Альховский С. В., Кочергин-Никитский К. С., Сергеев О. В.,  
Грибенча С. В., Раев С. А.

## Молекулярно-генетическая характеристика вируса, выделенного от больных острым энцефаломиелитом человека и множественным склерозом

Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского ФГБУ «ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи»  
Минздрава России, 123098, г. Москва

Изучение антигенной и молекулярно-генетической структуры вируса острого энцефаломиелита человека (ОЭМч) показало высокое сходство гена N данного вируса с гомологичным геном фиксированного вируса бешенства. Результаты анализа нуклеотидной последовательности свидетельствуют о принадлежности вируса ОЭМч к генотипу 1 лиссавирусов. Последовательность гена N вируса ОЭМч наиболее близка к таковым штаммов ERA-CB20-M и RV-97 вируса бешенства. Наличие вируснейтрализующих антител (ВНА) к вирусу ОЭМч у 6% доноров крови в США и у 1/3 больных рассеянным склерозом, обследованных А. К. Шубладзе и соавт., указывает на необходимость дальнейших исследований роли вируса ОЭМч в патологии человека.

**Ключевые слова:** вирус острого энцефаломиелита человека; рассеянный склероз; фиксированный вирус бешенства; вируснейтрализующие антитела; филогенетический анализ.

**Для цитирования:** Вопросы вирусологии. 2015; 60(4): 14–18.

Barinsky I.F., Grebennikova T.V., Alkhovsky S.V., Kochergin-Nikitsky K.S., Sergeyev O. V., Gribench S.V., Raev S.A

### Molecular genetic characteristics of the virus isolated from patients with human acute encephalomyelitis and multiple sclerosis

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", 123098, Moscow, Russia

The study of the antigenic and molecular genetic structure of human acute encephalomyelitis virus (HAEV) showed a high similarity of the HAEV N gene with the homologous gene of the fixed rabies virus strain. The results of the nucleotide sequence analysis indicate that HAEV belongs to the lyssavirus genotype 1. The N gene sequence is the closest to those of the ERA-CB20-M and RV-97 strains of the rabies virus. The need for further research into the role of the human acute encephalomyelitis virus in human pathology stems from past surveys that revealed the presence of the VNAs against this virus in 6 per cent of the blood received from donors in the USA and in each third among the patients with multiple sclerosis in the former USSR.

**Key words:** human acute encephalomyelitis virus (HAEV); multiple sclerosis; fixed rabies virus; virus neutralizing antibodies (VNAs); phylogenetic analysis.

**Citation:** Voprosy virusologii. 2015; 60(4): 14–18. (In Russ.)

**For correspondence:** Oleg Sergeev, MD, PhD; e-mail: osergeyev123@gmail.com

Received 29.05.14

### Введение

Штаммы вируса острого энцефаломиелита человека (ОЭМч) были впервые выделены в 1942 г. из крови больных [1]. В дальнейшем идентичные штаммы вируса ОЭМч выделены из спинномозговой жидкости больных множественным склерозом (МС) [1]. Свойства вируса ОЭМч были детально изучены А. К. Шубладзе и соавт. [1]. Вирус ОЭМч отнесен к семейству Rhabdoviridae, определены его сходство с уличным и фиксированным вирусами бешенства и признаки, отличающие его от этих вирусов.

В исследованиях В. Н. Бычковой и соавт. [1] по выделению и изучению 9 штаммов вируса ОЭМч установлено, что этот вирус выделяется из спинномозговой жидкости и крови больных рассеянным склерозом, что практически не доказано для уличного и фиксированного вирусов бешенства. Заболевание у животных, вызванное вирусом ОЭМч, сопровожда-

ется поражением белого вещества мозга (демиелинизация) и развитием хронических форм с ремиссиями и обострениями, проявляющимися парезами и атаксией, и отличается длительностью течения (от 2 до 5 мес у мышей и от 2 до 12 мес у птиц).

Заслуживает специального внимания тот факт, что при признаваемой большинством исследователей полиэтиологической природе МС у 28% больных МС, обследованных авторами, выявлены в высоком титре вируснейтрализующие антитела (ВНА), хотя никто из них не получал прививку против бешенства. Следует также отметить, что у этой 1/3 серопозитивных к вирусу ОЭМч больных МС в стадии обострения В. Н. Бычковой и соавт. выявлена активация специфических реакций клеточного иммунитета к вирусу ОЭМч.

Все это предопределило проведение специальных молекулярно-биологических исследований, посвященных генетической характеристике штаммов ви-

руса ОЭМч в сравнении с уличным и фиксированным вирусами бешенства.

### Материалы и методы

**Вирусные штаммы.** Использовали штамм «Резник» вируса ОЭМч, выделенного А. К. Шубладзе в 1959 г. Вирус получен из государственной коллекции вирусов РФ при ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава России в виде лиофилизированной мозговой суспензии. Вирус прошел 29 мозговых пассажей на 6 - 7-граммовых мышках-сосунках. Титр вируса при внутримозговом заражении составлял  $5,5 \lg \text{ЛД}_{50}/0,03 \text{ мл}$ . Этот вирус был использован для инфицирования культуры клеток ВНК-21. Клетки получали из музея культур клеток ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» и выращивали на среде DMEM с добавлением 5% сыворотки эмбриона телят при  $37^\circ\text{C}$  в атмосфере 5%  $\text{CO}_2$ . На этой культуре были проведены 2 пассажа. Титр вируса в культуральной жидкости составил  $6 \lg \text{ЛД}_{50}/\text{мл}$ . Параллельно на этой культуре проводили 3 серийных пассажа фиксированного вируса бешенства штамма ERA-CB20-M, полученного С. В. Грибенчей и соавт. благодаря новому принципу селекции вируса из популяции штамма ERA [2]. Титр этого штамма вируса составил  $6,33 \text{ТСГО}_{50}/\text{мл}$ . Оба штамма были выделены из 100 мл культуральной жидкости методом ультрацентрифугирования.

Штаммом «Резник» были заражены беспородные белые мыши интрацеребрально в дозе 50 - 100  $\text{ЛД}_{50}$ . На 5 - 7-й день после заражения все мыши заболели паралитическим энцефалитом. Титр вируса в мозге мышшей варьировал в пределах  $10^{7,3} - 10^{7,7} \text{ЛД}_{50}$ . Из ткани мозга мышшей, заболевших паралитическим энцефалитом, делали срезы, а также отпечатки. После высушивания препараты (отпечатки головного мозга) фиксировали в ацетоне при  $-20^\circ\text{C}$ . На 2-е сутки фиксированные препараты на стеклах окрашивали прямым методом иммунофлюо-

ресценции с использованием моноклональных антител 2e11 [2]. Структуру и размер специфических включений определяли в люминесцентном микроскопе.

**Выделение РНК.** Суспензию очищенного вируса ОЭМч смешивали с равным объемом реагента TRIzol («Life Technology», США). Далее выделяли РНК согласно прилагаемой инструкции производителя. Конечный осадок РНК растворяли в 100 мкл дистиллированной воды, обработанной DEPC. Концентрацию РНК измеряли с помощью флуориметра Qubit («Invitrogen», США).

**Подготовка ДНК-библиотек и секвенирование.** Для получения кДНК около 100 нг РНК фрагментировали в 15 мкл реакционной смеси для обратной транскриптазы с гексапраймером при  $85^\circ\text{C}$  в течение 5 мин, после чего помещали в лед. К фрагментированной РНК добавляли 200 ед. фермента RevertAid Premium («Thermo Scientific», США) и 20 ед. ингибитора РНКаз RNAsine («Promega», США), инкубировали при  $25^\circ\text{C}$  10 мин, далее при  $42^\circ\text{C}$  в течение 60 мин. Реакцию останавливали прогреванием при  $70^\circ\text{C}$  в течение 10 мин. Синтез второй цепи кДНК проводили с помощью набора NEBNext mRNA Second Strand Synthesis Module («NEB», США) в соответствии с инструкцией. Полученную дцДНК очищали, используя набор MinElute PCR Purification Kit («QIAGEN», Германия), на автоматической станции QIAcube.

Для получения ДНК-библиотек из дцДНК использовали набор TruSeq DNA Sample Prep Kits v2 («Illumina», США) в соответствии с инструкцией. Для селекции ДНК по размеру применяли реагент Ampure XP («Beckman Coulter», США) с расчетом получения ДНК-библиотек длиной более 270 нуклеотидных оснований (н. о.), что соответствует размеру вставки около 150 н. о. Данные требования к размеру ДНК-библиотек связаны с использованием для секвенирования набора, позволяющего секвенировать не более

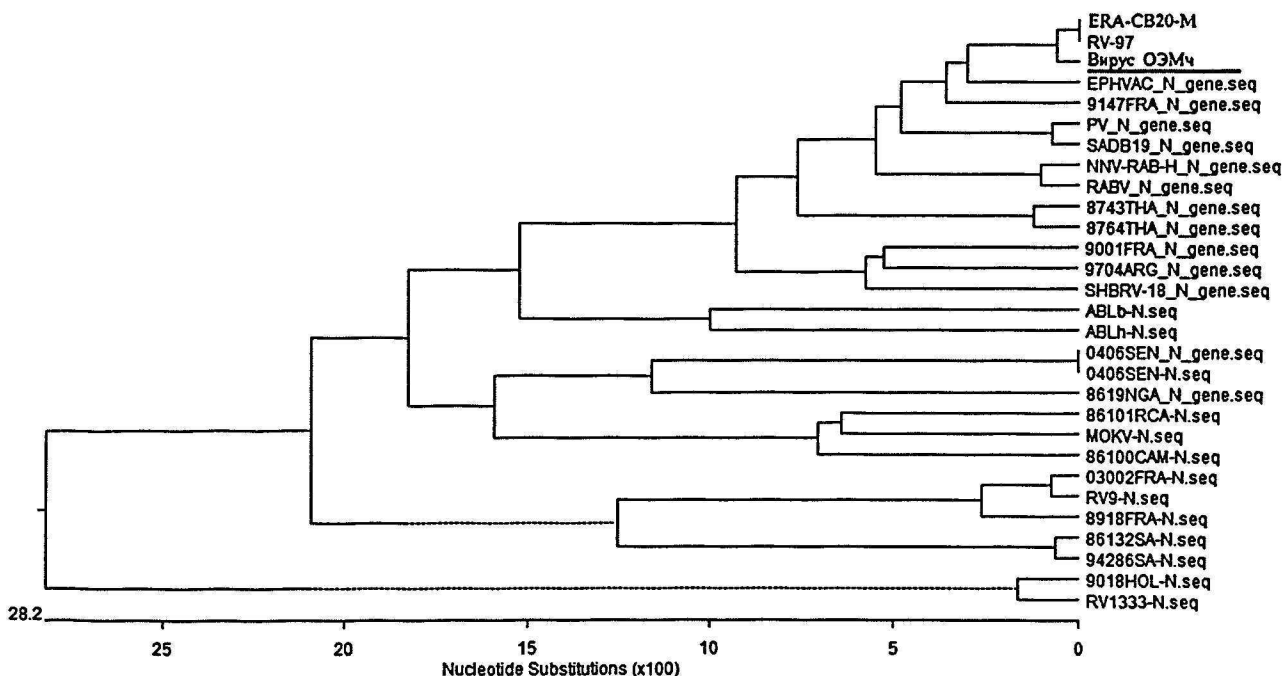


Рис. 1. Первичная структура гена N лиссавирусов и вируса ОЭМч.

Первичная структура генома вирусов бешенства штамма ERA-CB20-M и ОЭМч штамма «Резник»

Штамм	Позиция (нумерация от ATG гена N)					
	51	135	171	186	255	369
ERA-CB20-M	A	A	A	T	T	A
«Резник»	G	G	G	C	G	G
Аминокислотная замена	-	-	-	-	C→W	-

150 н. о. в одну сторону. Полученные библиотеки визуализировали на станции автоматического электрофореза QIAxcel Advanced System («QIAGEN», Германия). Молярность полученных библиотек измеряли с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени (2x SsoFast EvaGreen Supermix («BioRad», США), прибор Bio-Rad CFX1000) согласно рекомендациям, изложенным в руководстве Sequencing Library qPCR Quantification Guide («Illumina», США).

Секвенирование ДНК-библиотек проводили на приборе MiSeq («Illumina», США), используя набор MiSeq Reagent Kits v2 (300PE) в соответствии с инструкцией производителя.

**Биоинформационный анализ.** Обработку данных полногеномного секвенирования, сборку контигов и картирование ридов проводили с помощью программы CLC Genomics Workbench 6.0 («CLC Bio», США). Предварительный поиск гомологичных последовательностей осуществляли, используя сервис BLASTX (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Для анализа нуклеотидных и аминокислотных последовательностей использовали пакет программ Lasergene Core Suite («DNAs-tar», США). Последовательности сравнивали методом множественного выравнивания по алгоритму ClustalW. Филогенетический анализ и построение дендрограмм проводили с использованием программы MegaAlign версии 6.06 по методу ближнего соседа или максимального правдоподобия (maximum likelihood) с 100-кратным бутстрэп-тестированием.

### Результаты и обсуждение

На основании данных морфологии вириона вирус ОЭМч был отнесен к семейству Rhabdoviridae [1]. В данном исследовании были использованы наиболее релевантные методы классификации данного вируса, изучения его антигенной природы и филогенетического анализа генома.

Установлено, что специфичность моноклональных антител 2e11 в равной мере распространяется на оба использованных в работе вируса - ОЭМч (штамм «Резник») и бешенства ERA-CB20-M. Как известно, меченые ФИТЦ моноклональные антитела 2e11 связываются в непрямом и прямом иммунофлуоресцентном тесте с N-белком вирусов семейства Rhabdoviridae [2].

В наших дальнейших исследованиях анализировали первичную структуру гена N двух вирусов, вируса ОЭМч штамма «Резник» и фиксированного вируса бешенства штамма ERA-CB20-M (рис. 1). Затем проводили сравнение полного генома обоих вирусов и анализировали филогенетические отношения.

Определяли первичную структуру фрагмента гена N вируса ОЭМч, кодирующего нуклеокапсидный белок вириона. Полученные данные о нуклеотидной последовательности фрагмента гена N вируса ОЭМч сравнивали с данными гомологичной последовательности фиксированного вируса бешенства, а также

других штаммов вируса бешенства, взятых из работы O. Delmas и соавт. [4].

На рис. 1 представлена филогенетическая дендрограмма, построенная на основании последовательностей гена N вируса ОЭМч штамма «Резник» и фиксированного вируса бешенства штамма ERA-CB20-M. Показана наибольшая гомология гена N этих двух вирусов. В гене N вируса ОЭМч штамма «Резник» обнаружены 6 замен по сравнению с гомологичным фрагментом гена N штамма ERA-CB20-M вируса бешенства, все замены являются однонуклеотидными и одна из них приводит к аминокислотной замене (см. таблицу). Вместе с рядом других штаммов вируса бешенства они образуют генотип 1. Различия внутри генотипа 1 составляют не более 5%, от других генотипов он отличается на 15–20% (см. рис. 1). Для сравнения приведена внешняя группа, включающая изоляты RV1333 и 9018HOL, которая отличается от других генотипов более чем на 25%.

Анализ дендрограммы, представленной на рис. 2, показывает, что геном вируса ОЭМч штамма «Резник» имеет наибольшую гомологию с геномом фиксированного (вакцинного) вируса бешенства штамма RV-97 (98%), также относящегося к генотипу 1 вирусов семейства Rhabdoviridae.

МС является в настоящее время распространенным заболеванием в странах умеренного климата и регистрируется в 4,7 - 6,8% случаев среди всех органических поражений нервной системы. Вирусная этиология заболевания предполагается на основании результатов целой серии вирусологических исследований, в ходе которых были выделены вирусы семейств Herpesviridae, Rhabdoviridae, Paramyxoviridae и группы арбовирусов.

Относительно инapparантного течения рабической инфекции у человека данных очень мало [3]. При обследовании здоровых лиц в США ВНА к фиксированному вирусу бешенства обнаружены в низких титрах в 6% случаев у доноров, никогда не подвергавшихся вакцинации против бешенства [1].

Выпускаявшаяся на харьковском заводе биопрепаратов МЗ СССР инактивированная формалином мозговая крысиная вакцина из вируса ОЭМч (штамм «Резник») с успехом использовалась при внутримышечном введении как лечебная вакцина для профилактики рецидивов заболевания. Вакцина оказывала лечебное действие только у 1/3 больных рассеянным склерозом, у которых были обнаружены ВНА к вирусу ОЭМч и внутрикожная проба с вакциной давала положительный результат. Среди 56 лиц, страдающих другими заболеваниями ЦНС, положительная кожная проба наблюдалась лишь у 1 больного.

Таким образом, проведенное изучение молекулярно-генетической структуры вируса ОЭМч показало высокое сходство генома данного вируса с геномом фиксированного вируса бешенства штаммов ERA-CB20-M и RV-97. Результаты анализа последовательности с использованием программного обеспечения BLASTX свидетельствуют о его принадлежности к генотипу 1 лиссавирусов. Последовательность генома вируса ОЭМч штамма «Резник» наиболее близка к последовательности вируса бешенства штамма RV-97. Наличие ВНА у 6% доноров крови в США и у 1/3 больных рассеянным склерозом, обследованных А. К. Шубладзе и соавт. [1], указывает на необходимость дальнейших исследований роли вируса ОЭМч в патологии человека.

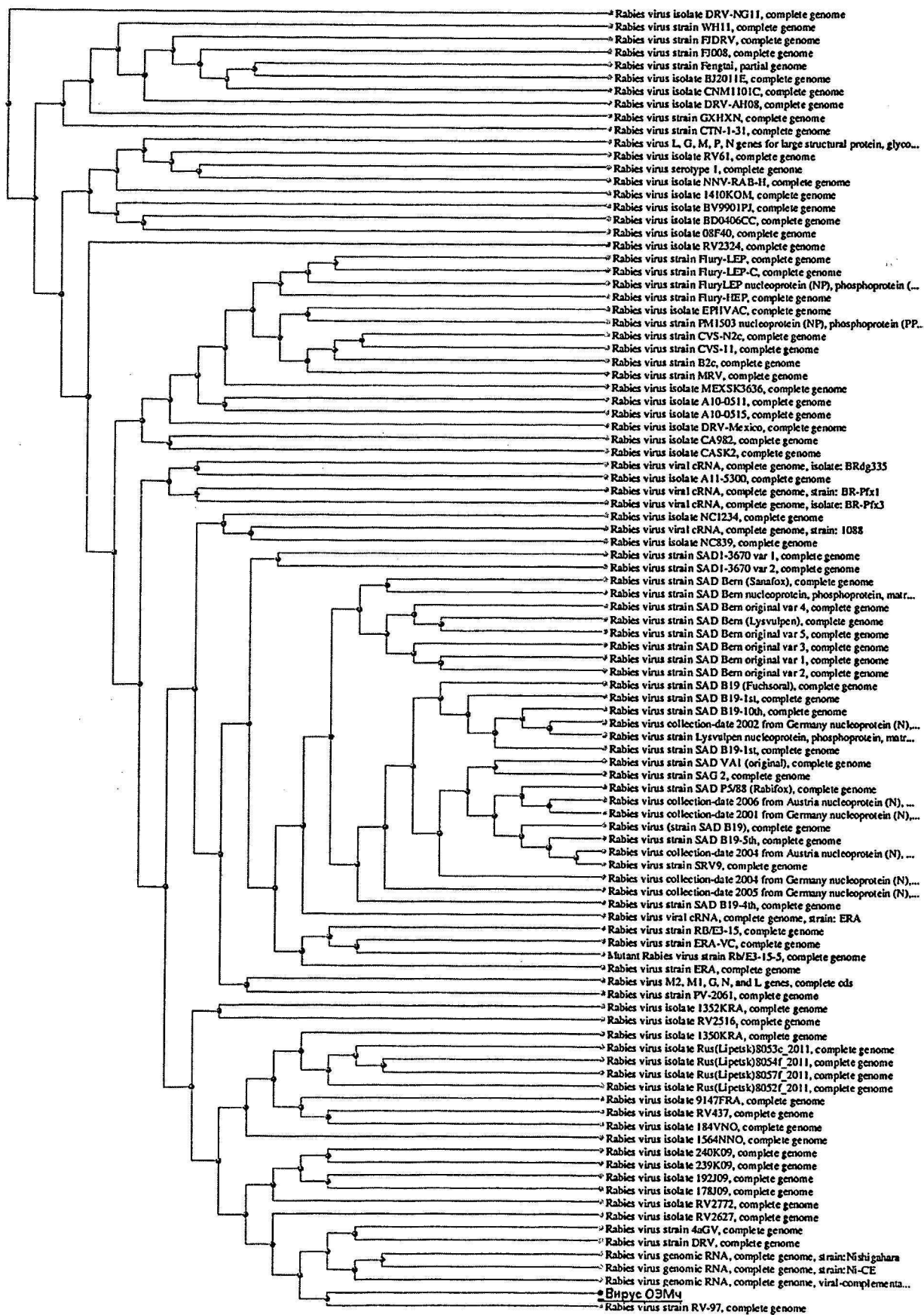


Рис. 2. Первичная структура полного генома лиссавирусов и вируса ОЭМч.



1. Баринский И.Ф., Шубладзе А.К. *Этиология хронических вирусных нейроинфекций*. М.: Медицина; 1984.
2. Гривенча С.В., Козлов А.Ю., Костина Л.В., Елаков А.Л., Лосич М.А., Цибезов В.В. и др. Получение моноклональных антител к нуклеопротеину вируса бешенства. *Вопросы вирусологии*. 2013; 58(5): 38–43.
3. Гривенча С.В., Львов Д.К. Бешенство. В кн.: Львов Д.К., ред. *Вирусы и вирусные заболевания человека и животных*. М.: Медицина; 2013: 811.
4. Delmas O., Holmes E.C., Talbi C., Larrous F., Dacheux L., Bouchier C., Bourhy H. Genomic diversity and evolution of the lyssaviruses. *PLoS One*. 2008; 3(4): e2057.

1. Barinskiy I.F., Shubladsze A.K. *Etiology of the Chronic Neuroinfections [Etiologiya Khronicheskikh Virusnykh Neyroinfektsiy]*. Moscow: Meditsina; 1984. (in Russian).
2. Gribencha S.V., Kozlov A.Yu., Kostina L.V., Elakov A.L., Losich M.A., Tsibezov V.V. et al. Obtaining of monoclonal antibodies against the rabies virus nucleoprotein. *Voprosy Virusologii*. 2013; 58(5): 38–43. (in Russian).
3. Gribencha S.V., L'vov D.K. Rabies. In: L'vov D.K., ed. *Viruses and Viral Diseases of Humans and Animals [Virusy i Virusnye Zabolevaniya Cheloveka i Zhivotnykh]*. Moscow: Meditsina; 2013: 811. (in Russian).
4. Delmas O., Holmes E.C., Talbi C., Larrous F., Dacheux L., Bouchier C., Bourhy H. Genomic diversity and evolution of the lyssaviruses. *PLoS One*. 2008; 3(4): e2057.

Поступила 29.05.14

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 615.371:579.841.931.012.6:578.832.1.083

Садикалиева С. О.<sup>1</sup>, Султанкулова К. Т.<sup>1</sup>, Шораяева К. А.<sup>1</sup>, Строчков В. М.<sup>1</sup>, Червякова О. В.<sup>1</sup>, Зайцев В. Л.<sup>1</sup>, Табынов К. К.<sup>1</sup>, Сандыбаев Н. Т.<sup>1</sup>, Сансызбай А. Р.<sup>1</sup>, Егоров А. Ю.<sup>2</sup>

## Генетическая стабильность HA-, NA- и NS-генов рекомбинантного векторного вируса Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1), экспрессирующего бруцеллезный ген

<sup>1</sup>НИИ проблем биологической безопасности, 080409, пос. Гвардейский, Казахстан; <sup>2</sup>HSC Development GmbH, Тульн, Австрия

Сконструирован рекомбинантный штамм вируса гриппа Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1), экспрессирующий бруцеллезный ген *Omp16*, на основе технологии обратной генетики для создания векторной противобруцеллезной вакцины. Полученный рекомбинантный штамм является генетически стабильным. Стабильность подтверждена сравнительным анализом нуклеотидных последовательностей HA-, NA- и NS-генов рекомбинантного векторного вируса Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1), экспрессирующего ген *Omp16* (GenBank: AAA59360.1) *Brucella abortus*. Сравнительный генетический анализ показал, что нуклеотидная последовательность гена NS 1-го и 5-го пассажных уровней вируса Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) на 100% соответствует исходному участку 12AAS2TC\_124omp16g, содержащему химерный NS1-124-Omp16 в составе ДНК-плазмиды pHW2000. В результате сравнительного генетического анализа установлена 100% идентичность нуклеотидных последовательностей HA- и NA-генов 1-го и 5-го пассажных уровней рекомбинантного штамма Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) с генами HA и NA штамма A/AstanaRG/6:2/2009 (H5N1). Было показано, что рекомбинантный векторный вирус Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1), экспрессирующий бруцеллезный ген *Omp16*, сохраняет генетическую стабильность на протяжении 5 пассажей на 10-суточных развивающихся куриных эмбрионах (ПКЭ).

**Ключевые слова:** рекомбинантный векторный вирус; бруцеллезный ген; гемагглютинин; нейраминидаза; неструктурный белок; полимеразная цепная реакция; генетический анализ.

Для цитирования: Вопросы вирусологии. 2015; 60(4): 18–23.

Sadikaliyeva S.O., Sultankulova K.T., Shorayeva K.A., Strochkov V.M., Chervyakova O.V., Zaitsev V.L., Tabynov K.K., Sandybayev N.T., Sansyzbay A.R., Egorov A.Yu.

### Genetic stability of the HA, NA, and NS genes of the recombinant vector virus Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) expressing the brucellar gene

<sup>1</sup>Scientific-Research Institute of Biological Safety Problems, 080409, Gvardeiskiy, Kazakhstan; <sup>2</sup>HSC Development GmbH, Tulln, Austria

The recombinant strain Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) of the influenza virus expressing the brucellar *Omp16* gene was constructed on the basis of the technology of reverse genetics for the purpose of developing vector anti-brucellosis vaccine. The obtained recombinant strain is a genetically stable construction. This stability is confirmed by the comparative analysis of the nucleotide sequences of the HA, NA, and NS genes of the recombinant vector virus Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) expressing the *Omp16* gene of the *Brucella abortus* (GenBank: AAA59360.1). The comparative analysis showed that the nucleotide sequence of the NS gene of the first and the fifth passage level of the Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) virus corresponded for 100% to the initial part of 12AAS2TC\_124 Omp16g containing the chimera NS1-124-Omp16 in the composition of DNA (deoxyribonucleic acid) plasmids pHW2000. Total identity with HA and NA genes of the strain A/AstanaRG/6:2/2009 (H5N1) was shown by the comparative analysis of the nucleotide sequences of HA and NA genes of the first and the fifth passage level of the recombinant strain Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1). The recombinant vector virus Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) expressing the brucella *Omp16* gene maintains the genetic stability during 5 passages in 10-day developing chicken embryos.

**Key words:** recombinant vector virus; brucellosis gene; hemagglutinin; neuraminidase; non-structural protein; PCR (polymerase chain reaction); genetic analysis.

Citation: Voprosy virusologii. 2015; 60(4): 18–23. (In Russ.)

For correspondence: Sandugash Sadikaliyeva, Junior research fellow; e-mail: t.m.tlenchieva@mail.ru

Received 11.03.14

Для корреспонденции: Садикалиева Сандугаш Оразбековна, мл. науч. сотр.; e-mail: t.m.tlenchieva@mail.ru

## Введение

Важнейшим и перспективным методом борьбы с бруцеллезной инфекцией является иммунопрофилактика. По данным Объединенного комитета экспертов ФАО, бруцеллез сельскохозяйственных животных распространен практически во всем мире [1, 2].

Противобруцеллезные вакцины имеют существенные недостатки, к которым относятся абортгенность, непродолжительный иммунитет и неэффективная защита против данной инфекции. С целью устранения этих недостатков разрабатываются новые вакцины против бруцеллеза, такие как ДНК-вакцины, векторные вакцины. В связи с этим сотрудниками НИИПББ с помощью методов обратной генетики сконструирован модифицированный по NS-гену рекомбинантный векторный вирус гриппа A Flu-NS1-124-Omp16 антигенного подтипа H5N1, несущий бруцеллезный ген.

Концепция гриппозного вектора основана на получении методом обратной генетики рекомбинантных штаммов вируса гриппа с модифицированными по длине геном NS. Белок NS1 - один из факторов патогенности вируса, ответственный за подавление врожденного иммунитета хозяина и позволяющий вирусу гриппа успешно реплицироваться на фоне подавленной системы интерферона (ИФН). Удаление белка NS1 ведет к abortивной репликации вируса из-за активации широкого круга противовирусных факторов и формирования противовирусного статуса в клетках [3-6].

У рекомбинантного штамма вируса гриппа A Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1), несущего бруцеллезный ген в качестве донора гемагглютинина (HA) и нейраминидазы (NA), использован вакцинный штамм A/AstanaRG/6:2/2009 (H5N1), который является реассортантом высокопатогенного вируса гриппа A/chicken/Astana/6/2005 (H5N1) и A/Puerto Rico/8/34 (H1N1). Была внесена мутация в сайт протеолитического расщепления HA штамма A/chicken/Astana/6/2005 (H5N1) (GenBank: FJ390028.1) путем удаления аминокислотного мотива RRRK [7, 8].

Установлено, что полученный рекомбинантный векторный вирус Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) является эффективным вектором для доставки бруцеллезного гена *Omp16* в организм иммунизируемых животных. Рекомбинантный гриппозный вектор Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) рекомендуется использовать в качестве кандидата для создания вакцины, обеспечивающий формирование противобруцеллезного иммунитета [9].

Целью данной работы был анализ генов NA, HA и NS рекомбинантного векторного вируса Flu-NS1-124-Omp16 антигенного подтипа H5N1, несущего бруцеллезный ген *Omp16*.

## Материалы и методы

**Конструирование рекомбинантного векторного вируса Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1).** Синтез генетической конструкции, содержащей генетические сегменты PB2, PB1, PA, NP, M и NS вируса гриппа A/PR/8/34 (H1N1) (ID CY033578.1) и HA, NA вакцинного штамма A/AstanaRG/6:2/2009 (H5N1) вируса гриппа, проведен в двунаправленной экспрессионной плазмиде рНВ [10, 11].

Для создания векторной вакцины на основе вируса гриппа, стабильно синтезирующего белок бактерии бруцеллеза, была синтезирована ДНК-плаزمид рНВ 12AAS2TC\_124omp16g, содержащая рекомбинантный вирусный ген белка NS1 с последовательностью *Omp16* (GenBank: AAA59360.1). Генетическая конструкция синтезирована в компании «Gene Art Life Technologies», Австрия.

Рекомбинантный векторный вирус Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1), синтезирующий бруцеллезный

ген, был получен методом трансфекции плазидами сертифицированных клеток Vero при помощи методики Nucleofector™, «Lonza». Дефицитные по ИФН клетки Vero (Европейская коллекция клеточных культур) совместно трансфицированы с 0,5 мкг/мл плазидами, кодирующими гены PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M и NS. Трансфицированные клетки исследованы до появления цитопатического действия (ЦПД). После проявления ЦПД надосадочную жидкость центрифугировали при 300 g в течение 15 мин.

**Культивирование вирусов в куриных эмбрионах.** Куриные эмбрионы заражали суспензией вируса в аллантоисную полость и помещали в термостат для инкубации при 34°C в течение 48 ч. После инкубации куриные эмбрионы помещали в холодильник при -4°C для охлаждения. В качестве объекта исследований в работе использованы 1-й и 5-й пассажные уровни вируса Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) на 10-суточных развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ).

**Выделение РНК.** Вирусную РНК из вирусосодержащей суспензии выделяли с использованием набора QIAmp Viral RNA Mini Kit, «Qiagen».

**ПЦР-анализ.** Для наработки фрагментов кДНК использовали набор Super Script III One-Step RT-PCR with platinum Taq фирмы «Invitrogen». Амплификацию проводили с использованием термоциклера GeneAmp PCR System 9700, «Applied Biosystems». Параметры амплификации: наработка первой цепи кДНК - 45°C 60 мин, активация полимеразы при 94°C 2 мин, 5 циклов - 94°C 30 с, 45°C 30 с, 68°C 3 мин, 31 цикл - 94°C 30 с, 57°C 30 с, 68°C 3 мин, 68°C 7 мин. Олигонуклеотидные праймеры, используемые для амплификации HA-, NA- и NS-генов рекомбинантного векторного вируса A Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1), представлены в таблице.

**Секвенирование.** Определение первичной нуклеотидной последовательности проводили методом дидеокси-секвенирования с использованием набора Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit v 3.1 (ABI) на автоматическом 16-капиллярном секвенаторе Genetic Analyser 3130 xl, «Applied Biosystems» (США).

**Сравнительный компьютерный анализ.** Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей проведен с использованием компьютерных программ Vector NTI и MEGA 4.

## Результаты и обсуждение

Согласно литературным источникам, в профилактике бруцеллеза у животных определенное место принадлежит вакцинации [12]. Рекомбинантные вирусы являются кандидатами для производства современных вакцин [13, 14]. Для создания эффективных вакцин, кроме выбора оптимальных протективных факторов, необходима эффективная система доставки, обеспечивающая презентацию гена. В качестве такой системы используется один из аттенуированных штаммов вируса гриппа A/

Олигонуклеотидные праймеры, используемые для амплификации HA-, NA- и NS-генов рекомбинантного векторного вируса A Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1)

Ген	Праймер	Последовательность
HA	Sc-HA-f	TATTCGTCGAGCTCAGCAAAAGCAGGGG
	Bh-HA-r	ATAGGATCCCGTATTAGTAGAAACAAGGGTGTTTT
NA	Xb-NA-f	TATCTAGACAGGGAGCAAAAGCAGGAGT
	Hd-NA-r	ATAAAGCTTCGTATTAGTAGAAACAAGGAGTTTTT
NS	NS-f	AGCAAAAGCAGGGTGACAAAG
	NS-r	CTCTTGCTCCACTTCAAGC

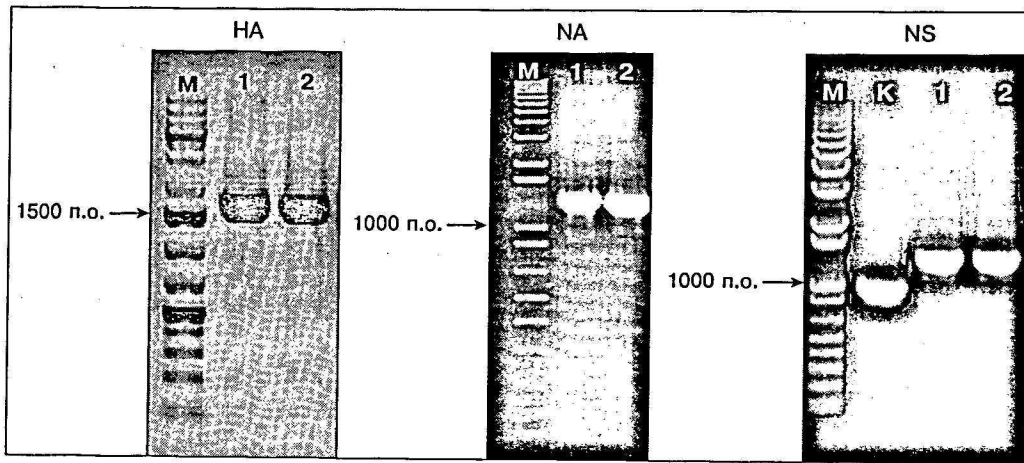


Рис. 1. Электрофоретический профиль разделения амплифицированных генов HA, NA и химерного гена NS рекомбинантного вируса Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) 1-го и 5-го пассажных уровней.

HA: M – маркер, «Fermentas»; 1 – HA (1710 п. о.) Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) 1-го пассажного уровня; 2 – HA (1710 п. о.) Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) 5-го пассажного уровня; NA: M – маркер, «Invitrogen»; 1 – NA (1490 п. о.) Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) 1-го пассажного уровня; 2 – NA (1490 п. о.) Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) 5-го пассажного уровня; NS: M – маркер, «Invitrogen»; K – NS A/PR/8/34 (H1N1); 1 – NS (1280 п. о.) Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) 1-го пассажного уровня; 2 – NS (1280 п. о.) Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) 5-го пассажного уровня.

Puerto Rico/8/34 (H1N1). Для получения рекомбинантного штамма вируса гриппа А, экспрессирующего бруцеллезный ген *Omp16* (GenBank: AAA59360.1), связанный с открытой рамкой считывания гена *NS1*, в качестве исходного штамма был выбран A/Puerto Rico/8-NS1-124 с модифицированным по длине геном *NS*, кодирующим 124 аминокислоты N-терминальной области белка.

Рекомбинантный вирус Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) сконструирован путем котрансфекции культуры клеток Vero, затем адаптирован к 10-суточным ПКЭ. Для подтверждения генетической стабильности генов *NA*, *HA* и *NS* было проведено 5 дополнительных пассажей рекомбинантного вируса Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1), экспрессирующего бруцеллезный ген *Omp16*.

При создании эффективной вакцины против бруцеллеза немаловажную роль играет идентификация иммуногенных белков. Известно, что при иммунизации мышей белком *Omp16* у них наблюдается повышение активно-

сти цитотоксических лимфоцитов CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, а также Т-клеток [15, 16]. Исходя из этого, в данной работе в качестве бруцеллезного агента был выбран белок *Omp16*, который характеризуется как иммуногенный и защитный антиген. *Omp16* является белком наружной мембраны, представляет собой липопротеин и содержится во всех шести видах и известных биоварах бактерии *Brucella*.

Для проведения генетического анализа были наработаны гены *HA*, *NA* и *NS* 1-го и 5-го пассажных уровней рекомбинантного вируса Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1). Результаты амплификации представлены на рис. 1.

На данном рисунке представлены отдельные полосы HA-, NA- и NS-сегментов рекомбинантного вируса Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) с химерной конструкцией NS1, содержащей вставку нуклеотидной последовательности гена *Omp16*. Из-за вставки в гене *NS1* бруцеллезного агента *Omp16* ген NS рекомбинантного вируса отличается от гена *NS* вируса гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)

1	GTGCACTCC GAAAGTGGGG GGGAGCAAAA GCAGGGTGAC AAAGACATAA TGGATCCAAA CACTGTGTCA HindIII SAGCTGGAGG STTCAACCCC CCCTCGTTTT CGTCCSACTG TTCTGTATT ACSTAGGTTT GTGACACAGT TCGAAAAGTCC ATCTAACGAA AGAAAACCGTA
101	GTCCGCAAA GAGTTGCAGA CCAAGAATA GGTGATGCC CATTCCTGA TCGGCTTCGC CGAGATCAGA AATCCCTAAG AGGAAGGGGC AGCACCCTCG CAGGCCTTTG STCAACGTCT GGTCTTGTAT CCACTACGGG GTAAGGAAC AGCCGAAGCG GCTCTAGTCT TTAGGGATTG TCCTTCCCGG TCGTGGGAGC
201	GTCTGGACAT CGAGACAGCC ACACGTGCTG GAAAGCAGAT AGTGGAGCGG ATTCTGAAA GAAATCCGA TGAGGCACCT AAAATGACCA TGGCCCTGTG CAGACSTGTA GCTCTGTCCG TGTGCACGAC STTTCGTCTA TCACCTCGCC TAAGACTTTC TTCTTAGGCT ACTCCGTGAA TTTTACTGGT ACCGGAGACA
301	ACCTGCGTCG CGTTACSTAA STGACATGAC TCTTGAGGAA ATGTCAAAGG AGTGGTCCAT GCTCATACC AAGCAGAAA TGGCAGGGCC TCTTTGTATC TGGACGCAGC GCAATGGATT GACTGTACTG AGAAGCTTAT TACAGTTCCT TCACCAGGTA CGAGTATGGG TTCGCTTTC ACCGTCGGG AGAAAACATAG
401	AGAATGGACC AGGCGATCAT GGGAGGATG AGAAGATTG AATCAATAGC AAGATCCCA ATAGCAATAG CACTTTTCAT GTCACTTCCA GTGGCAGGAT TCTTACSTGG TCCGCTAGTA CCCTCCCTAC TCTTCTTAAG TTAGTTATCG TTCTAGTGGT TATCGTTATC GTGAAAAGTA CAGTGAACGT CACCGTCTTA
501	GGCCATCAAA AAGAATCTT CCAACAATG CAGGGGATCT TGGACTTGA GCAGGGGCAG CAACACCAGG ATCATCAAA GATTTCACAG TGAATGTGGG CGCGTAGTTT TTTCTTAGAA GGTTTGTTAC GTCCCTTAGA ACCTGAACCT GGTCCCGGTC GTTGTGGTCC TAGTAGTGT CTAAAGTGTG ACTTACACCC
601	AGATAGAATA TTCTTGGATC TTGATTATC ACITATAAGA GCAGATGCAC AACAAACACT TTCAAAACAA GCAGATGGC TTCAAAGATA TCCACAATAT TCTATCTTAT AAGAAGCTAG AACTAAGTAG TGAATATTCT GGTCAAGGTG TTGTTTGTGA AAGTTTGTG CGTGTTACCG AAGCTTCTAT AGGTCTTATA
701	TCAATTCAAA TAGAAGGACA TGACAGTAG AGAGGAACA GAGAGTATAA TCTTCCACTT GGACAAGAA GGGCAGGAGC AACAAAGAGAT TTCCTTGCAT AGTTAATGTT ATCTTCTGT ACGTCTACTG TCTCCTTGT CTCTCATATT AGAACGTGA CCTGTTTCTT CCCGTCGTCG TTGTTCTCTA AAGGAACGTA
801	CAAGAGGGGT GCCAACAAAT AGAATGAGAA CAATATCATA TGGAAAACGAA AGACCACTGG CAGTGTGGCA CGCAGACACA TGCTGGTCA AGAATAGAAG GTTCTCCCA CCGTTGTTA TCTTACTCTT GTTATAGTAT ACCTTTGCTT TCTGGTCACC GTCACAGCT GCGTCTGTGT AGGACAGTGT TCTTATCTTC
901	GGCAGTGACA GTGCTTAATG GGGCTGGAAG ATGATAATAA GCGGCCGC CCCTCACTGT CAGGAATTAC CCGACCTTC TACTATTATT CCGCGCCG

Рис. 2. Нуклеотидная последовательность NS1 гена рекомбинантного вируса Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1).



	78	80	90	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
12AAS2TC_124Omp16g	78	AGGTAGATTGCTTTTGGCAATGTCGCGAAACAGTTCAGACASSAGAACTAGCTGATGCGCCCATTCCTGATCGGCTTCGGCCGAGATCCGAAATCCSTAAAGAGAGGGGGAGCCACCCCTCGGCTTCGGA												
NS1-124-Omp16 (H5N1) 1p	43	AGGTAGATTGCTTTTGGCAATGTCGCGAAACAGTTCAGACASSAGAACTAGCTGATGCGCCCATTCCTGATCGGCTTCGGCCGAGATCCGAAATCCSTAAAGAGAGGGGGAGCCACCCCTCGGCTTCGGA												
NS1-124-Omp16 (H5N1) 5p	43	AGGTAGATTGCTTTTGGCAATGTCGCGAAACAGTTCAGACASSAGAACTAGCTGATGCGCCCATTCCTGATCGGCTTCGGCCGAGATCCGAAATCCSTAAAGAGAGGGGGAGCCACCCCTCGGCTTCGGA												
Consensus	78	AGGTAGATTGCTTTTGGCAATGTCGCGAAACAGTTCAGACASSAGAACTAGCTGATGCGCCCATTCCTGATCGGCTTCGGCCGAGATCCGAAATCCSTAAAGAGAGGGGGAGCCACCCCTCGGCTTCGGA												

Рис. 3. Сравнительный анализ NS1 гена рекомбинантного вируса Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) 1-го и 5-го пассажных уровней с исходной конструкцией 12AAS2TC\_124omp16g.

DNA Sequences	Translated Protein Sequences
NA_A/chicken/Astana/6/2005(FJ390028..1)	*** **
NA_A/AstanaRG/6:2/2009 (H5N1)	*** **
NA_Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) 1p	*** **
NA_Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) 5p	*** **

Рис. 4. Выравнивание нуклеотидных последовательностей NA штаммов вируса гриппа A/chicken/Astana/6/05(H5N1) (GenBank: FJ390028..1), A/AstanaRG/6:2/2009 (H5N1) и рекомбинантного вируса Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) 1-го и 5-го пассажных уровней.

DNA Sequences	Translated Protein Sequences
NA_FJ390029..1 A/chicken/Astana/6/2005	*** **
NA_A/AstanaRG/6:2/2009 (H5N1)	*** **
NA_Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) 1p	*** **
NA_Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) 5p	*** **

Рис. 5. Выравнивание нуклеотидных последовательностей NA штамма вируса гриппа A/chicken/Astana/6/05 (H5N1) (GenBank: FJ390029..1), A/AstanaRG/6:2/2009 (H5N1) и рекомбинантного вируса Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) 1-го и 5-го пассажных уровней.

дикого типа (К), увеличенным размером (1280 пар оснований (п. о.)), что было подтверждено результатами электрофореза в агарозном геле продуктов амплификации кДНК. Размеры полученных сегментов NA (1490 п. о.), NA (1710 п. о.) соответствуют размерам цельных сегментов генома вируса гриппа, описанных в литературе [17].

Известно, что делеция NS1-гена критична для репродукции вируса, так как приводит к неполноценной репликации в генетически компетентных организмах. Однако вирусы гриппа, утратившие NS1, могут размножаться в ИФН-дефицитных клеточных линиях, подобных клеткам *Vero*, накапливаясь до титров, сравнимых с титрами вирусов дикого типа. Исследования показали, что в отличие от вирусов с полностью удаленным геном NS полученные штаммы не утрачивают способность к репродукции в ИФН-компетентных клетках, что связано с присутствием N-терминального РНК-связывающего домена в белке NS1 и частичным сохранением функции белка как антагониста системы ИФН I типа [3, 18].

Было проведено секвенирование нуклеотидной последовательности гена NS1 рекомбинантного вируса Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1). Полученная нуклеотидная последовательность представлена на рис. 2.

Как видно из рис. 2, нуклеотидная последовательность гена NS1 рекомбинантного вируса имеет вставку нуклеотидной последовательности гена бруцеллезного белка *Omp16* размером 503 п. о., расположенного между нуклеотидными позициями 429 и 932.

При создании вакцины немаловажную роль играет генетическая стабильность рекомбинантного вируса. Для этого оценивали стабильность NS-гена 1-го и 5-го пассажных уровней рекомбинантного вируса Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) с использованием компьютерной программы Vector NTI. Результаты сравнения нуклеотидных последовательностей этих пассажных уровней рекомбинантного вирусного гена NS, содержащего последовательность *Omp16 Brucella abortus* с исходным участком 12AAS2TC\_124Omp16g в ДНК-плазмиде pHW2000, приведены на рис. 3.

Сравнительный генетический анализ показал, что степень сходства химерного гена NS рекомбинантного штамма 1-го и 5-го пассажных уровней вируса Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) на 100% соответствует исходному участку 12AAS2TC\_124Omp16g, содержащему рекомбинантный вирусный ген белка NS1 с последовательностью *Omp16* в составе ДНК-плазмиды pHW2000. Таким образом, нуклеотидная последовательность NS-гена 5-го пассажного варианта штамма Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) не претерпевает каких-либо изменений по сравнению с исходной конструкцией и 1-м пассажным уровнем.

При создании рекомбинантного штамма Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) в качестве донора NA и NA использован штамм A/AstanaRG/6:2/2009 (H5N1). Данный штамм был получен методом обратной генетики и представляет собой реассортант высокопатогенного штамма вируса гриппа A/chicken/Astana/6/2005 (H5N1) и виру-



са гриппа A/Puerto Rico/8/34. Так как штамм A/chicken/Astana/6/2005 (H5N1) является высокопатогенным и имеет сайт протеолитического расщепления HA с мотивом повторяющихся аминокислот, была внесена мутация в этот участок путем удаления аминокислотного мотива RRRK [7, 8].

Сегмент HA рекомбинантного вируса имеет последовательность, совпадающую с модифицированным сайтом расщепления сегмента HA вируса гриппа A/AstanaRG/6:2/2009 (H5N1) (рис. 4).

Секвенирование и последующий сравнительный анализ последовательности гена, кодирующего HA вируса гриппа A/chicken/Astana/6/05 (H5N1) (GenBank: FJ390028.1), A/AstanaRG/6:2/2009 (H5N1) и рекомбинантного вируса Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) 1-го и 5-го пассажных уровней, подтвердили наличие модификации в сайте расщепления гена HA, т. е. в нуклеотидной последовательности рекомбинантного вируса Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) участок нуклеотидной последовательности, отвечающий за патогенность, отсутствует. Таким образом, HA вируса гриппа A/AstanaRG/6:2/2005 (H5N1) и рекомбинантного штамма Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) 1-го и 5-го пассажных уровней идентичны на 100%.

На рис. 5 показаны результаты сравнения гена NA рекомбинантного вируса со штаммом A/chicken/Astana/6/05 (H5N1) (GenBank: FJ390029.1) и A/AstanaRG/6:2/2009 (H5N1).

Сравнительный анализ нуклеотидной последовательности гена NA 1-го и 5-го пассажных уровней рекомбинантного вируса Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) с генами NA штаммов A/chicken/Astana/6/05 (H5N1) (GenBank: FJ390029.1) и A/AstanaRG/6:2/2009 (H5N1) показал, что они не имеют никаких замен в нуклеотидных последовательностях, т. е. идентичны.

В последние годы использование обратной генетики, основанной на применении плазмид, содержащих кДНК-копии фрагментов вирусного генома, позволяет конструировать вакцинные штаммы вируса гриппа путем котрансфекции культуры клеток *Vero*. Метод позволяет исключить риск контаминации вакцинного штамма посторонними инфекционными агентами из неконтролируемых биологических материалов. Указанная технология дает возможность вводить в геном вируса гриппа (посредством сайт-специфического мутагенеза) мутации и делеции, которые придают вирусу полезные свойства высокопродуктивного и аттенуированного штамма, а также вставки чужеродных нуклеотидных последовательностей, кодирующие протективные белки, что обеспечивает создание векторной вакцины [19–21].

Предназначенные для производства вакцинные штаммы вируса гриппа должны соответствовать по антигенной структуре гемагглютинину и нейраминидазе вирусов, доминирующих в Республике Казахстан.

### Заключение

Сравнительный генетический анализ показал, что нуклеотидная последовательность гена NS 1-го и 5-го пассажных уровней вируса Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) на 100% соответствует исходному участку 12AAS2TC\_124Omp16g, содержащему химерный вирусный ген белка NS1 с последовательностью *Omp16* (GenBank: AAA59360.1) *Brucella abortus* в составе ДНК-плазмиды pHW2000.

В ходе сравнительного генетического анализа установлена 100% идентичность нуклеотидных последовательностей HA- и NA-генов 1-го и 5-го пассажных уровней рекомбинантного штамма Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) с генами HA и NA штамма A/AstanaRG/6:2/2009 (H5N1).

Для рекомбинантного вируса Flu-NS1-124-Omp16

(H5N1) была продемонстрирована высокая генетическая стабильность. Секвенирование генов HA, NA и NS этого вируса после 5 пассажей на 10-суточных РКЭ показало отсутствие мутаций в данных генах.

Использование в качестве вакцины рекомбинантного аттенуированного вируса гриппа Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1), несущего бруцеллезный ген *Omp16*, может служить перспективным подходом в решении задач разработки нового поколения противобруцеллезных вакцин.

### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1–6, 10–11, 13–21 с.м. REFERENCES)

- Строчков В.М., Червякова О.В., Султанкулова К.Т., Мамадалиев С.М., Зайцев В.Л., Шораева К.А. и др. Рекомбинантные штаммы A/AstanaRG/6:2/2009 и A/AstanaRG/5:3/2009 вируса гриппа, полученные методом обратной генетики. В кн.: *Материалы международной конференции «Современное состояние генетики в Казахстане»*. Алматы; 2010; 63–5.
- Игнатъева А.В., Руднева И.А., Тимофеева Т.А., Шилов А. А., Забережный А.Д., Алипер Т.И. и др. Высокопродуктивный вирус-реассортант, содержащий гемагглютинин и нейраминидазу пандемического вируса гриппа A/MOSCOW/01/2009 (H1N1). *Вопросы вирусологии*. 2011; 56 (4): 9–14.
- Готкина Т.М., Рыскельдинова Ш.Ж., Асанжанова Н.Н., Кыдырбаев Ж.К., Кожамкулов Е.М., Инкарбеков Д.И. и др. Возможность использования морских свинок как модельных животных для изучения иммунобиологических свойств рекомбинантных вирусов гриппа А, экспрессирующих бруцеллезные белки L7/L12 и Omp16. В кн.: *Материалы международной научной конференции молодых ученых «Инновационное развитие науки в обеспечении биологической безопасности»*. Гвардейский; 2013; 47–54.
- Ставицкий С.Б., Носков А.Н., Кравченко Т.Б. Молекулярная вакцина для профилактики бруцеллеза. Патент РФ № 2285538, 2006.

### REFERENCES

- Racloz V., Schelling E., Chitnis N., Roth F., Zinsstag J. Persistence of brucellosis in pastoral systems. *Rev. Sci. Tech.* 2013; 32 (1): 61–70.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (2010). *Brucella melitensis* in Eurasia and the Middle East. Proc. FAO technical meeting in collaboration with WHO and OIE, May 2009, Rome. FAO Animal Production and Health Proceedings No. 10. FAO, Rome. Available at: [www.fao.org/docrep/012/i1402e/i1402e00.pdf](http://www.fao.org/docrep/012/i1402e/i1402e00.pdf) (Accessed on 5 April 2013).
- Egorov A., Brandt S., Sereinig S., Romanova J., Ferko B., Katinger D. et al. Transfectant influenza A viruses with long deletions in the NS1 protein grow efficiently in Vero cells. *J. Virol.* 1998; 72(8): 6437–41.
- Fernandez-Sesma A. The influenza virus NS1 protein: inhibitor of innate and adaptive immunity. *Infect. Disord. Drug Targets.* 2007; 7(4): 336–43.
- Ferko B., Stasakova J., Romanova J., Kittel C., Sereinig S., Katinger H. et al. Immunogenicity and protection efficacy of replication-deficient influenza A viruses with altered NS1 genes. *J. Virol.* 2004; 78: 13037–45.
- Garcia-Sastre A., Biron C.A. Type 1 interferons and the virus-host relationship: a lesson in detente. *Science.* 2006; 312: 879–82.
- Strochkov V.M., Chervyakova O.V., Sultankulova K.T., Mamadaliev S.M., Zaytsev V.L., Shoraeva K.A. et al. Recombinant strains A/AstanaRG/6: 2/2009 and A/AstanaRG/5: 3/2009 influenza virus obtained by reverse genetics. In: *Proceedings of International Conference "Current Status of Genetics in Kazakhstan."* [Материалы международной конференции «Современное состояние генетики в Казахстане»]. Алматы; 2010; 63–5. (in Russian)
- Ignat'eva A.V., Rudneva I.A., Timofeeva T.A., Shilov A. A., Zaberzhnyy A.D., Aliper T.I. et al. A highly reassortant containing the hemagglutinin and neuraminidase pandemic influenza A/MOSCOW/01/2009 (H1N1). *Voprosy virusologii.* 2011; 56 (4): 9–14. (in Russian)
- Gotskina T.M., Ryskel'dinova Sh.Zh., Asanzhanova N.N., Kydyrbaev Zh.K., Kozhamkulov E.M., Inkarbekov D.I. et al. The possibility of using guinea pigs as an animal model for the study of immunobiological properties of recombinant influenza A viruses expressing brucellosis proteins L7/L12 and Omp16. In: *Proceedings of the International Conference of Young Scientists "Innovative Development of Science in Biological Safety."* [Материалы международной научной конференции молодых ученых «Инновационное развитие науки в обеспечении биологической безопасности»]. Гвардейский; 2013; 47–54. (in Russian)
- De Wit E., Spronken M.I., Bestebroer T.M., Rimmelzwaan G.F., Osterhaus A.D., Fouchier R.A. Efficient generation and growth of influenza virus A/PR/8/34 from eight cDNA fragments. *Virus Res.* 2004; 103(1-2): 155–61.
- Hoffmann E., Neumann G., Kawaoka Y., Hobom G., Webster R.G.

- A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010; 97(11): 6108–13.
12. Stavitskiy S.B., Noskov A.N., Kravchenko T.B. Molecular Vaccine for Preventive Maintenance Brucellosis. Patent RF № 2285538, 2006. (in Russian).
  13. WHO Guidance on development of influenza vaccine reference viruses by reverse genetics. Available at: [whqlibdoc.who.int/hq/2005/WHO\\_CDS\\_CSR\\_GIP\\_2005.6.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2005/WHO_CDS_CSR_GIP_2005.6.pdf).
  14. Leclercq S., Harms J.S., Oliveira S.C. Enhanced efficacy of DNA vaccines against an intracellular bacterial pathogen by genetic adjuvants. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2003; 4: 99–107.
  15. Pasquevich K.A., Estein S.M., Garcia Samartino C., Zwerdling A., Coria L.M., Barrionuevo P. et al. Immunization with recombinant *Brucella* spp. outer membrane proteins Omp16 or Omp19 in adjuvant induces specific CD41 and CD81 T cells as well as systemic and oral protection against *Brucella abortus* infection. *Infect. Immun.* 2008; 77(1): 436–45.
  16. Luo D., Ni B., Li P., Shi W., Zhang S., Han Y. et al. Protective immunity elicited by a divalent DNA vaccine encoding both the L7/L12 and Omp16 genes of *Brucella abortus* in BALB/c mice. *Infect. Immun.* 2006; 74: 2734–41.
  17. Wang X., Li M., Zheng H., Muster T., Palese P., Beg A.A. et al. Influenza A virus protein prevents activation of NFK-B and induction of alpha/beta interferon. *J. Virol.* 2000; 74(24): 11566–73.
  18. Kochs G., Martinez-Sobrido L., Lienenklaus S., Weiss S., Garca-Sastre A., Staeheli P. Strong interferon-inducing capacity of a highly virulent variant of influenza A virus strain PR8 with deletions in the NS1 gene. *J. Gen. Virol.* 2009; 90 (12): 2990–4.
  19. Liu M., Zhang Y., Liu C.G., Pan W.Q., Liu C.N., Yang T. Generation of High-yield vaccine strain wholly derived from Avian Influenza Viruses by Reverse Genetics. *Chin. J. Biotech.* 2006; 22: 720–6.
  20. Stech J., Gam H., Wegmann M., Wagner R., Klenk H.D. A new approach to an influenza live vaccine: modification of the cleavage site of hemagglutinin. *Nat. Med.* 2005; 11(6): 683–9.
  21. Hoffmann E., Webster R. G. Unidirectional RNA polymerase I-polymerase II transcription system for the generation of influenza A virus from eight plasmids. *J. Gen. Virol.* 2000; 81(12): 2843–7.

Получена 11.03.14

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 616.921.5-036.1-074

Осидак Л. В., Гончар В. В., Волощук Л. В., Головачева Е. Г., Куликова Н. А., Дондурей Е. А., Афанасьева О. И., Суховецкая В. Ф., Милькин К. К., Образцова Е. В., Мушкатина А. Л., Коновалова Н. И., Писарева М. М., Гончарова Е. С., Галкина С. Н., Дринеvский В. П., Го А.

## Клинико-лабораторная характеристика гриппа А(Н1N1pdm2009) у детей и взрослых в период 2009 – 2013 гг. в Санкт-Петербурге

ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, 196237, г. Санкт-Петербург

Сравнительный анализ клинико-лабораторных показателей у 419 детей и 468 взрослых, госпитализированных по поводу гриппа А(Н1N1) до и в течение пандемического цикла 2009 - 2013 гг., показал, что клиническая картина пандемического гриппа у пациентов любого возраста, в том числе в постпандемический период, в целом типична для гриппа, а ее характер определяется вовлечением (или отсутствием такового) в процесс легких, причем частота развития пневмоний во все сравниваемые периоды статистически значимо более высокая среди взрослых, чем среди детей. При пандемическом гриппе статистически значимо чаще, чем при сезонном, регистрировали гипертермию ( $\geq 39^\circ\text{C}$ ), геморрагический и диспептический синдромы. Выявлен ряд различий основных характеристик клинической симптоматики пневмоний между выжившими и умершими пациентами с тяжелой формой пандемического гриппа. Установлены закономерности цитокиновых реакций у пациентов любого возраста в зависимости от выраженности интоксикации и наличия осложнений. Доказана лечебная эффективность включения противовирусных химиопрепаратов в комплексную терапию гриппа.

Ключевые слова: грипп А(Н1N1pdm2009); дети; пандемия; пневмония; особенность клинической картины.

Для цитирования: Вопросы вирусологии. 2015; 60(4): 23–28.

Osidak L.V., Gonchar V.V., Voloshuk L.V., Golovacheva E.G., Culikova N.A., Dondurey E. A., Afanasjeva O.I., Suhovezkaia V.F., Milkint K.K., Obratsova E.V., Mushkatina A.L., Konovalova N.I., Pisareva M.M., Goncharova E.S., Galkina S.N., Drinevsky V.P., Go A.

### Clinical and laboratory presentation of the influenza A (H1N1pdm 2009) in children and adults during the period of 2009-2013 in St. Petersburg

Research Institute of Influenza, 196237, St. Petersburg, Russia

Comparative analysis of the clinical laboratory data from 419 children and 468 adults hospitalized during the pandemic of A (H1N1pdm 2009) and pre- and post-pandemic periods (2010-2013) showed that the clinical presentation of the pandemic influenza in patients of all ages is generally typical for influenza, and its character is determined by the degree of involvement of lungs in the process. Besides, the incidence of pneumonia in adults is statistically significantly higher than in children. During all compared periods hyperthermia ( $\geq 39^\circ\text{C}$ ), hemorrhagic and dyspeptic syndrome were observed. Some differences in the main clinical manifestations of pneumonia in recovered patients and patients who died of the severe pandemic influenza were observed. The regularities of the cytokine reactions depending on the intensity of intoxication and occurrence of complications were determined in patients of all ages. Medical efficacy of inclusion of antiviral chemotherapeutic agents into complex influenza treatment was proved.

Key words: influenza (AH1N1pdm 2009); children; pandemic; pneumonia; peculiarity of clinical presentation.

Citation: *Voprosy virusologii.* 2015; 60(4): 23–28. (In Russ.)

For correspondence: Lyudmila Osidak, MD, PhD, DSc, prof.; e-mail: [Lvosidak@mail.ru](mailto:Lvosidak@mail.ru)

Received 17.03.14

Для корреспонденции: Осидак Людмила Викторовна, д-р мед. наук, проф.; e-mail: [Lvosidak@mail.ru](mailto:Lvosidak@mail.ru)

## Введение

По данным CDC, в пандемию гриппа 2009 г., во время которой было зафиксировано 18 499 летальных исходов, было вовлечено 214 стран по всему миру, при этом ее особенностью являлась высокая смертность среди лиц молодого возраста [1, 2]. Установлено, что в России 78,8% умерших от пандемического гриппа приходилось на возрастную группу 18–53 года, 5,8% составляли дети и только 2,4% – лица старше 65 лет [3, 4].

Если в сезоны, предшествующие пандемии гриппа 2009 г., в Европе господствовали штаммы вирусов гриппа А(Н3N2) и В, а вирус гриппа А(Н1N1) был незначительно представлен А(Н1N1)/Brisbane/59/2007, во втором полугодии 2009 г. стали доминировать штаммы вируса гриппа А(Н1N1pdm2009), подобные А(Н1N1)/California/7/2009, активно циркулировавшие и в сезон 2010–2011 гг., составляя 53% от всех выделенных вирусов гриппа [5].

Цель настоящей работы – анализ клинико-лабораторных показателей у детей и взрослых, госпитализированных по поводу гриппа А(Н1N1pdm2009) в течение пандемического цикла (2009–2013), в сравнении с данными, полученными ранее (2008–2009).

## Материалы и методы

Анализ клинико-лабораторных показателей осуществлен у 419 детей в возрасте от 1 мес до 17 лет и у 468 взрослых с верифицированным гриппом А(Н1N1), госпитализированных в базовые отделения ФГБУ «НИИ гриппа», а также у 39 пациентов (23 выживших и 16 умерших), находившихся в отделении реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ). Этиологию заболеваний устанавливали в материалах из носовых ходов и носоглотки методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени по протоколу CDC (Атланта, США) с наборами Ампли-Сенс Influenza virus A/H1N1-swine-FL (ФГУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора), а также методом вирусыведения (на культуре клеток MDCK и куриных эмбрионах) [6]. Сроки забора материалов для установления этиологии заболевания ограничивались 3 днями от начала появления первых симптомов.

Представлены результаты вскрытия взрослых пациентов, умерших от гриппа, обусловленного вирусом А(Н1N1pdm2009), которые сравнивали с данными, полученными ранее [7]. Наличие генетического материала вирусов гриппа А и В в тканях легких, трахеи, бронхов, селезенки и других органов определяли также методом ОТ-ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени.

Осуществлено сравнение цитокинового статуса (содержание в сыворотке крови ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-8, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-1 $\alpha$ , ИФН- $\alpha$  и ИФН- $\gamma$  и анти-ИФН- $\alpha$  у взрослых пациентов с верифицированным гриппом А(Н1N1pdm09), не осложненным и осложненным пневмонией). Указанные показатели определяли дважды: в 1–3-й день от начала заболевания (при поступлении в стационар) и через 7–10 дней (при выписке в связи с выздоровлением) иммуноферментным методом с использованием отечественных тест-систем производства ООО «Цитокин», Санкт-Петербург [8]. Учет результатов проводили с помощью автоматического фотометра для микропланшетов при длине волны 492 нм со стандартом без определяемого антигена в растворе. Количественную оценку результатов осуществляли методом построения калибровочной кривой с их учетом на спектрофотометре StatFax-2100 при длине волны для ИФН- $\alpha$  450 нм, для ИФН- $\gamma$  – 492 нм.

В соответствии с протоколом открытого сравнитель-

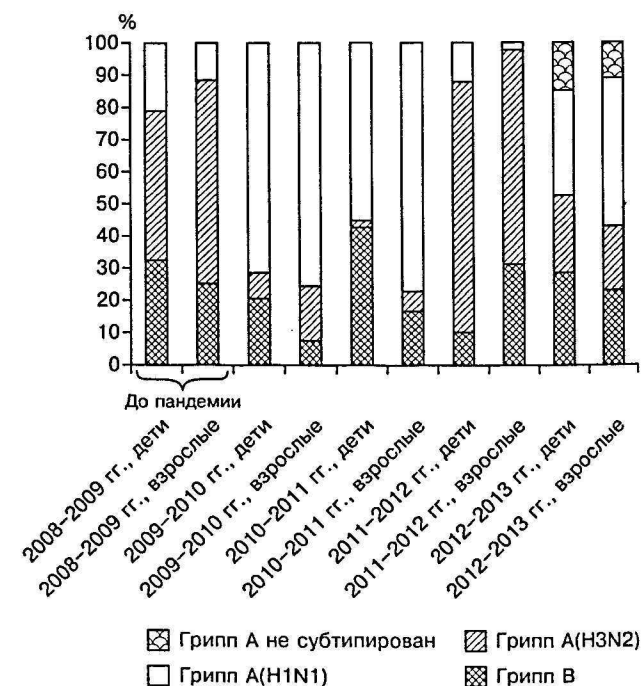
ного клинического исследования в параллельных группах от 02.12.2009 проведена сравнительная оценка эффективности комплексного лечения детей с верифицированным гриппом с включением этиотропных химиопрепаратов (озельтамивира – с 1 года, занамивира – с 5 лет или арбидола-умифеновира – с 3 лет) и терапии, не включавшей противовирусные препараты. Основными критериями включения пациентов в наблюдаемые группы являлись клинические симптомы гриппа и длительность заболевания до начала лечения (прием первой дозы препарата) не более 48 ч. В окончательной разработке оставались только пациенты с верифицированным гриппом А(Н1N1pdm2009).

Статистический анализ осуществлен с помощью пакета программ Statistica версии 5.5 [9].

## Результаты и обсуждение

Если в допандемический период (2008–2009) в этиологии заболевания у 185 детей и 183 взрослых, госпитализированных по поводу гриппа, доминировал вирус А(Н3N2), а вирус А(Н1N1) обнаруживался лишь в 20,8 и 11,5% случаев, во время пандемии и в первый постпандемический подъем заболеваемости 2010–2011 гг. наблюдалось статистически значимое преобладание вируса гриппа А(Н1N1pdm2009) (у 70,9% из 311 и у 54,9% из 180 обследованных детей, у 75,1% из 227 и у 76,8% из 260 взрослых соответственно). В сезон 2011–2012 гг. частота обнаружения вируса гриппа А(Н1N1pdm 2009) составила всего 11,8 и 2,1%, но в сезон 2012–2013 гг. его удельный вес вновь повысился до 31,1–36,5% случаев из 191 обследованного ребенка и 260 взрослых соответственно (см. рисунок).

Во время пандемии 2009 г. наибольшую группу госпитализированных пациентов по поводу гриппа А(Н1N1pdm2009) составили школьники 7–17 лет (53,3%) и взрослые 18–39 лет (76,4%), а доля пациентов в возрасте до 2 лет и старше 60 лет (27,6 и 2,3% соответственно) была статистически значимо ( $p < 0,05$  и  $p <$



Удельный вес возбудителей гриппа у детей и взрослых, госпитализированных по поводу верифицированного гриппа в 2009–2013 гг. (Санкт-Петербург).

Степень тяжести и частота осложнений при верифицированном гриппе типа А (H1N1)

Признак	Частота встречаемости в разные эпидемические периоды, абс/%							
	2008–2009 гг.		при гриппе А(H1N1pdm2009)					
	дети (n = 37)	взрослые (n = 20)	2009–2010 гг.		2010–2011 гг.		2012–2013 гг.	
			дети (n = 221)	взрослые (n = 170)	дети (n = 99)	взрослые (n = 185)	дети (n = 62)	взрослые (n = 93)
Степень тяжести:								
легкая	2/5,4	4/20,0	14/6,3	40/23,5**	6/6,1	13/7,0	7/11,2	22/23,6
среднетяжелая	34/91,9	14/75,0	201/90,9	108/63,5	89/89,9	158/85,4	54/86,8	70/75,3
тяжелая	1/2,7	1/5,0	6/2,7	22/12,9*,**	4/4,0	14/7,6*	1/1,6	1/1,1
Осложнения:								
ОСЛТ	6/19,3	0**	39/17,6	0**	20/20,2	0**	4/6,5	8/8,6
отит, синусит	3/9,7	1/5,0	23/10,4	8/4,7	8/8,1	7/3,8	12/19,3	0
бронхит	6/19,3	6/30,0	24/10,8	32/18,8*,**	12/12,1	39/21,1*,**	7/11,3	23/24,7
пневмония	1/2,7	4/20,0**	19/8,6	62/36,5***	5/5,1	43/23,2**	5/8,1	23/24,7**
ТЭЛА	0	0	0	0	0	1/0,6	0	0
миокардит, МКД	0	0	1/0,5	0	0	1/0,6	0	0

Примечание. n – число пациентов с гриппом А(H1N1) в группе; абс. – число пациентов с данным признаком; % – отношение абс. к n; ТЭЛА – тромбоэмболия легочной артерии; МКД – миокардиодистрофия; различия показателей статистически значимы: \* – по отношению к допандемическому периоду 2009 г., \*\* – по отношению к детям в группе.

0,005 соответственно) меньше, чем в предыдущие годы (43,9 и 21,4% соответственно), однако в эпидемические сезоны 2010–2011 и 2012–2013 гг. наблюдаемый детский контингент в возрасте до 2 лет составил уже 54,1 и 73,4%, а в возрасте 7–17 лет – всего 15,5 и 5,7% соответственно, но пациентов старше 60 лет среди госпитализированных больных было лишь 6,5 и 13,5%.

Частота тяжелых и осложненных форм заболевания гриппом А(H1N1pdm 2009) у детей была такой же, как и в допандемический период, преимущественно при развитии острых стенозирующих ларинготрахеитов (ОСЛТ) (табл.1). У взрослых пациентов статистически значимо чаще в пандемический и постпандемический периоды, как и в других исследованиях [2, 10, 11], развивались пневмонии.

Если в допандемический период тяжелую степень тяжести гриппа регистрировали только у пациентов с осложненным преморбидным фоном, то во время пандемии – в 1/3 случаев на фоне полного здоровья, при этом в 50% случаев эти пациенты нуждались в лечении в ОРИТ. Летальные исходы во все годы пандемического цикла регистрировали только у взрослых пациентов.

Клиническая картина пандемического гриппа у пациентов любого возраста в целом была типичной для данной инфекции, а ее характер определялся вовлечением в процесс (или отсутствием такового) легких. Практически у всех пациентов независимо от возраста наблюдались симптомы интоксикации в виде повышенной температуры тела до 38,5°C и более (в том числе у каждого третьего - четвертого пациента, как взрослого, так и ребенка, - гипертермия), слабости, головной и мышечных болей, озноба, потливости, режы (только у детей) возбуждения с бредом и судорогами. При пандемическом гриппе А(H1N1pdm2009) отмечено более частое развитие геморрагического синдрома (у взрослых пациентов преи-

мущественно в виде кровохарканья (34,1–14,5% против 13,1% случаев в более ранних наблюдениях), а у детей – носового кровотечения (14,5–7,1% против 3,3% случаев) и микрогематурии, определяемой лабораторно).

Умеренно выраженные катаральные явления в носоглотке наблюдались у всех пациентов, но при гриппе А(H1N1pdm2009) во время пандемии и в постпандемическом периоде статистически значимо чаще регистрировали сухой болезненный кашель (у взрослых в 96,4,

Таблица 2

Основные клинические и рентгенологические показатели у взрослых больных гриппом А (H1N1), осложненным пневмонией

Клинический признак	Частота встречаемости у пациентов с гриппом А (H1N1) в разные эпидемические периоды, абс/%		
	до пандемии (2006–2009 гг.) (n = 38)	при гриппе А(H1N1pdm2009)	
		2009–2010 гг. (n = 62)	2010–2011 гг. (n = 43)
Тяжелая степень тяжести	1/2,6	16/25,8*	14/32,5*
Температура тела $\geq 39^\circ\text{C}$	16/42,1	54/87,1*, **	31/72,1*
Мокрота с примесью крови	6/15,8	22/35,6*, **	7/16,3
ДН II–III степени	1/2,6	8/12,9*	8/18,6*
Сатурация кислорода крови $< 90\%$	1/2,6	8/12,9*	8/18,6*
Отсутствие мокроты	9/23,7	20/32,3	16/30,3
Объем поражения:			
одностороннее	29/76,4	28/45,2*, **	26/60,5*
двустороннее	9/23,6	34/54,8*, **	17/39,5*
Характер инфильтрации:			
очаговая	22/57,9	4/6,5*, **	15/34,9*
очагово-сливная	16/42,1	58/93,5*, **	28/65,1*
Фибрирование	0	5/8,1*	3/7,0*

Примечание. n – число пациентов с верифицированным гриппом А(H1N1); различия показателей статистически значимы ( $p < 0,05$ ): \* – по отношению к показателям до пандемии, \*\* – по отношению к показателям в постпандемическом периоде.



Динамика цитокинового профиля у пациентов с верифицированным гриппом А(H1N1pdm2009)

Показатель, пг/мл		Без осложнений, абс/% (n = 61)		С пневмонией, абс/% (n = 62)	
		I	II	I	II
ФНО- $\alpha$ (N < 50)	> N	21/34,4	12/19,7	55/88,7**	57/91,9**
	<i>M</i> $\pm$ <i>m</i>	34,72 $\pm$ 2,2	30,95 $\pm$ 2,1	93,27 $\pm$ 4,4***	99,57 $\pm$ 74,6***
ИЛ-1 $\beta$ (N < 50)	> N	58/95,1	59/96,7	62/100,0	57/91,9
	<i>M</i> $\pm$ <i>m</i>	93,47 $\pm$ 4,8	86,67 $\pm$ 4,1	111,34 $\pm$ 6,1	94,76 $\pm$ 6,1*
ИЛ-1ra (N < 200)	> N	29/47,5	32/52,5	62/100,0**	58/93,5
	<i>M</i> $\pm$ <i>m</i>	279,49 $\pm$ 34,5	326,63 $\pm$ 36,7	785,2 $\pm$ 55,7***	795,87 $\pm$ 47,5***
ИЛ-6 (N < 50)	> N	1/1,6	4/6,6	48/77,4***	52/83,5***
	<i>M</i> $\pm$ <i>m</i>	21,40 $\pm$ 1,5	22,66 $\pm$ 1,5	78,12 $\pm$ 4,1***	74,92 $\pm$ 3,4***
ИФН- $\alpha$ (N < 50)	> N	21/34,4	24/39,3	6/9,7	1/1,6
	<i>M</i> $\pm$ <i>m</i>	48,94 $\pm$ 4,6	48,94 $\pm$ 4,7	26,38 $\pm$ 3,1**	24,22 $\pm$ 2,9**
Анти-ИФН- $\alpha$ (N < 20,0)	> N	48/78,7	61/100,0	61/98,4*	61/98,4
	<i>M</i> $\pm$ <i>m</i>	448,19 $\pm$ 29,1	583,97 $\pm$ 30,2	549,99 $\pm$ 28,4*	619,27 $\pm$ 31,6
ИФН- $\gamma$ (N < 50)	> N	20/32,8	7/11,5	1/1,6*	0/0
	<i>M</i> $\pm$ <i>m</i>	43,51 $\pm$ 1,8	35,16 $\pm$ 1,6	24,87 $\pm$ 1,2**	23,82 $\pm$ 1,1**
ИЛ-10 (N < 50)	> N	24/39,3	21/34,4	61/98,4***	62/100,0***
	<i>M</i> $\pm$ <i>m</i>	46,01 $\pm$ 3,1	42,92 $\pm$ 2,9	98,39 $\pm$ 3,2***	107,46 $\pm$ 3,7***
ИЛ-8 (N < 50)	> N	61/100,0	57/93,4	31/100,0	31/100,0
	<i>M</i> $\pm$ <i>m</i>	103,36 $\pm$ 3,2	91,91 $\pm$ 3,4	150,51 $\pm$ 0,3***	136,91 $\pm$ 5,3***

Примечание. I – острый период; II – период ранней реконвалесценции; абс. – число пациентов с величиной данного показателя; % – отношение абс. к n (числу пациентов с гриппом А(H1N1pdm2009) в группе); различия показателей статистически значимы по сравнению с таковыми при неосложненном гриппе: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$ ; N – норма.

93,5 и 97,1% случаев против 71,6% в более ранних наблюдениях, у детей в 81,9, 73,5 и 98,1% случаев против 62,2%) и боль в горле (у взрослых в 100% , у детей в 46,5% случаев против 57,9% и практического отсутствия симптома у детей в более ранних наблюдениях).

Если у детей симптомы желудочно-кишечной дисфункции (повторная рвота, разжижение и учащение стула до 3–4 раз в сутки, тошнота и боли в животе), развившиеся в первые 2 сут, регистрировали при гриппе примерно одинаково часто во все наблюдаемые периоды (в 20,8% случаев в допандемическом периоде, в 23,1% случаев во время пандемии, в 19,5 и 17,3% случаев в постпандемические эпидемические подъемы), у взрослых их частота статистически значимо увеличилась с 0 до 8,8% во время пандемии ( $p < 0,05$ ) и 19,4% ( $p < 0,005$ ) в первый постпандемический год, снизившись до 4,8% случаев в сезон 2012–2013 гг.

У взрослых с пневмониями при пандемическом гриппе статистически значимо преобладали двусторонние процессы (в 54,8 и 39,5% случаев против 23,6% случаев среди пациентов до пандемии (2006–2009)) с очагово-сливной инфильтрацией (в 93,5% случаев во время пандемии и в 65,1% случаев в постпандемический период против 42,1% случаев среди лиц с пневмониями до пандемии) (табл. 2).

Статистически значимо чаще при гриппе типа А(H1N1pdm2009) регистрировали тяжелую степень тяжести заболевания с гипертермией и выраженной интоксикацией. У каждого третьего пациента в мокроте была примесь крови при более высокой частоте выраженной дыхательной недостаточности (ДН) II – III степени на фоне сниженной сатурации кислорода в капиллярной крови < 90%. Следует отметить также более частое формирование фиброзирований, отсутствовавшего в более ранних наблюдениях.

В первые 3 дня заболевания у пациентов с гриппом

Таблица 4

Клинико-лабораторная характеристика тяжелой формы верифицированного гриппа А(H1N1pdm2009) в зависимости от исхода

Клинический признак	Частота признака в группах, абс/%		
	умершие (n = 16)	выжившие (n = 23)	
Пневмония:	односторонняя	1/6,3	10/43,5*
	двусторонняя	15/93,8	9/39,1*
	отсутствует	0	4/17,4*
Выраженная интоксикация:	слабость	16/100,0	22/95,7
	возбуждение	10/62,5	1/4,3
Геморрагический синдром:	всего	10/62,5	10/43,5*
	желудочное кровотечение	4/25,0	0
	ДВС	2/12,5	0
Показатель ОАК:	кровохарканье	5/31,3	2/8,7*
	нарастающая анемия	10/62,5	8/34,8
	лейкоцитоз	3/18,8	8/34,8
	нарастающая лимфопения	14/93,3	3/13,0*
Сатурация кислорода крови < 90%	16/100,0	11/73,9*	
Острая сердечно-сосудистая недостаточность	14/87,5	6/26,1*	
Жидкий стул	4/25,0	2/8,7*	

Примечание. n – число пациентов с верифицированным гриппом А(H1N1pdm2009); \* – различия показателей статистически значимы ( $p < 0,05$ ) по отношению к показателям у умерших; ОАК – общий анализ крови; ДВС – синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания.

Таблица 5

Продолжительность клинических симптомов у детей, больных гриппом А(H1N1pdm2009), при включении в терапию различных химиопрепаратов

Клинический симптом	Продолжительность, дни ( $M \pm m$ )			
	1 осельтамивир (n = 68)	2 занамибир (n = 29)	3 умифеновир (n = 37)	4 базисная терапия (n = 54)
Интоксикация	3,2 ± 0,15*	3,3 ± 0,21**	3,4 ± 0,21***	4,0 ± 0,19
Лихорадка	2,0 ± 0,3*	2,0 ± 0,1**	3,0 ± 0,43***	4,8 ± 0,20
Динамия	2,2 ± 0,09*	1,9 ± 0,23**	2,6 ± 0,15***	3,4 ± 0,08
Катаральные явления в носоглотке	5,8 ± 0,45*	4,9 ± 0,09**	6,4 ± 0,53***	7,9 ± 0,32
Кашель	6,1 ± 0,51	6,2 ± 0,09**	5,5 ± 0,15***	7,0 ± 0,24
Выделения из носа	5,1 ± 0,45*	3,6 ± 0,56**	4,8 ± 0,32***	5,8 ± 0,27
Острый период заболевания	6,2 ± 0,17*	6,4 ± 0,54**	6,4 ± 0,72***	8,0 ± 0,62

Примечание. Различия показателей статистически значимы между группами: \* – 1 и 4, \*\* – 2 и 4, \*\*\* – 3 и 4.

А(H1N1pdm2009), осложненным пневмонией, уровни провоспалительных (ФНО- $\alpha$ , ИЛ-8, ИЛ-6) и противовоспалительного (ИЛ-10) цитокинов были статистически значимо выше, чем в неосложненных случаях. Содержание ИЛ-1 $\beta$  у пациентов в обеих группах наблюдения при первом исследовании было примерно одинаковым, тогда как уровень ИЛ-1 $\alpha$  при пневмониях в 2,5–3 раза превышал таковой у пациентов без осложнений (табл. 3).

У лиц с пневмонией статистически значимо более выраженной, чем в неосложненных случаях, была динамика содержания как провоспалительных (ФНО- $\alpha$ , ИЛ-8, ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-6), противовоспалительных (ИЛ-10, ИЛ-1 $\alpha$ ) цитокинов, так и анти-ИФН- $\alpha$ . Статистически значимое повышение уровня анти-ИФН- $\alpha$  может считаться признаком преждевременной активации торможения иммунного реагирования, обусловленного продукцией ИФН- $\alpha$ .

Кроме того, у пациентов с гриппом А(H1N1pdm2009), осложненным пневмонией, статистически значимо более низким, чем при отсутствии осложнений, было содержание в сыворотке крови ИФН- $\alpha$  и ИФН- $\gamma$  без существенной динамики в последующем, что также свидетельствовало о снижении функциональной активности иммунокомпетентных клеток.

Выявлены различия симптоматики у выживших и умерших пациентов с тяжелой степенью тяжести пандемического гриппа, лечившихся в ОРИТ (табл. 4).

Практически у всех умерших (93,8%) было массивное двустороннее поражение легких в отличие от 39,1% среди выживших пациентов. Все больные поступали с выраженными симптомами интоксикации в основном в виде резкой слабости, но при этом у умерших статистически значимо чаще (62,5% против 4,3%) регистрировали возбуждение. Примерно у каждого третьего пациента наблюдался геморрагический синдром, более выраженный у погибших пациентов: кровохарканье в 31,3% случаев против 8,7% у выживших, желудочное кровотечение и ДВС-синдром (у 25 и 12,5% умерших), отсутствовавшие у выживших больных, что явилось подтверждением данных, полученных И. Н. Жилинской и соавт. [12]. Статистически значимо чаще у умерших регистрировался жидкий стул (25% против 8,7% среди выживших), нарастающую лимфопению (93,3% против 13% среди выживших).

Если при гриппе предыдущих лет отмечали значи-

тельные морфологические изменения в дыхательных путях по типу катарально-фиброзного и геморрагически-некротического воспаления, а в ткани легких даже в ранних стадиях выявляли вирусно-бактериальные бронхиты и бронхопневмонии с абсцедированием и плевральными наслоениями, высеvom из тканей легкого *S. aureus*, то у умерших от пандемического гриппа изменения слизистой оболочки гортани и трахеи были незначительными и имели катаральный и катарально-геморрагический характер [7]. Самые существенные изменения (тотальные или субтотальные) обнаружены в ткани легких, которые были увеличенными, неравномерно уплотненными с «резинистостью» ткани. На разрезе ткань пестрая, без фокусов абсцедирования и четко очерченных очагов. Наблюдались субтотальные поля уплотнения легких из безвоздушной ткани без гноевидного содержания. Выявлялись своеобразные распространенные изменения в альвеолярной выстилке по типу вирусного альвеолита с гигантоклеточным метаморфозом и формированием симпластов, а также признаки респираторного дистресс-синдрома, подробно описанного В. А. Цинзерлингом и соавт. [13].

Проведенное сравнительное изучение лечебной эффективности трех химиопрепаратов (осельтамивира, занамивира и унифеновира) у детей с верифицированным гриппом А(H1N1pdm2009) практически не выявило статистически значимых различий в продолжительности основных симптомов заболевания у получавших тот или иной химиопрепарат, кроме продолжительности выделений из носа, быстрее прекращавшихся на фоне занамивира. Однако в целом включение любого из этих препаратов в терапию гриппа оказалось статистически значимо более эффективным, чем только базисная (патогенетическая) терапия (табл. 5).

Следует отметить отсутствие у пациентов всех исследуемых групп развития каких-либо нежелательных явлений, связанных с приемом назначаемых препаратов, в том числе симптомов раздражения слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта.

Не было также зарегистрировано отрицательного влияния этиотропных препаратов на динамику показателей ОАК. Оценка динамики биохимических показателей в сыворотке крови (мочевина, аланинаминотрансфераза, аспартатаминотрансфераза и щелочная фосфатаза) показала отсутствие токсического действия изучаемых препаратов и подтвердила безопасность их применения в комплексном лечении больных гриппом.

## Выводы

1. Клиническая картина пандемического гриппа у пациентов любого возраста во все периоды пандемического цикла в целом типична для данной инфекции. Ее выраженность в значительной степени определялась развившимися осложнениями, в первую очередь вовлечением в процесс легких, что наблюдалось статистически значимо чаще у взрослых.

2. Выявлен ряд различий основных характеристик клинической симптоматики пневмоний между выжившими и умершими взрослыми пациентами с тяжелой степенью тяжести верифицированного гриппа А(H1N1pdm2009).

3. Показана статистически значимая эффективность и безопасность раннего включения в комплексную терапию пандемического гриппа противовирусных химиопрепаратов: осельтамивира, занамивира и отечественного умифеновира (арбидола).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Maria D. Van Kerkhove, Katelijin A. H. Vandemaële, Vivek Shinde, Giovanna Jaramillo-Gutierrez, Artemis Koukounari, Christl A. Donnelly et al. Risk Factors for Severe Outcomes following 2009 Influenza A (H1N1) Infection: A Global Pooled Analysis. 2011. Available at: <http://journals.plos.org/plosmedicine/article?id=10.1371/journal.pmed.1001053>.
2. Киселев О.И., Ершов Ф.И., Быков А.Т., Покровский В.И. Пандемия гриппа 2009/10: противовирусная терапия и тактика лечения. СПб; 2010.
3. Карпова Л.С., Пелих М.Ю., Столяров К.А., Поповцева Н.М., Столярова Т.П. Пандемия гриппа в России как часть глобального распространения гриппа А (H1N1)pdm09 в 2009-2011 гг. *Вопросы вирусологии*. 2012; 6: 26-30.
4. Цыбалова Л.М., Карпова Л.С., Комиссаров А.Б., Еропкин М.Ю., Грудинин М.П., Киселев О.И. Эпидемия гриппа А(H1N1)V 2009 г. в России. *Вестник РАМН*. 2011; 6: 30-6.
5. Еропкин М.Ю., Даниленко Д.М., Коновалова Н.И., Прокопец А.В., Гудкова Т.М., Григорьева В.А. и др. Выделение и антигенная характеристика вирусов гриппа, циркулировавших в России в эпидемические сезоны 2009-011 гг. В кн.: *Грипп: эпидемиология, профилактика и лечение. Сборник статей*. СПб.; 2011: 37-41.
6. Соминина А.А., Банников А.И., Зарубаев В.В., Писарева М.М. Лабораторная диагностика острых респираторных и других вирусных инфекций. В кн.: Киселев О.И., Маринич И.Г., Соминина А.А., ред. *Грипп и другие респираторные вирусные инфекции: эпидемиология, профилактика, диагностика и терапия*. СПб.; 2003: 70-91.
7. Волощук Л.В., Заришнюк П.В., Мушкатина А.Л., Днепровская Г.Л., Матвеева С.Н., Гончарова Л.Б. и др. Эпидемия гриппа 2009 года, клинические и патоморфологические особенности гриппа А H1N1 Калифорния по материалам СПб КИБ им. С.П.Боткина. В кн. Королев А.В., Жолобов В.Е., Рахманова А.Г., Яковлева А.А., ред. *Инфекционные болезни 2012*. СПб.; 2012: 69-79.
8. Киселев О.И., Мазуров В.И., Малиновская В.В., Сельков С.А. Определение интерферонового статуса как метод оценки иммунореактивности при различных формах патологии: Пособие для врачей. СПб; 2002.
9. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М.: Медиа Сфера; 2002.
10. Бабцева А.Ф., Романцова Е.Б., Молчанова И.Н., Юткина О.С., Арутюнян К.А., Бойченко Т.Г. Клинико-патогенетические особенности течения пневмонии у детей в период эпидемии гриппа. Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Чита; 2010.
11. Рекалова Е.М. Поражения легких в период пандемии свиного гриппа А(H1N1) 2009-2010 гг. *Клиническая иммунология. Аллергология. Инфектология*. 2010; 3: 42-8.
12. Жилинская И.Н., Азаренок А.А., Ильинская Е.В., Прочуханова А.Р., Воробьев С.Л., Сорокин Е.В. и др. Репродукция вируса гриппа в клетках эндотелия кровеносных сосудов человека. *Вопросы вирусологии*. 2012; 2: 20-3.
13. Цинзерлинг В.А., Воробьев С.Л., Зарубаев В.В., Беляевская Е.В., Эсауленко Е.В., Григорьева И.В. и др. Патогенетические аспекты гриппа в период эпидемии, вызванной вирусом H1N1v в 2009-2010 гг. *Архив патологии*. 2011; 73(6): 21-5.
- enA (H1N1) Infection: A Global Pooled Analysis. 2011. Available at: <http://journals.plos.org/plosmedicine/article?id=10.1371/journal.pmed.1001053>.
2. Kiselev O.I., Ershov F.I., Bykov A.T., Pokrovskiy V.I. *Pandemia of Influenza 2009/10: the Tactic of Antiviral Therapy [Pandemiya grippa 2009/10: protivovirusnaya terapiya i taktika lecheniya]*. St. Petersburg; 2010. (in Russian)
3. Karpova L.S., Pelikh M.Yu., Stolyarov K.A., Popovtseva N.M., Stolyarova T.P. An Influenza Pandemic in Russia as a Part of a Global Spread of the Influenza A (H1N1)pdm 09 in 2009-2011. *Voprosy virusologii*. 2012; 6: 26-30. (in Russian)
4. Tsybalova L.M., Karpova L.S., Komissarov A.B., Eroplin M.Yu., Grudin M.P., Kiselev O.I. Influenza A (H1N1)V2009 Epidemic in Russia. *Vestnik RAMN*. 2011; 6: 30-6. (in Russian)
5. Eroplin M.Yu., Danilenko D.M., Konovalova N.I., Prokopets A.V., Gudkova T.M., Grigor'eva V.A. et al. Extraction and antigenic specification of influenza viruses circulated in Russia during epidemic seasons 2009-011. In: *Influenza: Epidemiology, Prophylaxis: Digest of Articles [Gripp: epidemiologiya, profilaktika i lechenie. Sbornik statey]*. St. Petersburg; 2011: 37-41. (in Russian)
6. Somina A.A., Bannikov A.I., Zarubaev V.V., Pisareva M.M. Laboratory diagnosis of acute respiratory viral and other infections. In: Kiselev O.I., Marinich I.G., Somina A.A., eds. *Influenza and Other Respiratory Infections: Epidemiology, Prophylaxis, Diagnostics and Treatment [Gripp i drugie respiratornye virusnye infektsii: epidemiologiya, profilaktika, diagnostika i terapiya]*. St. Petersburg; 2003: 70-91. (in Russian)
7. Voloshchuk L.V., Zarishnyuk P.V., Mushkatina A.L., Dneprovskaya G.L., Matveeva S.N., Goncharova L.B. et al. Epidemic influenza of 2009, clinical and patomorphological aspects of influenza A H1N1 California on the materials of St. Petersburg Clinical Infectious Diseases Hospital after SP Botkin. In: Korolev A.V., Zholobov V.E., Rakhmanova A.G., Yakovleva A.A., eds. *Infectious Disease 2012 [Infektsionnye bolezni 2012]*. St. Petersburg; 2012: 69-79. (in Russian)
8. Kiselev O.I., Mazurov V.I., Malinovskaya V.V., Sel'kov S.A. *Determination of Interferon Status, as Method of Immunoreactivity's Estimation at Different Forms of Pathology: Manual for doctors [Opredelenie interferonovogo statusa kak metod otsenki immunoreaktivnosti pri razlichnykh formakh patologii: Posobie dlya vrachey]*. St. Petersburg; 2002. (in Russian)
9. Rebrova O.Yu. *Statistical Analysis of Medical Data. Application of Protocol Packet of Statistica Program [Statisticheskii analiz meditsinskikh dannyykh. Primenenie paketa prikladnykh programm Statistika]*. Moscow: Media Sfera; 2002. (in Russian)
10. Babtseva A.F., Romantsova E.B., Molchanova I.N., Yutkina O.S., Arutyunyan K.A., Boychenko T.G. Clinic-pathogenetic aspects of pneumonia's course in children during epidemic of influenza. In: *Materials of the Russian Scientific and Practical Conference with International Participation [Kliniko-patogeneticheskie osobennosti techeniya pnevmonii u detey v period epidemii grippa. Materialy Vserossiyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem]*. Chita; 2010. (in Russian)
11. Rekalova E.M. Pulmonary involvement during pandemic of influenza A (H1N1) swine 2009-2010. *Klinicheskaya immunologiya. Allergologiya. Infektologiya*. 2010; 3: 42-8. (in Russian)
12. Zhilinskaya I.N., Azarenok A.A., Il'inskaya E.V., Prochukhanova A.R., Vorob'ev S.L., Sorokin E.V. et al. Influenza virus reproduction in the endothelium cells of human blood vessels. *Voprosy virusologii*. 2012; 2: 20-3. (in Russian)
13. Tsinzerling V.A., Vorob'ev S.L., Zarubaev V.V., Belyaevskaya E.V., Esaulenko E.V., Grigor'eva I.V. et al. Pathogenetic aspects of Influenza during pandemic of influenza H1N12009-2010. *Arkhiv patologii* 2011; 73(6): 21-5. (in Russian)

## REFERENCES

1. Maria D. Van Kerkhove, Katelijin A. H. Vandemaële, Vivek Shinde, Giovanna Jaramillo-Gutierrez, Artemis Koukounari, Christl A. Donnelly et al. Risk Factors for Severe Outcomes following 2009 Influenza A (H1N1) Infection: A Global Pooled Analysis. 2011. Available at: <http://journals.plos.org/plosmedicine/article?id=10.1371/journal.pmed.1001053>.

Лаповок И. А.<sup>1</sup>, Лага В. Ю.<sup>1</sup>, Казеннова Е. В.<sup>1</sup>, Васильев А. В.<sup>1</sup>, Дзисюк Н. В.<sup>2</sup>, Утегенова А. К.<sup>2</sup>,  
Абишев А. Т.<sup>2</sup>, Тукеев М. С.<sup>2</sup>, Бобкова М. Р.<sup>1</sup>

## Молекулярно-эпидемиологический анализ ВИЧ-1 в Казахстане в 2009 – 2013 гг.

<sup>1</sup>Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва; <sup>2</sup>ГУ «Республиканский центр по профилактике и борьбе со СПИД» Минздрава Республики Казахстан, 050008, г. Алматы, Казахстан

Исследование посвящено анализу гена *pol* 205 образцов ВИЧ-1, собранных в Казахстане в 2009 и 2012–2013 гг. Получены данные о доминировании в Алматы и активной циркуляции в Восточно-Казахстанской области рекомбинантного варианта CRF02\_AG, при этом на основной территории Казахстана продолжает доминировать вариант IDU-A. Отмечена низкая распространенность (3%) мутаций лекарственной устойчивости к антиретровирусным препаратам в группе нелеченых пациентов.

Ключевые слова: ВИЧ-1; потребители инъекционных наркотиков; генотип; рекомбинант; вирусный вариант; IDU-A; CRF02\_AG; лекарственная устойчивость.

Для цитирования: Вопросы вирусологии. 2015; 60(4): 29–37.

Lapovok I.A.<sup>1</sup>, Laga V.Y.<sup>1</sup>, Kazennova E.V.<sup>1</sup>, Vasilyev A.V.<sup>1</sup>, Dzissyuk N.V.<sup>2</sup>, Utegenova A. K.<sup>2</sup>, Abishev A.T.<sup>2</sup>,  
Tukeev M.S.<sup>2</sup>, Bobkova M.R.<sup>1</sup>

### Molecular epidemiological analysis of HIV-1 in Kazakhstan in 2009-2013

<sup>1</sup>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", 123098, Moscow, Russia; <sup>2</sup>Republican AIDS Center, 050008, Almaty, Kazakhstan

In this study *pol* gene analysis of 205 HIV-1 samples collected in Kazakhstan in 2009 and 2012-2013 was carried out. CRF02\_AG variant is dominating in Almaty and actively circulates in East Kazakhstan Province. IDU-A variant is dominating in the rest of Kazakhstan. The data on low prevalence (3%) of HIV drug resistance mutations in native patients were obtained.

Key words: HIV-1; IDU; genotype; recombinant; viral variant; IDU-A; CRF02\_AG; drug resistance.

Citation: Voprosy virusologii. 2015; 60(4): 29–37. (In Russ.)

For correspondence: Ilya Lapovok, MD, PhD; e-mail: i\_lapovok@mail.ru

Received 03.06.14

### Введение

Эпидемия ВИЧ-инфекции в странах Центральной Азии продолжает развиваться, и по темпам прироста числа инфицированных людей этот регион занимает сейчас лидирующую позицию в мире. В числе стран, вовлеченных в эпидемический процесс, одной из первых стал Казахстан, где темпы ежегодного роста эпидемии, по данным за 2011 г., превышают 25% [1].

Распространение ВИЧ-инфекции в Казахстане началось несколькими годами позже, чем это в Украине и России, и массивный рост числа случаев регистрировался приблизительно с начала 2000-х годов. Основными уязвимыми группами по риску заражения в первые годы были те же, что и в других странах СНГ, т. е. потребители инъекционных наркотиков (ПИН) и как следствие их гетеросексуальные партнеры. Программы лечения ВИЧ-инфекции также несколько задержались в сравнении с Россией, охват терапией до сих пор ограничен, и в настоящее время доля пациентов, получающих терапию, среди нуждающихся в ней составляет 27% [1].

Эпидемиологи выделяют 4 этапа эпидемии ВИЧ-инфекции в Казахстане [2]:

1. 1987–1995 гг. – небольшое число ВИЧ-инфицированных лиц, стабильное и медленное увеличение числа новых случаев инфицирования.

2. 1996–2000 гг. – первая волна эпидемии, характери-

зующаяся заметным увеличением числа новых случаев инфицирования главным образом из-за проникновения вируса в среду ПИН в Темиртау Карагандинской области.

3. 2001–2004 гг. – вторая волна инфекции, вызванная массовым распространением ВИЧ в Павлодаре, а также на западе и юге Казахстана.

4. 2005 г. по настоящее время – третья волна инфекции, связанная со вспышкой ВИЧ-инфекции в Алматы; с этого же времени растет число случаев передачи вируса половым путем.

На начало 2012 г. в Казахстане официально было зарегистрировано 17 763 ВИЧ-инфицированных лиц, из которых мужчины составляли 70,1%, женщины – 27,6%, дети до 14 лет – 2,1% [3]. Основным путем инфицирования в Казахстане, как и в большинстве сопредельных стран, остается потребление инъекционных наркотиков [4, 5], при этом доля гетеросексуальной передачи продолжает расти.

Молекулярные исследования вариантов ВИЧ, распространенных в Казахстане, проводились в 1999–2001 и 2003 гг. [6, 7]. Как было показано в 2002 г., в северных регионах страны (Караганда, Павлодар) и в Алматы доминировал вариант IDU-A подтипа А ВИЧ-1, т. е. тот же вирус, который преобладал (и продолжает доминировать) в большинстве стран СНГ. Уже на третьем эта-



пе, на фоне доминирования варианта IDU-A [6] во всех регионах Казахстана, в стране были зарегистрированы отдельные случаи инфекции ВИЧ-1 рекомбинантного варианта CRF02\_AG [7]. Этот вариант, обычный для Западной Африки, вначале был обнаружен в 2002–2003 гг. в Узбекистане, а сейчас широко распространен и в других странах Центральной Азии [4, 5, 7–10]. С тех пор новых данных о генетических вариантах ВИЧ в Казахстане не поступало.

В последние годы в Казахстане внедряется методология генотипирования ВИЧ с целью анализа лекарственной устойчивости. Данные, получаемые с помощью этого метода, могут служить важным источником информации о генетических вариантах вирусов, циркулирующих в стране. В ходе такого исследования могут быть выявлены как основные (major) мутации, определяющие собственную лекарственную устойчивость вируса, так и мутации полиморфизма, возникающие в участках генома вне связи с характером лечения и его эффективностью [11, 12].

Целью данной работы были исследование гена *pol* образцов ВИЧ-1, собранных в Казахстане в 2009–2013 гг., и сравнительный анализ изменчивости вируса в ходе эпидемии с момента ее начала.

### Материалы и методы

Образцы крови от ВИЧ-инфицированных пациентов, принадлежащих к разным группам риска и проживающих в различных регионах Казахстана, получали с их информированного согласия. Общее число пациентов, получающих антиретровирусную терапию (лечение), составило 40, число пациентов, никогда не получавших специфического лечения (нелеченые), – 165. Образцы были собраны в 2 этапа: в 2009 г. (коллекция 2009) и 2012–2013 гг. (коллекция 2012–2013). В качестве материала для исследования на первом этапе были использованы мононуклеарные клетчат периферической крови (МКПК), содержащие провирусную ДНК ВИЧ, на втором этапе – РНК ВИЧ, выделенная из плазмы крови. Всего было собрано 50 образцов коллекции 2009 и 115 образцов коллекции 2012–2013.

Провирусную ДНК ВИЧ-1 из МКПК выделяли с помощью системы DNA/RNA Extractor QIAcube и QIAamp DNA Blood Mini Kit («Qiagen», США) в соответствии с инструкцией производителя [13]. Провирусная ДНК затем была использована в качестве матрицы в *in-house*-модификации гнездовой ПЦР. В результате получали последовательности двух участков гена *pol*: область протеазы с 1-й по 99-ю аминокислоту (положения 2253–2549 в соответствии с вариантом HXB2 [12]), область обратной транскриптазы с 45-й по 241-ю аминокислоту (положения 2682 – 3272 нуклеотидных оснований (н. о.)) и область интегразы с 1-й по 205-ю аминокислоту (положения 4230 – 4844 н.о.). Последовательности исследуемых областей ДНК получали с применением методики, опубликованной ранее [14].

Для части образцов была исследована РНК ВИЧ-1 из плазмы крови. Анализ проводили с помощью системы АмплиСенс® HIV-Resist-Seq («ИнтерЛабСервис», Россия) или системы ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System version 2.0 («Abbott», США).

Всего с помощью системы АмплиСенс и методом *in-house* были получены нуклеотидные последовательности областей, кодирующих протеазу и обратную транскриптазу, в 50 образцах коллекции, собранной в 2009 г. В коллекции 2012–2013 гг. 141 образец был проанализирован с применением системы АмплиСенс, еще для 14 образцов этой коллекции соответствующие области генома были получены с применением системы ViroSeq.

Кроме того, с помощью *in-house*-метода, описанного выше, были получены последовательности области обратной транскриптазы для 9 образцов ДНК МКПК, собранных в Казахстане в 1999 – 2002 гг. (коллекция 2002) [6], и 15 последовательностей области интегразы гена *pol* коллекции 2009.

Выравнивание последовательностей, полученных при анализе всех образцов генетического материала, филогенетический анализ по принципу максимального правдоподобия, а также анализ генетической дистанции выполняли с применением программы MEGA 5.0 (Институт биодизайна, Темпе, Аризона, США) [15].

Определение генотипа и анализ мутаций устойчивости в образцах от леченых пациентов проводили с помощью on-line приложений COMET HIV-1/2 & HCV v. 0.2 [16] и HmIVdb Program v.6.2.0 [17] соответственно.

### Результаты и обсуждение

*Анализ эпидемиологических данных коллекций 2009 и 2012–2013.* В 2009 г. было получено 50 образцов крови от ВИЧ-инфицированных пациентов. Соотношение мужчины/женщины составило 30:20. 12 пациентов, 9 из которых – женщины, были инфицированы в результате половых контактов, что составило 24%, 37 (74%) человек относились к группе ПИН. У одного пациента способ инфицирования не был установлен. Средний возраст пациентов составил 33 года (21–53 года). Образцы в 2009 г. были получены из Алматинской области ( $n = 22$ ), Восточно-Казахстанской области ( $n = 16$ ), Караганды ( $n = 10$ ) и Павлодара ( $n = 2$ ).

В 2012–2013 гг. были собраны образцы от 155 ВИЧ-инфицированных пациентов. Доля мужчин в данной выборке была близка к таковой в коллекции 2009 г. – 56%, при этом соотношение путей заражения отличалось: 93 (60%) случая инфекции из 155 стали результатом гетеросексуальных контактов, и лишь 49 (32%) пациентов относились к группе ПИН. 7 пациентов (дети от 2 мес до 3 лет) были инфицированы в результате передачи инфекции от матерей вертикальным путем, 1 пациент – в результате гомосексуального контакта, еще для 5 человек путь инфицирования остался невыясненным. Средний возраст пациентов этой коллекции также составил 33 года (4–55 лет). Образцы были получены из Алматинской области ( $n = 48$ ), Восточно-Казахстанской области ( $n = 7$ ), Караганды ( $n = 58$ ), Павлодара ( $n = 10$ ), Южно-Казахстанской области ( $n = 21$ ) и других регионов ( $n = 11$ ).

*Анализ гена *pol* в коллекциях 2009 и 2012–2013.* Подтипная принадлежность была определена для всех анализированных образцов ВИЧ-1 (табл. 1).

По данным on-line генотипирования и филогенетического анализа 24 (48%) образца коллекции 2009 относились к генетическому варианту IDU-A, 2 (4%) – к рекомбинантному варианту CRF03\_AB, 21 (42,0%) – к рекомбинанту CRF02\_AG.

В коллекции 2012–2013 99/155 (63,9%) образцов относились к варианту IDU-A, 51 (32,9%) – к тому же варианту CRF02\_AG, что и образцы 2009 г.

Из вирусов других генетических вариантов мы обнаружили в этой коллекции 2 образца подтипа В (от гетеросексуальных мужчин из Алматы и Караганды соответственно), 1 образец CRF03\_AB (от 51-летней женщины из Алматы, относящейся к группе ПИН и, по эпидемиологическим данным, инфицированной в 2003 г. в Калининграде) и 1 образец от гетеросексуального мужчины 42 лет из Алматы, относящийся к рекомбинанту CRF07\_BC (рис. 1).

В одном образце коллекции 2009 был получен сложный для интерпретации результат генотипирования

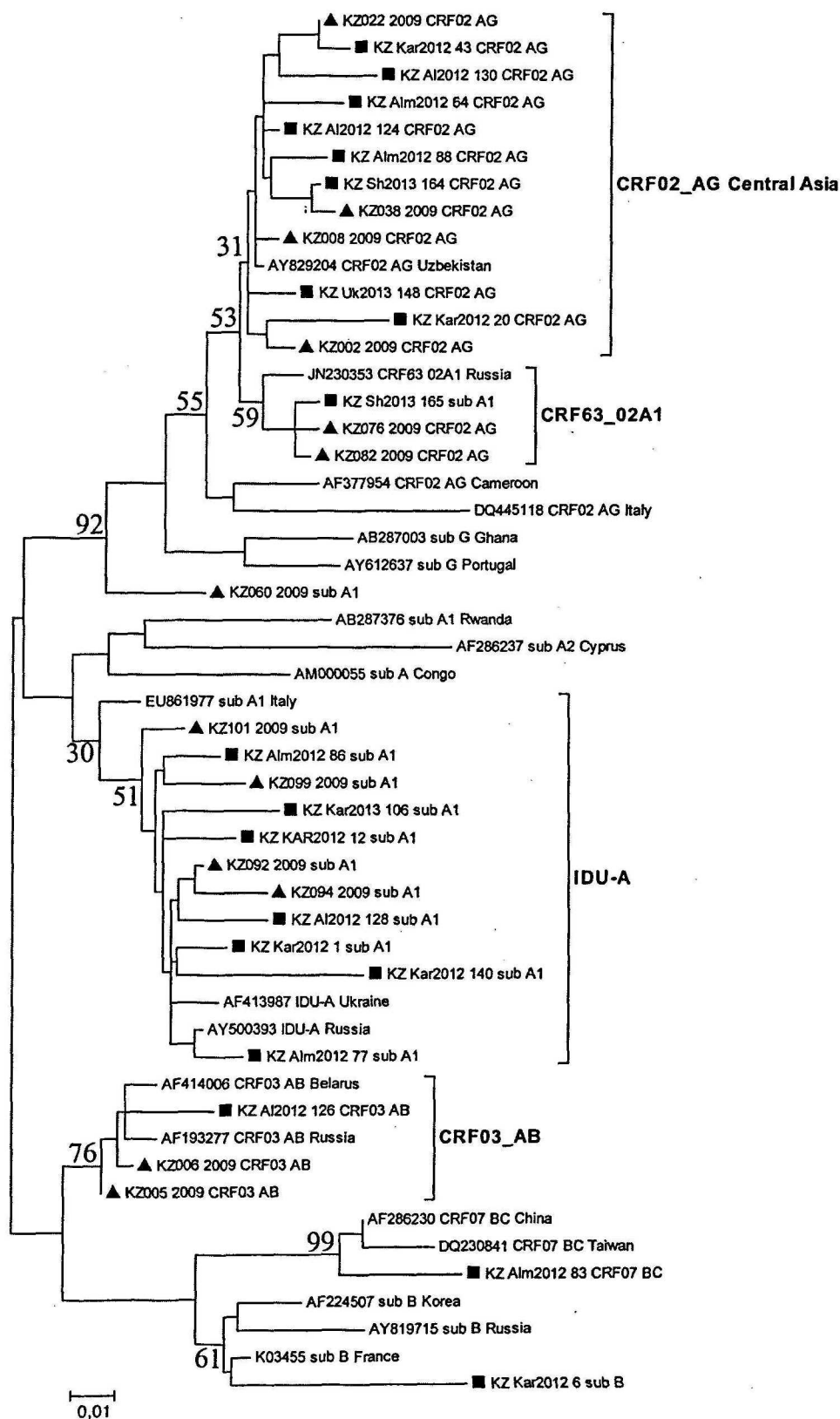


Рис. 1. Результат филогенетического анализа региона РНК, кодирующего протеазу и обратную транскриптазу ВИЧ-1 (положение 2253 - 3245 по отношению к варианту HXB-2, GenBank K03455), методом максимального правдоподобия (500 независимых построений).

Коллекция 2009 г. отмечена треугольниками, коллекция 2012–2013 гг. – квадратами. Для всех образцов предварительно были получены данные о геномном типе с использованием on-line приложения COMET HIV-1/2 & HCV v. 0.2 (результат определения генотипа указан в названиях образцов). Анализ был проведен с использованием статистической модели нуклеотидных замен (HKY+G). Здесь и на рис. 2 и 3 образцы группы сравнения обозначены их номерами в GenBank. Фигурными скобками выделены кластеры, образуемые последовательностями различных генетических вариантов.

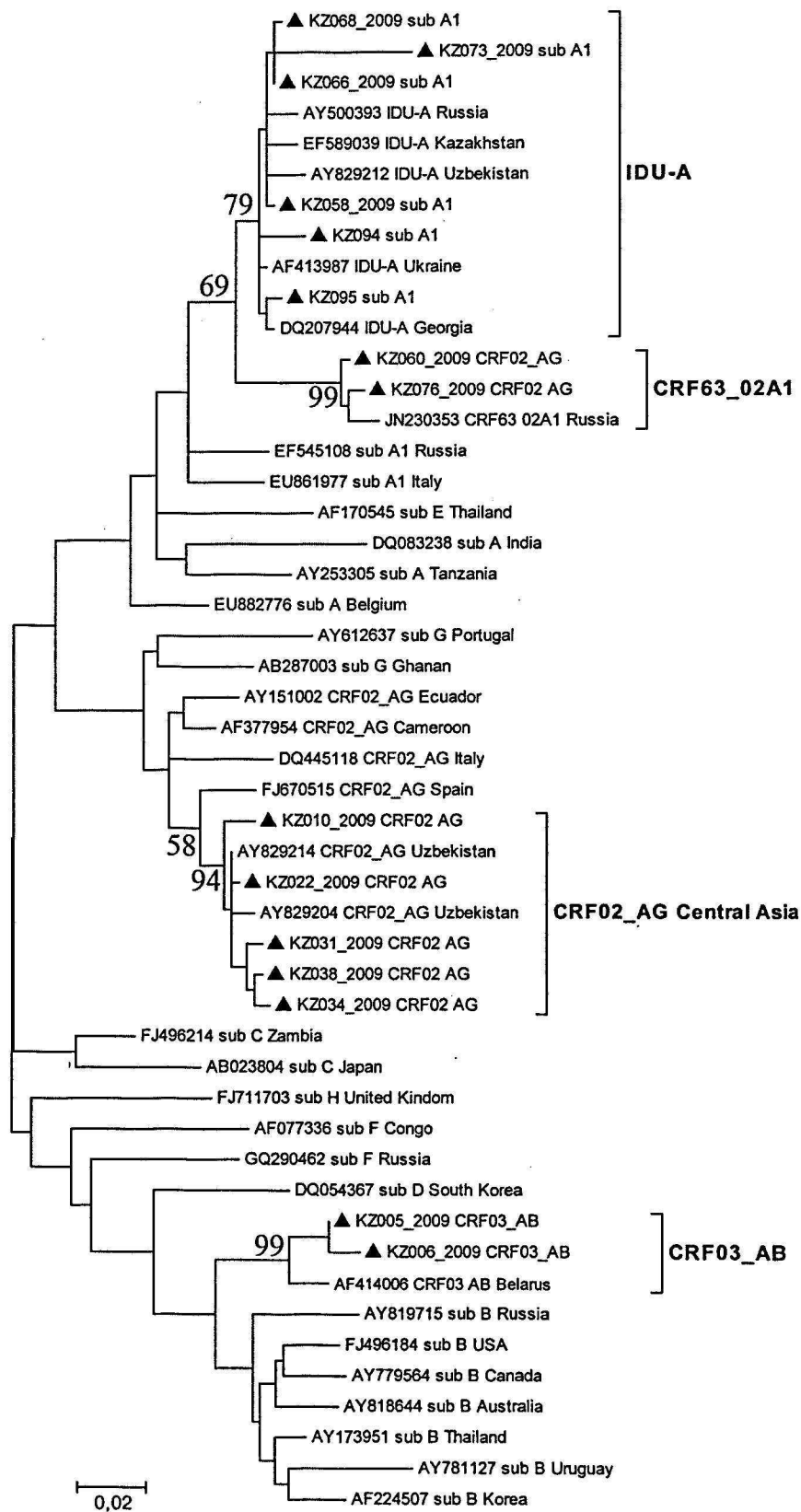


Рис. 2. Результат филогенетического анализа региона РНК, кодирующего интегразу ВИЧ-1 (с 1-й по 205-ю аминокислоту, положение 4230–4844 по отношению к варианту НХВ-2, GenBank K03455) образцов коллекции 2009 г. (выделены треугольниками, методом максимального правдоподобия (500 независимых построений)).

Для всех образцов предварительно были получены данные о генотипе с использованием on-line приложения COMET HIV-1/2 & HCV v. 0.2 (результаты определения генотипа указаны в названиях образцов). Анализ был проведен с использованием статистической модели нуклеотидных замен (GTR+G).

Таблица 1  
Распределение генетических вариантов ВИЧ-1 в коллекциях 2009 и 2012–2013 гг.

Регион/город Казахстана	Количество образцов					итого
	IDU-A	CRF02_AG	CRF03_AB	CRF6302A1	V/CRF07_BC	
<i>Коллекция 2009</i>						
Восточный Казахстан	12	1	-	3	-	16
Алматы	-	20	2	-	-	22
Павлодар	2	-	-	-	-	2
Караганда	10	-	-	-	-	10
<i>Коллекция 2012-2013</i>						
Восточный Казахстан	5	2	-	-	-	7
Алматы	7	38	1	-	2	48
Павлодар	10	-	-	-	-	10
Караганда	54	3	-	-	1	58
Южный Казахстан	15	5	-	1	-	21
Западный Казахстан	2	-	-	-	-	2
Астана	3	1	-	-	-	4
Костанай	2	-	-	-	-	2
Кызылорда	-	2	-	-	-	2
Мангистау	1	-	-	-	-	1
Всего...	123	72	3	4	3	205

области протеазы и обратной транскриптазы: при использовании *on-line* для субтипирования программ образец KZ060\_2009 можно было отнести как к подтипу A1, так и к рекомбинанту AG, в то время как филогенетический анализ демонстрировал его близость образцам подтипа G и рекомбинанта CRF02\_AG. Еще 3 образца – KZ076\_2009, KZ082\_2009 и KZ\_Sh2013\_165 – образовывали общую ветвь на филогенетическом дереве с новым рекомбинантным вариантом CRF63\_02/A1, описанным в Новосибирске [18]. Анализ этих образцов с применением программы RIP, предназначенной для идентификации рекомбинантов [17], выявил близость 4 упомянутых образцов CRF63\_02/A1. Дальнейший анализ последовательностей области интегразы подтвердил принадлежность образцов KZ060\_2009 и KZ076\_2009 к этой рекомби-

Таблица 2  
Мутации гена *pol* из списка SDRM [12], обнаруженные в образцах ВИЧ-1 от пациентов, не получающих специфической терапии

Мутация	Препарат, к которому имеется устойчивость	Год постановки диагноза	Год получения образца	Регион
<i>Ингибиторы протеазы</i>				
D30N	NFV	2006	2009	Караганда
M46L	IDV, NFV, FPV, LPV ATV, TPV	2001	2012	Караганда
<i>НИОТ</i>				
M184I	3TC, FTC, ABC, ddI	2008	2009	Восточный Казахстан
<i>ННИОТ</i>				
K103N	NVP, EFV	2006	2009	Павлодар
G190S	NVP, EFV	2007	2009	Восточный Казахстан

Примечание. Здесь и в табл. 3: НИОТ – нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы; ННИОТ – ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы.

нантной форме, что доказывает факт циркуляции CRF63\_02/A1 на территории Казахстана в 2009 г. (рис. 2).

В обеих коллекциях была обнаружена закономерность в распределении генотипов между различными регионами страны. Так, большая часть образцов из Алматы (83,3% для коллекции 2009 и 79,2% – 2012–2013) оказалась принадлежащей к варианту CRF02\_AG. В свою очередь вариант IDU-A доминировал в Караганде (100% коллекции 2009 и 93,1% – 2012–2013), Павлодаре и Восточно-Казахстанской области.

Данная эпидемиологическая картина может быть следствием миграционных потоков из граничащих с Алматинской областью Киргизии и Узбекистана, где активно распространен CRF02\_AG [4, 5]. Это свидетельствует о роли Алматинской области как своеобразного проводника инфекции между центральной и северной частями

страны, с одной стороны, и другими странами Центральной Азии – с другой, через который происходит распространение CRF02\_AG по территории Казахстана.

*Анализ мутаций в составе исследованных областей генома.* Полученные в ходе работы последовательности гена *pol* были проанализированы с использованием *on-line* приложения HIVdb Program. В группе нелеченых пациентов осуществляли поиск замен из списка «надзорных мутаций лекарственной устойчивости» (surveillance drug resistance mutations – SDRM), для леченых пациентов использовали *on-line* ресурс [12]. Кроме того, был проанализирован естественный полиморфизм вируса в исследованных образцах.

Среди образцов ВИЧ-1, полученных от 165 наивных пациентов коллекций 2009 и 2012–2013, было обнаружено в общей сложности 5 образцов, содержащих по одной SDRM-мутации (табл. 2). Все вирусы, содержащие эти мутации, относились к IDU-A- варианту. Таким образом, частота распространения устойчивости среди нелеченых пациентов составила 3%.

В коллекции 2012–2013 присутствовало 40 образцов от пациентов, ранее имевших опыт антиретровирусной терапии. Наиболее распространенной схемой лечения в данной группе была комбинация зидовудин/ламивудин/невирапин, зидовудин/ламивудин/эфаверенц и зидовудин/ламивудин/лопинавир с ритонавиром. Мутации из перечня основных (major) в различных областях генома были обнаружены в 15 из 40 образцов (табл. 3).

Частота встречаемости мутаций полиморфизма для наивных и леченых пациентов представлена в табл. 4. Среди таковых можно отметить замену K20I в протеазе, характерную для рекомбинантов A/G. Она была обнаружена в общей сложности в 71,9% образцов CRF02\_AG и 50% образцов CRF63\_02A1 обеих коллекций. Характерная для варианта IDU-A мутация полиморфизма V77I была широко распространена в обеих коллекциях: данная замена в области протеазы была обнаружена в 58,3% образцов IDU-A коллекции 2009 и 28,3% - коллекции 2012–2013. Еще одной заменой, характерной только для IDU-A, стала I93L. Она была



Мутации гена *pol* [12], обнаруженные в образцах ВИЧ-1 от пациентов, имевших опыт специфической терапии ( $n = 40$ )

Мутация	Препарат, к которому имеется устойчивость	Число образцов с мутацией	Терапия, применяемая на момент генотипирования
<i>НИОТ</i>			
M184V	3TC, FTC, ABC, ddI	11	AZT+3TC+NVP – 7 пациентов AZT+3TC+EFV – 3 пациента 3TC+ABC+NVP – 1 пациент
T215YF	3TC ABC AZT d4T ddI FTC TDF	3	AZT+3TC+NVP – 1 пациент AZT+3TC+EFV – 1 пациент AZT+ABC+NVP – 1 пациент
L210W	AZT d4T ddI ABC TDF	1 (с T215Y и M41L)	AZT+3TC+EFV
M41L	AZT d4T ddI ABC TDF	3 (два с T215Y)	AZT+3TC+NVP – 1 пациент AZT+3TC+EFV – 1 пациент 3TC+ABC+NVP – 1 пациент
D67N	AZT d4T ddI ABC TDF	1 (с T215Y и M41L)	3TC+ABC+NVP
L74I	ddI ABC	1	AZT+3TC+EFV
K219E	AZT	1	3TC+ABC+NVP
<i>ННИОТ</i>			
K101E	NVP EFV, ETR, RPV	4	AZT+3TC+NVP – 2 пациента AZT+3TC+EFV – 2 пациента
K103N	NVP EFV	5	AZT+3TC+NVP – 3 пациента AZT+3TC+EFV – 1 пациент 3TC+ABC+NVP – 1 пациент
G190S/A	NVP EFV	5	AZT+3TC+NVP – 3 пациента AZT+3TC+EFV – 2 пациента
E138G	NVP EFV, ETR, RPV	1	AZT+3TC+NVP
E179D	NVP EFV, ETR, RPV	1	AZT+3TC+EFV
V106A	NVP EFV	1	AZT+3TC+NVP

Примечание. Здесь и в табл. 3: НИОТ – нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы; ННИОТ – ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы.

Мутации полиморфизма областей Pro и RT гена *pol*, обнаруженные в образцах ВИЧ-1 от нелеченых ( $n = 165$ ) и леченых пациентов ( $n = 40$ )

Мутация	Коллекция 2009 ( $n = 50$ )		Коллекция 2012–2013 ( $n = 155$ )			
	доля в группе, %	количество по генотипам	леченые ( $n = 40$ )		нелеченые ( $n = 115$ )	
			доля в группе, %	количество по генотипам	доля в группе, %	количество по генотипам
<i>Область протеазы</i>						
K20I	44,0	CRF02_AG – 20 CRF63_02A1 – 2	-	-	25,2	CRF02_AG – 29
L10I/V/F	4,0	CRF02_AG – 1 IDU-A – 1	12,5	IDU-A – 5	13,9	CRF02_AG – 5 IDU-A – 10 CRF07_BC – 1
I93L	14,0	IDU-A – 7	45,0	IDU-A – 18	33,9	IDU-A – 39
V77I	28,0	IDU-A – 14	25,0	IDU-A – 10	15,7	IDU-A – 18
<i>Область обратной транскриптазы</i>						
A62V	22,0	IDU-A – 11	27,5%	IDU-A – 11	14,8	IDU-A – 17
M184I/L	4,0	CRF02_AG – 1 IDU-A – 1	-	-	-	-
K238N	2,0	IDU-A – 1	-	-	-	-
E138A	2,0	IDU-A – 1	-	-	5,2	CRF02_AG – 2 IDU-A – 4
V179I/E	2,0	IDU-A – 1	-	-	0,9	CRF07_BC – 1
V90I	-	-	2,5	IDU-A – 1	-	-

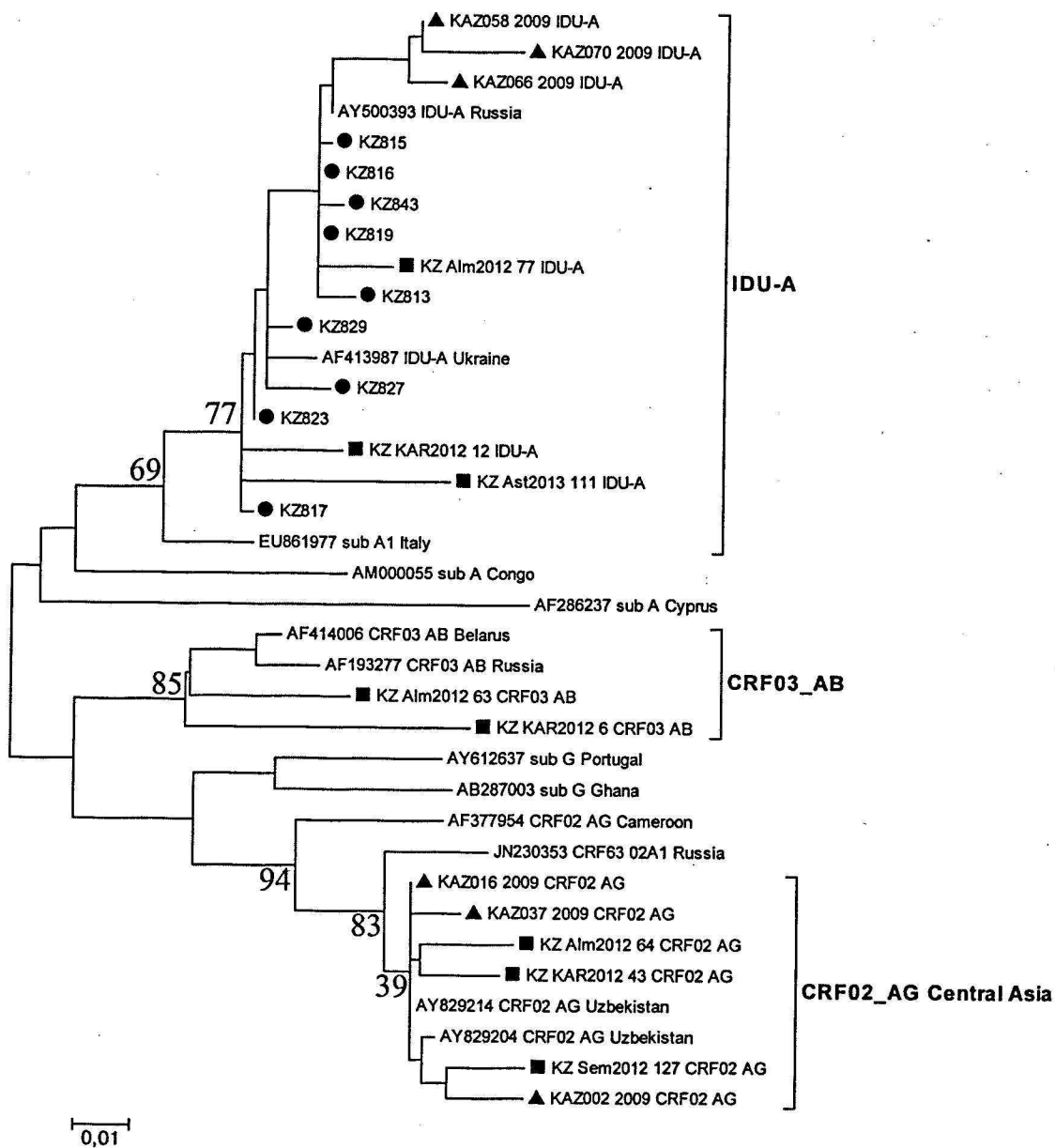


Рис. 3. Результат филогенетического анализа региона РНК, кодирующего обратную транскриптазу ВИЧ-1 (с 45-й по 222-ю аминокислоту, положение 2682–3215 по отношению к варианту HXB-2, GenBank K03455), методом максимального правдоподобия (500 независимых построений).

Коллекция 2002 г. отмечена кружками, коллекция 2009 г. – треугольниками, коллекция 2012–2013 гг. – квадратами. Для всех образцов указан генотип, предварительно определенный с помощью филогенетического анализа. Анализ был проведен с использованием статистической модели нуклеотидных замен (HKY+G).

обнаружена в 29,2 и 58,6% образцов IDU-A коллекций 2009 и 2012–2013 соответственно.

Распространенность замены A62V в области обратной транскриптазы для образцов IDU-A обеих коллекций составила 45,8 и 28,3% для обеих коллекций соответственно, при этом в 32 из 39 образцов обеих коллекций (82,1%), содержащих замену A62V, одновременно с ней присутствовала замена V77I.

Из 15 образцов коллекции 2009, для которых были получены последовательности, кодирующие интегразу, 2 относились к варианту CRF03\_AB и содержали полиморфную замену E157Q. Остальные относились к IDU-A и содержали замену L74I, которая является типичной для варианта IDU-A [19].

При исследовании области, кодирующей интегразу, был обнаружен 1 образец (KZ010\_2009), относящийся к рекомбинантному варианту CRF02\_AG и выделенный от пациента из Алматы, который содержал вставку в 48 нуклеотидов после 644-го нуклеотида интегразы. Эта вставка является дубликацией предыдущих 49 нуклеотидных остатков, за исключением одного аденилового нуклеотида. Это приводило к удлинению интегразы данного образца на границе каталитического и C-концевого доменов на 16 аминокислот, при этом не происходил сдвиг рамки считывания в области интегразы.

Анализ обратной транскриптазы ВИЧ-1 в образцах коллекции 2002. Коллекция ВИЧ-1, собранная в 1999–2002 гг. в Казахстане, была проанализирована в то время по генам

*gag* и *env* [6]; все образцы этой коллекции относились к варианту IDU-A. Ген *pol* этих образцов вируса ранее не был исследован, поэтому исключить их принадлежность к одному из рекомбинантов на основании данных 2002 г. было нельзя. Для уточнения генетического варианта ВИЧ-1 в коллекции 2002 был проведен анализ гена *pol*. В ходе этого дополнительного анализа были получены последовательности области обратной транскриптазы 9 образцов: 5 из Павлодара, 3 из Караганды и 1 из Шымкента (Южно-Казахстанская область). Филогенетический анализ полученных последовательностей в сравнении с образцами различных вариантов ВИЧ-1 из базы GenBank и последовательностями коллекций 2009 и 2012–2013 достоверно подтвердил принадлежность исследованных образцов коллекции 2002 к варианту IDU-A не только по генам *gag* и *env*, но и по гену *pol* (рис. 3). Пять из девяти образцов вируса содержали типичную для IDU-A замену A62V, что является дополнительным индикатором принадлежности образцов коллекции 2002 к этому варианту.

Никаких принципиальных отличий структуры последовательностей коллекции 2002 от коллекций 2009 и 2012–2013 обнаружено не было. Для установления факта возможной эволюции варианта IDU-A с течением времени была подсчитана генетическая дистанция области гена *pol*, а именно фрагмента 2748 – 3215 н. о. обратной транскриптазы для этого варианта в трех выборках. Учитывая тот факт, что основной группой риска в коллекции 2002 были ПИН, мы оценили генетическую дистанцию во всех трех коллекциях в пределах этой группы. Различия значений генетической дистанции между коллекциями 2009 и 2012–2013 не были статистически достоверными. Поэтому эти коллекции были объединены в одну группу. Генетическая дистанция в коллекции 2002 и объединенной группе 2009 и 2012–2013 составила 0,013 и 0,030 соответственно ( $p < 0,05$ ). Наконец, были подсчитаны генетические дистанции всех образцов IDU-A в коллекции 2002, с одной стороны, и в объединенной группе 2009 и 2012–2013 - с другой, независимо от группы риска. Генетическая дистанция для коллекций 2002 и 2009/2012–2013 составила 0,012 и 0,025 соответственно ( $p < 0,05$ ). Увеличенная генетическая дистанция в образцах IDU-A (в том числе от пациентов ПИН) коллекций 2009 и 2012–2013 свидетельствует о том, что вариант IDU-A в Казахстане с течением времени дивергировал, что привело к увеличению его гетерогенности в последние годы.

### Выводы

1. Проведен молекулярно-генетический анализ гена *pol* 205 образцов ВИЧ-1, собранных в различных регионах Казахстана в 2009 и 2012–2013 гг. Получены данные о доминировании варианта IDU-A на основной территории Казахстана, за исключением Алматы.

2. Получены сведения о доминировании в Алматы (82,9%) и об активном распространении в Восточно-Казахстанской области (26,1%) рекомбинантного варианта ВИЧ-1 CRF02\_AG.

3. Зафиксирована низкая распространенность в исследованной группе мутаций лекарственной устойчивости к антиретровирусным препаратам (3%).

Полученные в ходе работы нуклеотидные последовательности опубликованы в GenBank под номерами HQ739036-HQ739040, HQ739042, HQ739045-HQ739050, JF682734-JF682738, JF682742-JF682746, JF682748-JF682751, JF682755, JF682756, JF682758-JF682764, JF718184-JF718209, JF718211-JF718213, JF718215-JF718226, KC123195-KC123197, KC156527-KC156531, KC215144-KC215157, KJ396596-KJ396604, KF194217, KF208426, KF498449-KF498527, KF512380-KF512470, KF554429-KF554452, KF588572-KF588634, KF678858-

KF678860, KC215158, KC215159, KC215162-KC215164, KC215166, KC215169, KC215170, KC215172, KC215174, KC215175, KC215177- KC215180.

Работа выполнена при финансовой поддержке Седьмой рамочной программы Европейского Союза по проекту «Collaborative HIV and Anti-HIV Drug Resistance Network (CHAIN)» № 223131 и Международного Научно-технического Центра (МНТЦ) по проекту № 3826.

### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1, 4–13, 15–18 см. REFERENCES)

2. Ганина Л.Ю. Национальный отчет о выполнении дозорного эпидемиологического надзора в 2009 году. Алматы; 2010.
3. Тулеев М.С., Елизарьева А.В., Бокажанова А.Т., Петренко И.И., Ганина Л.Ю., Касымбекова С.Ж. Национальный отчет о выполнении Декларации о приверженности делу борьбы с ВИЧ и СПИД. Отчетный период: январь 2010 года – декабрь 2011 года. Алматы; 2012.
4. Лага В.Ю., Казеннова Е.В., Васильев А.В., Лаповок И.А., Исмаилова А., Бейшеева Н. Молекулярно-генетическая характеристика вариантов ВИЧ-1, распространенных на территории Киргизии. *Вопросы вирусологии*. 2012; 57 (5): 26–32.
19. Лаповок И.А., Лага В.Ю., Васильев А.В., Саламов Г.Г., Казеннова Е.В., Матковский И.А. и др. Молекулярно-генетический анализ области гена *pol*, кодирующей интегразу ВИЧ-1, среди пациентов из России и Украины. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии*. 2012; 4 (2): 73–81.

### REFERENCES

1. *Global report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2012*. Geneva: UNAIDS; 2012.
2. Ganina L.Yu. *National Report about Epidemiological Monitoring in 2009 [Natsional'nyy Otchet o Vypolnenii Dozornogo Epidemiologicheskogo Nadzora v 2009 Godu]*. Алматы; 2010. (in Russian)
3. Tuлеев М.С., Елизарьева А.В., Бокажанова А.Т., Петренко И.И., Ганина Л.Ю., Касымбекова С.Ж. *National Report of the Implementation of the Declaration of Commitment on HIV and AIDS. Reporting period: January 2010 – December 2011 [Natsional'nyy Otchet o Vypolnenii Deklaratsii o Priverzhennosti Delu bor'by s VICH i SPID. Otchetnyy period: yanvar' 2010 goda – dekabr' 2011 goda]*. Алматы; 2012. (in Russian)
4. Carr J.K., Nadai Y., Eyzaguirre L., Saad M.D., Khakimov M.M., Yakubov S.K. et al. Outbreak of a West African recombinant of HIV-1 in Tashkent, Uzbekistan. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2005; 39 (5): 570–5.
5. Kurbanov F., Kondo M., Tanaka Y., Zalaliev M., Giasova G., Shima T. et al. Human immunodeficiency virus in Uzbekistan: epidemiological and genetic analyses. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2003; 19 (9): 731–8.
6. Bobkov A.F., Kazennova E.V., Sukhanova A.L., Bobkova M.R., Pokrovsky V.V., Zeman V.V. et al. An HIV type 1 subtype A outbreak among injecting drug users in Kazakhstan. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2004; 20 (10): 1134–6.
7. Eyzaguirre L.M., Erasiloiva I.B., Nadai Y., Saad M.D., Kivtunen N.G., Gomatos P.J. et al. Genetic characterization of HIV-1 strains circulating in Kazakhstan. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2007; 46 (1): 19–23.
8. Andersson S., Norrgren H., Dias F., Biberfeld G., Albert J. Molecular characterization of human immunodeficiency virus (HIV)-1 and -2 in individuals from guinea-bissau with single or dual infections: predominance of a distinct HIV-1 subtype A/G recombinant in West Africa. *Virology*. 1999; 262 (2): 312–20.
9. Dowling W.E., Kim B., Mason C.J., Wasunna K.M., Alam U., Elson L. et al. Forty-one near full-length HIV-1 sequences from Kenya reveal an epidemic of subtype A and A-containing recombinants. *AIDS*. 2002; 16 (13): 1809–20.
10. Zhang M., Foley B., Schultz A.K., Macke J.P., Bulla I., Stanke M. et al. The role of recombination in the emergence of a complex and dynamic HIV epidemic. *Retrovirology*. 2010; 7: 25. Available at: <http://www.retrovirology.com/content/7/1/25>
11. Shahriar R., Rhee, S.Y., Liu T.F., Fessel W.J., Scarsella A., Towner W. et al. Nonpolymorphic human immunodeficiency virus type 1 protease and reverse transcriptase treatment-selected mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009; 53 (11): 4869–78.
12. HIV Drug Resistance Database. Available at: <http://hivdb.stanford.edu>.
13. Manual of QIAamp DNA Blood Mini QIAcube Kit. Available at: <https://www.qiagen.com/ru/products/catalog/automated-solutions/sample-prep/qiaamp-dna-blood-mini-qiacube-kit>

14. Laga V.Yu., Kazennova E.V., Vasil'ev A.V., Lapovok I.A., Ismailova A., Beysheeva N. et al. Molecular-genetic characterization of the HIV-1 variants abundant in Kirghizia. *Voprosy virusologii*. 2012; 57 (5): 26–32. (in Russian)
15. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 2011; 28 (10): 2731–9.
16. COntext-based Modeling for Expeditious Typing HIV-1. Available at: <http://comet.retrovirology.lu/>.
17. HIV Databases. Available at: <http://www.hiv.lanl.gov/>.
18. Baryshev P.B., Bogachev V.V., Gashnikova N.M. Genetic characterization of an isolate of HIV type 1 AG recombinant form circulating in Siberia, Russia. *Arch. Virol.* 2012; 157 (12): 2335–41.
19. Lapovok I.A., Laga V.Yu., Vasil'ev A.V., Salamov G.G., Kazennova E.V., Matkovskiy I.A. et al. Molecular-genetic analysis of pol gene region coding for HIV-1 integrase in patients from Russia and Ukraine. *VICH-infektsiya i immunosupressii*. 2012; 4(2): 73–81. (in Russian)

Поступила 03.06.14

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015  
УДК 616.98:578.835.151-078.33:615.373

Сейбиль В. Б.<sup>1</sup>, Малышкина Л. П.<sup>1</sup>, Агеева О. Т.<sup>2</sup>, Косолапова Е. И.<sup>3</sup>, Множинина Е. Г.<sup>4</sup>, Грошенкова Е. В.<sup>5</sup>, Кривцов Н. В.<sup>6</sup>, Гурьянова Н. И.<sup>7</sup>, Дальцаева М. К.<sup>8</sup>, Фомина Н. С.<sup>9</sup>

## Коллективный иммунитет к полиомиелиту у населения отдельных регионов России

<sup>1</sup>ФГБУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова», 142782, г. Москва; <sup>2</sup>ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Воронежской области», 394038, г. Воронеж; <sup>3</sup>ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Калужской области», 248018, г. Калуга; <sup>4</sup>ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии Московской области», 141014, г. Мытищи; <sup>5</sup>ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ярославской области», 150054, г. Ярославль; <sup>6</sup>ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии Республики Алтай», 649002, г. Горно-Алтайск; <sup>7</sup>ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Северная Осетия – Алания», 362021, г. Владикавказ; <sup>8</sup>ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии Чеченской республики», 364038, г. Грозный; <sup>9</sup>ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ненецком автономном округе», 166000, г. Нарьян-Мар

Целью настоящего исследования является изучение состояния коллективного иммунитета к полиомиелиту у населения 8 областей и республик России. Показатели коллективного иммунитета к полиомиелиту позволяют, с одной стороны, судить о качестве проводимой вакцинопрофилактики, а с другой стороны, показывают степень защищенности населения от возможной инфекции. В 8 регионах обследовано 2138 человек. Антитела к полиовирусу I – III типов определяли с помощью вакцинных вирусов Сэбина в реакции нейтрализации в культуре ткани клеток RD.

В результате установлено, что вакцинопрофилактика полиомиелита в обследованных регионах проводится на достаточно высоком уровне, благодаря чему число обследованных с антителами во многих регионах и возрастных группах достигает или приближается к 100 %, а средняя геометрическая титра антител также имеет высокие показатели.

Исследование убедительно доказало необходимость продолжать вакцинопрофилактику населения от полиомиелита и контролировать состояние коллективного иммунитета.

Ключевые слова: полиомиелит; коллективный иммунитет у привитых; вакцинопрофилактика.

Для цитирования: Вопросы вирусологии. 2015; 60(4): 37–40.

Seybil V.B.<sup>1</sup>, Malysheva L.P.<sup>1</sup>, Ageeva O.T.<sup>2</sup>, Kosolapova E.I.<sup>3</sup>, Mnozhdina E.G.<sup>4</sup>, Groshenkova E.V.<sup>5</sup>, Krivtsov N.V.<sup>6</sup>, Gurianova N.I.<sup>7</sup>, Daltsaeva M.K.<sup>8</sup>, Fomina N.S.<sup>9</sup>

## Collective immunity against poliomyelitis among the population of several regions of Russia

<sup>1</sup>Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis, 142782, Moscow, Russia; <sup>2</sup>Center of Hygiene and Epidemiology of Voronezh Region, 394038, Voronezh, Russia; <sup>3</sup>Center of Hygiene and Epidemiology of Kaluga Region, 248018, Kaluga, Russia; <sup>4</sup>Center of Hygiene and Epidemiology of Moscow Region, 141014, Mytisci, Russia; <sup>5</sup>Center of Hygiene and Epidemiology of Yaroslavl Region, 150054, Yaroslavl, Russia; <sup>6</sup>Center of Hygiene and Epidemiology of Republic of Altai, 649002, Gorno-Altaysk, Russia; <sup>7</sup>Center of Hygiene and Epidemiology of Republic of North Ossetia – Alania, 362021, Vladikavkaz, Russia; <sup>8</sup>Center of Hygiene and Epidemiology of Chechen Republic, 364038, Grozny, Russia; <sup>9</sup>Center of Hygiene and Epidemiology of Nenets Autonomous Area, 166000, Naryan Mar, Russia

The goal of this work was to estimate the collective immunity against poliomyelitis among the population of 8 regions and republics of Russia. The rates of the collective immunity against poliomyelitis allow the polio vaccination quality to be estimated and the population protection rate to be simultaneously demonstrated. A total of 8 regions (2138 people) were tested. The antibodies to the polioviruses of 1-3 types were determined against the vaccine Sabin strains in the neutralization test in the RD cell line. As a result, we found that vaccination against poliomyelitis in all observed regions was maintained at the required high level. Thus, the number of people with antibodies to the polio in most regions and age groups approximates or reaches 100%, while GMT is also high. This work demonstrated the necessity of the continuation of vaccination against poliomyelitis and control over collective immunity.

Key words: poliomyelitis; collective immunity among vaccinated; vaccination.

Citation: *Voprosy virusologii*. 2015; 60(4): 37–40. (In Russ.)

For correspondence: Vladimir Seybil, MD, PhD; e-mail: [institute@poliomyelit.ru](mailto:institute@poliomyelit.ru)

Received 16.09.14

Для корреспонденции: Сейбиль Владимир Борисович, канд. мед. наук; e-mail: [institute@poliomyelit.ru](mailto:institute@poliomyelit.ru)



Ликвидация полиомиелита как инфекции вместо намеченных 12 лет растянулась уже на 25 лет, но победного конца пока не видно. Однако за эти годы достигнут колоссальный успех в снижении заболеваемости. Если в начале борьбы с инфекцией в 1988 г. регистрировали более 350 тыс. случаев заболевания в год, то в последние годы на большинстве континентов заболеваемости нет, а в целом в мире регистрируют несколько сотен случаев в год.

Тем не менее огромное значение по-прежнему имеет качество вакцинопрофилактики и состояние коллективного иммунитета у населения.

Убедительным примером может служить эпидемия полиомиелита в 2010 г. в Таджикистане. Надо отметить, что еще во времена Советского Союза качество вакцинопрофилактики в республиках Средней Азии и охват населения прививками не были высокими. Как показала жизнь, за последние десятилетия сдвигов в лучшую сторону не произошло. Осенью 2009 г. в Таджикистан из Индии был занесен дикий полиовирус I типа, который вызвал большую эпидемию. По данным ВОЗ, в стране заболели 460 человек, из них 20 умерли; по данным Г.Г. Онищенко, в стране заболели более 700 человек. Такая большая разница связана с тем, что ВОЗ учитывает только те случаи, когда выделяют полиовирус. Данные Г.Г. Онищенко базировались на клинике и эпидемиологии заболевших. Среди больных 90 % составляли дети до 6 лет.

Из Таджикистана мигранты в 2010 г. завезли вирус в Россию. В стране заболели 14 человек – 7 мигрантов и 7 коренных жителей России.

Занос в Россию полиовируса из Таджикистана и возникновение единичных случаев заболевания убедительно показывают, что состояние коллективного иммунитета в России

находится на достаточно высоком уровне в результате качественной вакцинации.

## Материалы и методы

На протяжении многих лет сотрудники института совместно с региональными эпидслужбами ведут постоянный контроль за состоянием коллективного иммунитета к полиомиелиту в отдельных областях России.

В настоящей работе представлены результаты обследования сывороток крови 2138 человек разных возрастных групп из 8 областей и республик России. Были проверены 97 сывороток из Воронежской области, 210 - из Калужской области, 332 - из Московской области, 182 - из Ярославской области, 423 - из Республики Алтай, 301 - из Республики Северная Осетия (Алания), 393 - из Чеченской Республики и 200 сывороток из Ненецкого автономного округа.

Антитела к 3 типам полиовируса определяли в реакции нейтрализации в культуре клеток RD. В качестве антигена использовали штаммы Сэбина 3 типов вируса полиомиелита. Нулевыми считали сыворотки, в которых отсутствовали антитела в разведении 1:8.

Состояние коллективного иммунитета оценивали по 2 показателям: проценту сывороток с антителами соответствующего типа и средней геометрической титра антител.

Полученные результаты анализировали по региону в целом и отдельным возрастным группам: 1–2, 3–4, 9–10, 16–17 лет, взрослые.

## Результаты

Данные обследования 2138 сывороток из 8 регионов России на наличие антител к полиовирусу I типа представлены в табл. 1.

Таблица 1

Состояние коллективного иммунитета к вирусу полиомиелита I типа в обследованных регионах

Регион	Число сывороток	% сывороток с антителами	СГТ, log <sub>2</sub>	Возрастная группа, годы															
				1–2			3–4			9–10			16–17			взрослые			
				число сывороток	% сывороток с антителами	СГТ, log <sub>2</sub>	число сывороток	% сывороток с антителами	СГТ, log <sub>2</sub>	число сывороток	% сывороток с антителами	СГТ, log <sub>2</sub>	число сывороток	% сывороток с антителами	СГТ, log <sub>2</sub>	число сывороток	% сывороток с антителами	СГТ, log <sub>2</sub>	
Воронежская область	97	99,0	7,4														97	99,0	7,4
Калужская область	210	99,0	8,7	54	100,0	8,5	35	97,1	8,6	121	99,2	8,9							
Московская область	332	99,0	7,9	66	100,0	8,5	59	99,0	8,2				52	98,8	8,6	155	98,9	7,6	
Ярославская область	182	97,8	7,0										80	100,0	7,4	102	96,1	6,7	
Республика Алтай	423	98,6	7,4	55	98,2	8,0	55	100,0	8,0	3	3*	6,0	93	100,0	7,9	217	97,7	6,7	
Республика Северная Осетия (Алания)	301	100,0	8,6	3	3*	5,7	17	17*	8,4	136	100,0	8,8	145	100,0	8,6				
Чеченская Республика	393	97,4	7,4				98	100,0	7,9				197	99,0	7,7	98	92,8	6,1	
Ненецкий автономный округ	200	100,0	8,2				100	100,0	8,2				100	100,0	7,4				
<b>Всего</b>	<b>2138</b>	<b>98,8</b>	<b>7,8</b>	<b>178</b>	<b>99,6</b>	<b>7,7</b>	<b>364</b>	<b>99,4</b>	<b>8,2</b>	<b>260</b>	<b>99,7</b>	<b>7,9</b>	<b>667</b>	<b>99,6</b>	<b>7,9</b>	<b>669</b>	<b>96,9</b>	<b>6,9</b>	

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3: \* – абсолютное число; СГТ – средняя геометрическая титра.

Таблица 2

## Состояние коллективного иммунитета к вирусу полиомелита II типа в обследованных регионах

Регион	Число сыво-роток	% сыво-роток с антите-лами	СГТ, log <sub>2</sub>	Возрастная группа, годы															
				1-2			3-4			9-10			16-17			взрослые			
				число сыво-роток	% сыво-роток с антите-лами	СГТ, log <sub>2</sub>	число сыво-роток	% сыво-роток с антите-лами	СГТ, log <sub>2</sub>	число сыво-роток	% сыво-роток с антите-лами	СГТ, log <sub>2</sub>	число сыво-роток	% сыво-роток с антите-лами	СГТ, log <sub>2</sub>	число сыво-роток	% сыво-роток с антите-лами	СГТ, log <sub>2</sub>	
Воро-нежская область	97	93,8	6,6														97	93,8	6,6
Калужская область	210	98,6	8,2	54	98,1	8,9	35	97,1	8,6	121	99,2	7,8							
Москов-ская об-ласть	332	98,4	7,8	66	96,3	8,8	59	100,0	8,3				52	100,0	7,6	155	98,0	7,6	
Ярос-лавская область	182	98,9	7,3										80	100,0	8,9	102	98,0	6,1	
Республика Алтай	423	99,1	7,1	55	100,0	7,4	55	96,4	8,1	3	3*	5,3	93	100,0	6,8	217	99,1	6,9	
Республика Северная Осетия (Алания)	301	99,7	8,5	3	3*	8,3	17	17*	8,4	136	100,0	8,8	145	99,3	8,2				
Чеченская Респуб-лика	393	99,0	7,4				98	100,0	8,0				197	99,0	7,4	98	97,9	6,8	
Ненец-кий автоном-ный округ	200	100,0	7,2				100	100,0	8,0				100	100,0	6,4				
Всего...	2138	98,4	7,5	178	98,6	8,4	364	98,9	8,2	260	99,7	7,3	667	99,7	7,6	669	97,4	6,8	

Таблица 3

## Состояние коллективного иммунитета к вирусу полиомелита III типа в обследованных регионах

Регион	Число сыво-роток	% сыво-роток с антите-лами	СГТ, log <sub>2</sub>	Возрастная группа, годы															
				1-2			3-4			9-10			16-17			взрослые			
				число сыво-роток	% сыво-роток с антите-лами	СГТ, log <sub>2</sub>	число сыво-роток	% сыво-роток с антите-лами	СГТ, log <sub>2</sub>	число сыво-роток	% сыво-роток с антите-лами	СГТ, log <sub>2</sub>	число сыво-роток	% сыво-роток с антите-лами	СГТ, log <sub>2</sub>	число сыво-роток	% сы-вороток с анти-телами	СГТ, log <sub>2</sub>	
Воро-нежская область	97	96,9	7,2														97	96,9	7,2
Калуж-ская область	210	98,6	7,5	54	98,1	7,7	35	97,1	7,7	121	99,2	7,2							
Москов-ская область	332	99,2	8,0	66	99,0	8,2	59	99,0	8,6				52	100,0	8,3	155	98,8	8,2	
Ярос-лавская область	182	97,8	7,0										80	100,0	7,4	102	96,1	6,7	
Респуб-лика Алтай	423	99,8	7,8	55	98,2	7,0	55	100,0	8,2	3	3*	6,3	93	100,0	8,2	217	100,0	7,7	
Республика Северная Осетия (Алания)	301	99,0	6,6	3	3*	7,3	17	17*	7,1	136	98,5	6,4	145	99,3	6,6				
Чечен-ская Респу-блика	393	97,4	7,2				98	99,0	7,6				197	99,5	7,3	98	91,8	6,5	
Не-нецкий авто-номный округ	200	100,0	8,2				100	100,0	8,2				100	100,0	7,2				
Всего...	2138	98,6	7,4	178	98,8	7,6	364	99,2	7,9	260	99,2	6,6	667	99,8	7,5	669	96,7	7,3	

Полученные показатели как по регионам, так и по возрастным группам оказались высокими. Число сывороток с антителами I типа в целом по обследованной группе достигало 98,8%. Несколько ниже эти показатели были в Чеченской Республике, Ярославской области, Республике Алтай. В остальных 5 обследованных регионах количество иммунных сывороток достигало 99–100%. Необходимо отметить достаточно высокие показатели средней геометрической титра антител – средний показатель  $7,8 \log_2$ .

Оценивая показатели коллективного иммунитета в отдельных возрастных группах, необходимо заметить, что количество иммунных сывороток в 4 группах приближалось к 100%, и только в группе взрослых оно было чуть ниже – 96,9%. Средняя геометрическая титра была около  $8 \log_2$  во всех возрастных группах, кроме группы взрослых, в которой этот показатель равнялся  $6,9 \log_2$ .

Состояние коллективного иммунитета к полиовирусу II типа представлено в табл. 2.

Во всех обследованных регионах доля сывороток с антителами к полиовирусу II типа составляла от 93,8% (Воронежская область) до 98,4–100% в остальных обследованных регионах при среднем показателе 98,4%. Средняя геометрическая титра антител колебалась в пределах  $6,6$ – $8,5 \log_2$  при среднем показателе  $7,5 \log_2$ .

Большая доля иммунных сывороток установлена практически во всех возрастных группах, она приближалась к 100%. Средняя геометрическая титра антител колебалась от  $6,8 \log_2$  (взрослые) до  $8,0 \log_2$  (дети 1–2 и 3–4 лет).

Состояние коллективного иммунитета к полиовирусу III типа представлено в табл. 3.

Подобно состоянию коллективного иммунитета к полиовирусам I и II типов, показатели коллективного иммунитета к полиовирусу III типа были достаточно высокими во всех обследованных регионах: процент серопозитивных сывороток колебался в пределах 96,9–100 при средней величине 98,6%. Средняя геометрическая титра антител составила  $7,4 \log_2$ .

В отдельных возрастных группах количество сывороток с антителами составляло 98,8 – 99,8%. Только в группе взрослых оно снижалось до 96,7%. Во всех возрастных группах отмечены достаточно высокие показатели средней геометрической титра антител:  $6,6$ – $7,6 \log_2$ .

### Обсуждение

Проведенные исследования убедительно показали, что число иммунных лиц как в обследованных регионах, так и в отдельных возрастных группах было высоким, приближающимся к 100%. Высокий показатель и средней геометрической титра антител, величина которого никогда не опускалась ниже  $6 \log_2$ . Следовательно, качество вакцинопрофилактики во всех изученных регионах хорошее.

Случай заноса дикого полиовируса в Россию в 2010 г. указывает на то, что вакцинопрофилактика должна оставаться на высоком уровне с полным охватом детей всех возрастов, подлежащих вакцинации.

### Заключение

Оценка состояния коллективного иммунитета к полиомиелиту в 8 регионах России свидетельствовала о его высоких показателях как во всех обследованных регионах, так и в отдельных возрастных группах.

Поступила 16.09.14

КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015  
УДК 578.832.1:578.531.08

Дешева Ю. А., Смолоногина Т. А., Руденко Л. Г.

## Доклиническое изучение реассортантного вакцинного штамма вируса гриппа A/17/перепел/Гонконг/97/84 (H9N2)

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

В настоящем исследовании изучены свойства реассортантного штамма вируса гриппа A/17/перепел/Гонконг/97/84 (H9N2), подготовленного в отделе вирусологии ФГБУ «НИИЭМ» СЗО РАМН. Вакцинный кандидат на основе донора аттенуации A/Ленинград/134/17 (H2N2), содержащий гемагглютинин (HA) и нейраминидазу (NA) апатогенного птичьего вируса гриппа A(H9N2) линии G1, проявлял свойства температурочувствительности и холодовой адаптации. При интраназальном введении мышам вакцинный штамм A(H9N2) был аттенуированным, не размножался в легких, но хорошо репродуцировался в носовых ходах, вызывая выработку поствакцинальных антител. Вакцинный штамм A(H9N2) был иммуногенен при введении мышам в виде как интраназальной живой гриппозной вакцины (ЖГВ), так и инактивированной гриппозной вакцины (ИГВ). Интраназальное введение ЖГВ подтипа A(H9N2) стимулировало выработку локальных антител, что приводило к снижению репродукции в легких заражающего вируса другой антигенной разновидности G9.

Ключевые слова: вирус птичьего гриппа; гриппозная вакцина.

Для цитирования: Вопросы вирусологии. 2015; 60(4): 40–44.

Desheva Yu.A., Smolonogina T.A., Rudenko L.G.

### A preclinical trial of the reassortant influenza virus vaccine strain A/17/Quail/Hong Kong/97/84 (H9N2)

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

In this work, we examined the reassortant influenza virus strain A/17/Quail/Hong Kong/97/84 (H9N2) prepared at the Virology Department, Institute of Experimental Medicine, Russian Academy of Medical Sciences. The A/Leningrad/134/17 (H2N2)-based vaccine candidate contained hemagglutinin and the neuraminidase from the nonpathogenic avian influenza A virus A(H9N2) of the G1 antigenic lineage. The vaccine candidate showed the ts-properties and cold adaptation. When administered intranasally to mice, the vaccine strain A(H9N2) was attenuated. It did not multiply in the lungs but was reproduced well in the nasal cavity, causing the production of the post-vaccination antibody. The A/17/Quail/Hong Kong/97/84(H9N2) virus was immunogenic when administered to mice as a LAIV intranasally or as a IIV intramuscularly. Intranasal A(H9N2) LAIV stimulated local production of the antibodies, which resulted in reduction in lung titers of the challenge virus G9.

Key words: avian influenza virus; influenza vaccine.

Citation: Voprosy virusologii. 2015; 60(4): 40–44. (In Russ.)

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

Received 17.03.14

Для корреспонденции: Дешева Юлия Андреевна, д-р мед. наук, вед. науч. сотр.; e-mail: desheva@mail.ru

Вирусы птичьего гриппа подтипа А(Н9N2) характеризуются высокой способностью передаваться от птиц к домашним животным и человеку в связи с легким возникновением вариантов, обладающих сродством к сиаловым рецепторам млекопитающих [1]. В сероэпидемиологических исследованиях, проведенных в Китае, выявлены антитела к вирусам А(Н9N2) у 15% работников птицефабрик [2]. Вирусы А(Н9N2), выделенные от людей с симптомами респираторной инфекции в Гонконге и Китае с 1997 по 2009 г. [3], принадлежали в основном к антигенной линии G1 в отличие от других вирусов А(Н9N2), выделенных от свиней и домашней птицы и относящихся к антигенной разновидности G9. Вирусы А(Н9N2), вызвавшие случаи заболевания у людей, не являлись высокопатогенными (ВП), т. е. не обладали высокорасщепляемым гемагглютинином (НА) и не были высоковирулентными для домашней птицы [4]. Тем не менее молекулярно-генетический анализ генов, кодирующих внутренние белки вирусных изолятов А(Н9N2), показал их сходство с ВП вирусами А(Н5N1), вызвавшими вспышку среди людей в 1997 г. [5]. Филогенетический анализ показал, что после 1994 г. евразийские вирусы А(Н9N2) в результате процессов генетической реассортации с участием вирусов G1 и G9, циркулирующих среди дикой и домашней птицы, сформировали уже несколько антигенных линий. В последнее время в Китае доминирующими становятся линии h9.4.2.5, h9.4.2.6, представленные изолятами А(Н9N2), полученными в 2005–2011 гг. от кур. В то же время продолжается глобальное распространение линий h9.3.3, h9.4.1 и h9.4.2, представленных вирусами А(Н9N2) А/утка/Хоккайдо/26/99, А/перепел/Гонконг/G1/97 и А/курица/Гонконг/G9/97, при этом две последние линии могут представлять наибольшую угрозу для здоровья населения по сравнению с другими [6]. Поскольку вирусы птичьего гриппа подтипа Н9 передаются человеку, имеют генетическое сходство с ВП вирусами А(Н5N1) и широко распространены в Азии, Европе и на Ближнем Востоке, разработка вакцин, защищающих человека от гриппа подтипа А(Н9N2), была включена ВОЗ в общий план предпандемической подготовки [7]. В нашей стране в доклинических и клинических испытаниях ранее были изучены вакцинные штаммы против потенциально пандемического и пандемического гриппа подтипов Н1, Н5 и Н7, полученные на основе донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (Н2N2) [8, 9]. Настоящее исследование посвящено изучению биологических свойств вакцинного штамма А(Н9N2), разработанного на основе донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (Н2N2) и содержащего гены поверхностных гликопротеинов НА и нейраминидазы (NA) от вируса птичьего гриппа А/перепел/Гонконг/G1/97 (Н9N2).

## Материалы и методы

**Вирусы.** В работе были использованы холодоадаптированный (ХА) донор аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (Н2N2) [Лен/17] из коллекции отдела вирусологии ФБГУ «НИИЭМ» СЗО РАМН; реассортантный штамм А/17/перепел/Гонконг/97/84 (Н9N2) [Лен17/Н9], полученный методами классической генетической реассортации в развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ) на основе донорского штамма Лен/17 по описанным ранее методикам [10]. Реассортант унаследовал гены НА и NA от птичьего вируса и 6 генов негликозилированных белков от донора аттенуации Лен/17 (формула генома 6:2), что было подтверждено рестрикционным анализом ДНК-копий генов внутренних и неструктурных белков и секвенированием генов НА и NA. В исследовании также использовали вирусы гриппа подтипа А(Н9N2), выделенные в Гонконге от птиц и человека: А/перепел/Гонконг/G1/97 (Н9N2) [Н9N2-дт], А/Гонконг/1073/99 (Н9N2), А/курица/Гонконг/G9/97 (Н9N2), предоставленные Центром по контролю и предупреждению заболеваний, США. Вирусы культивировали в аллантоисной полости 10–11-дневных РКЭ: реассортант Лен17/Н9 и родительский штамм Лен/17 при 34°C в течение 48 ч, дикие вирусы подтипа А(Н9N2) при 37°C в течение 24–26 ч.

**Оценка прививочных свойств реассортантного вируса Лен17/Н9 на мышах**

*Патогенность* изучали на самках мышей линии СВА в

возрасте 10–12 нед (питомник Рапполово, Ленинградская область). Мышей под легкой эфирной анестезией заражали интраназально 0,05 мл вирусосодержащей аллантоисной жидкости с 6 lg или 7 lg ЭИД<sub>50</sub> реассортантного вируса или 6 lg ЭИД<sub>50</sub> одного из родительских штаммов. В контрольной группе животным вводили 0,05 мл стерильного фосфатного буферного раствора (ФБ). Эвтаназию проводили согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 266 МЗ РФ от 19.06.2003). Репродукцию вирусов определяли в легких и носовых ходах мышей (по 3 из каждой группы) на 3-и сутки по показателям титрования суспензии органов в РКЭ начиная с разведения 1:10 для легких и 1:2 для носовых ходов.

*Подготовка инактивированного антигена для парентеральной иммунизации.* Вирус очищали и концентрировали по описанному методикам [11], после чего вирусную суспензию с содержанием 1 мг/мл (40 000 ГАЕ/мл) смешивали с предварительно разведенным в 40 раз 37% раствором формальдегида в соотношении 100:1 с последующей экспозицией не менее 3 сут при 4°C. Для определения полноты инаktivации вирус в неразведенном виде, а также разведенный в 10 и 100 раз инокулировали в аллантоисную полость 10-дневных куриных эмбрионов и инкубировали в течение 2 сут при 34°C, после чего содержание вируса определяли в реакции гемагглютинации.

*Изучение иммуногенности.* Группы мышей иммунизировали реассортантным вирусом Лен17/Н9 интраназально в дозе 7 lg ЭИД<sub>50</sub> или внутримышечно в дозе 10 мкг/0,1 мл. Часть животных иммунизировали последовательно протитипами живой (ЖГВ) и инаktivированной гриппозной вакцины (ИГВ) с интервалом 21 день. В контрольных группах животным вводили родительские вирусы Лен/17 или Н9N2-дт в дозе 6 lg ЭИД<sub>50</sub> или ФБ.

Сыворотки крови и смывы из носовых ходов мышей были получены через 4 нед после последней иммунизации. Реакцию торможения гемагглютинации (РТГА) и реакцию микронеutralизации (РМН) с сыворотками проводили с использованием в качестве антигена реассортантного вируса Лен17/Н9. Реакцию нейтрализации выполняли, как описано ранее [12], за исключением того, что спектрофотометрию планшетов после окрашивания 0,2% спиртовым раствором кристаллического фиолетового проводили при длине волны 630 нм. Иммуноферментный анализ (ИФА) для определения вирусспецифических IgG и IgA выполняли по описанной методике [12] в 96-луночных планшетах («Sarstedt, Inc.», Ньютон, Северная Каролина, США), которые предварительно сенсбилизировали 100 ГАЕ/0,1 мл цельного очищенного вируса Лен17/Н9. Результаты выражали в десятичных логарифмах величины, обратной конечному разведению. За конечное разведение принимали наименьшее разведение образца, дающее оптическую плотность при длине волны 490 нм, превышающую среднюю оптическую плотность в контрольных образцах более чем на 3 стандартных отклонения.

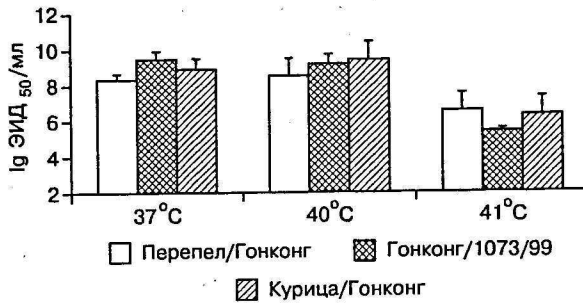
*Экспериментальное заражение.* Животным, предварительно иммунизированным по схемам ЖГВ-плацебо и ИГВ-ЖГВ, а также контрольным интактным животным вводили интраназально по 0,05 мл вируса А/курица/Гонконг/G9/97 (Н9N2) в заражающей дозе 7 lg ЭИД<sub>50</sub>. Репродукцию вирусов определяли в легких и носовых ходах мышей на 3-и сутки после заражения.

*Статистические методы.* При анализе полученных результатов определяли среднегеометрические титры, средние величины и среднеквадратическое отклонение ( $M \pm СКО$ ). Статистическую значимость различий устанавливали с помощью непараметрического критерия Манна - Уитни при критическом уровне значимости 0,05.

## Результаты и обсуждение

В процессе отбора потенциальных кандидатов для подготовки вакцинных штаммов против возможных пандемий будущего была произведена оценка репродукции в куриных эмбрионах различных штаммов вируса птичьего гриппа подтипа Н9. Для определения верхней ограничительной температуры были изучены характеристики репродукции в





Определение верхней ограничительной температуры инкубации в куриных эмбрионах вирусов гриппа подтипа А(Н9N2), выделенных от птиц и человека.

По оси абсцисс – показатели температурных режимов инкубации исследуемых вирусов А/перепел/Гонконг/Г1/97 (Н9N2), А/Гонконг/1073/99 (Н9N2), А/курица/Гонконг/Г9/97 (Н9N2); по оси ординат – показатели 50% эмбриональной инфекционной дозы (ЭИД<sub>50</sub>), выраженные в log<sub>10</sub>.

РКЭ при различных температурах следующих вирусов: А/перепел/Гонконг/Г1/97 (Н9N2), А/Гонконг/1073/99 (Н9N2), А/курица/Гонконг/Г9/97 (Н9N2). Показана высокая степень температуростойкости всех исследованных вирусов: показатели инфекционности при 40°C практически не отличались от таковых при 37°C (см. рисунок), и только при повышении температуры до 41°C репродукция указанных штаммов снижалась.

При изучении фенотипических свойств вакцинного кандидата Лен17/Н9 были продемонстрированы высокий уровень репродукции при понижении температуры инкубации до 25°C и практически полное отсутствие инфекционности при 40°C, что свидетельствовало о приобретении реассортантным вирусом Лен17/Н9 свойств температурочувствительности (Δ-фенотип) и холодовой адаптации (са-фенотип), являющихся маркерами аттенуации (табл. 1).

При интраназальном введении мышам линии СВА в заражающей дозе 6 - 7 lg ЭИД<sub>50</sub> реассортант Лен17/Н9 репродуцировался в носовых ходах в титрах 1,1 - 3,5 lg ЭИД<sub>50</sub>/мл соответственно и не размножался в легочной ткани, где температура существенно выше, чем в носовых ходах (табл.2). Выделенный от птиц в 1999 г. вирус А(Н9N2) дикого типа размножался в легких мышей без предварительной адаптации в среднем титре 4,9 lg ЭИД<sub>50</sub>/мл. При этом средняя потеря массы тела подопытных животных на 3 - 5-е сутки после инфекции диким вирусом А(Н9N2) не превышала 4% (данные не показаны), что подтверждает полученные ранее сведения о низкой патогенности для мышей вирусов птичьего гриппа подтипа А(Н9N2) [13].

Однократное интраназальное введение вакцинного штамма А(Н9N2) мышам вызывало образование нейтрализующих сывороточных антител к гомологичному вирусу (табл. 3). При этом уровни поствакцинальных антигемагглютинирующих антител не отличались от таковых в контрольной группе интактных животных, однако в ИФА выявлено наличие в поствакцинальных носовых смывах мышей иммуноглобулинов – IgG и IgA к вакцинному вирусу. Интраназальное введение родительского вируса Лен17 подтипа А(Н2N2) также вызывало формирование локальных IgA, реагирующих с вирусом А(Н9N2). Достоверное увеличение уровней поствакцинальных антигемагглютинирующих антител было достигнуто только в группах, включающих ИГВ (см. табл. 3). Иммунизация вакцинным штаммом А/17/перепел/Гонконг/97/84 (Н9N2), принадлежащим к антигенной линии G1, создавала 25–50% за-

щиту от инфекции вирусом другой антигенной разновидности А/курица/Гонконг/Г9/97 (Н9N2) даже при отсутствии перекрестно-реагирующих антигемагглютинирующих антител (табл. 4).

Таким образом, представленный вакцинный кандидат А/17/перепел/Гонконг/97/84 (Н9N2) с формулой генома 6:2 характеризовался высоким уровнем репродукции в куриных эмбрионах, температурочувствительностью, адаптацией к пониженной температуре культивирования, характерной для аттенуированного донорского штамма. Реассортантный вакцинный штамм, содержащий НА и NA апатогенного птичьего вируса гриппа А(Н9N2), был аттенуированным для мышей, поскольку не размножался в легких, однако хорошо репродуцировался в носовых ходах, вызывая выработку поствакцинальных антител. Штамм А/17/перепел/Гонконг/97/84 (Н9N2) был иммуногенен при введении мышам в виде как ЖГВ интраназально, так и ИГВ внутримышечно. Интраназальное введение ЖГВ подтипа А(Н9N2) стимулировало выработку локальных антител, что приводило к снижению репродукции в легких заражающего вируса другой антигенной разновидности (G9).

Вакцина, разрабатываемая против потенциально пандемических вирусов гриппа, должна обладать такими качествами, как возможность быстрой наработки вирусного материала, простота транспортировки, простота введения прививаемым контингентам и наиболее широкий спектр действия против различных антигенных разновидностей в пределах одного подтипа. ЖГВ в полной мере удовлетворяет этим требованиям, поскольку вводится интраназально, производится на основе высокопродуктивных ХА донорских штаммов, выпускается в лиофилизированном виде и стимулирует различные механизмы иммунного ответа, включая локальные IgA, цитотоксические CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоциты, неспецифические факторы иммунитета (интерферон, НК-клетки) [14, 15]. В настоящем исследовании был подробно изучен созданный нами вакцинный штамм на основе вируса птичьего гриппа А/перепел/Гонконг/Г1/97 (Н9N2), представляющего собой эталонный штамм антигенной линии G1.

За рубежом ранее были подготовлены и изучены вак-

Таблица 1  
Репродукция реассортанта А/17/перепел/Гонконг/97/84 (Н9N2) и родительских вирусов при различной температуре культивирования в куриных эмбрионах

Вирус	Характеристика	Репродуктивная активность, средние титры, lg ЭИД <sub>50</sub> /мл ± СКО, при температуре инкубации:		
		34°C	25°C	40°C
А/17/перепел/Гонконг/97/84 (Н9N2)	Вакцинный кандидат	9,8 ± 0,5	7,0 ± 0,2	1,8 ± 0,3
А/Ленинград/134/17/57 (Н2N2)	ХА донорский штамм	9,5 ± 0,3	7,3 ± 0,2	1,5 ± 0,0
А/перепел/Гонконг/6/97 (Н9N2)	Апатогенный вирус птичьего гриппа	8,6 ± 0,3	1,5 ± 0,0	9,2 ± 0,2

Таблица 2  
Репродукция реассортантного вируса гриппа А/17/перепел/Гонконг/97/84 (Н9N2) и родительских штаммов на 3-й сутки после интраназального введения мышам

Препарат	Характеристика	Заражающая доза, lg ЭИД <sub>50</sub>	Титры вируса в гомогенатах органов, M ± СКО lg ЭИД <sub>50</sub> /мл	
			легкие (n = 3)	носовые ходы (n = 3)
Лен17/Н9	Вакцинный кандидат	6	1,5 ± 0,0	1,1 ± 0,3
		7	1,5 ± 0,0	3,8 ± 0,2
Лен17	ХА донорский штамм	6	2,3 ± 0,5	2,5 ± 0,3
Н9N2-дт	Апатогенный вирус птичьего гриппа	6	4,9 ± 0,5	1,8 ± 0,5

Выработка сывороточных и локальных антител через 28 дней после иммунизации мышей реассортантным вакцинным штаммом А/17/перепел/Гонконг/97/84 (H9N2) в виде ЖГВ или ИГВ\*

Таблица 3

Препарат		Число животных в группе	Поствакцинальные антитела			
1-я иммунизация	2-я иммунизация		сывороточные, СГТ		локальные, М ± СКО log <sub>10</sub>	
			РТГА	РМН	ИФА	
				IgG	IgA	
ЖГВ Лен17/Н9	ФБ	5	5,0	9,1	1,6 ± 0,9	2,6 ± 0,7**
ИГВ Лен17/Н9	ФБ	6	15,9	21,8***	1,0 ± 0,5	1,6 ± 0,7
Н9N2-дт	ФБ	5	6,6	11,9	1,5 ± 0,5	1,6 ± 0,4
Лен/17	ФБ	5	5,0	5,0	1,4 ± 0,4	2,4 ± 0,7#
ИГВ Лен17/Н9	ЖГВ Лен17/Н9	5	11,5	13,2	1,4 ± 0,5	1,5 ± 0,8
ЖГВ Лен17/Н9	ИГВ Лен17/Н9	5	20,0	17,4	1,2 ± 0,3	1,3 ± 0,4
Контроль (ФБ)	ФБ	5	5,0	5,0	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0

Примечание. \* – значения р даны по сравнению с аналогичными показателями в группе интактных животных; \*\* –  $p = 0,005$ ; \*\*\* –  $p = 0,005$ ; # –  $p = 0,035$ .

Защита мышей, иммунизированных вакцинным штаммом А/17/перепел/Гонконг/97/84 (H9N2), от реинфекции антигенно отличающимся вирусом птичьего гриппа А/курица/Гонконг/Г9/97 (H9N2)

Таблица 4

Препарат	Поствакцинальные антитела к штамму А/курица/Гонконг/Г9/97 (H9N2) в РТГА, СГТ	Выделение заражающего вируса из легких		Выделение заражающего вируса из носовых ходов	
		выделено/всего	средние титры вируса ± СКО Ig ЭИД <sub>50</sub> /мл	выделено/всего	средние титры вируса ± СКО Ig ЭИД <sub>50</sub> /мл
ЖГВ	≤ 5,0	3/4	4,2 ± 2,0	2/4	1,1 ± 0,3
ИГВ-ЖГВ	≤ 5,0	2/4	3,1 ± 1,8	2/4	1,3 ± 0,5
Контроль (ФБ)	≤ 5,0	4/4	6,9 ± 0,6	4/4	2,0 ± 0,8

цинные штаммы на основе рекомендованных ВОЗ вирусов А/Гонконг/1073/99 (H9N2) и А/курица/Гонконг/Г9/97 (H9N2) [16, 17]. В доклинических и клинических испытаниях инактивированных вакцин на основе вируса А/Гонконг/1073/99 (H9N2) было обнаружено, что субъединичная вакцина значительно уступала в иммуногенности цельновирионной. У 40% лиц до 1970 года рождения наблюдалась перекрестная реакция предвакцинальных сывороток с вирусом А(H9N2), что может объясняться ранее перенесенной инфекцией, вызванной вирусами А(H2N2), период циркуляции которых завершился в конце 60-х годов XX века. Поствакцинальные титры антигемагглютинирующих и нейтрализующих антител в этой возрастной группе достигали протективных значений (≥ 1:40) при однократном введении субъединичной вакцины, в то время как среди большинства людей более молодого возраста, привитых двукратно субъединичным или цельновирионным препаратом, интенсивность иммунного ответа была крайне низкой [16].

В клинических испытаниях была также изучена ЖГВ на основе американского донора аттенуации А/Энн Арбор/6/60(H2N2) и штамма А/курица/Гонконг/Г9/97 (H9N2) [18]. Была показана безвредность препарата; 4-кратные сероконверсии антигемагглютинирующих антител после двукратного интраназального введения в дозе 8,2 Ig ТЦИД<sub>50</sub> наблюдались у 58% лиц, которые были серонегативными до прививки. Отмечено, что хотя участниками исследования были лица не старше 1968 года рождения, среди них около 30% до прививки были серопозитивными к штамму А(H9N2), что объясняется авторами перекрестным реагированием антител, приобретенных к современным сезонным вирусам гриппа. Авторы делают вывод о необходимости обследования прививаемых контингентов до иммунизации вакциной А(H9N2). Ряд исследований подтверждает высокий уровень перекрест-

ного реагирования вирусов А(H9N2) с антителами к современному эпидемическим вирусам гриппа по сравнению с другими вирусами птичьего гриппа, такими как H5 или H7 [19].

В нашем исследовании представлены результаты первого опыта по созданию отечественного вакцинного штамма для ЖГВ подтипа А(H9N2). Получено еще одно экспериментальное подтверждение способности донора аттенуации Лен/17 при скрещивании с температуроустойчивыми вирусами птичьего гриппа передавать признаки аттенуации реассортантным штаммам при сохранении последних иммуногенности и протективной активности. В целом представленные результаты свидетельствуют о том, что вакцинный кандидат А (H9N2) может быть использован для производства как живой, так и инактивированной гриппозных вакцин, поскольку не только обладает высокой репродуктивной активностью в РКЭ, но и, как показано в эксперименте на мышах, способен индуцировать иммунный ответ при интраназальном введении в виде прототипа ЖГВ и парентеральном введении в виде прототипа ИГВ.

#### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 2–8, 11–19 см. REFERENCES)

- Каверин Н.В., Смирнов Ю.А. Межвидовая трансмиссия вирусов гриппа А и проблема пандемий. *Вопросы вирусологии*. 2003; 48(3): 4–10.
- Дешева Ю.А., Смолоногина Т.А., Сергеева М.В., Рекстин А.Р., Свэйн Д., Климов А.И. и др. Изучение биологических свойств холодаадаптированного реассортантного штамма вируса гриппа подтипа H7N3. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2009; 1: 31–6.
- Дешева Ю.А., Руденко Л.Г., Александрова Г.И., Смолоногина Т.А. Штамм вируса гриппа для производства живой и инактивированной гриппозной вакцины. Патент РФ № 2464309, 2012.

#### REFERENCES

- Kaverin N.V., Smirnov Yu.A. Interspecies transmission of influenza A viruses and influenza pandemics. *Voprosy virusologii*. 2003; 48(3): 4–10. (in Russian)
- Wang M., Fu C.X., Zheng B.J. Antibodies against H5 and H9 avian influenza among poultry workers in China. *N. Engl. J. Med.* 2009; 360(24): 2583–4.
- Peiris M., Yuen K.Y., Leung C.W., Chan K.H., Ip P.L., Lai R.W. et al. Human infection with influenza H9N2. *Lancet*. 1999; 354: 916–7.
- Saito T., Lim W., Suzuki T., Suzuki Y., Kida H., Nishimura S.I. et al. Characterization of a human H9N2 influenza virus isolated in Hong Kong. *Vaccine*. 2001; 20(1–2): 125–33.
- Guan Y., Shortridge K.F., Krauss S., Chin P.S., Dyrting K.C., Ellis T. et al. H9N2 influenza viruses possessing H5N1-like internal genomes continue to circulate in poultry in southeastern China. *J. Virol.* 2000; 74(20): 9372–80.
- Jiang W., Liu S., Hou G., Li J., Zhuang Q., Wang S. et al. Chinese and global distribution of H9 subtype avian influenza viruses. *PLoS One*. 2012; 7(12): e52671.
- World Health Organization. Antigenic and genetic characteristics of influenza A(H5N1) and influenza A(H9N2) viruses for development of candidate vaccine viruses for pandemic preparedness – February 2011. *Wkly Epidemiol. Rec.* 2011; 86(11): 93–100. Available at: <http://www.who.int/wer/2011/wer8611.pdf>
- Rudenko L., Kiseleva I., Mironov A., Desheva J., Larionova N., Chirkova T. et al. Development of pandemic live attenuated influenza vaccine (LAIV) in Russia. *Influenza Other Respir. Viruses*. 2011; 5(Suppl. 3): 333–7.
- Desheva Yu.A., Smolnogiina T.A., Sergeeva M.V., Rekstin A.R., Swayne D., Klimov A.I. et al. Study of biological properties of cold-adapted reassortant strain of influenza virus subtype H7N3. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii*. 2009; 1: 31–6. (in Russian)
- Desheva Yu.A., Rudenko L.G., Aleksandrova G.I., Smolnogiina T.A. Influenza Virus Strain for Producing Live and Inactivated Influenza Vaccine. Patent RF № 2464309, 2012. (in Russian)

11. Shirvan A.N., Moradi M., Aminian M., Madani R. Preparation of neuraminidase-specific antiserum from the H9N2 subtype of avian influenza virus. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 2007; 31(4): 219–23.
12. Rowe T., Abernathy R.A., Hu-Primmer J., Thompson W.W., Lu X., Lim W. et al. Detection of antibody to avian influenza A(H5N1) virus in human serum by using a combination of serologic assays. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37(4): 937–43.
13. Lu X., Renshaw M., Tumpey T.M., Kelly G.D., Hu-Primmer J., Katz J. M. Immunity to influenza A H9N2 viruses induced by infection and vaccination. *J. Virol.* 2001; 75: 4896–901.
14. Johnson P. R., Feldman S., Thompson J. M., Mahoney J. D., Wright P. F. Immunity to influenza A virus infection in young children: a comparison of natural infection, live cold-adapted and inactivated vaccines. *J. Infect. Dis.* 1986; 154: 121–6.
15. Rudenko L.G., Arden N. H., Grigorieva E., Naychin A., Rekestin A., Klimov A. et al. Immunogenicity and efficacy of Russian live attenuated and U.S. inactivated influenza vaccines used alone and in combination in nursing home residents. *Vaccine.* 2001; 19: 308–18.
16. Stephenson I., Nicholson K.G., Glück R., Mischler R., Newman R.W., Palache A. M. et al. Safety and antigenicity of whole virus and subunit influenza A/Hong Kong/1073/99(H9N2) vaccine in healthy adults: phase I randomized trial. *Lancet.* 2003; 362: 1959–66.
17. Chen H., Subbarao K., Swayne D., Chen Q., Lu X., Katz J. et al. Generation and evaluation of a high-growth reassortant H9N2 influenza A virus as a pandemic vaccine candidate. *Vaccine.* 2003; 21: 1974–9.
18. Karron R.A., Callahan K., Luke C., Thumar B., Mc Auliffe J., Schappell E. et al. A live attenuated H9N2 influenza vaccine is well tolerated and immunogenic in healthy adults. *J. Infect. Dis.* 2009; 199(5): 711–6.
19. Todd S., de Bruin E., Nhat N.T., Koopmans M., Boni M.F. Potential for H9-positive serological signals in humans due to cross-reactivity among influenza subtypes. *J. Infect. Dis.* 2014; 210(1) 161–3.

Поступила 17.03.14

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 615.371:578.832.1].036.8

**Боравлева Е.Ю.<sup>1</sup>, Чвала И.А.<sup>2</sup>, Ломакина Н.Ф.<sup>1</sup>, Репин П.И.<sup>2</sup>, Мудрак Н.С.<sup>3</sup>, Руденко Л.Г.<sup>3</sup>, Гамбарян А.С.<sup>1</sup>, Дрыгин В.В.<sup>2</sup>**

## **Испытание апатогенного вируса гриппа H5N3 в качестве живой ветеринарной вакцины**

<sup>1</sup>ФГБНУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова», 142782, г. Москва; <sup>2</sup>ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», 600901, г. Владимир; <sup>3</sup>ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», 197376, г. Санкт-Петербург

Сравнивали 4 экспериментальных штамма, сконструированных в лаборатории молекулярной биологии вирусов гриппа ФГБНУ «ИПВЭ им. М.П. Чумакова», с апатогенным H5N3-вирусом A/duck/Moscow/4182/2010 (dk/4182) в качестве живой ветеринарной вакцины. Экспериментальные штаммы содержали H5-гемагглютинин от вакцинного штамма VN/H5N1-PR8/CDC-RG (VN-PR8) или аттенуированного вируса, полученного путем селекции из высоковирулентного A/chicken/Kurgan/3/2005 (H5N1). Внутренние гены и нейраминидаза экспериментальных штаммов были либо от холодоадаптированного донора аттенуации A/Leningrad/134/17/57 (H2N2), либо от непатогенного H6N2-вируса A/gull/Moscow/3100/2006. В опытах на мышах было показано, что все испытанные штаммы непатогенны для мышей, после однократной вакцинации вызывают высокий прирост антител и хорошо защищают от последующего заражения высоковирулентным вирусом H5N1. Индекс патогенности на курах всех экспериментальных штаммов равен нулю при значении 2,89 для вируса A/chicken/Kurgan/3/2005 (H5N1). Сравнивали разные схемы вакцинации цыплят. Штамм dk/4182 при аэрозольной вакцинации 1-дневных цыплят был апатогенен, обеспечивал высокий и равномерный прирост антител и полную защиту от последующего заражения вирусом A/chicken/Kurgan/3/2005.

**Ключевые слова:** вирус гриппа; H5N1; ветеринарная вакцина.

*Для цитирования:* Вопросы вирусологии. 2015; 60(4): 44–49.

**Boravleva E.Y.<sup>1</sup>, Chvala I.A.<sup>2</sup>, Lomakina N.F.<sup>1</sup>, Repin P.I.<sup>2</sup>, Mudrak N.S.<sup>3</sup>, Rudenko L.G.<sup>3</sup>, Gambaryan A.S.<sup>1</sup>, Drygin V.V.<sup>2</sup>**

### **Testing of apathogenic influenza virus H5N3 as a poultry live vaccine**

<sup>1</sup>M.P. Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalites, 142782, Moscow, Russia; <sup>2</sup>Federal Center for Animal Health (FGBI "ARRIAH"), 600901, Vladimir, Russia; <sup>3</sup>Institute of Experimental Medicine, 197376, St. Petersburg, Russia

Four H5N2 experimental vaccine strains and the apathogenic wild duck H5N3 influenza virus A/duck/Moscow/4182/2010 (dk/4182) were tested as a live poultry vaccine. Experimental strains had the hemagglutinin of the A/Vietnam/1203/04 strain lacking the polybasic HA cleavage site or the hemagglutinin from attenuated virus (Ku/at) that was derived from the highly pathogenic influenza virus A/chicken/Kurgan/3/2005 (H5N1). The hemagglutinin of the Ku-at has the amino acid substitutions Asp54/Asn and Lys222/Thr in HA1 and Val48/Ile and Lys131/Thr in HA2, while maintaining the polybasic HA cleavage site at an invariable level. The other genes of these experimental strains were from the H2N2 cold-adapted master strain A/Leningrad/134/17/57 (VN-Len and Ku-Len) or from the apathogenic H6N2 virus A/gull/Moscow/3100/2006 (VN-Gull and Ku-Gull). A single immunization of mice with all tested strains elicited a high level of serum antibodies and provided complete protection against the challenge with the lethal dose of A/chicken/Kurgan/3/05. The pathogenicity indexes of the Ku-at and the other strains for chicken were virtually zero, whereas the index of the parent H5N1 virus A/chicken/Kurgan/3/2005 was 2.98. Intravenous, intranasal, and aerosol routes of vaccination were compared. It was shown that the strain dk/4182 was totally apathogenic for one-day-old chicken and provided complete protection against the highly pathogenic H5N1 virus.

**Key words:** influenza virus A; H5N1; poultry vaccine.

*Citation:* Voprosy virusologii. 2015; 60(4): 44–49. (In Russ.)

*For correspondence:* Aleksandra Gambarya, MD, PhD, ScD; e-mail: al.gambaryan@gmail.com

Received 30.11.13

*Для корреспонденции:* Гамбарян Александра Сергеевна, д-р биол. наук, зав. лаб. молекулярной биологии вирусов гриппа; e-mail: al.gambaryan@gmail.com



## Введение

Широкое распространение высоковирулентных вирусов гриппа кур H5N1 в странах Юго-Восточной Азии и Африки не только наносит колоссальный ущерб птицеводству этих стран, но и является источником постоянной опасности как для местного населения, так и для всего человечества. Если вирус приобретет способность передаваться от человека к человеку, возможна пандемия, сравнимая по последствиям с пандемией «испанки» 1918 г.

Созданы вакцины, которые должны обеспечить защиту людей в случае пандемии гриппа H5N1. Однако еще более благоприятным сценарием было бы прекращение циркуляции этих опасных вирусов за счет широкой вакцинации домашней птицы. Методами обратной генетики создано множество штаммов-продуцентов H5N1 для производства инактивированных вакцин [1]. Такие вакцины демонстрируют высокую эффективность в эксперименте, но по каким-то причинам не обеспечивают надежной защиты птиц при практическом применении в ветеринарии [2]. Кроме того, они слишком дороги для поголовной превентивной вакцинации домашней птицы.

Живые гриппозные вакцины требуют значительно меньших количеств антигена, чем инактивированные, поэтому они дешевле и при острой необходимости могут быть быстро наработаны в достаточных количествах [3]. Живые аттенуированные вакцины против болезней Марека, Ньюкасла, Гамборо, микоплазма, инфекционного ларинготрахеита и энцефаломиелита птиц успешно применяются в птицеводстве [4–6].

В ряде лидирующих лабораторий мира не прекращаются попытки создания живых ветеринарных вакцин против H5N1. Очень распространены живые химерные вакцины [7–9].

Так, М. Park и соавт. сконструировали химерные вакцины со встроенным доменом гемагглютинина H7 на базе вируса NDV и встроенным эктодоменом NDV на базе вируса H5N1 [8]. L. Cornelissen и соавт. сконструировали штамм NDV, экспрессирующий растворимый тример гемагглютинина H5 [7]. Вышеперечисленные вакцины были эффективны против как патогенных вирусов NDV, так и вирусов птичьего гриппа.

S. Pavlova и соавт. получили рекомбинант аттенуированного вируса ларинготрахеита кур, устойчиво экспрессирующий ген гемагглютинина H5. Данный вакцинный штамм защищал кур от высоковирулентных H5N1 вирусов различных эволюционных ветвей [9].

H. Cui и соавт. получили рекомбинант авирулентного вируса болезни Марека (MDV), экспрессирующий гемагглютинин высоковирулентного H5N1 вируса. Полученный штамм показал высокую эффективность против как летальных MDV, так и высоковирулентных H5N1 вирусов [10].

Традиционным подходом к созданию аттенуированных противогриппозных вакцин является получение реассортантов антигенно-актуального вируса с другим вирусом гриппа, так называемым донором аттенуации, которым может быть либо холодоадаптированный вирус, либо апатогенный вирус диких птиц. Однако в работах [11, 12] показано, что реассортанты с холодоадаптированными внутренними генами недостаточно иммуногенны для кур.

В последние годы становится популярной идея конструирования живых вакцин для домашней птицы на основе птичьих вирусов. Так, H. Shi и соавт. методом обратной генетики создали штамм H5N1, в гемагглютинине которого удален сайт нарезания, а все внутренние гены происходят от апатогенного H9N2 вируса A/chicken/F/98 [13].

Аналогичный реассортант с внутренними генами от апатогенного H6N2 вируса чайки получен Е.Ю. Боравлевой и соавт. [14].

W. Zhang и соавт. разработали новый температурочувствительный донор аттенуации на базе апатогенного H9N2-вируса утки. Реассортанты H5N1 с формулой 6x2 с внутренними генами от этого донора хорошо защищали кур от летальной H5N1 инфекции [15].

Появились новые подходы, базирующиеся на понимании молекулярных механизмов патогенности вирусов гриппа и методе обратной генетики [16, 17].

После того как было показано, что неструктурный белок вируса гриппа NS1 подавляет клеточный ответ на интерферон 1 [18], началась разработка так называемых дельта-NS1-вакцин (delNS1), лишенных белка NS1 частично или полностью [19–22].

Несмотря на множество наработок, использование живых анти-H5N1-вакцин в ветеринарии не практикуется по двум причинам. Во-первых, одним из затруднений является невозможность исследовать эпидемиологическую ситуацию серологически, поскольку невозможно отличить антитела, вызванные внешней инфекцией, от антител к вакцине.

Для преодоления этого затруднения используют стратегию «дифференцирования вакцинированных и инфицированных животных» (DIVA), а именно введение в вакцину специальных антигенных маркеров, отличающих ее от дикого вируса. Одним из приемов стратегии DIVA является введение в вакцинный штамм нейраминидазы, отличной от нейраминидазы циркулирующего вируса [23].

Во-вторых, имеются опасения утечки вируса в окружающую среду с восстановлением высокой патогенности за счет мутаций или реассортаций с другими вирусами [24]. Действительно, трудно исключить возможность того, что вирус, лишенный гена NS1, не приобретет этот ген при совместном заражении клетки вакцинным и диким вирусом. В то же время делеция гена NS1 настолько хорошо аттенуирует вирус, что остальные гены могут, не проявляя этого, нести в себе множественные факторы патогенности. В таком случае реассортант, восстановивший ген NS1, может оказаться весьма опасным вирусом.

Живая вакцина, не вызывающая такого опасения, должна быть аттенуирована не по одному принципу или одному гену, а желательно по всем генам, тогда она не сможет служить причиной возникновения опасных реассортантов. Теоретически можно допустить, что апатогенные H5 вирусы диких уток могут служить живой анти-H5-вакциной. В ходе долгой совместной эволюции со своими хозяевами они приспособились хорошо размножаться, не причиняя вреда инфицированной птице [25]. Однако в литературе мало данных, касающихся иммуногенности утиных вирусов для кур, более того, по данным T. Ito и соавт., вирус H5N2 диких уток вообще не способен инфицировать кур [26].

Целью настоящей работы было сравнение апатогенного H5N3 вируса дикой утки и ряда штаммов, аттенуированных по разным принципам, в качестве живой ветеринарной вакцины против H5N1. Ранее мы описали получение 4 реассортантных штаммов с формулой H5N2 [12, 14]. Источниками H5-гемагглютинина для рекомбинантов служили вакцинный штамм A/Vietnam/1203/04-PR8/CDC-RG (VN-PR8) либо аттенуированный вирус H5N1, полученный путем селекции из высоковирулентного A/chicken/Kurgan/3/2005 [27]. Внутренние гены и нейраминидаза экспериментальных штаммов были либо от холодоадаптированного донора аттенуации A/Leningrad/134/17/57 (H2N2), либо от непатогенного вируса A/gull/Moscow/3100/2006 (H6N2) [28]. В данной работе приводятся результаты сравнительных испытаний на мышах и курах вышеописанных штаммов и апатогенного вируса дикой утки A/duck/Moscow/4182/2010 (H5N3).

## Материалы и методы

**Вирусы.** H6N2-вирус A/gull/Moscow/3100/2006 (gull/3100) и H5N3-вирус A/duck/Moscow/4182/2010 (dk/4182) выделены из фекалий соответственно чайки и утки с московского пруда и хранятся в коллекции Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова [28]. Вирус VN H5N1-PR8/CDC-RG (VN-PR8) любезно предоставлен д-ром Р. Донисом (CDC, США). Холодоадаптированный вирус A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) был получен в Институте экспериментальной медицины (Санкт-Петербург).

Работа с высоковирулентным вирусом A/chicken/Kurgan/3/2005 проводилась в условиях третьего уровня биологической безопасности. Вирусы выращивали в 10-дневных куриных эмбрионах. Инфекционность вирусосодержащей аллантоисной жидкости (ВАЖ) определяли титрованием на эмбрионах и выражали в ЭИД<sub>50</sub>.



Выживаемость мышей после вакцинации и контрольного заражения и прирост антител после вакцинации

Препараты:	Доза, мкг НА/мышь	Выживаемость*	Антитела**		Протективность***
			IgG1	IgG2a	
Инактивированные вакцины (VN-PR8):					
цельновирioнная	0,5	97 ± 3	2	3,2	76 ± 12
цельновирioнная	2	96 ± 4	2,5	3,6	95 ± 3
сплит	0,5	96 ± 4	< 2	< 2	17 ± 18
сплит	2	97 ± 3	< 2	2,2	72 ± 8
Живые (штаммы) ЭИД <sub>50</sub> /мышь					
Ku/05	10 <sup>2</sup>	0	-	-	-
Ku/at	10 <sup>6</sup>	85 ± 12	3,1	4,2	98 ± 2
Ku-Len	10 <sup>7</sup>	95 ± 5	3	3,3	92 ± 6
Ku-Gull	10 <sup>6</sup>	90 ± 7	3,2	4,1	95 ± 5
VN-PR8	10 <sup>6</sup>	20 ± 10	3,5	3,9	96 ± 3
VN-Len	10 <sup>7</sup>	96 ± 3	2,9	3,2	94 ± 4
VN-Gull	10 <sup>6</sup>	91 ± 5	3,4	3,9	97 ± 2
dk/4182	10 <sup>6</sup>	96 ± 4	3,1	3,8	95 ± 4
Контроль без иммунизации	-	97 ± 3	-	-	0

Примечание. Приводятся данные, усредненные по трем опытам. Каждая группа состояла из 20 мышей; \* - % выживших после заражения испытуемым штаммом; \*\* - среднегеометрический титр, Ig; \*\*\* - % выживших на 14-й день после КЗ высоковирулентным вирусом A/chicken/Kurgan/3/2005 (H5N1) в дозе 100 LD<sub>50</sub>.

апатогенным вирусом A/gull/Moscow/3100/2006 получены реассортанты Ku-Gull и VN-Gull. Во всех 4 реассортантах ген гемагглютиниона соответствовал гемагглютиниону H5, а все остальные гены соответствовали генам доноров аттенуации - A/Leningrad/134/17/57 для Ku-Len и VN-Len и A/gull/Moscow/3100/2006 для Ku-Gull и VN-Gull, т. е. формула всех штаммов была H5N2 [14]. В качестве сравнения с искусственными штаммами в испытании был включен вирус дикой утки A/duck/Moscow/4182/2010 (H5N3).

#### Безопасность, иммуногенность и протективная активность штаммов на мышах

Как видно из табл. 1, вирулентность для мышей аттенуированного вируса Ku/at по сравнению с исходным вирусом Ku/05 снижена на много порядков; она ниже, чем у американского вакцинного штамма VN-PR8. Патогенность реассортантов Ku-Gull и VN-Gull еще ниже, а холодоадаптированных реассортантов Ku-Len и VN-Len, как и вируса dk/4182, - практически нулевая.

Все экспериментальные штаммы вызывали у мышей высокий и сбалансированный по содержанию IgG1/IgG2a прирост антител к H5 гемагглютиниону вируса гриппа.

Протективный эффект любого из экспериментальных штаммов сопоставим с эффектом высокой дозы инактивированной цельновирioнной вакцины и существенно выше, чем у сплит-вакцины. Однократное инфицирование любым из них приводит почти к 100% защите от последующего КЗ 100 ЛД<sub>50</sub> вируса A/chicken/Kurgan/3/2005.

#### Индекс патогенности экспериментальных штаммов при внутривенном заражении кур

Для определения индексов патогенности были сформированы 8 групп цыплят в возрасте 42 сут по 10 голов в каждой. Группы цыплят содержали в индивидуальных изолирующих боксах.

Индекс патогенности исходного вируса A/chicken/Kurgan/3/2005 составил 2,89, в то время как у всех цыплят, внутривенно зараженных штаммами VN-Len, VN-Gull, Ku/at, Ku-Len, Ku-Gull, gull/3100 и dk/4182, в течение 10 сут наблюдений не отмечали каких-либо клинических признаков заболевания, и по результатам эксперимента все штаммы были признаны низковирулентными (IVPI=0).

Аттенуированный вариант A/chicken/Kurgan/3654at/2005 (Ku/at) был получен из высоковирулентного вируса A/chicken/Kurgan/3/2005 (H5N1) культивированием в условиях, имитирующих жизненный цикл вирусов гриппа диких уток, как описано в [27].

Получение холодоадаптированных реассортантов VN-Len и Ku-Len, а также реассортантов VN-Gull и Ku-Gull описано в [14]. Генный состав реассортантов установлен секвенированием определенных фрагментов генома либо в полимеразной цепной реакции (ПЦР) с дифференцирующими праймерами [14]. Номера нуклеотидных последовательностей, зарегистрированных в GenBank: EU152234-EU152241, DQ323672-DQ323679, HQ724520-HQ724527, CY120776, KF885672-KF885679.

**Определение индекса патогенности вирусов на курах.** Внутривенно каждому из 10 6-недельных неиммунных цыплят вводили по 0,1 мл исследуемой стерильной вирусосодержащей суспензии в разведении 1:10 на стерильном фосфатно-солевом буфере (ФБР). Отсутствие специфических антител в крови цыплят подтверждали в реакции торможения гемагглютинации (РТГА).

За птицами устанавливали ежедневное наблюдение в течение 10 сут и рассчитывали индекс патогенности (IVPI) как описано в [11].

Все экспериментальные исследования на мышах и курах проводили согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных».

**Аэрозольная вакцинация и контрольное заражение цыплят.** Цыплят помещали в 20-литровый контейнер, к которому была подведена трубка от ультразвукового распылителя «Муссон» (изготовитель - Алтайский приборостроительный завод, г Барнаул). Отводящая трубка была направлена на HEPA-фильтр. Создавали аэрозоль из свежей ВАЖ. Цыплят выдерживали в аэрозольной атмосфере 30 мин. После обработки цыплят 10 мин облучали ультрафиолетом и рассаживали по клеткам, после чего ежедневно взвешивали, собирали фекалии и контролировали падеж. Через 14 дней брали пробы крови из подключичной вены на определение антител, а через 30 дней проводили контрольное заражение (КЗ) вирусом гриппа A/chicken/Kurgan/3/2005 (H5N1) также аэрозольным способом.

**Определение вируса в фекалиях кур.** С 3-го по 6-й день после инфицирования или после КЗ цыплят по одному пересаживали из клетки, где содержалась вся группа, в коробки с чистой фильтровальной бумагой на дне. Через полчаса собирали свежие фекалии с фильтровальной бумаги, суспендировали в двойном объеме ФБР с добавлением антибиотиков (0,4 мг/мл гентамицина, 0,1 мг/мл канамицина, 0,01 мг/мл нистатина и 2% раствора MусoKill АВ («РАА Laboratories GmbH»)), центрифугировали при 4 тыс. об/мин 10 мин и заражали супернатантом 10-дневные куриные эмбрионы. Через 48 ч инкубации собирали аллантоисную жидкость и определяли наличие вируса гриппа по реакции гемагглютинации.

**Иммунизация и контрольное заражение мышей, а также определение антител к вирусам гриппа в сыворотках мышей и цыплят** описаны в [14].

## Результаты

Для аттенуации высоковирулентного H5N1-вируса A/chicken/Kurgan/3/2005 мы проводили селекцию в условиях, имитирующих жизненный цикл вирусов диких уток, а именно выдерживали вирус в кислой среде, обрабатывали инфекционный материал протеазами, а на последнем этапе отбирали живых эмбрионов после 3-дневного культивирования. В ходе селекции в гемагглютине Ku/at появились 4 аминокислотные замены, 3 из которых являются реверсиями к последовательности, характерной для непатогенных вирусов гриппа птиц [27].

Путем реассортации Ku/at с холодоадаптированным донором аттенуации A/Leningrad/134/17/57(H2N2) (Len) был получен штамм Ku-Len. Аналогичным образом из вакцинного штамма VNH5N1-PR8/CDC-RG (VN-PR8) получен реассортант VN-Len.

Затем путем реассортации штаммов Ku-Len и VN-Len с

Таблица 2

Выживание цыплят разного возраста при разных способах заражения

Штамм	Способ заражения (возраст)		
	Внутривенный (42 сут)	Интраназальный (5 сут)	Аэрозольный (1 сут)
Ku/05	0/10*	0/5	0/5
Ku/at	10/10	8/11	-
Ku-Len	10/10	20/20	19/19
Ku-Gull	10/10	14/17	1/13
VN-Len	10/10	19/19	12/12
VN-Gull	10/10	9/10	6/10
dk/4182	10/10	8/8	26/26
gull/3100	10/10	8/8	8/8

\*Число выживших/число зараженных.

**Сравнение патогенности экспериментальных штаммов при разных схемах заражения кур**

Выживаемость инфицированных цыплят зависит от их возраста и пути введения вируса. 6-недельные цыплята выжили даже после внутривенного введения экспериментальных вакцинных штаммов (табл. 2). 5-дневные и 1-дневные цыплята частично гибли при инфицировании штаммами Ku/at, Ku-Gull и VN-Gull. Штаммы Ku-Len, VN-Len и природные изоляты dk/4182 и gull/3100 не вызвали ни одного случая падежа.

**Иммуногенность экспериментальных штаммов для цыплят**

Для оценки иммуногенности разных штаммов через 2 нед после инфицирования у каждого цыпленка брали по 200 мкл крови из подключичной вены и определяли титр специфических антител в сыворотках методом иммуоферментного анализа (ИФА). Антигенами служили соответствующие очищенные вирусы (VN-PR8 для определения антител к HA/H5 и gull/3100 для HA/H6). На рис.1 представлены титры антител в сыворотках крови индивидуальных цыплят после инфицирования реассортантными штаммами и вирусами гриппа диких птиц: A/duck/Moscow/4182/2010 (H5N3) и A/gull/Moscow/3100/2006 (H6N2).

У цыплят, вакцинированных вирусами Ku-Len и VN-Len, среднегеометрические титры лежат между значениями 100 и 200, причем разброс титров от сыворотки к сыворотке достигает 20. Примерно у половины цыплят титры анти-H5-антител ниже 100, что меньше защитной величины. Вирусы Ku-Gull и VN-Gull вызывают примерно в 10 раз более высокий и более равномерный прирост антител, надежно превышающий защитный уровень у всех инфицированных цыплят. Среднегеометрические титры в группах вакцинированных dk/4182 либо gull/3100 ниже, чем в группах Ku-Gull и VN-Gull, но даже в самых «слабых» сыворотках титр превышает защитный уровень (около 200). Соотношение иммуногенности реассортантов Ku-Len и VN-Len, с одной стороны, и Ku-Gull и VN-Gull - с другой, коррелирует с их патогенностью. Однако природные изоляты dk/4182 и gull/3100 обеспечивают высокий и равномерный прирост антител, не вызывая у цыплят клинических признаков заболевания.

**Патогенность и протективная активность экспериментальных штаммов при аэрозольном заражении цыплят. Выделение вируса с фекалиями**

Сравнение внутривенной, интраназальной и аэрозольной вакцинации (табл. 2) дало основание заключить, что наиболее жестким способом инфицирования является аэрозольная вакцина-

ция 1-дневных цыплят. Кроме того, чем моложе цыплята, тем они чувствительнее к КЗ, поэтому такая схема опыта лучше всего способна выявить слабые стороны экспериментальных вакцин. В табл. 3 и на рис. 2 приводятся результаты типичного опыта по аэрозольной вакцинации 1-дневных цыплят с последующим заражением 100 LD<sub>50</sub> H5N1-вируса A/chicken/Kurgan/3/2005. Штаммы Ku-Gull и VN-Gull вызывают существенный падеж цыплят и выделяют вакцинный вирус с фекалиями, т. е. не пригодны для использования в качестве живой вакцины. Штаммы Ku-Len и VN-Len не вызывают признаков заболевания, нет падежа и кривая массы тела совпадает с кривой массы тела интактных цыплят; также нет выделения вируса. Однако эти штаммы недостаточно иммуногенны, и защита от последующего КЗ невелика. Наилучшие результаты получены с вирусом A/duck/Moscow/4182/2010, который не вызывал падежа и видимых признаков заболевания цыплят, но тем не менее обеспечивал высокий и равномерный прирост антител и 100% защиту от высоковирулентного вируса H5N1. После вакцинации вирус dk/4182 выделяется с фекалиями, однако возможная его утечка в окружающую среду не должна вызывать опасений, этот вирус и так циркулирует с утками как в дикой природе, так и в городских прудах. Важно то, что куры, вакцинированные вирусом dk/4182, не выделяют вирус A/chicken/Kurgan/3/2005 после КЗ. Иными словами, подобная вакцинация способна не только сохранять поголовье домашних птиц, но и тормозить распространение H5N1 вирусов.

**Обсуждение**

Вирусы H5N1 привлекли внимание широкой общественности в 1997 г. после случаев смертельных заболеваний людей в Гонконге, где методом борьбы с опасным вирусом стало поголовное уничтожение всей домашней птицы, и эта мера принесла свои плоды – данная эволюционная ветвь вирусов H5N1 была полностью уничтожена. Вплоть до 2003 г. случаев заболевания людей не отмечали. Однако другие варианты вирусов H5N1 продолжали циркулировать среди домашней птицы, и начиная с 2003 г. эпизодически вызывали заболевание людей, часто со смертельным исходом. В 2005 г. вирус распространился по всей южной части Евразии и в Африке. С вирусом ведется перманентная борьба – уничтожается поголовье птиц в местах вспышек, проводится вакцинация домашней птицы, но все эти меры оказываются недостаточными. По не совсем понятным причинам даже трехкратная вакцинация кур инактивированными вакцинами не предотвращает последующее заболевание и распространение вируса [2]. Непрекращающиеся усилия добиться полного антигенного соответствия вакцин циркулирующему вирусу приводят к ускорению эволюции вируса и изменению антигенных характеристик, что вызывает потребность в очередной модернизации вакцинных штаммов [29]. Одним из способов вырваться из этого порочного круга было бы использование живых вакцин, способных привести к гораздо более широкой перекрестной защите, чем инактивированные вакцины.

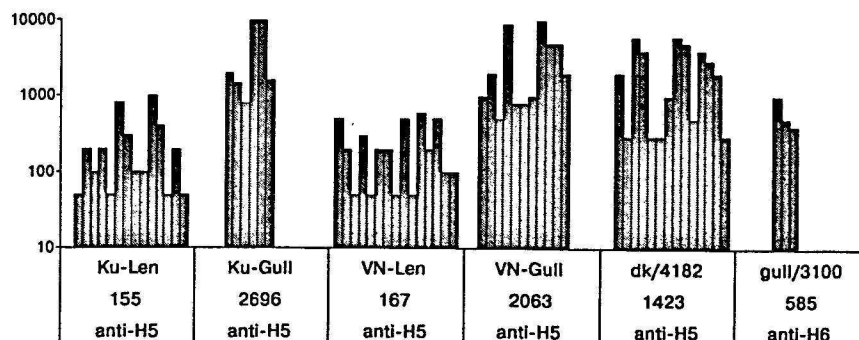


Рис. 1. Титры анти-H5- либо анти-H6-антител в сыворотках индивидуальных цыплят, инфицированных вирусами Ku-Len, Ku-Gull, VN-Len, VN-Gull, dk/4182 либо gull/3100. Под названиями штаммов приведены значения среднегеометрических титров для всей группы и специфичность антител.

Таблица 3

Патогенность, выделение вируса с фекалиями и протективность экспериментальных штаммов при аэрозольной вакцинации 1-дневных цыплят

Штамм	После вакцинации			После КЗ	
	доза ЭИД <sub>50</sub>	выживаемость, %*	вирус в фекалиях**	выживаемость, %	вирус в фекалиях
Ku-Len	10 <sup>6</sup>	100	-	25	+/-
Ku-Gull	10 <sup>5</sup>	20	+	100	-
VN-Len	10 <sup>6</sup>	100	-	20	+/-
VN-Gull	10 <sup>5</sup>	40	+	100	-
dk/4182	10 <sup>5</sup>	100	+/-	100	-
Контроль без иммунизации	-	100		0	+/-

Примечание.\* – выживаемость к стартовой величине после заражения испытуемым штаммом и после КЗ 100 LD<sub>50</sub> вируса A/chicken/Kurgan/3/2005 (H5N1); \*\* – обнаружение вакцинного вируса (до КЗ) или вируса Ku/05 (после КЗ) в фекалиях на 3–6-й день после инфицирования. + – всегда, – – никогда, +/- – иногда.

В данной работе мы испытали в качестве живых ветеринарных вакцин 5 штаммов с гемагглютинином трех эволюционных ветвей субтипа H5. Наши результаты подтвердили данные A. Sugitani и соавт. [11] о том, что вирусы с внутренними генами холодоадаптированного донора чрезмерно аттенуированы для кур и не обеспечивают надежной защиты. В то же время все 3 штамма с внутренними генами от вирусов диких птиц обеспечивали полную защиту от КЗ высоковирулентным вирусом A/chicken/Kurgan/3/2005 (H5N1), несмотря на то, что гемагглютинин штамма VN-Gull относится к другой кладе H5N1-вирусов, а гемагглютинин вируса A/duck/Moscow/4182/2010 – к отдаленной эволюционной ветви вирусов субтипа H5 [30]. Результаты испытаний реассортантов Ku-Gull и VN-Gull дают информацию о механизмах патогенности H5N1-вирусов. Оба этих штамма имеют 7 генов вируса gull/3100, полностью безопасного для цыплят. Гемагглютинин Ku-Gull несет 4 аттенуирующие мутации, снижающие рН конформационного перехода гемагглютина от 5,6 до 5,1. Тем не менее этот реассортант вызывает гибель 1-дневных цыплят, очевидно, за счет сохранения полносного сайта нарезания, который считается основным маркером патогенности вирусов гриппа птиц. Гемагглютинин VN-Gull лишен полносного сайта, однако этот реассортант также вызывает гибель 1-дневных цыплят, по-видимому, за счет высокого рН конформационного перехода. На зависимость инфекционности H5N1-вируса от рН конформационного перехода указывали также В. Клепп и соавт [20]. Иными словами, только молекула гемагглютинаина H5N1-вирусов обеспечивает как минимум два механизма повышения патогенности для кур.

Другие гены тоже несут многочисленные факторы патогенности (эта тема обсуждается в работе [27]). Это необходимо иметь в виду, конструируя вакцинные штаммы H5N1. В последние годы методом обратной генетики создано много экспериментальных живых вакцин путем внесения в геном вируса одного или ряда изменений, радикально устраняющих отдельные факторы патогенности. Полученные штаммы глубоко аттенуированы при сохранении хорошей иммуногенности [19–22]. Однако генетическая стабильность таких конструкций может вызывать сомнения. В случае реассортации, рекомбинации или реверсии может возникнуть вирус с нежелательными характеристиками. Не случайно в последнее время снова становится популярной старая идея В. Мигри – использовать гены авирулентных вирусов диких птиц как доноры аттенуации при создании вакцин [12–15, 31]. Вирусы гриппа диких птиц тысячами подвергались стабилизирующему естественному отбору по признаку авирулентности. Лишь в противостественных условиях птицеводческих ферм с круглогодичной скученностью птицы повышение вирулентности перестает

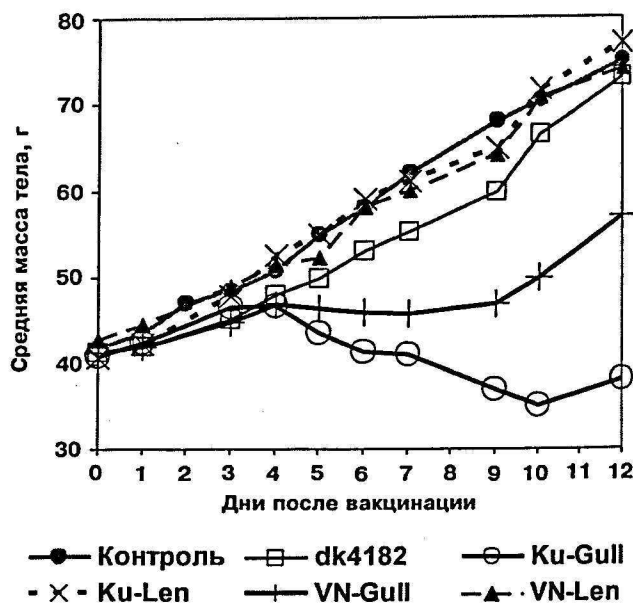


Рис. 2. Динамика массы тела цыплят после аэрозольного заражения штаммами VN-Len, VN-Gull, Ku-Len, Ku-Gull и dk/4182.

быть препятствием для распространения вируса. За годы циркуляции в домашних курах у H5N1-вирусов практически во всех генах накопилось множество мутаций, повышающих их патогенность.

Логическим завершением идеи В. Мигри является использование в качестве живой вакцины природного авирулентного вируса целиком. Наш опыт показывает, что вирус H5N3 дикой утки хорошо работает в качестве живой ветеринарной вакцины против вирусов H5N1. Такая вакцина должна быть генетически стабильной. Возможная утечка вакцинного вируса во внешнюю среду не должна представлять проблемы, так как этот вирус и так свободно в ней циркулирует. Дополнительными преимуществами такой вакцины являются простота производства, дешевизна и отсутствие необходимости покупки патентов на использование.

### Выводы

1. Получены аттенуированные реассортанты вирусов гриппа H5N1, перспективные в качестве продуцентов инактивированных и живых вакцин.
2. Выбран штамм, который можно рассматривать как кандидат на ветеринарную живую вакцину против высоковирулентных вирусов H5N1.

### Благодарности

Авторы выражают благодарность д.б.н. С.С. Ямниковой за предоставление штамма A/chicken/Kurgan/3/2005, к.б.н. М.А. Циванюк и к.б.н. А.В. Щербакову (ФГБУ «ВНИИЗЖ») за участие в отдельных этапах работы и д-ру R. Donis (Центры по контролю и профилактике заболеваний, Атланта, Джорджия, США) за предоставление вакцинного штамма VN5N1-PR8/CDC-RG. Работа поддержана грантами РФФИ 11-04-00517-а, 14-04-00547.

### ЛИТЕРАТУРА (п. п. 1–2, 4–13, 15–17, 19–26, 29–31 см REFERENCES)

3. Гендон Ю.З. Преимущества и недостатки инактивированной и живой вакцины против гриппа. *Вопросы вирусологии*. 2004; 49(4): 4–12.
14. Боравлева Е.Ю., Ломакина Н.Ф., Кропоткина Е.А., Руднева И.А., Дрыгин В.В., Гамбарян А.С. и др. Упрощенный способ получения реассортанта вируса гриппа с H5 гемагглютинином и остальными генами от патогенного H6N2 вируса. Испытание полученного штамма на мышах и курах. *Вопросы вирусологии*. 2011; 56(6): 9–14.



18. Романовская-Романько Е.А., Ferko В., Вышемирский О.И., Романова Ю.Р., Krenn В., Muster Т. и др. Доклинические исследования интраназальной живой гриппозной H5N1-вакцины с удаленным NS1-геном. *Вопросы вирусологии*. 2011; 56(6): 19–22.

27. Ломакина Н.Ф., Боравлева Е.Ю., Кропоткина Е.А., Ямникова С.С., Дрыгин В.В., Гамбарян А.С. Аттенуация вируса гриппа А/курица/Курган/3/2005 (H5N1) селекцией в условиях, имитирующих жизненный цикл вирусов диких уток. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2011; 3: 35–41.

28. Ломакина Н.Ф., Гамбарян А.С., Боравлева Е.Ю., Кропоткина Е.А., Кириллов И.М., Лаврентьев М.В. и др. Характеристика апатогенного вируса гриппа А/Чайка/Москва/3100/2006 (H6N2), выделенного в г. Москве. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2009; 1: 32–40.

## REFERENCES

- Jung E.J., Lee K.H., Seong B.L. Reverse genetic platform for inactivated and live-attenuated influenza vaccine. *Exp. Mol. Med.* 2010; 42(2): 116–21.
- Kim J., Kayali G., Walker D., Forrest H.L. Webby R.J., Webster R.G. et al. Puzzling inefficiency of H5N1 influenza vaccines in Egyptian poultry. *PNAS*. 2010; 107(24): 11044–9.
- Gendon Yu.Z. Advantages and disadvantages of inactivated and live influenza vaccine. *Voprosy Virusologii*. 2004; 49(4): 4–12. (in Russian)
- Chien K.Y., Blackburn K., Liu H.C., Goshe M.B. Proteomic and Phosphoproteomic Analysis of chicken Embryo Fibroblasts Infected with Cell Culture-Attenuated and Vaccine Strains of Marek's Disease Virus. *J. Proteome Res.* 2012; 11(12): 5663–77.
- Evans J.D., Leigh S.A., Purswell J.L., Jacob R., Peebles E.D., Collier S.D. et al. A comparative study of live attenuated F strain-derived *Mycoplasma gallisepticum* vaccines. *Avian Dis.* 2012; 56: 396–401.
- Vagnozzi A., Zavala G., Riblet S.M., Mundt A., Garcia M. Protection induced by commercially available live-attenuated and recombinant viral vector vaccines against infectious laryngotracheitis virus in broiler chickens. *Avian Pathol.* 2012; 41(1): 21–31.
- Cornelissen L.A., de Leeuw O.S., Tacken M.G., Klos H.C., de Vries R.P., de Haan C.A. et al. Protective efficacy of Newcastle disease virus expressing soluble trimeric hemagglutinin against highly pathogenic H5N1 influenza in chickens and mice. *PLoS One*. 2012; 7(8): e44447.
- Park M.S., Steel J., Garcia-Sastre A., Swayne D., Palese P. Engineered viral vaccine constructs with dual specificity: avian influenza and Newcastle disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 2006; 103(21): 8203–8.
- Pavlova S.P., Veits J., Mettenleiter T.C., Fuchs W. Live vaccination with an H5-hemagglutinin-expressing infectious laryngotracheitis virus recombinant protects chickens against different highly pathogenic avian influenza viruses of the H5 subtype. *Vaccine*. 2009; 27(37): 5085–90.
- Cui H., Gao H., Cui X., Zhao Y., Shi X., Wang Y. et al. Avirulent Marek's Disease Virus Type 1 Strain 814 Vectors Expressing Avian Influenza (AI) Virus H5 Hemagglutinin Induced Better Protection Than Turkey Herpesvirus Vectors AI Vaccine. *PLoS One*. 2013; 8(1): e53340.
- Suguitan A.L. Jr, McAuliffe J., Mills K.L., Jin H., Duke G., Subbarao K. et al. Live, Attenuated Influenza A H5N1 Candidate Vaccines Provide Broad Cross-Protection in Mice and Ferrets. *PLoS Med.* 2006; 3(9): 1541–54.
- Gambaryan A.S., Lomakina N.F., Boravleva E.Y., Kropotkina E.A., Klimov A.I., Rudenko L.G. et al. Comparative safety, immunogenicity and efficacy of several anti-H5N1 influenza experimental vaccines in a mouse and chicken models *Influenza Other Respir. Viruses*. 2012; 6(3): 188–95.
- Shi H., Liu X.F., Zhang X., Chen S., Sun L., Lu J. Generation of an attenuated H5N1 avian influenza virus vaccine with all eight genes from avian viruses. *Vaccine*. 2007; 25(42): 7379–84.
- Boravleva E.Yu., Lomakina N.F., Kropotkina E.A., Rudneva I.A., Drygin V.V., Gambaryan A.S. et al. The generation and characteristics of reassortant influenza A virus with H5 hemagglutinin and other genes from the apathogenic virus H6N2. *Voprosy Virusologii*. 2011; 56(6): 9–14. (in Russian)
- Zhang W., Tu J., Zhao Z., Chen H., Jin M. The new temperature-sensitive mutation PA-F35S for developing recombinant avian live attenuated H5N1 influenza vaccine. *Virolog. J.* 2012; 23(9): 97. doi: 10.1186
- Palese P., Shaw M.L. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In: Knipe D.M., Howley P. M., eds. *Fields virology*. 5th ed., vol. II. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia, PA; 2006: 1648–89
- Steel J. New strategies for the development of H5N1 subtype influenza vaccines: progress and challenges. *BioDrugs*. 2011; doi: 10.2165
- Romanovskaya-Roman'ko E.A., Ferko B., Vysheмирskiy O.I., Romanova Yu.P., Krenn B., Muster T. et al. Preclinical studies of live intranasal H5N1 influenza vaccine with the deleted HSI gene. *Voprosy Virusologii*. 2011; 56(6): 19–22. (in Russian)
- Garcia-Sastre A., Biron C.A. Type 1 interferons and the virus-host relationship: a lesson in detente. *Science*. 2006; 312: 879–82.
- Krenn B.M., Egorov A., Romanovskaya-Romanko E., Wolschek M., Nakowitsch S., Ruthsatz T. et al. Single HA2 mutation increases the infectivity and immunogenicity of a live attenuated H5N1 intranasal influenza vaccine candidate lacking NS1. *PLoS One*. 2011; 6(4): e18577. doi: 10.1371
- Steel J., Lowen A.C., Pena L., Angel M., Solórzano A., Albrecht R. et al. Live attenuated influenza viruses containing NS1 truncations as vaccine candidates against H5N1 highly pathogenic avian influenza. *J. Virol.* 2009; 83(4): 1742–53.
- Zhou H., Zhu J., Tu J., Zou W., Hu Y., Yu Z. et al. Effect on virulence and pathogenicity of H5N1 influenza A virus through truncations of NS1 eIF4G1 binding domain. *J. Infect. Dis.* 2010; 202(9): 1338–46.
- Capua I., Terregino C., Cattoli G., Mutinelli F., Rodriguez J.F. Development of a DIVA (differentiating infected from vaccinated animals) strategy using a vaccine containing a heterologous neuraminidase for the control of avian influenza. *Avian Pathol.* 2003; 32: 47–55.
- Lee S.W., Markham P.F., Coppo M.J., Legione A.R., Markham J.F., Noormohammadi A.H. et al. Attenuated vaccines can recombine to form virulent field viruses. *Science*. 2012; 337(6091):188.
- Webster R.G., Bean W.J., Gorman O.T., Chambers T.M., Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol. Rev.* 1992; 56: 152–79.
- Ito T., Goto H., Yamamoto E., Tanaka H., Takeuchi M., Kuwayama M. et al. Generation of a highly pathogenic avian influenza A virus from an avirulent field isolate by passaging in chickens. *J. Virol.* 2001; 75: 4439–43.
- Lomakina N.F., Boravleva E.Y., Kropotkina E.A., Yamnikova S.S., Drygin V.V., Gambaryan A.S. Attenuation of A/Chicken/Kurgan/3/2005 (H5N1) Influenza Virus Using Selection in an Environment Simulating the Life Cycle of Wild Duck Viruses. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2011; 26(3): 132–9.
- Lomakina N.F., Gambaryan A. C., Boravleva E.Yu., Kropotkina E.A., Kirillov I.M., Lavrient'ev M.V., Yamnikova S.S. Character of Apathogenic Influenza A Viruses Found in Moscow, Russia. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2009; 24(1): 37–45.
- El-Zoghby E.F., Arafa A.S., Kilany W.H., Aly M.M., Abdelwhab E.M., Hafez H.M. Isolation of avian influenza H5N1 virus from vaccinated commercial layer flock in Egypt. *Virolog. J.* 2012; 9(1): 294
- Continued evolution of highly pathogenic avian influenza A (H5N1): updated nomenclature WHO/OIE/FAO H5N1 Evolution Working Group DOI:10.1111/j.1750-2659.2011.00298.x Available at: www.influenzajournal.com
- Murphy B.R., Sly D.L., Tierney E.L., Hosier N.T., Massicot J.G., London W.T. et al. Reassortant virus derived from avian and human influenza A viruses is attenuated and immunogenic in monkeys. *Science*. 1982; 218: 1330–2.