

ISSN 0507-4088 (Print)
ISSN 2411-2097 (Online)



Д.И.ИВАНОВСКИЙ

ВОПРОСЫ ВИРУСОЛОГИИ

PROBLEMS OF VIROLOGY

6

Том 60 • 2015



издательство
"МЕДИЦИНА"

www.medlit.ru

Volume 60 • Issue 6 • 2015



ISSN 0507-4088

9 770507 408005

ОБЗОРЫ

- Ершов Ф.И., Наровлянский А.Н.** Использование индукторов интерферона при вирусных инфекциях 2, 5–10
- Калинина О.В.** Вирус гепатита С: механизмы изменчивости, классификация, эволюция 5, 5–10
- Лапин Б.А., Шевцова З.В.** К 50-летию открытия геморрагической лихорадки обезьян и вируса ГЛО 1, 5–10
- Морозова О.В., Исаева Е.И., Вязов С.О.** Новые подходы к лечению флавивирусных инфекций 6, 5–9
- Найхин А.Н., Лосев И.В.** Роль консервативных и гипервариабельных иммунодоминантных эпитопов внутренних белков вирусов гриппа А в формировании цитотоксического Т-клеточного иммунного ответа 1, 11–16
- Петров А.А., Плеханова Т.М., Сидорова О.Н., Борисевич С.В., Махлай А.А.** Вакцины на основе РНК-репликона вируса везикулярного энцефаломиелита лошадей против вирусных геморрагических лихорадок 3, 14–18
- Смирнова К.В., Дидук С.В., Сенюта Н.Б., Гурцевич В.Э.** Молекулярно-биологические свойства гена *LMP1* вируса Эпштейна–Барр: структура, функции и полиморфизм 3, 5–13

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Алимбарова Л.М., Лазаренко А.А., Баринский И.Ф., Дига В.И.** Изучение противовирусной активности НРМ-7.0 – экстракта мицелия высшего гриба *Fusarium sambucinum* на модели экспериментальной герпесвирусной инфекции 5, 21–26
- Балышева В.И., Прудникова Е.Ю., Гальнбек Т.В., Балышев В.М.** Перевиваемая сублиния клеток $A_4C_2/9K$ и ее использование в исследованиях с вирусом африканской чумы свиней 2, 43–47
- 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 4, 14–18
- Боравлева Е.Ю., Чвала И.А., Ломакина 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 4, 44–49
- Виткова О.Н., Капустина О.В., Лобова Т.П., Михайлова В.В., Сафонов Г.А., Власова Н.Н., Белоусова Р.В.** Сравнительное изучение чувствительности и специфичности иммуноферментного анализа с хемилюминисцентной и колориметрической детекцией для выявления антигенов и антител к вирусам гриппа птиц и болезни Ньюкасла 6, 41–45
- Гончарова Е.В., Сенюта Н.Б., Смирнова К.В., Щербак Л.Н., Гурцевич В.Э.** Вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ) в России: инфицированность населения и анализ вариантов гена *LMP1* у больных ВЭБ-ассоциированными патологиями и здоровых лиц 2, 11–17
- Грибкова Н.В., Сивец Н.В., Шмелева Н.П., Чешенок Е.В., Лапо Т.П., Аношко О.Н.** Этиология ОРВИ среди госпитализированных детей в Республике Беларусь в 2011 и 2012 гг. 3, 37–40
- Губанова М.Н., Мадзаев С.Р., Жибурт Е.Б.** Распространенность и встречаемость инфекций у доноров крови в России 6, 29–31
- Гулюкин М.И., Козырева Н.Г., Иванова Л.А., Степанова Т.В., Клименко А.И., Коваленко А.В., Дробин Ю.Д., Василенко В.Н.** Межвидовая передача вируса лейкоза крупного рогатого скота в эксперименте 5, 32–37
- Дешева Ю.А., Смолоногина Т.А., Руденко Л.Г.** Доклиническое изучение реассортантного вакцинного штамма вируса гриппа A/17/перепел/Гонконг/97/84 (H9N2) 4, 40–44

- Джигоев Ю.П., Парамонов А.И., Рева О.Н., Букин Ю.С., Козлова И.В., Демина Т.В., Ткачев С.Е., Злобин В.И.** Детекция потенциальных сайтов рекомбинации вируса клещевого энцефалита методами сравнительной геномики 3, 44–49
- Закутский Н.И., Балышева В.И., Хухорова И.Ю., Юрков С.Г.** Инфекционные и иммуногенные свойства вируса лихорадки долины Рифт в зависимости от уровня пассажей и условий хранения 2, 41–43
- Иванова В.Т., Иванова М.В., Сапурина И.Ю., Бурцева Е.И., Трушакова С.В., Исаева Е.И., Кириллова Е.С., Степанова Н.В., Оскерко Т.А., Манькин А.А.** Сравнительное исследование углеродных нанотрубок и полимерных композитов, содержащих наночастицы серебра, в качестве сорбентов вирусов гриппа А и В 3, 25–30
- Карпова Л.С., Соминина А.А., Бурцева Е.И., Пелих М.Ю., Феодоритова Е.Л., Поповцева Н.М., Столярова Т.П., Киселев О.И.** Сравнение эпидемий гриппа в России, вызванных пандемическим вирусом гриппа A(H1N1)pdm09 в период с 2009 по 2013 г. 3, 19–24
- Козлов В.Г., Иванов А.П., Иванова О.Е., Варгин В.В.** Получение поликлональных энтеровирусных антител (IgY) от куриц и их оценка в качестве альтернативы энтеровирусным нейтрализующим сывороткам кроликов 1, 31–34
- Колomeец А.Н., Довгополюк Е.С., Сергеева И.В., Ястребов В.К., Тюменцев А.Т.** Показатели лекарственной устойчивости вируса иммунодефицита человека к антиретровирусным препаратам у ВИЧ-инфицированных лиц в Сибирском федеральном округе в 2010–2012 гг. 1, 20–23
- Контаров Н.А., Ермакова А.А., Гребенкина Н.С., Юминова Н.В., Зверев В.В.** Изучение противовирусной активности полиэлектролитов в отношении вируса гриппа 4, 5–9
- Костинов М.П., Чикина Е.Ю., Кулакова Н.А., Борисова В.Н., Магаршак О.О.** Эффективность вакцинации против гепатита В у больных хронической обструктивной болезнью легких и возможности коррекции иммунного ответа 6, 9–14
- Кузнецова С.А., Исакова-Сивак И.Н., Кузнецова В.А., Петухова Г.Д., Лосев И.В., Донина С.А., Руденко Л.Г., Найхин А.Н.** Влияние точечных мутаций в генах полимеразного комплекса вируса гриппа A/PR/8/34 (H1N1) на иммунный ответ мышей 2, 25–30
- 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. 4, 29–37
- Ленева И.А., Леонова Е.И., Махмудова Н.Р., Фальнская И.Н., Федякина И.Т., Зверев В.В., Михайлова Н.А.** Разработка экспериментальной модели сочетанной вирусно-бактериальной пневмонии 5, 27–31
- Лободанов С.А., Киселев И.С., Амму Ю.И., Горбаленя А.Е., Claas E.C.J., Зверев В.В., Файзулов Е.Б.** Исследование видовой структуры риновирусов и коронавирусов, циркулировавших в Московском регионе в период с 2007 по 2012 г. 3, 31–36
- Логонова Н.В., Дерябин П.Г., Вашкова В.В.** Биологическая характеристика коллекционных штаммов вирусов группы японского энцефалита 1, 17–20
- Львов Д.К., Бурцева Е.И., Щелканов М.Ю., Колобухина Л.В., Феодоритова Е.Л., Трушакова С.В., Кириллова Е.С., Беляев А.Л., Меркулова Л.Н., Вартаман Р.В., Кистенева Л.Б., Иванова В.Т., Оскерко Т.А., Силюянова Э.В., Мукашева Е.А., Краснослободцев К.Г., Гарина Е.О., Альховский С.В., Прилипов А.Г., Федякина И.Т., Богданова В.С., Прошина Е.С., Самохвалов Е.И., Аристова В.А., Кириллов И.М., Малышев Н.А.** Развитие эпидемии гриппа на отдельных территориях России и в странах Северного полушария в сезоне 2013–2014 гг. 5, 11–16

**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. Новоостоповская, д. 5, стр. 14,
ОАО «Издательство "Медицина"»

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

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

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

www.medlit.ru

ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ

Тел./факс +7-495-678-64-84

E-mail: info@idm.msk.ru

www.medlit.ru

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

Редактор **Е.П. Мороз**

Художественный редактор
А. В. Минаичев

Технический редактор
Т. В. Нечаева

Корректор **Л. В. Кузнецова**

Переводчик **С. К. Чаморовский**

Верстка **Е. М. Архипова**

Сдано в набор 03.09.2015.

Подписано в печать 12.10.2015.

Формат 60 × 88%.

Печать офсетная.

Печ. л. 6,00.

Усл. печ. л. 5,88.

Уч.-изд. л. 6,36.

Заказ 933.

Отпечатано в типографии ООО

"Подольская Периодика",

142110, г. Подольск, ул. Кирова, 15

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

Т. 60. №6 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.

6

Том 60 · 2015

Редакционная коллегия

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

Зам. главного редактора: **Дерябин П.Г.** (д.м.н., проф.)

Ответственный секретарь: **Гребенникова Т.В.** (д.б.н., проф.)

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

Члены редколлегии:

Баринский И.Ф. (д.м.н., проф.)

Белюсова Р.В. (д.в.н., проф.)

Галегов Г.А. (д.б.н., проф.)

Гендон Ю.З. (д.м.н., проф.)

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

Гурцевич В.Э. (д.м.н., проф.)

Ершов Ф.И. (д.м.н., проф., акад. РАН)

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

Зуев В.А. (д.м.н., проф.)

Иванова О.Е. (д.м.н., доцент)

Карганова Г.Г. (д.б.н., доцент)

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

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

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

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

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

Щелканов М.Ю. (д.б.н.)

Юминова Н.В. (д.м.н., доцент)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Иванов А.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.Л. (д.м.н., проф.; СПб, Россия)

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

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

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

Покровский В.И. (д.м.н., проф., 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)

Goujgoulouva G. (PhD; Sofia, Bulgaria)

Hoenen T. (PhD; Hamilton, USA)

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

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

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

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

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

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

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

Oxford J. (DSc; London, UK)

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

Roggendorf M. (MD, Essen, Germany)

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

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

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

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

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

Vainionpää R. (Docent; Turku, Finland)

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

Webby R. (PhD, Memphis, USA)

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

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

RUSSIAN ACADEMY OF SCIENCES
VOPROSY VIROLOGII
(PROBLEMS OF VIROLOGY)

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

Volume 60 • 6 • 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; **Onishchenco G.G.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS; **Uryvaev L.B.** – MD, PhD, DSc, Prof., corresponding member of RAS; **Shchelkanov M.Yu.** – Sc.D.; **Yuminova N.V.** – MD, PhD, DSc, docent

Editorial council

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

Aliper T.I. – Sc.D., Prof. (Moscow)

Anan'ev V.Yu. – MD, PhD (Vladivostok)

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

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

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

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

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

Garbuz Yu.A. – MD (Khabarovsk)

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

Grigor'ev S.N. – MD (Magadan)

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

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

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

Ivanov L.I. – MD (Khabarovsk)

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

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

Lebedev G.B. – MD (Anadyr')

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

Lisitsin E.A. – MD, PhD (Vladimir)

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

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

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

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

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

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

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

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

Reznik V.I. – MD, PhD (Khabarovsk)

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

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

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

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

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

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

Yanovich V.A. – MD, PhD (Birobidzhan)

Yashkulov K.B. – MD, PhD (Elista)

Advisory Board

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

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

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

Gribova 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

ОБЗОРЫ

Морозова О.В., Исаева Е.И., Вязов С.О. Новые подходы к лечению флавивирусных инфекций 5

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Костинов М.П., Чикина Е.Ю., Кулакова Н.А., Борисова В.Н., Магаршак О.О.** Эффективность вакцинации против гепатита В у больных хронической обструктивной болезнью легких и возможности коррекции иммунного ответа 9
- Москалейчик Ф.Ф., Лага В.Ю., Дельгадо Е., Вега И., Фернандес-Гарсия А., Перес-Альварес Л., Корнилова Г.В., Пронин А.Ю., Жернов Ю.В., Томсон М.М., Бобкова М.Р., Карамов Э.В.** Стремительное распространение циркулирующей рекомбинантной формы CRF02-AG ВИЧ-1 на территории России и сопредельных стран 14
- Мукашева Е.А., Колобухина Л.В., Меркулова Л.В., Кистенева Л.Б., Заплатников А.Л., Смолоногина Т.А., Дешева Ю.А., Михайлова Е.В., Романовская А.В., Дубовицкая Н.А., Бурцева Е.И.** Серодиагностика в надзоре за циркуляцией вирусов гриппа в период пандемии, вызванной А (H1N1)pdm09 19
- Оспельникова Т.П., Исаева Е.И., Колодяжная Л.В., Козулина И.С., Андреева С.А., Полосков В.В., Ершов Ф.И.** Противовирусная активность препаратов интерферона бета 1а 24
- Губанова М.Н., Мадзаев С.Р., Жибурт Е.Б.** Распространенность и встречаемость инфекций у доноров крови в России 29
- Тюлько Ж.С., Якименко В.В.** Стратегия использования синонимичных кодонов в кодирующих последовательностях вируса клещевого энцефалита 32
- Сергеев А.А., Кабанов А.С., Булычев Л.Е., Сергеев А.А., Пьянков О.В., Боднев С.А., Галахова Д.О., Замедьянская А.С., Титова К.А., Шишкина Л.Н., Агафонов А.П., Сергеев А.Н.** Течение заболевания у сурков при интраназальном заражении вирусом оспы обезьян 37
- Виткова О.Н., Капустина О.В., Лобова Т.П., Михайлова В.В., Сафонов Г.А., Власова Н.Н., Белоусова Р.В.** Сравнительное изучение чувствительности и специфичности иммуноферментного анализа с хемилюминисцентной и колориметрической детекцией для выявления антигенов и антител к вирусам гриппа птиц и болезни Ньюкасла 41

В ПОМОЩЬ ВИРУСОЛОГУ

- Слепова О.С., Светлова Е.В., Ковалева Л.А., Макаров П.В., Кугушева А.Э., Денисова Е.В., Вахова Е.С., Захарова Г.Ю., Кондратьева Ю.А., Андрияшин А.Е., Демкин В.В.** Исследования вируса герпеса человека 6-го типа и других герпес-вирусов, вызывающих заболевания глаз, методом полимеразной цепной реакции 45
- Указатель статей, опубликованных в журнале "Вопросы вирусологии" в 2015 г.** *

CONTENTS

REVIEW

Morozova O.V., Isaeva E.I., Viazov S.O. New approaches to the treatment of the flavivirus infections

ORIGINAL RESEARCH

- Kostinov M.P., Chikina E.Y., Kulakova N.A., Borisova V.N., Magarshak O.O.** Anti-hepatitis B vaccination and postvaccinal immunity stimulation in patients with chronic obstructive pulmonary disease
- Moskaleychik F.F., Laga V.Yu., Delgado E., Vega Y., Fernandez-Garcia A., Perez-Alvarez L., Kornilova G.V., Pronin A.Yu., Zhernov Yu.V., Thomson M.M., Bobkova M.R., Karamov E.V.** Rapid spread of the HIV-1 circular recombinant CRF02-AG in Russia and neighboring countries
- Mukasheva E.A., Kolobukhina L.V., Merkulova L.V., Kisteneva L.B., Zaplatnikov A.L., Smolonogina T.A., Desheva Yu. A., Mikhaylova E.V., Romanovskaya A.V., Dubovitskaya N.A., Burtseva E.I.** Serodiagnosis in the surveillance of the influenza virus circulation during the development of the pandemic caused by A (H1N1) pdm09
- Ospelnikova T.P., Isaeva E.I., Kolodyaznaya L.V., Kozulina I.S., Andreeva S.A., Poloskov V.V., Ershov F.I.** Antiviral activity of the interferon beta 1a
- Gubanova M.N., Madzaev S.R., Zhiburt E.B.** Prevalence and incidence of the infections among blood donors in Russia
- Tyulko J. S., Yakimenko V. V.** Strategy of synonymous codon usage in encoding sequences of the tick-borne encephalitis virus
- Sergeev A.I.A., Kabanov A.S., Bulychev L.E., Sergeev Ar.A., Pyankov O.V., Bodnev S.A., Galakhova D.O., Zamedyanskaya A.S., Titova K.A., Shishkina L.N., Agafonov A.P., Sergeev A.N.** Development of the disease in marmot at the intranasal infection with the monkeypox virus
- Vitkova O.N., Kapustina O.V., Lobova T.P., Mikhailova V.V., Safonov G.A., Vlasova N.N., Belousova R.V.** Comparative Research into Sensitivity and Specificity of Immunoenzyme Analysis with Chemiluminescence and Colorimetric Detection for Detecting Antigens and Antibodies to Avian Influenza Viruses and Newcastle Disease

TO VIROLOGIST'S AID

Slepova O.S., Svetlova E.V., Kovaleva L.A., Makarov P.V., Kugusheva A.E., Denisova E.V., Vahova E.S., Zaharova G.Yu., Kondrat'eva Yu.A., Andryushin A.E., Demkin V.V. PCR Study of the human herpes virus type 6 and other viruses of the herpes group in eye diseases

Index of articles published in 2015

* см. на 2-й и 3-й полосе обл.

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

Морозова О.В.¹, Исаева Е.И.¹, Вязов С.О.²

Новые подходы к лечению флавивирусных инфекций

¹Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва; ²Институт вирусологии, госпиталь Университета Дуйсбург-Эссен, Эссен, Германия

Поскольку спонтанный мутагенез и быстрые перестройки квазивидов РНК-содержащих флавивирусов, а также отсутствие вирусных и клеточных систем репарации РНК приводят к устойчивости к индивидуальным изначально эффективным противовирусным препаратам, рекомендуют комбинированную терапию нуклеозидными и нуклеозидными ингибиторами вирусных ферментов в сочетании с иммуномодуляторами. Применение специфических иммуноглобулинов не только не обеспечивает полной элиминации большинства флавивирусов, но может приводить к усилению их инфекционности вследствие проникновения комплексов вирионов со специфичными антителами в клетки с рецепторами для Fc-фрагментов иммуноглобулинов.

Ключевые слова: вирус гепатита С; вирус клещевого энцефалита; рибавирин; интерферон; ингибиторы протеаз; РНКазы; иммуноглобулины; пептиды.

Для цитирования: Вопросы вирусологии. 2015; 60 (6): 5–9.

Morozova O.V.¹, Isaeva E.I.¹, Viazov S.O.²

New approaches to the treatment of the flavivirus infections

¹"The D.I. Ivanovsky Institute of Virology" Federal State Budgetary Institution "Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya" of the Ministry of Health of the Russian Federation, 123098, Moscow, Russia; ²Virology Institute of University Hospital, Essen, Germany

Since spontaneous mutagenesis and quasi-species rearrangements of the RNA-containing viruses, as well as an absence of both viral and cellular RNA reparation systems, causes resistance to originally effective antiviral drugs, combination therapy with nucleoside and non-nucleoside inhibitors of the viral enzymes in combination with immunomodulators is recommended. The use of specific immunoglobulins does not result in complete elimination of the flaviviruses but rather in possible antibody-dependent enhancement of the flavivirus infection by means of increased penetration of complexes of virions with specific antibodies into cells with receptors for Fc-fragments of immunoglobulins.

Key words: Hepatitis C virus; tick-borne encephalitis virus; ribavirin; interferon; protease inhibitors; RNases; immunoglobulins; peptides.

Received 21.11.13

For correspondence: Olga Morozova, MD, PhD, ScD; e-mail: omorozova2010@gmail.com

Citation: Voprosy virusologii. 2015; 60(6): 5–9. (In Russ.)

Семейство флавивирусов включает патогенные для человека и животных РНК-содержащие вирусы, из которых наиболее распространены вирус гепатита С (ВГС), вирусы денге типов 1–4, желтой лихорадки, лихорадки Западного Нила, японского и клещевого энцефалитов (ВКЭ). По оценкам ВОЗ, 130–170 млн человек в мире инфицированы ВГС и ежегодная смертность от этой инфекции достигает 350 тыс. человек [1]. Инфекция, вызываемая ВГС, в 60–80% случаев переходит в хроническую форму. Примерно у 20% больных хроническим гепатитом С развивается цирроз печени, что повышает риск развития печеночной недостаточности и гепатоцеллюлярной карциномы с летальным исходом.

Вирусы другого рода *Flavivirus* семейства *Flaviviridae* переносятся членистоногими (комарами, клещами и др.). Их стабильная циркуляция в природных популяциях среди многочисленных позвоночных и беспозвоночных резервуарных хозяев не поддается регулируемому контролю, поэтому полная элиминация посредством всеобщей

вакцинации недостижима. До 200 млн человек в мире инфицированы флавивирусами (для ссылок см. [2]). В зонах риска инфицирования вирусом денге проживают более 2 млрд человек, вирусом желтой лихорадки – 600 млн [2–5]. Индуцированные флавивирусами энцефалиты могут переходить в хроническую форму и приводить к инвалидизации с развитием параличей и парезов. Оценки частот персистентных форм инфекции и уровней смертности различны для разных видов флавивирусов. Для наиболее распространенного на территории России и поэтому наиболее изученного ВКЭ уровни летальных исходов достигают 20–60% от общего числа инфицированных лиц для дальневосточного генетического типа, 6–8 и 1–2% для сибирского и западноевропейского типов соответственно [4]. Наиболее высокие частоты хронизации инфекции отмечены для сибирского типа ВКЭ [4].

Генетическая гетерогенность флавивирусов, обусловленная отсутствием редактирующей активности РНК-зависимых РНК-полимераз и систем репарации РНК, а

также модулирование врожденного и специфического иммунитета приводят к недостаточности вакцинопрофилактики и неполной защите от гетерологичных штаммов. Широкая распространенность и тяжесть заболеваний, вызываемых флавивирусами, а также высокие уровни смертности, персистенции возбудителей и инвалидизации пациентов наряду с отсутствием или недостаточной эффективностью вакцин обуславливают разработку и применение противовирусных препаратов.

Поиск потенциальных мишеней для противофлавивирусных препаратов

Флавивирусы – оболочечные РНК-содержащие вирусы диаметром 40–50 нм со сходной молекулярной организацией. Геном представлен одноцепочечной РНК положительной полярности длиной от 9 до 11 тыс. нуклеотидных остатков (н. о.), содержащей одну открытую рамку считывания, окруженную нетранслируемыми регуляторными областями со шпильочно-петлевыми структурами. Рецепторопосредованный эндоцитоз обеспечивает проникновение флавивирусов в клетки. Многоэтапное взаимодействие флавивирусов с рецепторами завершается клатринопосредованным эндоцитозом, слиянием вирусной оболочки и клеточной мембраны и освобождением геномной РНК. Для ВГС описаны рецепторы CD81, SR-BI, CLDN-1 и OCLN [6]. Идентифицированы клеточные рецепторы для переносимых комарами флавивирусов: олиго- и полисахариды (в частности, гепарин, гепарансульфат и глюкозаминогликаны (ГАГ)) [7–8], а также мембранные белки. Рецепторы липопротеинов низкой плотности и интегрин $\alpha_5\beta_1$ являются функциональными рецепторами только в некоторых перmissive культурах клеток млекопитающих. Лектины С-типа (С-type lectin receptors (CLR)) на поверхности миелоидных клеток также могут служить рецепторами для различных патогенов, включая флавивирусы [9]. Ингибиторы проникновения оболочечных РНК-содержащих вирусов широкого спектра действия – производные родамина LJ-001 и 2'-дезоксигуанидина dUY11 интеркалируют в липидный бислой, препятствуя таким образом слиянию вирусной и клеточной мембран, что показано только для ВГС, но не для других флавивирусов [10–11].

Инициация трансляции происходит с внутреннего участка связывания рибосом (internal ribosome entry site (IRES)), расположенного в 5'-нетранслируемой области вирусного генома. Полипротеин-предшественник ко- и посттрансляционно подвергается протеолитическому процессингу под действием вирусных и клеточных протеаз. Вирусная трипсиноподобная сериновая протеаза локализована в 180 аминокислотных остатках (а. о.) N-концевого домена белка NS3, зависит от кофактора – 40 а. о. неструктурного белка NS2B флавивирусов и гидролизует преимущественно пептидные связи после основных а. о., таких как Arg – Arg, Arg – Lys, Lys – Arg или Gln – Arg в позициях P1 и P2, которым предшествуют Gly, Ala или Ser в позиции P1' [3]. Поэтому ингибиторы протеаз бензамидин и фенилметилсульфонилфторид (phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF)) не активны по отношению к флавивирусной протеазе NS3, в то время как конкурентный ингибитор конформационный аналог субстрата пальматин, производные пиразола и пептидные аналоги участков расщепления флавивирусного полипротеина могут ингибировать процессинг флавивирусных белков [2]. Поскольку гидролиз пептидных связей между всеми вирусными гликопротеинами рГМ, Е и NS1 происходит под действием клеточной протеазы, их созревание невозможно селективно блокировать нетоксичными противовирусными препаратами. Однако ингибиторы α -глюкозидаз эндоплазматического ретикула блокируют N-гликозилирование поверхностных

гликопротеинов флавивирусов, препятствуя их выходу из клеток. Существенное ингибирование созревания флавивирусов обнаружено под действием N-нонил-дезоксиноджиримицина (N-nonyl-deoxynojirimycin), что, возможно, опосредуется подавлением секреции гликопротеинов Е и NS1 [12]. Расщепление полипротеина на N-конце приводит к образованию трех структурных белков, из которых один связывается с геномной РНК с образованием нуклеокапсида, а два другие гликопротеина образуют вирусную оболочку после интеркаляции в липидный бислой.

Большие неструктурные белки NS3 и NS5 флавивирусов (для ВГС NS3 и NS5B) обеспечивают репликацию геномных РНК с образованием промежуточных продуктов: частично двухцепочечных репликативных интермедиатов и полностью двухцепочечных репликативных форм без синтеза ДНК-копий геномов и субгеномных РНК. Кэпирование 5'-концов геномных РНК флавивирусов катализируется неструктурными белками NS5, на N-конце которого расположены активные центры гуанилилтрансферазы, N7- и 2'-O-метилтрансферазы, и NS3, обладающим РНК-трифосфатазной активностью. Ферментативная активность NTRазы и репликазы, ассоциированная с белком NS3 флавивирусов, может ингибироваться широким спектром аналогов нуклеозидов с модифицированным азотистым основанием, таких как рибавирин-5'-трифосфат, паклитаксел (paclitaxel), а также модифицированными нуклеотидами с заместителями по гетероциклическому кольцу (ring expanded nucleosides (RENs) triphosphates) [13] или производными нуклеотидов с негидролизуемой связью между β - и γ -фосфатами [2]. При этом ингибирование ферментативных активностей белка NS3 флавивирусов достигается только в оптимальных условиях *in vitro*, в то время как противовирусные свойства *in vivo* остаются неизвестными. Ингибиторами метилтрансферазной активности флавивирусного белка NS5 могут служить производные S-аденозилметонина (S-adenosylmethionine (SAM)) или S-аденозилмоноцистеина (S-adenosylhomocysteine (SAH)), являющиеся ингибиторами большинства вирусных и клеточных метилтрансфераз [2, 10]. Так, неплапоцин А (neplapocin A) – природный карбоциклический нуклеозид и его более стабильные аналоги без гликозидной связи абакавир и карбовир могут ингибировать образование “кэп”-структур на 5'-концах флавивирусных РНК. Альтернативный способ ингибирования связывания белка NS5 с “кэп”-структурами состоит в фосфорилировании эукариотического фактора инициации трансляции eIF4E, приводящем к снижению специфичности взаимодействия [2]. Аффинное взаимодействие альдегидсодержащих и 4-N-экзо-фотореакционных аналогов нуклеотидов с белками NS3 и NS5 не обеспечивало полного ингибирования репликации флавивирусов в инфицированных клетках [14–15].

Единственный неструктурный гликопротеин NS1 флавивирусов находится на поверхности инфицированных клеток и секретируется из инфицированных клеток в форме гомо- и гетеродимеров. У гепацирусов и пестирусов вместо гена NS1 идентифицирован ген р7. Малые неструктурные белки, отличающиеся по размерам в разных типах инфицированных клеток, обеспечивают закрытие репликативного комплекса [2–5].

Генетическая изменчивость и варибельность вирусных белков РНК-содержащих флавивирусов затрудняют создание специфических противовирусных препаратов. Исследование молекулярных механизмов проникновения флавивирусов в клетки, репликации геномных РНК и трансляции позволило идентифицировать специфические флавивирусные мишени и создать конформационные модели для дизайна специфических ингибиторов [1, 2].

Лечение флавивирусных инфекций: проблемы и перспективы

Рибавирин, аналог нуклеозида, является ингибитором не только вирусных, но и клеточных ферментов синтеза нуклеиновых кислот и поэтому токсичен для клеток хозяина. Описано угнетение кроветворения [1, 11, 15]. Иммуномодулятор интерферон может приводить к дисбалансу цитокинов. При его длительном применении наблюдают развитие аллергических реакций и индукцию антител, направленных к интерферону, что обуславливает необходимость отмены лечения [1, 16]. Повышенные дозы интерферона вызывают иммунодепрессию [16]. Несмотря на сходство молекулярной организации трех родов семейства флавивирусов, многочисленные попытки ингибирования репродукции ВКЭ аналогом нуклеозида рибавирином, который широко используется для лечения гепатита С и полиомиелита, оказались безуспешными. Широкое применение интерферона и его индукторов для лечения флавивирусных инфекций также ограничено, поскольку опыт комбинированной терапии гепатита С рибавирином и интерфероном показал, что побочными эффектами являются усталость, лихорадка, желудочно-кишечные нарушения, нейропсихиатрические симптомы, анемия и другие гематологические осложнения. Таким образом, помимо относительно невысокой эффективности в отношении разных флавивирусов и высокой стоимости, комбинированная терапия интерфероном и рибавирином может вызывать побочные эффекты.

В настоящее время применяют противовирусные препараты прямого действия (*direct-acting antivirals* – DAAs), ингибирующие неструктурные белки флавивирусов: сериновую протеазу – NS3/4A и РНК-зависимую РНК-полимеразу – белки NS5A/NS5B. В 2011 г. α -кетонамидные линейные пептидомиметики, обратимо взаимодействующие с каталитическим центром протеазы NS3/4A ВГС, телапревир (*telaprevir*) и боцепревир (*bocoprevir*) были разрешены для клинического применения в Северной Америке и Европе. Применение этих препаратов в сочетании с пегилированным ИФН- α и рибавирином для лечения хронического гепатита С, вызванного генотипом 1 ВГС, приводило к полному исчезновению вируса у ранее не леченных больных в 67–75% случаев. В контрольной группе в результате комбинированной терапии интерфероном и рибавирином устойчивое снижение вирусных нагрузок наблюдали у 45% пациентов [1, 16, 17]. В настоящее время на стадии клинических испытаний находится ряд ингибиторов вирусной NS3/4A-протеазы (*sofosbuvir*, *simeprevir*, *sofosbuvir*) [18–24]. Некоторые из них представляют собой макроциклические пептидомиметики, также блокирующие каталитический центр протеазы с помощью нековалентного взаимодействия. Применение ингибиторов NS3/4A-протеазы ВГС ограничено из-за быстрого появления и селекции резистентных вариантов флавивирусных квазивидов; подавления не всех генотипов ВГС и побочных эффектов [18, 19]. Возможный способ преодоления этих препятствий состоит в комбинированной терапии ингибиторами протеазы в сочетании не только с рибавирином и интерфероном, но и с противовирусными препаратами с иными флавивирусными мишенями, например ингибиторами РНК-полимеразы NS5B или белка NS5A.

Ингибиторы РНК-зависимой РНК-полимеразы NS5B ВГС включают нуклеозиды или их производные (НИ) и ненуклеозидные ингибиторы (НИИ). НИ непосредственно блокируют каталитический центр РНК-полимеразы. Поскольку структура каталитического сайта консервативна для всех генотипов ВГС, НИ активны в отношении широкого спектра вариантов вируса. В экспериментах *in vitro* выявлено ограниченное число мутантов, резистент-

ных к НИ. В отличие от НИ механизм действия НИИ основан на аллостерическом эффекте. Для НИИ характерен низкий барьер генетической резистентности.

Успехи в изучении механизмов взаимодействия флавивирусов и организма хозяина [17], позволившие идентифицировать клеточные факторы репликации геномной РНК [25], привели к разработке препаратов, блокирующих взаимодействие вирусных и клеточных факторов [18, 19, 25]. Предполагается, что циклофилин А вызывает конформационные изменения неструктурного белка NS5A ВГС, приводящие к активации вирусной РНК-полимеразы. Разработаны несколько ингибиторов циклофилина А, один из которых алиспоривир (Дебио-025) продемонстрировал сравнительно высокую эффективность и низкую частоту побочных реакций как при монотерапии, так и при сочетанном применении с интерфероном и рибавирином.

Перспективной мишенью для терапии гепатита С является микроРНК-122 (*miR-122*), специфичная для клеток печени, взаимодействующая с геномом ВГС и повышающая эффективность вирусной репликации [9, 18, 19, 26]. Клинические испытания по подавлению этого взаимодействия с помощью химически модифицированных антагонистов (антагомиров) *miR-122*, в частности миравирсена, продемонстрировали снижение титров вируса при слабой выраженности побочных эффектов.

Список потенциальных клеточных мишеней для химиотерапии гепатита С постоянно расширяется [9, 17, 18]. Начаты исследования препаратов, ингибирующих клеточные рецепторы и корецепторы для ВГС. Эти препараты включают соединение ITX 5061, взаимодействующее с рецептором SRB1, и уже лицензированные препараты эрлотиниб и эзетимиб, реагирующие с белками EGFR и NPC1L1 соответственно. Интенсивно ведется и поиск веществ, ингибирующих плейотропные функции других вирусных белков – P7, белка нуклеокапсида С и белков оболочки E1 и E2.

Несмотря на прогресс специфической терапии ВГС аналогичные ингибиторы протеаз и репликаз других флавивирусов пока не найдены.

Схемы лечения клещевого энцефалита (КЭ) в разных странах, расположенных в эндемичных зонах, отличаются. В России лечение КЭ основано на применении специфического иммуноглобулина из сывороток крови доноров, аналогов интерферонов – виферона, реаферона-ЕС-липидта (человеческий рекомбинантный ИФН- α 2 и ИФН- α 2b) или индукторов интерферона (ларифана, неовира, тилорона, амиксина, циклоферона, ремантадина, ридостина, камедона, йодантипирина), а также цитофлавина, энериона, маннитола, ноотропила, пентоксифиллина и рибонуклеазы А из поджелудочной железы быка. Однако известно, что белки, к которым относятся иммуноглобулины и РНКазы с молекулярной массой от 12,3–13,7 до 45–150 кДа, не способны проникать в эукариотические клетки и внеклеточные вирионы, следовательно, их возможное действие ограничено поверхностями инфицированных клеток и вирионов. Также не исключен риск контаминации препаратов из донорской крови или органов животных инфекционными агентами. Более того, известно, что в присутствии поли- и моноклональных антител, специфичных к гликопротеину Е, инфекционность флавивирусов может возрастать, что приводит к уменьшению средней продолжительности жизни животных после заражения [27, 28]. Иммуные комплексы вирионов со специфичными антителами проникают в клетки с рецепторами для Fc-фрагментов иммуноглобулинов, к которым относятся В-лимфоциты с CD16 на поверхности, мононуклеарные лейкоциты, нейтрофилы, нормальные клетки-киллеры, эозинофилы, базофилы и тучные клетки, приводя к уве-

личению общего количества зараженных клеток. При этом увеличиваются концентрации цитокинов и количество лимфоцитов, что вызывает каскадное усиление вирусной инфекции. Эффект иммунного усиления инфекционности флавивирусов (antibody-dependent enhancement) является эпителиоспецифичным и индуцируется только некоторыми моноклональными антителами, направленными к гликопротеину Е [28]. Возможно, иммунное усиление инфекционности обусловлено как проникновением комплексов вирионов с антителами к гликопротеину Е в клетки в результате их связывания с рецепторами для Fc-фрагментов иммуноглобулинов [16], так и активацией синтеза РНК в результате связывания белка Е, экранирующего РНК-матрицу [14, 15]. Поэтому введение специфического иммуноглобулина возможно не позже 96 ч после укуса клеща, такая терапия не рекомендована в европейских странах, несмотря на производство иммуноглобулинов.

Препараты интерферона (реаферон, лейкинферон и другие) можно вводить внутримышечно, внутривенно, эндолумбально и эндолимфатически. Однако большие дозы интерферона $1-6 \cdot 10^6$ МЕ обладают иммунодепрессивным свойством, а устойчивость клеток к ВКЭ не прямо пропорциональна титрам интерферона. Поэтому целесообразно использовать относительно небольшие дозы препарата либо применять индукторы интерферона (двуспиральная РНК фага 2, амиксин, камедон и другие), обеспечивающие невысокие титры интерферона и обладающие иммуномодулирующим свойством. Их эффективность при экспериментальном клещевом энцефалите показана И.Ф. Баринским и соавт. [29]. Дополнительно назначают искусственную вентиляцию легких при нарушении сознания, панангин при нарушениях ритма и проводимости, а также общеукрепляющие растворы глюкозы.

Помимо природных белковых рибонуклеаз в стадии доклинических испытаний вирулицидных, противовирусных свойств и токсичности при разных способах и схемах введения находятся искусственные низкомолекулярные РНКазы на основе металлокомплексов, биогенных аминов, антисмысловых олигонуклеотидов, рибозимов и пептидов.

В европейских эндемичных областях лечение КЭ включает строгий постельный режим, поддержание водно-солевого баланса и применение парацетамола, аспирина, нестероидных противовоспалительных препаратов, анальгетиков, витаминов и антипиретиков. В тяжелых случаях врачи рекомендуют кортикостероиды, хотя их использование официально не разрешено [5]. В Китае к общепринятым методам лечения клещевых нейроинфекций добавляют фитопрепараты, содержащие витамины и микроэлементы.

Заключение

Благодаря развитию молекулярной вирусологии выявлены потенциальные мишени для специфических противовирусных препаратов при уменьшении токсичности для клеток человека. Поскольку для РНК-содержащих флавивирусов спонтанный мутагенез, быстрые перестройки квазивидов и отсутствие вирусных и клеточных систем репарации РНК приводят к возникновению устойчивости к индивидуальным изначально эффективным противовирусным препаратам, в настоящее время рекомендуют комбинированную терапию нуклеозидными и нуклеозидными ингибиторами вирусных ферментов в сочетании с иммуномодуляторами. Для лечения гепатита С в качестве дополнения к ранее применявшейся комбинированной терапии нуклеозидным аналогом рибавирином и пролонгированным ИФН- α применяют специфические ингибиторы

вирусных протеаз. Для продолжающегося поиска и идентификации противовирусных препаратов необходим поэтапный скрининг комбинаторных библиотек [30] низкомолекулярных аналогов нуклеозидов или ингибиторов вирусных протеаз, а также пептидов, обеспечивающих проникновение флавивирусов в клетки (пептид слияния, участки связывания рецепторов), и искусственных РНКаз. Применение специфических иммуноглобулинов не только не обеспечивает полной инактивации большинства флавивирусов, но может приводить к каскадному иммунному усилению инфекционности флавивирусов посредством проникновения комплексов вирионов со специфичными антителами в клетки через рецепторы для Fc-фрагментов иммуноглобулинов с увеличением концентраций цитокинов и ростом количества лимфоцитов. Наряду с высокомолекулярными иммуноглобулинами белковые РНКазы с молекулярной массой от 12,3–13,7 до 45–150 кДа не способны проникать в клетки и внеклеточные вирионы. Цитокины, включая нативные и рекомбинантные интерфероны, а также индукторы интерферонов могут приводить к дисбалансу иммунитета. Не исключен риск контактов белковых препаратов из донорской крови или органов животных инфекционными агентами. В дополнение к противовирусным препаратам прямого действия необходима индукция преимущественно клеточного Th1-иммунного ответа.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1–28, 30 см. REFERENCES)

29. Баринский И.Ф., Лазаренко А.А., Алимбарова Л.М., Давыдова А.А. Эффективность сочетанного применения иммуномодуляторов и вакцины при клещевом энцефалите в эксперименте. *Вопросы вирусологии*. 2011; 56 (4): 45–7.

REFERENCES

1. Tong J., Wang Y., Lu Y. New developments in small molecular compounds for anti-hepatitis C virus (HCV) therapy. *J. Zhejiang Univ. Sci. B*. 2012; 13 (1): 56–82.
2. Baier A. Flavivirus infections and potential targets for antiviral therapy. In: Ruzek D., ed. *Flavivirus encephalitis*. Intech, Croatia; 2011: 89–104.
3. Chambers T.J., Weir R.C., Grakoui A., McCourt D.W., Bazan J.F., Fletterick R.J. et al. Evidence that the N-terminal domain of non-structural protein NS3 from yellow fever virus is a serine protease responsible for site-specific cleavages in the viral polyprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1990; 87 (22): 8898–902.
4. Gritsun T.S., Lashkevich V.A., Gould E.A. Tick-borne encephalitis. *Antiviral Res.* 2003; 57 (1–2): 129–46.
5. Mansfield K.L., Johnson N., Phipps L.P., Stephenson J.R., Fooks A.R., Solomon T. Tick-borne encephalitis virus – a review of an emerging zoonosis. *J. Gen. Virol.* 2009; 90 (Pt 8): 1781–94.
6. Poordad F., McCone J.Jr., Bacon B.R., Bruno S., Manns M.P., Sulkowski M.S. et al. Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *N. Engl. J. Med.* 2011; 364 (13): 1195–206.
7. Lee E., Lobigs M. Substitutions at the putative receptor-binding site of an encephalitic flavivirus alter virulence and host cell tropism and reveal a role for glycosaminoglycans in entry. *J. Virol.* 2000; 74 (19): 8867–75.
8. Lee E., Lobigs M. Mechanism of virulence attenuation of glycosaminoglycan-binding variants of Japanese encephalitis virus and Murray Valley encephalitis virus. *J. Virol.* 2002; 76 (10): 4901–11.
9. Robinson M.J., Sancho D., Slack E.C., LeibundGut-Landmann S., Reise Sousa C. Myeloid C-type lectins in innate immunity. *Nat. Immunol.* 2006; 7 (12): 1258–65.
10. De Clercq E. Antiviral agents: characteristic activity spectrum depending on the molecular target with which they interact. *Adv. Virus Res.* 1993; 42: 1–55.
11. De Clercq E. Highlights in antiviral drug research: antivirals at the horizon. *Med. Res. Rev.* 2013; 33 (6): 1215–48.
12. Wu S.F., Lee C.J., Liao C.L., Dwek R.A., Zitzmann N., Lin Y.L. Antiviral effects of an iminosugar derivative on flavivirus infections. *J. Virol.* 2002; 76 (8): 3596–604.
13. Borowski P., Niebuhr A., Schmitz H., Hosmane R.S., Bretner M.,

- Siwecka M.A. et al. NTPase/helicase of Flaviviridae: inhibitors and inhibition of the enzyme. *Acta Biochim. Pol.* 2002; 49 (3): 597–614.
14. Morozova O.V., Safronov I.V., Bahvalova V.N., Dobrikov M.I. Affinity labelling of the tick-borne encephalitis virus RNA replicase proteins by 4-N-exo-base-substituted photoreactive CTP analogs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1998; 8 (7): 787–92.
 15. Morozova O.V., Safronov I.V. Viral protein functions study by affinity modification. *Mini Rev. Med. Chem.* 2001; 1 (3): 283–91.
 16. Thomas D.B. *Viruses and the cellular immune response*. New York, Basel, Hong Kong; 1993.
 17. Ploss A., Dubuisson J. New advances in the molecular biology of hepatitis C virus infection: towards the identification of new targets. *Gut.* 2012; 61: 25–35.
 18. Büchler S, Bartenschlager R. New targets for antiviral therapy of chronic hepatitis C. *Liver Int.* 2012; 32 (Suppl. 1): 9–16.
 19. Schaeffer E.A., Chung R.T. Anti-hepatitis C virus drugs in development. *Gastroenterology.* 2012; 142 (6): 1340–50.
 20. Chopp S., Vanderwall R., Hult A., Klepser M. Simeprevir and sofosbuvir for treatment of hepatitis C infection. *Am. J. Health Syst. Pharm.* 2015; 72 (17): 1445–55.
 21. Jacobson I.M., Dore G.J., Foster G.R., Fried M.W., Radu M., Rafalsky V.V. et al. Simeprevir with pegylated interferon alfa 2a plus ribavirin in treatment-naïve patients with chronic hepatitis C virus genotype 1 infection (QUEST-1): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* 2014; 384 (9941): 403–13.
 22. Guedj J., Pang P.S., Denning J., Rodriguez-Torres M., Lawitz E., Symonds W., Perelson A.S. Analysis of hepatitis C viral kinetics during administration of two nucleotide analogues: sofosbuvir (GS-7977) and GS-0938. *Antivir. Ther.* 2014; 19 (2): 211–20.
 23. Liu M., Tuttle M., Gao M., Lemm J.A. Potency and resistance analysis of hepatitis C virus NS5B polymerase inhibitor BMS-791325 on all major genotypes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014; 58 (12): 7416–23.
 24. Wang C., Sun J.H., O'Boyle D.R. 2nd, Nower P., Valera L., Roberts S. et al. Persistence of resistant variants in hepatitis C virus-infected patients treated with the NS5A replication complex inhibitor daclatasvir. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013; 57 (5): 2054–65.
 25. Salloum S., Tai A.W. Treating hepatitis C infection by targeting the host. *Transl. Res.* 2012; 159 (6): 421–9.
 26. Stahla-Beek H.J., April D.G., Saedi B.J., Hannah A.M., Keenan S.M., Geiss B.J. Identification of a novel antiviral inhibitor of the flavivirus guanylyltransferase enzyme. *J. Virol.* 2012; 86 (16): 8730–9.
 27. Peiris J.S., Porterfield J.S. Antibody-mediated enhancement of flavivirus replication in macrophage cell lines. *Nature.* 1979; 282 (5738): 509–11.
 28. Phillipotts R.J., Stephenson J.R., Porterfield J.S. Antibody-dependent enhancement of tick-borne encephalitis virus infectivity. *J. Gen. Virol.* 1985; 66 (8): 1831–7.
 29. Barinskiy I.F., Lazarenko A.A., Alimbarova L.M., Davydova A.A. Efficacy of combined use of immunomodulators and vaccines in the tick-borne encephalitis in the experiment. *Voprosy virusologii.* 2011; 56 (4): 45–7. (in Russian)
 30. Kampmann T., Yennamalli R., Campbell P., Stoermer M.J., Fairlie D.P., Kobe B. et al. In silico screening of small molecule libraries using the dengue virus envelope E protein has identified compounds with antiviral activity against multiple flaviviruses. *Antiviral Res.* 2009; 84 (3): 234–41.

Поступила 21.11.13

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 615.371:578.8911.03:616.36-002-022-06:616.241.015.46

Костинов М.П.¹, Чикина Е.Ю.¹, Кулакова Н.А.¹, Борисова В.Н.², Магаршак О.О.¹

Эффективность вакцинации против гепатита В у больных хронической обструктивной болезнью легких и возможности коррекции иммунного ответа

¹ФГБУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 105064, г. Москва; ²ЗАО «Комбиотех», 117871, г. Москва

Проблема вакцинации против гепатита В пациентов с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) весьма актуальна, поскольку в настоящее время недостаточно изучены процессы формирования поствакцинального иммунитета, особенно при комбинированном введении вакцин и иммунокорректирующих препаратов, а также вопросы безопасности вакцинации и ее влияния на течение ХОБЛ. В связи с этим целью работы явилась оценка эффективности вакцинации против гепатита В пациентов, страдающих ХОБЛ, и возможности коррекции иммунного ответа препаратом Аффинолейкин. Было обследовано 59 больных ХОБЛ тяжелого и среднетяжелого течения в возрасте от 35 до 65 лет, которым вводили вакцину против гепатита В (ЗАО «Комбиотех») по схеме 0–1–6 мес, у 25 из них вакцинация сочеталась с применением иммунокорректирующего препарата Аффинолейкин. Группу сравнения составили 34 здоровых человека, вакцинированные по аналогичной схеме. Вакцинация не сопровождалась ухудшением течения заболевания и развитием необычных реакций. Выявлены особенности поствакцинального иммунного ответа: после первого введения вакцины 70% пациентов с ХОБЛ в отличие от здоровых лиц были серонегативными, за исключением больных, которым дополнительно вводили Аффинолейкин. После второй вакцинации у 41% пациентов уровень антител был ниже защитного при 100% сероконверсии у больных, получавших Аффинолейкин. Введение третьей дозы вакцины привело к быстрому и значительному нарастанию уровня антител в основном в высоких концентрациях при 100% сероконверсии у всех пациентов в течение 6 мес. Сочетанное применение вакцины против гепатита В и Аффинолейкина у больных ХОБЛ приводит к достоверному снижению частоты рецидивов заболевания и улучшению показателей функции внешнего дыхания в течение года.

Ключевые слова: вакцинация; хроническая обструктивная болезнь легких; гепатит В; Аффинолейкин.

Для цитирования: Вопросы вирусологии. 2015; 60 (6): 9–14.

Для корреспонденции: Чикина Елена Юрьевна, канд. мед. наук, науч. сотр. лаб. аллергодиагностики; e-mail: gelo.68@mail.ru

Anti-hepatitis B vaccination and postvaccinal immunity stimulation in patients with chronic obstructive pulmonary disease

¹I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, 105064, Moscow, Russia; ²Kombiotekh, Ltd., 117871, Moscow, Russia

The problem of the anti-hepatitis B vaccination of patients with chronic obstructive lung disease (COPD) was discussed due to the lack of studies concerning the developing of the postvaccinal immunity, especially when vaccination is combined with the immunomodulating treatment. The data on the vaccination safety and its influence on the clinical course of COPD are also insufficient. Therefore, in this work we investigated the efficiency of the antihepatitis B vaccination in adults with chronic obstructive pulmonary disease under the treatment with the immunomodulating Affinoleikin drug. A total of 93 patients were tested including 59 patients with severe and moderate COPD (aged from 35 to 65 years). 34 of these 59 patients were vaccinated against hepatitis B (Kombiotekh) according to 0-1-6 month scheme, and 25 of them were vaccinated against hepatitis B during the treatment with Affinoleikin. The control group consisted of 34 healthy patients. Our study demonstrated good tolerance and high immune efficiency of the anti-hepatitis B vaccine.

However, after the first vaccination the level of HBs-AT was below protective level in patients with COPD compared to healthy patients. Also, 64 to 70 % of patients with COPD were seronegative excluding the patients receiving the Affinoleikin treatment, whose antibody titer was protective after the first vaccine dose, but did not reach the level typical of healthy patients.

After the second vaccination we detected low and medium protective antibody levels in 58.9% of patients from the 1st group, whereas 41% were seronegative. Introduction of the third vaccine dose led to fast and significant increase in the antibody level mainly in high concentrations with 100% seroconversion in all patients. Combined antihepatitis B vaccination and Affinoleikin treatment in patients with COPD leads to faster biosynthesis of HBs-AT in protective concentrations and decrease of seronegative response, but it has no effect on frequency and type of general and local postvaccinal response.

Key words: vaccination; chronic obstructive lung disease (COPD); hepatitis B; Affinoleikin.

Received 29.05.14

For correspondence: Elena Chikina, MD, PhD; e-mail: gelo.68@mail.ru
Citation: Voprosy virusologii. 2015; 60(6): 9–14. (In Russ.)

По оценке экспертов ВОЗ, около 2 млрд людей в мире инфицированы вирусом гепатита В, около 400 млн человек больны [1, 2]. В России заболеваемость вирусным гепатитом В (ВГВ) в последние годы составляет от 8,56 до 35 на 100 тыс. населения с явной тенденцией к повышению особенно среди лиц 15–30 лет [3, 4]. Высокий риск развития тяжелых и хронических форм осложненных, таких как цирроз и первичный рак печени, а также высокая смертность от терминального поражения печени (15%) позволяют считать ВГВ самым распространенным и опасным инфекционным заболеванием печени.

Поскольку до сих пор не существует специфического лечения данного заболевания, наиболее эффективным средством предупреждения возникновения и распространения ВГВ является вакцинация [5]. Несмотря на определенные практические достижения в профилактике гепатита В, остаются открытыми вопросы вакцинопрофилактики детей и взрослых, страдающих различными хроническими заболеваниями. Так, не изучены многие аспекты вакцинопрофилактики больных хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ).

ХОБЛ является одним из наиболее распространенных патологических состояний во всем мире и характеризуется высокой инвалидизацией и смертностью. По официальным данным Министерства здравоохранения РФ, в России зарегистрировано 2,4 млн больных ХОБЛ, однако результаты эпидемиологических исследований позволяют предположить, что их число может составлять около 16 млн. [6, 7]. Проблема вакцинации пациентов с ХОБЛ требует дальнейшего изучения, поскольку в современной литературе мало данных о качестве формирующегося поствакцинального иммунитета, особенно при комбинированном введении вакцин, а также о безопасности вакцинации и ее влиянии на течение заболевания.

Другой проблемой является наличие вторичной иммунной недостаточности у больных ХОБЛ, включающей как нарушение факторов местной защиты, так и изменения, затрагивающие клеточное и гуморальное звено иммунитета. Частые бактериальные и вирусные инфекции,

а также длительная иммуносупрессивная терапия усугубляют иммунные нарушения [6, 8, 9]. Вакцинация таких больных приводит к выработке специфических антител, однако их уровень ниже, чем у практически здоровых лиц, а у определенной части даже могут не обнаруживаться защитные титры антител. Поэтому введение иммунокорректоров в сочетании с вакцинами приводит к снижению частоты присоединения интеркуррентных заболеваний и созданию условий, способствующих продукции специфических антител [10–12].

В связи с этим целью исследования явилась оценка эффективности вакцинации против гепатита В взрослых, страдающих ХОБЛ, и возможности коррекции иммунного ответа.

Материалы и методы

Исследование проводилось в лаборатории вакцинопрофилактики и иммунотерапии аллергических заболеваний ФГБУ «НИИВС им. И.И. Мечникова» и на базе пульмонологического отделения ГКБ № 57. В соответствии с целью и поставленными задачами было обследовано 93 человека, из них 59 больных ХОБЛ тяжелого и среднетяжелого течения в возрасте от 35 до 65 лет. В зависимости от схемы вакцинации были сформированы 2 группы: I группа – 34 пациента, которым вводили вакцину против гепатита В (ЗАО «Комбиотех») по схеме 0–1–6 мес, II группа – 25 больных ХОБЛ, у которых вакцинация по аналогичной схеме сочеталась с применением препарата Аффинолеикин. Группу сравнения составили 34 здоровых реципиента, привитых только вакциной против гепатита В по той же схеме.

Вакцинацию проводили на фоне ремиссии при выписке из стационара, а также в амбулаторных условиях. Во время вакцинации заболевание контролировалось базисной терапией, включающей применение ингаляционных кортикостероидов и бронхолитиков в соответствии со стандартами лечения ХОБЛ.

Для вакцинации использовали рекомбинантную дрожжевую вакцину против гепатита В производства ЗАО «Комбиотех», которая представляет собой сорби-

Частота обострений и развития острых респираторных инфекций (ОРИ) у больных ХОБЛ в течение года до и после вакцинации против гепатита В

Группа	Частота обострений ХОБЛ в течение 12 мес		Частота развития ОРИ в течение 12 мес	
	до вакцинации	после вакцинации	до вакцинации	после вакцинации
I (n = 34)	2,63±0,24	2,63±0,16	1,88±0,15	1,92±0,15
II (n = 25)	2,5±0,23	1,63±0,12*	1,96±0,16	1,4±0,12**

Примечание. * – $p < 0,01$, ** – $p < 0,05$ – различия с исходными данными.

рованный на гидроксиде алюминия белок (HBsAg), синтезированный рекомбинантным штаммом дрожжей и содержащий антигенные детерминанты поверхностного антигена вируса гепатита В [13]. В 1 мл препарата содержится 20 мкг HBsAg, 0,5 мг алюминия гидроксида и не содержится консерванта.

В соответствии с инструкцией по применению препарата вакцину против гепатита В вводили внутримышечно в дельтовидную мышцу в дозе 1 мл. Пациентам II группы при каждом введении вакцинного препарата дополнительно однократно вводили Аффинолейкин подкожно в плечо другой руки в дозе 2 Ед, разведенный в 1 мл изотонического раствора натрия хлорида для инъекций [14]. Иммуномодулирующий препарат Аффинолейкин производства ФГУП НПО «Микроген» Минздрава России представляет собой комплекс низкомолекулярных белков, выделенных из мембран лейкоцитов человека и лиофилизированных с глицерином (5,4 мг в ампуле).

Иммунологическую эффективность вакцинации оценивали на основании определения содержания антител к вирусу гепатита В в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческих тест-систем ЗАО «Вектор-Бест» в соответствии с прилагаемой инструкцией. Забор крови осуществляли до вакцинации и через 1, 2, 6, 7 и 12 мес после первого введения вакцины. В качестве защитного титра рассматривали концентрацию анти-HBs 10 МЕ/л, уровень анти-HBs классифицировали как низкий при 10–100 мМЕ/мл, средний – 101–1000 мМЕ/мл и высокий – более 1000 мМЕ/мл.

Переносимость вакцины против гепатита В изучали среди привитых по частоте возникновения, выраженности и продолжительности системных (общих) и местных реакций на каждое введение препарата в течение 30 мин и далее в течение 5 дней после вакцинации путем опроса и осмотра пациента.

Для оценки влияния вакцинации на течение ХОБЛ проведен сравнительный анализ частоты обострений и респираторных инфекций, а также основных показателей функции внешнего дыхания (ФВД) в течение года до и после вакцинации. Частоту обострений ХОБЛ и респираторных инфекций за год, предшествующий вакцинации, изучали по данным медицинской документации. Частоту обострений ХОБЛ контролировали ежемесячно в течение года от момента введения первой дозы вакцины. Вентиляционную функцию легких изучали с помощью спирометра «Спиро С-100» (Россия). Исследуемые величины выражали в процентах к должным, что значительно упрощает сравнение различных групп пациентов, исключая необходимость стандартизации по возрасту, полу, массе тела, росту. Исследования ФВД проводились в первой половине дня не ранее чем через 4 ч после приема пищи. Основными оцениваемыми параметрами являлись форсированная жизненная емкость легких (ФЖЕЛ), объем форсированного выдоха за первую секунду (ОФВ₁) и расчетное соотношение этих параметров (ОФВ₁/ФЖЕЛ) – модифицированная проба Тиффно.

Результаты и обсуждение

Системные поствакцинальные реакции отмечались только после введения первой дозы вакцины и составили 1,7% (у 1 пациента II группы в виде общего недомогания), что сопоставимо с результатами в контрольной группе (2,9%). При этом в I группе не было отмечено развития системных реакций. При введении последующих доз вакцин развития реакций не зарегистрировано.

Местные реакции в виде гиперемии, болезненности в месте введения вакцины и отека до 2 см в диаметре в поствакцинальном периоде возникли лишь при введении

первой дозы и выявлены у 4 (6,8%) больных ХОБЛ: у 3 (5,1%) пациентов I группы и у 1 (1,7%) пациента II группы. В группе сравнения аналогичные местные реакции зарегистрированы у 3 (8,8%) человек. Все реакции оценивали как легкие, они самостоятельно купировались в течение 48 ч.

Следовательно, поствакцинальный период протекал благоприятно без развития нежелательных явлений как у здоровых, так и у больных ХОБЛ, привитых вакциной против гепатита В. Все поствакцинальные реакции не требовали лечения, купировались самостоятельно в течение 1–2 дней.

В соответствии с поставленными задачами была проведена оценка влияния вакцинации против гепатита В на течение основного заболевания, для чего контролировали частоту респираторных инфекций и обострений ХОБЛ в течение года (табл. 1).

У пациентов I группы частота обострений ХОБЛ и присоединения респираторных инфекций за год, предшествующий вакцинации, достоверно не отличалась от аналогичных показателей в течение года после вакцинации.

У больных ХОБЛ II группы после вакцинации количество обострений снизилось с 2,5±0,23 до 1,63±0,12 в год ($p < 0,01$). При этом через 12 мес после вакцинации против гепатита В в сочетании с Аффинолейкином у пациентов регистрировали более низкое число обострений заболевания по сравнению с больными I группы ($p < 0,01$).

Анализ полученных данных показал, что количество ОРИ у пациентов II группы снизилось с 1,96±0,16 до 1,4±0,12 в год ($p < 0,05$), к тому же число ОРИ в течение года после вакцинации во II группе исследования было ниже, чем у больных I группы ($p < 0,05$).

Для оценки влияния вакцинации против гепатита В на течение заболевания было проведено измерение основных показателей вентиляционной способности легких у больных ХОБЛ до и через 12 мес после вакцинации (табл. 2).

При статистическом анализе данных установлено, что абсолютные и относительные показатели ФЖЕЛ, ОФВ₁ и индекса Тиффно у больных I группы достоверно не отличаются от исходных значений и составляют 2474,71±85,04 мл, или 65,67±3,11%, 1658,19±55,24 мл, или 58,43±2,17%, и 54,4±2,13% соответственно.

Спустя 12 мес после вакцинации у пациентов II группы ФЖЕЛ составила 2490,02±100,8 мл (62,67±3,7%), что достоверно больше, чем исходная ФЖЕЛ. У пациентов II группы с ХОБЛ через 12 мес после вакцинации против гепатита В в сочетании с Аффинолейкином также наблюдалось увеличение как абсолютного, так и относительного показателя ОФВ₁, что составило 1969,06±25,7мл, или 73,73±1,75%. В результате исследования было выявлено, что спустя 12 мес после начала

Показатели ФЖЕЛ, ОФВ₁ и индекса Тиффно у пациентов с ХОБЛ через 12 мес после вакцинации против гепатита В

Группа	ФЖЕЛ		ОФВ ₁		Индекс Тиффно, %	
	до вакцинации	после вакцинации	до вакцинации	после вакцинации	до вакцинации	после вакцинации
I (n = 34)	2481,97±86,0 мл 65,99±3,12%	2474,71±85,0 мл 65,67±3,1%	1652,12±57,2 мл 59,1±2,5%	1658,19±55,2 мл 58,43±2,17%	54,6±2,3	54,4±2,1
II (n = 25)	2417,5±98,3 мл 60,91±3,61%	2490±100,8 мл* 62,67±3,7%*	1568,94±65,6 мл 54,28±2,82%	1612,6±71,1 мл** 58,51±3,13%**	50,6±2,6	53,4±3,0*

Примечание. * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,001$ – различия с исходными данными.

наблюдения индекс Тиффно был выше у пациентов II группы – $53,37 \pm 3,01\%$ ($p < 0,001$).

В соответствии с поставленными задачами нами была изучена иммунологическая эффективность вакцины против гепатита В у пациентов с ХОБЛ, для чего определяли концентрацию антител в сыворотке крови к HBsAg (табл. 3).

У больных ХОБЛ до начала исследования содержание антител IgG к HBsAg в сыворотке крови выявлялось в пределах от $3,4 \pm 0,32$ до $4,2 \pm 0,37$ мМЕ/мл, т. е. достоверных различий между группами, а также по сравнению со здоровыми лицами не обнаружено.

По данным серологического обследования через 1 мес после первой вакцинации пациенты с ХОБЛ I группы имели уровень антител к HBsAg ниже протективного – $9,59 \pm 0,92$ мМЕ/мл, при этом серонегативными были 70,6% больных, а протективный уровень анти-HBs низкой концентрации отмечен у 29,4% (табл. 4).

У пациентов II группы через 1 мес после введения первой дозы вакцины отмечалось нарастание концентрации антител до $123,3 \pm 31,7$ мМЕ/мл, что выше ($p < 0,001$), чем в I группе, но ниже ($p < 0,05$), чем у здоровых лиц ($143,3 \pm 54,91$ мМЕ/мл). Среди больных ХОБЛ II группы содержание специфических антител ниже защитного уровня наблюдалось у 31%, тогда как серопозитивными были 69% пациентов. Из них у 31% концентрация анти-HBs была низкой, а у 38% зарегистрированы средние значения содержания антител. Доля серонегативных лиц в I группе была выше, чем во II и контрольной группах ($p < 0,05$).

Через 1 мес после второго введения вакцины у всех больных ХОБЛ регистрировался защитный уровень HBs-антител, однако содержание специфических антител в I группе было ниже, чем во II группе и у здоровых лиц, и составило $95,2 \pm 14,2$ мМЕ/мл. Концентрация антител во II группе составила $427,4 \pm 74,8$ мМЕ/мл, что ниже ($p < 0,05$), чем у здоровых лиц ($630,5 \pm 147,8$ мМЕ/мл).

Число серонегативных пациентов через 1 мес после второй вакцинации снизилось и составило в I группе 41,1%, во II – 14,1%. Процент серонегативных пациентов в I группе был выше, чем среди здоровых лиц (12,7)

и пациентов II группы. Не было выявлено различий между этими показателями во II и контрольной группах ($p > 0,05$).

После второй вакцинации против гепатита В среди серопозитивных пациентов I группы защитный уровень анти-HBs низкой концентрации регистрировался у 44,1% больных, а средней концентрации – у 14,8%, что достоверно выше, чем во II и контрольной группах соответственно. Среди пациентов II группы низкая концентрация антител обнаружена у 14%, средняя – у 64%, высокая (более 1000 мМЕ/мл) – у 8,9% пациентов. Процент лиц с высоким и средним уровнем защитных антител во II группе больных ХОБЛ достоверно выше ($p < 0,01$), чем в I группе.

Введение третьей дозы вакцины привело к значительному нарастанию концентрации HBs-антител у больных ХОБЛ. Так, спустя месяц после третьей вакцинации титр антител в I группе составил $3551,47 \pm 584,15$ мМЕ/мл, во II группе – $4042,32 \pm 541,2$ мМЕ/мл при 100% сероконверсии во всех группах исследования. Большинство пациентов имели высокий уровень антител: в I группе 70,5%, во II – 75% ($p > 0,05$), при этом лишь 1 (2,9%) пациент из I группы имел низкий защитный титр антител. Эти данные сопоставимы с результатами, полученными при обследовании контрольной группы спустя месяц после третьей вакцинации.

Через 6 мес после законченной вакцинации выявлено некоторое снижение концентрации специфических антител у больных ХОБЛ, однако титр антител оставался на достаточно высоком протективном уровне. Так, в I группе концентрация антител равнялась $1953,27 \pm 284,23$ мМЕ/мл, во II – $2986,1 \pm 212,4$ мМЕ/мл и в контрольной группе – $2845,0 \pm 421,76$ мМЕ/мл при 100% уровне сероконверсии.

Среди серопозитивных лиц зарегистрирован защитный уровень антител средней и высокой концентрации, пациентов с низким защитным титром спустя 6 мес после введения третьей дозы вакцины не было, в I группе концентрация антител на уровне 101–1000 мМЕ/мл выявлена у 29,4%, во II – у 28% пациентов. Высокий уровень HBs-антител отмечен у большинства больных ХОБЛ, что составило от 57,1 до 72%.

Таблица 3

Динамика содержания IgG к HBsAg у больных ХОБЛ и здоровых лиц до и после вакцинации против гепатита В (в мМЕ/мл)

Группа	До вакцинации	Через 1 мес после V1	Через 1 мес после V2	Через 1 мес после V3	Через 6 мес после V3
I (n = 34)	$3,5 \pm 0,32$	$9,59 \pm 0,92^{**}$	$95,2 \pm 14,2^{***}$	$3551,5 \pm 584,2^{***}$	$1953,3 \pm 284,2^{***}$
II (n = 25)	$4,20 \pm 0,37$	$123,3 \pm 31,7^{***}$	$427,4 \pm 74,8^{*,***}$	$4042,3 \pm 541,2^{***}$	$2986,1 \pm 212,4^{***}$
Контроль (n = 34)	$3,4 \pm 0,33$	$143,3 \pm 54,9^{***}$	$630,5 \pm 147,8^{***}$	$3278,6 \pm 568,9^{***}$	$2845,0 \pm 421,8^{***}$

Примечание. * – $p < 0,001$ – различия с показателями у здоровых лиц; ** – $p < 0,05$, *** – $p < 0,0001$ – различия с исходными данными. Здесь и в табл. 4: V1 – первая вакцинация; V2 – вторая вакцинация; V3 – третья вакцинация.

В результате исследования у больных ХОБЛ 35–65 лет с тяжелым и среднетяжелым течением при вакцинации против гепатита В было установлено, что частота и характер поствакцинальных реакций не отличались от таковых у здоровых лиц. Это свидетельствует о хорошей переносимости пациентами с ХОБЛ вакцинации против гепатита В с использованием рекомбинант-

Таблица 4

Соотношение серонегативных и серопозитивных лиц, вакцинированных против гепатита В

Группа	Срок наблюдения	Серонегативные, %	С анти-НВs 10–100 мМЕ/мл, %	С анти-НВs 101–1000 мМЕ/мл, %	С анти-НВs выше 1000 мМЕ/мл, %
I	1 мес после V1	70,6	29,4	0	0
	1 мес после V2	41,1	44,1	14,8	0
	1 мес после V3	0	2,9	17,6	70,5
	6 мес после V3	0	2,9	29,4	67,7
II	1 мес после V1	31,0	31,0	38,0	0
	1 мес после V2	14,1	14,0	64,0	8,9
	1 мес после V3	0	0	25,0	75,0
	6 мес после V3	0	0	28,0	72,0
Контрольная	1 мес после V1	23,5	29,4	47,1	0
	1 мес после V2	12,7	16,8	52,9	17,6
	1 мес после V3	0	0	21,3	78,7
	6 мес после V3	0	0	30,2	69,8

ной дрожжевой вакцины производства ЗАО “Комбиотех”. Введение в схему иммунизации Аффинолейкина не приводит к развитию нежелательных поствакцинальных явлений и не имеет отличий в частоте и характере системных и местных постпрививочных реакций от группы без лекарственной поддержки.

В ходе исследования обнаружено, что иммунизация больных ХОБЛ вакциной против гепатита В без использования иммуномодулирующих средств не влияет на количество ОРИ и частоту обострений основного заболевания. Анализ полученных данных показал, что у пациентов II группы с ХОБЛ тяжелого и среднетяжелого течения, которые одновременно с вакциной против гепатита В получали препарат Аффинолейкин, отмечалось достоверное снижение числа обострений основного заболевания с $2,5 \pm 0,23$ до $1,63 \pm 0,12$ случая в год ($p < 0,01$) и ОРИ с $1,96 \pm 0,16$ до $1,4 \pm 0,12$ случая в год ($p < 0,05$) в течение года после вакцинации. При этом наблюдалось достоверное снижение числа обострений и ОРИ по сравнению как с исходными данными, так и с показателями у пациентов I группы.

В результате изучения основных показателей вентилиционной способности легких, таких как ФЖЕЛ, ОФВ, и индекс Тиффно, до начала исследования и спустя 12 мес после вакцинации у больных ХОБЛ тяжелого и среднетяжелого течения установлено, что проведение вакцинации против гепатита В не оказывает негативного влияния на функциональное состояние органов дыхания, а именно: основные показатели ФВД не изменяются. Применение иммуномодулирующего препарата Аффинолейкин в сочетании с вакциной против гепатита В приводит к улучшению всех основных показателей вентилиционной способности легких в течение года как следствие снижения числа респираторных инфекций и увеличения длительности периода ремиссии.

Проанализировав динамику содержания анти-НВs в сыворотке крови исследуемых до и после вакцинации, можно сделать вывод, что процесс формирования специфического иммунного ответа у больных ХОБЛ на вакцину против гепатита В имеет ряд особенностей. Во-первых, у пациентов с ХОБЛ в отличие от здоровых лиц после первого введения вакцины уровень анти-НВs оставался ниже протективного, в I группе через 1 мес после введения первой дозы препарата серопозитивными стали только 29,4% пациентов.

При этом титры анти-НВs зарегистрированы в пределах низких концентраций, что существенно отличалось от картины у здоровых лиц, у которых сероконверсию наблюдали в 76,5% случаев; у 47,1% привитых титры антител достигали средних значений.

Исключение составляют больные ХОБЛ, которым вместе с вакциной вводили Аффинолейкин, титр антител у них был защитным уже после введения первой дозы вакцины, но не достигал значений, наблюдаемых у здоровых лиц.

Во-вторых, защитный титр антител на низком и среднем уровне (от $50,6 \pm 1,1$ до $95,2 \pm 14,2$ и $630,5 \pm 147,8$ соответственно; $p < 0,05$) регистрировался после второй вакцинации в 58,9% случаях в I группе, а 41% составили серонегативные лица.

Замедленное формирование поствакцинального антителообразования у больных ХОБЛ обусловлено наличием вторичной иммунной недостаточности, включающей как нарушение факторов местной защиты, так и изменения, затрагивающие клеточное и гуморальное звено иммунитета [9, 13].

Вакцинация таких больных приводит к выработке специфических антител, однако их уровень ниже, чем у здоровых лиц, а у определенной части даже могут не обнаруживаться защитные титры антител, что отмечено рядом авторов при проведении вакцинации против различных инфекций больным с соматической патологией [10].

Введение третьей дозы вакцины привело к быстрому и значительному нарастанию уровня антител в основном в высоких концентрациях при 100% сероконверсии у всех пациентов с ХОБЛ. Через 6 мес после законченной вакцинации концентрация анти-НВs несколько снизилась, но осталась на достаточно высоких протективных уровнях.

Сочетанное применение вакцины против гепатита В и Аффинолейкина у больных ХОБЛ приводит к более быстрому синтезу анти-НВs в защитных концентрациях, сокращению числа серонегативных лиц, не влияя при этом на частоту и характер системных и местных постпрививочных реакций.

Сходные результаты получены при изучении влияния вакцинации против гепатита В с применением Аффинолейкина у детей с различной хронической патологией, в том числе хроническим рецидивирующим бронхитом, хронической патологией ЛОР-органов, аллергопатологией и другими заболеваниями [15, 16].

Таким образом, проведенные исследования продемонстрировали иммунологическую эффективность вакцины против гепатита В у больных ХОБЛ после завершения курса иммунизации. Введение Аффинолейкина усиливает поствакцинальный иммунный ответ и улучшает клиническое течение основного заболевания.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 2, 7 см. REFERENCES)

- Онищенко Г.Г. Распространение вирусных гепатитов как угроза национальной безопасности. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2003; 4: 93–9.
- Онищенко Г.Г. *О санитарно-эпидемиологической обстановке в Российской Федерации в 2009 году: Государственный доклад*. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2010.
- Учайкин В.Ф., Шамшева О.В. *Руководство по клинической вакцинологии*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2006.
- Бабанов С.А., Гайлис П.В. Хроническая обструктивная болезнь легких. *Терапевт*. 2010; 4: 59–67.
- Чучалин А.Г., ред. *Пульмонология: национальное руководство*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2009.

9. Чучалин А.Г. Хроническая обструктивная болезнь легких и сопутствующие заболевания Часть II. ХОБЛ и некардиальные поражения. *Русский медицинский журнал*. 2008; 5: 246–50.
10. Костинов М.П., ред. *Вакцинация детей с нарушенным состоянием здоровья: Практическое руководство для врачей*. М.: МДВ; 2002.
11. Костинов М.П. *Иммунокоррекция вакцинального процесса у лиц с нарушенным состоянием здоровья*. М.: МДВ; 2006.
12. Соловьева И.Л., Костинов М.П., Кусельман А.И. *Особенности вакцинации детей с измененным преморбидным фоном против гепатита В, кори, эпидемического паротита*. Ульяновск; 2006.
13. Фельдблюм И.И. Вакцинопрофилактика гепатита В в России: опыт использования отечественных медицинских иммунобиологических препаратов. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2012; 4: 61–7.
14. Мац А.Н., Боков М.Н., Кузьмина М.Н. Концепция низкомолекулярных антигенспецифичных цитокинов и ее новые практические приложения. *Аллергология и иммунология*. 2008; 4: 444–7.
15. Соловьева И.Л., Костинов М.П., Кусельман А.И., Микава Е.И. *Способ вакцинации против гепатита В детей со сниженной иммунореактивностью*. Патент РФ № 2294213; 2007.
16. Протасов А.Д. *Клинико-иммунологические аспекты вакцинопрофилактики бактериальных и вирусных инфекций у больных с хронической обструктивной болезнью легких*. Дисс. ... канд. мед. наук. М.; 2011.

REFERENCES

1. Weekly Epidemiological Monitor, November 2012. Available at: <http://www.emro.who.int>.
2. WHO. Weekly Epidemiological record. 2005; 33. Available at: http://www.who.int/vaccine_safety/topics/influenza/ru/index.
3. Onishchenko G.G. The spread of viral hepatitis as a threat to national security. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2003; 4: 93–9. (in Russian)
4. Onishchenko G.G. *On the Sanitary-epidemiological Situation in the Russian Federation in 2009: The State Report. [O sanitarno-epidemiologicheskoy obstanovke v Rossiyskoy Federatsii v 2009 godu: Gosudarstvennyy doklad]*. Moscow: Federal'nyy tsentr gigieny i epidemiologii Rospotrebnadzora; 2010. (in Russian)
5. Uchaykin V.F. Shamsheva O.V. *Manual of Clinical Vaccinology. [Rukovodstvo po klinicheskoy vaktinologii]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2006. (in Russian)
6. Babanov S.A., Gaylis P.V. Chronic obstructive pulmonary disease. *Terapevt*. 2010; 4: 59–67. (in Russian)
7. Global initiative for chronic obstructive lung disease. National Institutes of Health. 2009. Available at: http://www.goldcopd.org/uploads/users/files/GOLD_Report_2009
8. Chuchalin A.G., ed. *Pulmonary: National Leadership [Pul'monologiya: natsional'noe rukovodstvo]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2009. (in Russian)
9. Chuchalin A.G. Chronic obstructive pulmonary disease and comorbidities Part II. COPD and non-cardiac lesions. *Russkiy meditsinskiy zhurnal*. 2008; 5: 246–50. (in Russian)
10. Kostinov M.P., ed. *Vaccination of Children with Impaired Health Status: A Practical Guide for Physicians. [Vaktinatsiya detey s narushennym sostoyaniem zdorov'ya: Prakticheskoe rukovodstvo dlya vrachey]*. Moscow: MDV; 2002. (in Russian)
11. Kostinov M.P. *Immunocorrection vaccination process in patients with impaired health. [Immunokorreksiya vaktinal'nogo protsessa u lits s narushennym sostoyaniem edorov'ya]*. Moscow: MDV; 2006. (in Russian)
12. Solov'eva I.L., Kostinov M.P., Kusel'man A.I. *Features Vaccination of Children with a Modified Premorbid Background Against Hepatitis B, Measles, Mumps [Osobennosti vaktinatsii detey s izmenennym premorbidnym fonom protiv gepatita V, kori, epidemicheskogo parotita]*. Ul'yanovsk; 2006. (in Russian)
13. Fel'dblyum I.I. Vaccinal prevention hepatitis B in Russia: Experience in of domestic medical immunobiological preparations. *Epidemiologiya i vaktinoprofilaktika*. 2012; 4: 61–7. (in Russian)
14. Mats A.N., Bokov M.N., Kuz'mina M.N. Concept of low molecular weight antigen-specific cytokine and its new practical applications. *Allergologiya i immunologiya*. 2008; 4: 444–7. (in Russian)
15. Solov'eva I.L., Kostinov M.P., Kusel'man A.I., Mikava E.I. *Method of Hepatitis B Vaccination of Children with Reduced Immunoreactivity. Patent RF N 2294213; 2007*. (in Russian)
16. Protasov A.D. *Clinical and Immunological Aspects Vaccinal Prevention of Bacterial and Viral Infections in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Diss. Moscow; 2011*. (in Russian)

Поступила 29.05.14

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 616.98:578.828.61-092:612.017.1.064]-036.22

Москалейчик Ф.Ф.¹, Лага В.Ю.¹, Дельгадо Е.², Вега И.², Фернандес-Гарсия А.², Перес-Альварес Л.², Корнилаева Г.В.¹, Пронин А.Ю.³, Жернов Ю.В.¹, Томсон М.М.², Бобкова М.Р.¹, Карамов Э.В.¹

Стремительное распространение циркулирующей рекомбинантной формы CRF02-AG ВИЧ-1 на территории России и сопредельных стран

¹Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва; ²Национальный центр микробиологии, Институт Салуда Карлоса III, Махадаонда, Мадрид, Испания; ³ГУЗ МО «Московский областной центр по профилактике и борьбе со СПИДом и инфекционными заболеваниями», 129110, г. Москва

Статья посвящена исследованию распространения циркулирующей рекомбинантной формы CRF02-AG ВИЧ-1 по территории стран бывшего СССР на основе частичных и полногеномных сиквенсов. Впервые получен полногеномный сиквенс рекомбинанта CRF02-AG, циркулирующего в России (Московский регион). Построено общемировое филогенетическое дерево полногеномных сиквенсов CRF02-AG. Выявлены 3 четко кластеризующиеся географические группы: СНГ, Южная Корея и Франция, что, по-видимому, свидетельствует о единичном заносе вируса в каждый из регионов. Кластер СНГ характеризуется наименьшим генетическим разнообразием и является сравнительно молодым. Филогенетический анализ в пределах СНГ на основе последовательностей гена *env* четко дискриминирует 3 ветви: 2 российские и 1 узбекскую. Низкое генетическое разнообразие в двух российских кластерах свидетельствует как минимум о двух недавних независимых заносах рекомбинанта CRF02-AG на территорию России.

Ключевые слова: ВИЧ; субтип; циркулирующая рекомбинантная форма; молекулярная эпидемиология; филогенетическое дерево.

Для цитирования: Вопросы вирусологии. 2015; 60 (6): 14–19.

Для корреспонденции: Москалейчик Федор Феликсович, канд. биол. наук, ст. науч. сотр.; e-mail: fedor.mosckaleychick@gmail.com

Rapid spread of the HIV-1 circular recombinant CRF02-AG in Russia and neighboring countries

¹"The D.I. Ivanovsky Institute of Virology" Federal State Budgetary Institution "Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya" of the Ministry of Health of the Russian Federation, 123098, Moscow, Russia; ²Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain; ³AIDS Center of Moscow Region, 129110, Moscow, Russia

The spread of the HIV-1 circular recombinant CRF02-AG in countries of the former Soviet Union (Commonwealth of Independent States, CIS) was studied using partial and full-genome sequences. The full-genome sequence of the CRF02-AG recombinant circulating in Russia was obtained for the first time. A global phylogenetic tree of CRF02-AG full-genome sequences was constructed. Three distinct groups of the sequences were detected as clustered by the geographical location (CIS, South Korea, and France), which is indicative of the single-virus introduction in each of the regions mentioned above. The CIS cluster exhibiting minimum genetic diversity was, therefore, relatively young. The phylogenetic analysis of the env gene sequences within the CIS cluster made it possible to clearly discriminate three branches: two of Russian and one of Uzbek origin. The low genetic diversity within the two Russian subclusters provides evidence of at least two recent independent introductions of the CRF02-AG recombinant from Central Asia into Russia.

This work was performed within the framework of the 7th Federal Research Program (FP7), Project EURIPRED (European Research Infrastructures for Poverty Related Diseases), grant agreement No. 312661.

Key words: HIV; subtype; circular recombinant form; molecular epidemiology; phylogenetic tree.

Received 31.08.14

For correspondence: Fedor Moskaleychik, MD, PhD; e-mail: fedor.moskaleychick@gmail.com

Citation: *Voprosy virusologii*. 2015; 60(6): 14–19. (In Russ.)

Введение

Молекулярно-генетические особенности эпидемии ВИЧ/СПИДа в России изменялись по мере распространения ВИЧ-инфекции по территории страны и среди различных групп риска. В конце 80-х – первой половине 90-х годов XX века выявлялись преимущественно единичные случаи заражения различными подтипами ВИЧ-1 [1, 2]. Ситуация резко изменилась во второй половине 90-х годов в результате лавинообразного распространения инфекции среди потребителей инъекционных наркотиков (ПИН) в России и сопредельных странах с преобладанием ВИЧ-1 подтипа А1.

Этому предшествовала вспышка заражений ПИН в портовом городе Одессе в 1995 г.: число диагностированных зараженных ПИН выросло с 3 в конце 1994 г. до 1021 в 1995 г. [3]. ВИЧ-1 подтипа А1, попавший в среду ПИН Одессы, в дальнейшем быстро распространялся в среде ПИН Украины [4], России [5], Беларуси [6] и других стран бывшего СССР, что определяло молекулярно-генетический профиль эпидемии на многие годы вперед: преобладание подтипа А1 и низкое генетическое разнообразие в пределах этого подтипа. Вирусы подтипа А1 из стран бывшего СССР при совместном филогенетическом анализе с вирусами подтипа А1 из других стран образуют самостоятельный кластер А1-FSU (Formerly Soviet Union) [4, 7], именуемый в ряде работ также IDU-A [8–10] в связи с преобладанием среди зараженных инъекционных наркоманов (Injective Drug Users).

Распространение второго по численности подтипа В (IDU-B) связывают с независимой вспышкой ВИЧ-инфекции среди ПИН портового города Николаева [8]. Распространение рекомбинантной формы CRF03-AB ассоциируется со вспышкой ВИЧ-инфекции среди ПИН в Калининграде в 1996 г., причём А-области CRF03-AB имеют общее происхождение с А1-FSU, В-области – общее происхождение с IDU-B [11, 12].

В 2000-е годы эпидемия переходит в новую стадию с прогрессирующим охватом других групп риска – не ПИН: лиц, практикующих незащищенные половые контакты (как гомо-, так и гетеросексуального типа) [10]. На протяжении первого десятилетия XXI века роль полового пути передачи нарастала, к концу десятилетия

доли инъекционного и гетеросексуального путей передачи становятся сопоставимыми, доля МСМ-пути передачи (среди мужчин, практикующих секс с мужчинами) остается на уровне нескольких процентов [13].

При этом молекулярно-генетический профиль эпидемии определяется преимущественно предыдущим ПИН-этапом распространения инфекции – преобладанием ВИЧ-1 подтипа А1-FSU в группах инъекционной и гетеросексуальной передачи инфекции: более 90% на большей части территории стран бывшего СССР (за исключением Эстонии) [13]. Оставшиеся менее 10% распределены между ВИЧ-1 типа В и рекомбинантом CRF03-AB в разных пропорциях в различных регионах, вирусы типа В преобладают среди МСМ. Генетическое разнообразие в пределах группы ВИЧ-1 подтипа А1-FSU постепенно нарастает под действием генетического дрейфа и отбора [10]. При этом отбор представляется существенным фактором главным образом при половом пути передачи, поскольку в отличие от гемоконтактного пути в этом случае происходит заражение вирусом, завезено адаптированным к индивидуальным особенностям иммунной системы донора инфекции, а само заражение требует преодоления иммунных барьеров слизистой оболочки реципиента инфекции.

С середины первой декады XXI века по настоящее время обнаруживается вторжение новых генетических форм ВИЧ-1 на территорию России. Вспышка заражений вирусом типа С центральноафриканского происхождения зафиксирована в Приморском крае [14]. Все чаще выявляются отдельные случаи заноса, например парный случай заражения рекомбинантной формой А/Е, происходящей из Юго-Восточной Азии [10]. Наиболее угрожающе выглядит стремительное распространение рекомбинантной формы А/Г по территории России.

Впервые в России рекомбинант А/Г обнаружен в Новосибирской области в 2006 г. [15, 16], в пределах СНГ – в Узбекистане в 2003 г. [17]. В настоящее время рекомбинантная форма CRF02-AG широко распространилась по странам СНГ, включая Украину, Беларусь, Казахстан, Узбекистан, Киргизию и Армению. В России, помимо Новосибирска, рекомбинантная форма CRF02-AG обнаружена на Дальнем Востоке [14], нами выявлена у двух пациентов из Московского региона. Кроме того, в Но-

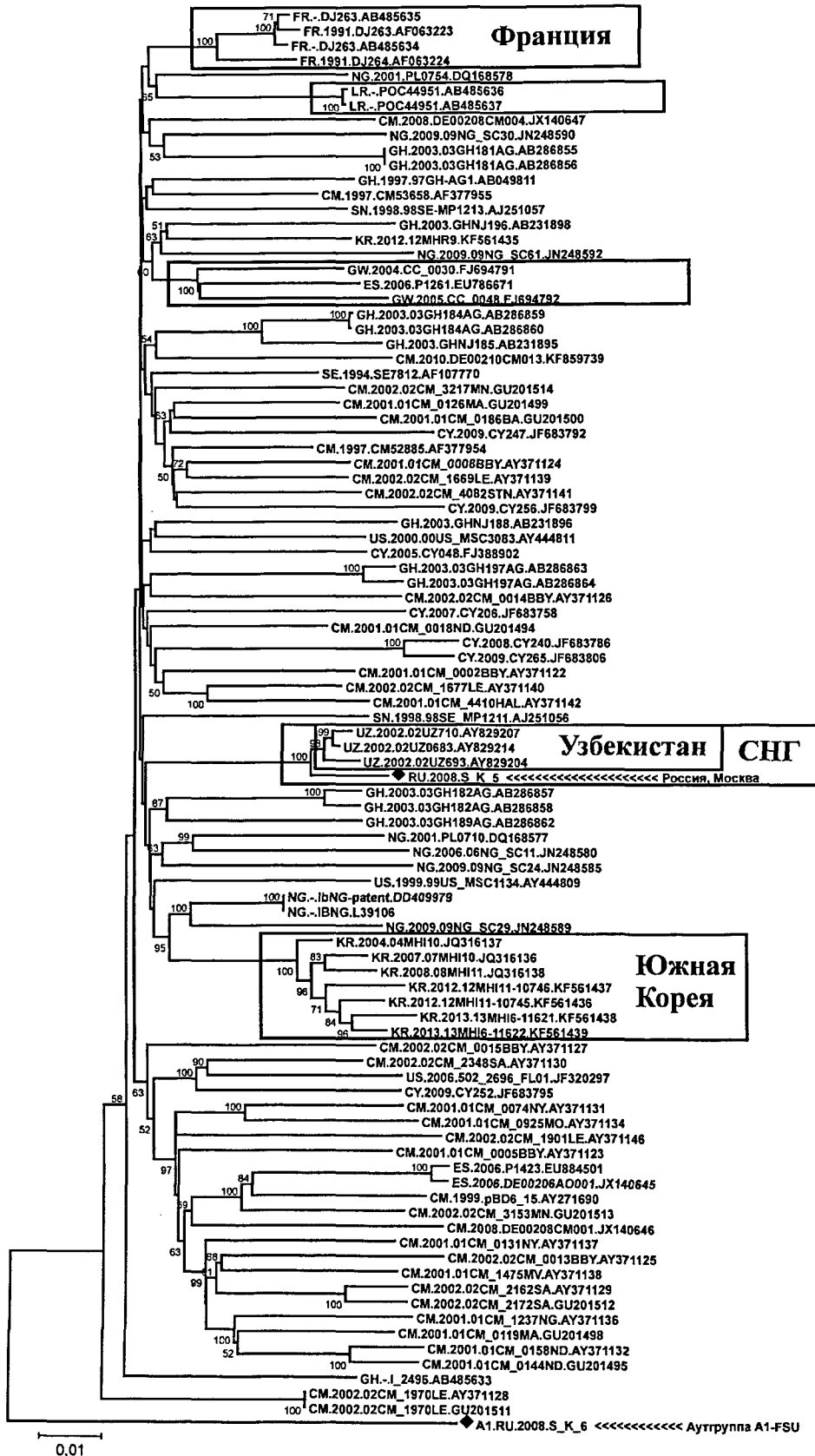


Рис. 1. Общемировое филогенетическое дерево полногеномных сиквенов циркулирующей рекомбинантной формы ВИЧ-1 CRF02-AG. Построено методом минимальной эволюции, эволюционная модель Кимуры (двухпараметрическая), частота замен варьирует в соответствии с Г-распределением ($\alpha = 1$), число бутстрэп-повторов 1000, показаны значения бутстрэп-поддержки не ниже 50%. Новые сиквены отмечены маркером \blacklozenge . Название каждого сиквенса содержит (разделены точками): двухбуквенный код страны происхождения по <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HelpDocs/databasecountrycode.html>; год забора крови; название сиквенса; инвентарный номер в ЛАНЛ-каталоге (accession number).

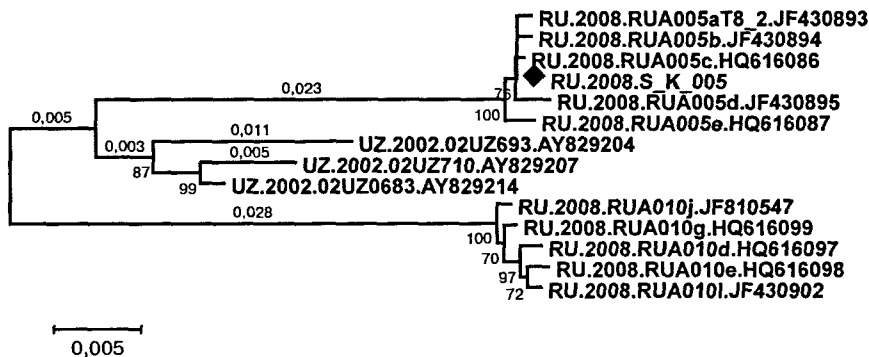


Рис. 2. Филогенетическое дерево ВИЧ-1 типа CRF02-AG, циркулирующего в СНГ, построенное по последовательностям гена *env*. Для наиболее длинных ветвей показаны длины: Г-дистанции. В остальном то же, что и на рис. 1.

восиберской области в результате рекомбинации между CRF02-AG и A1-FSU возникла новая циркулирующая рекомбинантная форма [15, 16], ныне зарегистрированная как CRF63-02A1, которая также распространилась на Дальнем Востоке [14]. На основе полногеномного секвенирования была построена рекомбинационная карта CRF63-02A1 [15, 16], в качестве наиболее близкого варианта в части CRF02-AG использовался полногеномный сиквенс вируса из Узбекистана [18], так как полногеномные сиквенсы CRF02-AG российского происхождения на тот момент отсутствовали.

Имеются данные о более высокой патогенности рекомбинанта CRF02-AG в сравнении с исходными нерекомбинантными типами вируса [19]. В настоящей работе предпринята попытка анализа происхождения и распространения рекомбинанта CRF02-AG по территории России и сопредельных стран на основании вновь полученных нами данных.

Материалы и методы

Образцы плазмы собраны с информированного согласия пациентов Пермского края и Московского региона. Сбор образцов производили, не применяя специальных критериев отбора, по мере того как пациенты приходили на систематический осмотр. Факторы риска, возможные места заражения, а также эпидемиологические связи с другими ВИЧ-инфицированными лицами выявляли на основании опроса пациентов. Кроме того, регистрировали возраст, пол пациента, дату забора клинического материала, дату и регион постановки диагноза «ВИЧ-инфекция».

Выделение РНК из плазмы проводили с помощью автоматической системы NucliSENS® miniMAG platform (“bioMérieux”) в соответствии с инструкцией производителя. Последовательности генома ВИЧ-1 получали *in house*-методом путем прямого секвенирования амплифицированных фрагментов полного генома.

Секвенирование полученных ампликонов выполняли с использованием автоматического секвенатора (ABI Prism 3130, «Applied Biosystems», США). Полученные нуклеотидные последовательности обрабатывали с применением программы BioEdit v.7.0.5.3. Филогенетический анализ выполняли с помощью программы MEGA 5.1. Подбор образцов последовательностей ВИЧ-1 для группы сравнения проводили с использованием генетической базы данных Лос-Аламосской национальной лаборатории (ЛАНЛ), США: <http://www.hiv.lanl.gov/>.

Работу по определению подтипа/циркулирующей рекомбинантной формы вируса по исследуемым областям генома выполняли с применением on-line-программы COMET v. 0.5 (<http://comet.retrovirology.lu/>).

Результаты и обсуждение

Были проанализированы 23 образца крови ВИЧ-инфицированных пациентов, не проходивших лечение: 10 образцов из Перми (забор крови в 2011 г.), 13 образцов из Московского региона (забор крови в 2008 г.). В Перми возрастной диапазон от 22 до 59 лет, средний возраст 36 лет, в Московском регионе – от 18 до 36 лет, средний возраст 25 лет. У пермских пациентов преобладает инъекционный путь заражения над гетеросексуальным (7:3), у московских пациентов исключительно половой путь передачи, один из пациентов – МСМ.

В ходе работы получено 2 полногеномных сиквенса, а также 21 последовательность начальной области гена *pol* (протеаза, обратная транскриптаза), 17 последовательностей V3-петли. Все пермские пациенты оказались носителями ВИЧ-1 исключительно подтипа A1, у московских пациентов также преобладал ВИЧ-1 подтипа A1, но обнаружены также ВИЧ-1 подтипа В (пациент СК-013, единственный МСМ в группе) и рекомбинантная форма CRF02-AG (пациенты СК-005 и СК-010).

По итогам анализа в on-line-программе *geno2pheno* все вирусы оказались R5-тропными.

Впервые получен полногеномный сиквенс рекомбинанта CRF02-AG, циркулирующего в России (пациент СК-005), другой полногеномный сиквенс, полученный в настоящей работе (пациент СК-006), относится к подтипу A1. Для второго носителя CRF02-AG, пациента СК-010, получены частичные сиквенсы гена *pol* (1382 пары нуклеотидов (п. н.), область, кодирующая протеазу и обратную транскриптазу) и гена *env* (625 п. н., область, кодирующая V3-петлю).

В генетической базе данных ЛАНЛ депонировано 14 037 последовательностей ВИЧ-1 рекомбинантной формы CRF02-AG, в том числе 93 полногеномных сиквенса из 13 стран, 3 [18] – из Узбекистана. На рис. 1. представлено филогенетическое дерево на основе полногеномных сиквенсов рекомбинантной формы CRF02-AG, в анализ был также включен новый российский полногеномный CRF02-AG-сиквенс, полученный нами (СК-005), в качестве аутгруппы использовали новый полногеномный сиквенс ВИЧ-1 подтипа A1 (СК-006), также полученный нами.

Филогенетическое дерево имеет форму звезды, кластеризация вблизи корня дерева ненадежна. Выявлены 3 четко кластеризующиеся географические группы: СНГ (3 сиквенса из Узбекистана [18] и новый сиквенс из России), Южная Корея и Франция, что, по-видимому, свидетельствует о единичном заносе вируса в каждый из регионов (1 из 8 южнокорейских сиквенсов находится вне основного кластера). Минорные кластеры образуют Либерия и Гвинея-Бисау. Остальные страны/регионы не кластеризуются и распределены по разным ветвям филогенетического дерева, что свидетельствует о множественном заносе ВИЧ-1 типа CRF02-AG в страну/регион, в том числе в страны Запада: США, Испанию, Швецию и Кипр.

Наибольшее разнообразие наблюдается в Камеруне, который можно рассматривать как наиболее вероятную родину рекомбинанта CRF02-AG. Распространение ВИЧ-1 типа CRF02-AG, по всей видимости, шло из Камеруна по странам Западной Африки к югу от Сахары. Из Камеруна и стран Западной Африки произошли множественные за-

носы на другие континенты. Так, в Испании четко разделяются 2 сиквенса вируса камерунского происхождения и 1 – вируса из Гвинеи-Бисау. Южнокорейский кластер имеет нигерийское происхождение. Локализовать происхождение французского кластера и кластера стран бывшего СССР не удается. В США и на Кипре обнаруживается вирус камерунского происхождения (представлен единичными сиквенсами для обеих стран), происхождение других вирусов США и Кипра, а также Швеции (представлен единичным сиквенсом) определить не удалось.

Анализ полногеномных сиквенсов позволяет сделать вывод о единстве происхождения ВИЧ-1 типа CRF02_AG в России и Узбекистане, но пока не дает возможности проследить его распространение по странам бывшего СССР. Среди частичных сиквенсов наибольший объем данных имеется по сиквенсам начальной области гена *pol* (область, кодирующая протеазу и начальную область полипептидной цепи обратной транскриптазы, для некоторых последовательностей так же не кодирующая начальная область). В генетической базе данных ЛАНЛ депонировано 83 последовательности начальной области гена *pol* ВИЧ-1 типа CRF02-AG длиной не менее 1000 п. н. (в том числе Россия – 55, Казахстан – 9, Узбекистан – 13, Киргизия – 3, Армения, Украина и Белоруссия – по 1). Наибольшая длина (исключая 4 полных последовательности гена, вырезанные из полногеномных сиквенсов) 1499 п. н.

Однако высокая консервативность гена *pol* не позволяет построить надежное филогенетическое дерево по последовательностям от 1000 п. н., последовательности из разных стран и регионов распределяются вперемешку между кластерами, а сами кластеры не поддерживаются бутстрэп-анализом. Единственный кластер с бутстрэп-уровнем 100% оказался смешанным: пара сиквенсов из Узбекистана и Киргизии. Следующий по надежности кластер с бутстрэп-уровнем 85%, далее 74% и ниже (филогенетическое дерево не приводится).

Существенно более вариабельным является ген оболочечных белков *env*, представленный 10 полными сиквенсами в генетической базе данных ЛАНЛ. Три полных последовательности гена *env* получены вырезанием из трех полногеномных сиквенсов из Узбекистана [18], один – из нового полногеномного сиквенса из Московского региона (СК-005). Филогенетическое дерево на основе всех 14 полных сиквенсов гена *env* представлено на рис. 2.

Видны 3 четко дискриминирующихся ветви: 2 российских и 1 узбекская. Генетическое разнообразие существенно выше в узбекской ветви, тогда как в обеих российских оно мало заметно, что, по всей видимости, связано с двумя недавними независимыми заносами инфекции. Узбекская ветвь располагается существенно ближе к корню дерева, что связано с возрастом образцов: узбекские образцы вируса (2002 г.) накопили меньше мутаций в сравнении с российскими (2008 г.) с момента дивергенции.

Таким образом, страны бывшего СССР, включая не только славянские республики, но и государства Средней Азии, образуют единое эпидемиологическое пространство: активные миграционные связи и отсутствие языкового барьера способствуют распространению ВИЧ-инфекции, включая трансграничные заносы.

Изменение генетического профиля эпидемии ВИЧ/СПИДа, в том числе широкое распространение рекомбинанта CRF02-AG по территории России и сопредельных стран ставит новые задачи перед отечественными разработчиками вакцин и антиретровирусных препаратов. Более того, повышенная патогенность ВИЧ-1 типа CRF02-AG [19] может способствовать его ускоренному распространению.

Работа выполнена в рамках Седьмой научной программы (FP7) проекта EURIPRED (European Research Infrastructures for Poverty Related Diseases), grant agreement number 312661.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1–9, 11, 12, 14, 15, 17–19 см. REFERENCES)

10. Казеннова Е.В., Васильев А.В., Лаповок И.А., Гришечкин А.Е., Лага В.Ю., Саламов Г.Г. и др. Генетические варианты ВИЧ-1 в азиатской части России. *Вопросы вирусологии*. 2013; 58 (4): 28–35.
13. Карамов Э.В., Гашникова Н.М., Дроздов И.Г., Онищенко Г.Г. *Мониторинг ВИЧ-инфекции в Евразии. Атлас вирусов иммунодефицита человека*. Новосибирск: ЦЭРИС; 2009.
16. Гашникова Н.М., Сафронов П.Ф., Никонова Ю.В., Унагаева Н.В., Лаптева Т.А. Свойства изолятов CRF02_AG ВИЧ-1, циркулирующих на территории Новосибирской области. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2011; 3: 38–43.

REFERENCES

1. Karamov E.V., Yaroslavtseva N.G., Shchelkanov M.Y., Martovitski D., Lukashov V., Kozlov A.P. et al. Antigenic and genetic relations between different HIV-1 subtypes in Russia. *Immunol. Infect. Dis.* 1996; 6: 15–24.
2. Lukashov V.V., Cornelissen M.T., Goudsmit J., Papuashvili M.N., Rytik P.G., Khaïtov R.M. et al. Simultaneous introduction of distinct HIV-1 subtypes into different risk groups in Russia, Byelorussia and Lithuania. *AIDS*. 1995; 9 (5): 435–9.
3. Hamers F.F. HIV infection in Ukraine (1987–96). *Rev. Epidemiol. Sante Publique*. 2000; 48 (Suppl. 1): 1S3–15.
4. Novitsky V.A., Montano M.A., Essex M. Molecular epidemiology of an HIV-1 subtype A subcluster among injection drug users in the Southern Ukraine. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 1998; 14 (12): 1079–85.
5. Bobkov A., Cheingsong-Popov R., Selimova L., Ladnaya N., Kazennova E., Kravchenko A. et al. An HIV type 1 epidemic among injecting drug users in the former Soviet Union caused by a homogeneous subtype A strain. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 1997; 13 (14): 1195–201.
6. Lukashov V.V., Karamov E.V., Eremin V.F., Titov L.P., Goudsmit J. Extreme founder effect in an HIV type 1 subtype A epidemic among drug users in Svetlogorsk, Belarus. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 1998; 14 (14): 1299–303.
7. Fernandez-Garcia A., Revilla A., Vazquez-de Parga E., Vinogradova A., Rakhmanova A., Karamov E. et al. The analysis of near full-length genome sequences of HIV type 1 subtype A viruses from Russia supports the monophyly of major intrasubtype clusters. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2012; 28 (10): 1340–3.
8. Nabatov A.A., Kravchenko O.N., Lyulchuk M.G., Shcherbinskaya A.M., Lukashov V.V. Simultaneous introduction of HIV type 1 subtype A and B viruses into injecting drug users in southern Ukraine at the beginning of the epidemic in the former Soviet Union. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2002; 18 (12): 891–5.
9. Thomson M.M., de Parga E.V., Vinogradova A., Sierra M., Yakovlev A., Rakhmanova A. et al. New insights into the origin of the HIV type 1 subtype A epidemic in former Soviet Union's countries derived from sequence analyses of preepidemic transmitted viruses. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2007; 23 (12): 1599–604.
10. Kazennova E.V., Vasil'ev A.V., Lapovok I.A., Grishchkin A.E., Laga V.Yu., Salamov G.G. et al. Genetic variants of HIV-1 in the Asian part of Russia. *Voprosy virusologii*. 2013; 58 (4): 28–35. (in Russian)
11. Liitsola K., Holm K., Bobkov A., Pokrovsky V., Smolskaya T., Leinikki P. et al. An AB recombinant and its parental HIV type 1 strains in the area of the former Soviet Union: low requirements for sequence identity in recombination. UNAIDS Virus Isolation Network. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2000; 16 (11): 1047–53.
12. Liitsola K., Tashkinova I., Laukkanen T., Korovina G., Smolskaja T., Momot O. et al. HIV-1 genetic subtype A/B recombinant strain causing an explosive epidemic in injecting drug users in Kaliningrad. *AIDS*. 1998; 12 (14): 1907–19.
13. Karamov E.V., Gashnikova N.M., Drozdov I.G., Onishchenko G.G. *Monitoring of HIV-infection in Eurasia. Atlas of the Human Immunodeficiency Virus. [Monitoring VICH-infektsii v Evrazii. Atlas virusov immunodefitsita cheloveka]*. Novosibirsk: TsERIS; 2009. (in Russian)
14. Kazennova E., Laga V., Lapovok I., Glushchenko N., Neshumae D., Vasilyev A. et al. HIV-1 Genetic Variants in the Russian Far East. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2014; 30 (8): 742–52.

15. 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.
16. Gashnikova N.M., Safronov P.F., Nikonorova Yu.V., Unagaeva N.V., Lapteva T.A. Properties CRF02_AG isolates of HIV-1 circulating in the Novosibirsk Region. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2011; 3: 38–43. (in Russian)
17. Kurbanov F., Kondo M., Tanaka Y., Zhalaliev 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.
18. 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.
19. Palm A.A., Esbjornsson J., Mansson F., Kvist A., Isberg P.E., Biague A. et al. Faster progression to AIDS and AIDS-related death among seroincident individuals infected with recombinant HIV-1 A3/CRF02_AG compared with sub-subtype A3. *J. Infect. Dis.* 2014; 209 (5): 721–8.

Поступила 31.08.14

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015
УДК 616.921.5-036.22-078-084

Мукашева Е.А.¹, Колобухина Л.В.¹, Меркулова Л.В.¹, Кистенева Л.Б.¹, Заплатников А.Л.², Смолоногина Т.А.³, Дешева Ю.А.³, Михайлова Е.В.⁴, Романовская А.В.⁴, Дубовицкая Н.А.⁴, Бурцева Е.И.¹

Серодиагностика в надзоре за циркуляцией вирусов гриппа в период пандемии, вызванной А(H1N1)pdm09

¹Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва; ²ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования» Минздрава России, 123995, г. Москва; ³ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», 197376, г. Санкт-Петербург; ⁴ГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Минздрава России, 410012, г. Саратов

В статье представлены результаты оценки особенностей выработки факторов гуморального иммунитета в ответ на инфицирование пандемическим вирусом гриппа А (H1N1)pdm09 лиц с различным эпидемиологическим анамнезом. Подтверждена высокая способность вирусов гриппа к распространению в коллективах закрытого типа, а также передача материнских антител новорожденным детям, в том числе к пандемическому штамму вируса гриппа А(H1N1)pdm09. Исследование показало, что иммунный ответ к поверхностным антигенам вируса гриппа – гемагглютинину и нейраминидазе – в ходе естественного инфицирования пандемическими штаммами вируса гриппа А(H1N1)pdm09 более чем в половине случаев формируется одновременно.

Ключевые слова: вирус гриппа; антитела к гемагглютинину и нейраминидазе; А(H1N1)pdm09.

Для цитирования: Вопросы вирусологии. 2015; 60 (6): 19–24.

Mukasheva E.A.¹, Kolobukhina L.V.¹, Merkulova L.V.¹, Kisteneva L.B.¹, Zaplatnikov A.L.², Smolonogina T.A.³, Desheva Yu.A.³, Mikhaylova E.V.⁴, Romanovskaya A.V.⁴, Dubovitskaya N.A.⁴, Burtseva E.I.¹

Serodiagnosis in the surveillance of the influenza virus circulation during the development of the pandemic caused by the A (H1N1)pdm09

¹"The D.I. Ivanovsky Institute of Virology" Federal State Budgetary Institution "Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya" of the Ministry of Health of the Russian Federation, 123098, Moscow, Russia; ²Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Ministry of Health of the Russian Federation, 123995, Moscow, Russia; ³Institute of Experimental Medicine, 197376, St. Petersburg, Russia; ⁴V.I. Razumovsky Saratov State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, 410012, Saratov, Russia

The goal of this work was to present the data of the study of the peculiarities of the generation factors of humoral immunity in the response to the infection with the pandemic influenza A (H1N1) pdm09 in patients with different epidemiological anamnesis. High ability of the influenza viruses to spread over closed communities and the transfer of the maternal antibodies to babies, including a pandemic strain of the influenza virus A (H1N1) pdm09, was confirmed. The results of this study showed that the immune response to the surface antigens of the influenza virus (hemagglutinin and neuraminidase) was formed during the natural infection with the pandemic strains of the influenza A (H1N1) pdm09 in more than a half of the cases simultaneously.

Key words: influenza virus; antibodies to hemagglutinin and neuraminidase; A (H1N1)pdm09.

Received 29.05.14

For correspondence: Evgeniya Mukasheva, researcher; e-mail: mukasheva_evgeniya@mail.ru
Citation: Voprosy virusologii. 2015; 60(6): 19–24. (In Russ.)

Результаты эпидемиологических исследований с использованием современных методов серодиагностики гриппа имеют неоспоримое значение при ретроспективной диагностике, оценке группы риска инфицирования и заболевания, степени их восприимчивости, а также

скорости вовлечения в инфекционный процесс, что позволяет предупредить социально-экономический ущерб благодаря научно обоснованному применению эффективных средств профилактики и лечения [1].

В июне 2009 г. ВОЗ объявила о первой за последние

Для корреспонденции: Мукашева Евгения Андреевна, науч. сотр. лаб. этиологии и эпидемиологии гриппа; e-mail: mukasheva_evgeniya@mail.ru

4 десятилетия пандемии гриппа вследствие быстрого глобального распространения нового вируса A(H1N1)pdm09 [2]. Первые штаммы, реассортанты вирусов гриппа свиней американской и евроазиатской линий, были детектированы среди людей в апреле 2009 г. в Северной Америке вопреки всем прогнозам относительно формирования нового пандемического варианта в популяции птиц стран Юго-Восточной Азии с участием высокопатогенного штамма А (H5N1) [3, 4].

Два поверхностных белка – гемагглютинин (НА) и нейраминидаза (НА) вируса гриппа A(H1N1)pdm09 – имели значительные отличия антигенных свойств от циркулировавших ранее сезонных штаммов вируса гриппа А(H1N1) [2, 5]. Характер гуморального иммунного ответа у людей, инфицированных пандемическим вирусом гриппа А (H1N1)pdm09, зависимость от возраста, состояние беременности и степень перекрестного взаимодействия с сезонными штаммами в значительной степени были не изучены [2].

Цель настоящей работы заключалась в выявлении особенностей выработки факторов гуморального иммунитета в ответ на инфицирование пандемическим вирусом гриппа А (H1N1)pdm09 среди лиц с различным эпидемиологическим анамнезом.

Материалы и методы

Сыворотки крови. В исследование были включены парные сыворотки крови от 203 пациентов, госпитализированных с симптомами острой респираторной вирусной инфекции (ОРВИ) в ИКБ № 1 Москвы (2009–2011), в том числе беременные женщины, у которых заболевание гриппом и ОРВИ протекает в тяжелой форме [6]; одинарные сыворотки крови от 287 детей школьного возраста, проживающих в условиях интернатного типа в Москве (2009); одинарные сыворотки 83 рожениц и 20 новорожденных детей в возрасте 1 дня (2010), собранные сотрудниками ГМУ им. В.И. Разумовского (Саратов, март–апрель 2010 г.).

Детекцию специфической РНК вируса гриппа А(H1N1)pdm09 проводили с использованием полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в режиме реального времени в носоглоточных смывах от госпитализированных пациентов с применением коммерческих тест-систем “АмплиСенс® РИБО-преп», «АмплиСенс® РЕБЕРТА-Л», “АмплиСенс® Influenza virus A/B-FL”, “АмплиСенс® Influenza virus A/H1-swine-FL» («ИнтерЛабСервис», Москва).

Уровни специфических антител к НА (анти-НА) определяли в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) согласно описанному ранее методу [7]. Для удаления неспецифических ингибиторов исследуемые сыворотки обрабатывали ферментом нейраминидазой холерного вибриона («Denka Seiken Co., Ltd.», Япония) с последующим прогреванием при 56°C в течение 30 мин. Включены антигены референс-штаммов вирусов гриппа, рекомендованные экспертами ВОЗ в эпидемические сезоны 2009–2011 гг.: A/Brisbane/59/07 (H1N1), A/California/07/2009 (H1N1)pdm09, A/Brisbane/10/07 (H3N2), A/Perth/16/09 (H3N2), B/Brisbane/60/2008 (линия В/Виктория-подобных), B/Florida/4/2006 (линия В/Ямагата-подобных). В реакции использовали 0,75% взвесь эритроцитов человека группы крови 0 (I).

Определение уровней специфических антител к НА (анти-НА) пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09 проводили в твердофазной реакции ингибирования нейраминидазной активности (твердофазная РИНА) по протоколу, описанному ранее, с последующей модификацией [8, 9]. Для выявления анти-НА использовали диагностический реассортантный штамм, подготовленный на основе вируса гриппа лошади А/лошадь/

Прага/1/56 (H7N7) – RN1/09–swine A(H7N1), содержащий НА от штамма A/California/07/2009 (H1N1)pdm09. Титр антинейраминидазных антител рассчитывали как величину, обратную разведению образца, дающего 50% ингибирование активности НА.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета Statistica (версия 6.0). Для представления полученных данных, не подчиняющихся нормальному распределению, использовали показатели описательной статистики, такие как медиана (*Me*) и квартили (*Q1*; *Q3*). Для сравнения двух независимых выборок, которые не подчинялись закону нормального распределения, применяли критерий Манна–Уитни. В случае связанных выборок сравнение проводили с помощью критерия знаковых рангов Уилкоксона. Для тех же целей в случае номинальных данных (доля лиц с определенным серологическим показателем) применяли двусторонний вариант точного критерия Фишера или критерий Мак-Нимара. При проведении множественных попарных сравнений на одном массиве данных учитывали поправку Бонферрони для критического уровня значимости.

Защитный уровень антител в крови в РТГА определяли как значение титра антител 1:40 и более, для РИНА такие значения титра антител неизвестны.

За диагностически значимую динамику титров специфических антител для РТГА и твердофазной РИНА был принят 4-кратный и больший прирост титров между первой и второй сыворотками крови, взятыми от одного пациента.

Результаты и обсуждение

В настоящее исследование были включены разные группы наблюдения в зависимости от их эпидемиологического анамнеза.

В 1-ю группу вошли 203 пациента, в том числе 75 беременных женщин на разных сроках гестации, госпитализированных с диагнозом «ОРВИ/грипп» в период эпидемических подъемов заболеваемости ОРВИ в 2009 – 2011 гг., этиологически связанных с появлением и активным распространением пандемического штамма вируса гриппа A(H1N1)pdm09 [3, 4]. Определенный интерес представляло оценить динамику специфических антител к вирусам гриппа в условиях его активной циркуляции среди таких пациентов, учитывая относительно короткий срок их пребывания в условиях стационара; интервалы между заборами парных проб крови составляли 7–10 дней, в некоторых случаях – от 3 до 15 дней.

Группа была разделена на пациентов с подтвержденной методом ОТ-ПЦР в реальном времени инфекцией A(H1N1)pdm09 (48 пациентов в 2009 г., 50 пациентов в 2011 г. и 57 беременных в 2011 г.), а также пациентов с ОРВИ (68 пациентов в 2011 г., в том числе 18 беременных), у которых не было детектировано специфической РНК вируса гриппа A(H1N1)pdm09 методом ОТ-ПЦР в носоглоточных смывах. Результаты титрования парных сывороток этих пациентов в РТГА со спектром циркулировавших штаммов представлены в табл. 1.

Прежде всего необходимо обратить внимание на то, что титры антител к A(H1N1)pdm09 ($Me (Q1; Q3) = 2,32 (2,32; 3,32) \log_2$) в сыворотках, взятых в первые дни заболевания, в этой группе были статистически значимо ниже титров к циркулировавшим ранее сезонным штаммам вируса гриппа А: A(H1N1) – $Me (Q1; Q3) = 4,32 (3,32; 6,32) \log_2$, ($p < 0,0001$) и A(H3N2) – $Me (Q1; Q3) = 3,32 (2,32; 4,32) \log_2$, ($p < 0,001$). Более выраженные различия показателей были получены в отношении штаммов вируса гриппа В обеих эволюционных линий. Выявленные различия свидетельствуют о разной активности вирусов гриппа в предыдущие эпидемические сезоны и

Показатели анти-НА у пациентов, госпитализированных в ИКБ № 1 в период 2009–2011 гг.

Сравниваемые показатели	Штаммы вирусов гриппа	Группы наблюдения							
		пациенты ИКБ № 1 (эпидсезоны 2009–2010 и 2010–2011 гг.)		пациенты ИКБ № 1 (эпидсезон 2010–2011 гг.)		Беременные женщины (пациенты ИКБ № 1, эпидсезон 2010–2011 гг.)			
		ПЦР-положительные на А(H1N1)pdm09 (n = 98)		ПЦР-отрицательные на А(H1N1)pdm09 (n = 30)		ПЦР-положительные на А(H1N1)pdm09 (n = 57)		ПЦР-отрицательные на А(H1N1)pdm09 (n = 18)	
		первая сыворотка	вторая сыворотка	первая сыворотка	вторая сыворотка	первая сыворотка	вторая сыворотка	первая сыворотка	вторая сыворотка
Титры анти-НА к штаммам вирусов гриппа А и В, Me (Q1; Q3) log ₂	A(H1N1)pdm09	2,32*, ** (2,32; 3,32)	3,32* (2,32; 5,32)	3,32*, * (2,32; 5,32)	4,32 (2,32; 5,32)	3,32*, **, (2,32; 3,32)	3,32*** (3,32; 4,32)	3,32**, **, ^^^ (2,32; 4,32)	3,32^^^ (3,32; 4,32)
	A(H1N1)	4,32* (3,32; 6,32)	5,32* (4,32; 6,32)	4,32 (3,32; 6,32)	5,32 (3,32; 6,32)	4,32*, ** (2,32; 5,32)	4,32** (3,32; 5,32)	4,82** (3,32; 6,32)	4,32 (3,32; 7,32)
	A(H3N2)	3,32** (2,32; 4,32)	3,32 (2,32; 4,32)	3,32 (2,32; 4,32)	3,32 (2,32; 4,32)	3,32**, ^ (3,32; 3,32)	3,32^ (3,32; 4,32)	3,32 (3,32; 4,32)	3,82 (3,32; 4,32)
	В/Виктория-подобный	4,32*, *** (3,32; 6,32)	5,32*** (4,32; 7,32)	5,32** (4,32; 6,32)	5,32 (4,32; 7,32)	4,32* (4,32; 5,32)	5,32 (4,32; 6,32)	4,82** (4,32; 6,32)	4,82 (4,32; 5,32)
	В/Ямагата-подобный	6,32*, * (5,32; 8,32)	7,32* (5,32; 8,32)	6,32** (5,32; 8,32)	6,32 (5,32; 8,32)	5,32* (4,32; 6,32)	5,32 (4,32; 6,32)	6,32** (4,32; 7,32)	5,32 (4,32; 6,32)
Процент защитных титров антител к вирусам гриппа (≥ 1:40)	A(H1N1)pdm09	9,2**	31,6**	26,7	33,3	1,8	10,5	5,6	11,1
	A(H1N1)	36,7**	61,2**	46,7	63,3	29,8^^	45,6^^	50	44,4
	A(H3N2)	13,3	18,4	16,7	20	5,3	10,5	22,2	22,2
	В/Виктория-подобный	48,0	56,1	66,7	66,7	47,4	56,1	50	50
	В/Ямагата-подобный	77,6	82,7	76,7	76,7	64,9	59,6	72,2	66,7

Примечание. * – $p < 0,0001$; ** – $p < 0,001$; *** – $p = 0,009$; # – $p = 0,008$; ** – $p = 0,004$; *** – $p = 0,0001$; ^ – $p = 0,003$; ^^ – $p = 0,02$; ^^ – $p = 0,01$.

подтверждают новизну пандемического вируса гриппа А(H1N1)pdm09.

Следует также отметить выявленные различия в динамике показателей титров антител к спектру исследованных вирусов гриппа. В группе ПЦР-положительных на А(H1N1)pdm09 статистически значимые различия между показателями титров антител в парных пробах получены в отношении А(H1N1)pdm09 и А(H1N1), а также вирусов гриппа В обеих линий. В группе беременных женщин приросты к штаммам вирусов гриппа А достоверны, но менее выражены по величине, что, возможно, связано с некоторой “задержкой” в стимулировании выработки специфических антител при беременности. Положительная динамика показателей титров антител к штамму вируса гриппа А(H1N1)pdm09 отмечена в группе беременных женщин, ПЦР-отрицательных на А(H1N1)pdm09. Можно предположить, что в эту группу также могли войти инфицированные А(H1N1)pdm09 женщины, однако при позднем заборе материала (носоглоточных смывов) результат был отрицательным.

Полученные данные коррелируют с динамикой процента лиц, приобретших после перенесенной инфекции титры специфических антител на защитном уровне. При этом необходимо отметить, что показатели были невысокими в группах с подтвержденной инфекцией А(H1N1)pdm09, что можно объяснить короткими промежутками между заборами проб крови. На это указывают и данные, полученные в отношении сезонных штаммов вирусов гриппа А(H3N2) и В, у которых положительной динамики обнаружено не было.

Все вышесказанное подтверждается показателями динамики специфических антител в ответ на инфекцию. Доля лиц с сероконверсией антител к А(H1N1)pdm09 была невысокой: 28,6% в группе с подтвержденной инфекцией А(H1N1)pdm09 (за исключением беременных

женщин) и 16,7% в группе пациентов, инфицированных другими ОРВИ. В группе беременных женщин показатели составили 14 и 11,1% соответственно. Также были выявлены сероконверсии к сезонному штамму А(H1N1), показатели в группах составили 22,4, 16,7, 14,0 и 11,1% соответственно. Это свидетельствует о том, что инфицирование пандемическим гриппом А(H1N1)pdm09 стимулировало выработку антител не только к пандемическому штамму А(H1N1)pdm09 вируса гриппа, но и к сезонному штамму вируса гриппа А(H1N1).

Подобные исследования парных сывороток крови лиц с подтвержденной методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени инфекцией пандемическим вирусом гриппа А(H1N1)pdm09 описаны в ряде научных статей. Результаты серологических исследований, представленных в этих статьях, различались и не всегда были подтверждены результатами, описанными в данной статье. Такие отличия могут быть связаны с различной активностью вирусов гриппа в разных странах и на отдельных территориях, а также с уровнем восприимчивости и инфицирования разных групп населения.

Процент лиц с титрами специфических антител к пандемическому вирусу гриппа А(H1N1)pdm09 на защитном уровне и лиц с сероконверсией по результатам исследований, проведенных в Австралии, был выше по сравнению с результатами нашего исследования [10]. Анти-НА на защитном уровне к А(H1N1)pdm09 регистрировали в 35% сывороток, взятых в начале заболевания, и в 87% сывороток, взятых через 2 нед [10]. Защитный уровень антител к сезонному вирусу гриппа А(H1N1) регистрировали в 53% сывороток, взятых в начале заболевания, и в 76% сывороток, взятых через 2 нед. Процент сероконверсии к пандемическому вирусу гриппа А(H1N1)pdm09 равен 61, к сезонному вирусу гриппа А(H1N1) – 16 [10].

Таблица 2

Показатели анти-НА у беременных женщин и новорожденных детей в марте–апреле 2010 г.

Показатель	Штамм вируса гриппа	Группы наблюдения	
		беременные (n = 83)	новорожденные (n = 20)
Анти-НА к штаммам вирусов гриппа А и В, Me (Q1; Q3) log ₂	A(H1N1)pdm09	4,32 (2,32; 5,32)	3,82 (2,32; 5,82)
	A(H1N1)	4,32* (2,32; 5,32)	6,32* (4,82; 6,32)
	A(H3N2)	2,32 (2,32; 3,32)	2,82 (2,32; 3,82)
	В/Виктория-подобный	4,32** (2,32; 5,32)	5,32** (3,82; 6,32)
	В/Ямагата-подобный	5,32*** (3,32; 6,32)	6,32*** (5,32; 7,32)
% защитных титров антител к вирусам гриппа (≥ 1:40)	A(H1N1)pdm09	30,0	30,0
	A(H1N1)	46,0 [#]	75,0 [#]
	A(H3N2)	5,0	5,0
	В/Виктория-подобный	34,0	55,0
	В/Ямагата-подобный	54,0 [#]	85,0 [#]

Примечание. * – $p = 0,006$; ** – $p = 0,013$; *** – $p = 0,001$; [#] – $p = 0,025$; [#] – $p = 0,012$.

Результаты исследований парных сывороток крови людей, проведенные в Сингапуре, сравнимы с нашими данными [2]. В сыворотках крови, взятых в начале заболевания от лиц с подтвержденной методом ОТ-ПЦР в реальном времени инфекцией A(H1N1)pdm09, не были обнаружены антитела на защитном уровне к пандемическому штамму вируса гриппа A(H1N1)pdm09, но выявлены в 79% образцов в сыворотках, взятых через 2 нед. Защитный уровень антител к A(H1N1) в начале заболевания обнаружен в 42% сывороток крови инфицированных людей, в последующие дни болезни – в 60% сывороток. Процент сероконверсии к A(H1N1)pdm09 равен 82, к A(H1N1) – 20 [2].

Процент лиц с титрами специфических антител к вирусу гриппа A(H3N2) на защитном уровне и лиц с сероконверсией по результатам обоих исследований, был выше по сравнению с данными настоящей работы. Защитный уровень антител регистрировали в 18–42% сывороток, взятых в начале заболевания, и в 33–64% сывороток, взятых через 2 нед; процент сероконверсии составил 11–18 [2, 10].

Результаты исследований сывороток крови беременных женщин также отличались от данных, полученных нами. Антитела на защитном уровне к пандемическому вирусу гриппа A(H1N1)pdm09 регистрировали в 35% сывороток, взятых в начале заболевания, и в 50% сывороток, взятых через 2 нед; к сезонному вирусу гриппа A(H1N1) – в 53 и 76% сывороток соответственно; к A(H3N2) – в 57 и 64% сывороток. Процент сероконверсии к пандемическому вирусу гриппа A(H1N1)pdm09 равен 28,5, к сезонному вирусу гриппа A(H1N1) – 7, к A(H3N2) – 14 [10].

Одна из целей настоящей работы заключалась в проведении скринингового исследования уровня специфических антител к пандемическому вирусу гриппа A(H1N1)pdm09 в сыворотках женщин с родоразрешением в марте – апреле 2010 г. и их новорожденных детей (2-я и 3-я группы наблюдения), т. е. сразу после первой волны пандемии, которая была закончена

к концу декабря 2009 г. Результаты представлены в табл. 2.

Результаты коррелируют с показателями, полученными в отношении госпитализированных пациентов с инфекцией A(H1N1)pdm09; кроме того (что представляет наибольший интерес), серологические показатели для двух антигенов, A(H1N1)pdm09 и A(H3N2), у новорожденных детей практически полностью соответствуют показателям у рожениц, а показатели для остальных антигенов не меньше, чем показатели у рожениц. Некоторые различия, вероятно, связаны с тем, что не представилось возможным объединить рожениц и детей попарно мать – ребенок. Эти данные подтверждают передачу специфических антител к вирусам гриппа, в том числе к пандемическому вирусу гриппа A(H1N1)pdm09, от матерей новорожденным детям, что имеет существенное значение в вопросах специфической профилактики новорожденных путем вакцинации беременных. Передача специфических антител новорожденным после вакцинации противогриппозными вакцинами беременных женщин в II и III триместрах была подтверждена в работах М.П. Костинова и соавт. [11].

Определенный интерес представлял и скрининг сывороток крови детей школьного возраста, проживающих в условиях интернатного типа (4-я группа наблюдения). С этой целью были исследованы 287 сывороток, взятых в мае 2010 г., т. е. в период, когда завершилась активная циркуляция этого вируса в РФ. Учитывая его новизну и отсутствие специфических антител, в том числе у детей, к началу его распространения, можно считать, что полученные результаты свидетельствовали об активной его передаче в данном коллективе: титры антител составил Me (Q1; Q3) = 6,32 (5,32; 7,32) log₂, защитные титры регистрировали у 78% детей, что значительно больше по сравнению с госпитализированными пациентами. Полученные результаты указывают на высокую вовлеченность в эпидпроцесс детей школьного возраста, проживающих в условиях интернатного типа, в случае заноса вируса гриппа в коллектив.

Данные изучения динамики антител ко второму поверхностному гликопротеину анти-НА в научной литературе более ограничены, хотя и вызывают не меньший интерес у исследователей. Работы с использованием препаратов очищенной НА при экспериментальной инфекции лабораторных животных и птиц известны с 60-х годов прошлого века; рядом авторов показана роль антинейраминидазных антител в снижении восприимчивости и развитии гриппозной инфекции у людей, в том числе перекрестная защита [12–15]. На важность исследований, направленных на изучение анти-НА с применением новых подходов, в последние годы неоднократно указывали эксперты ВОЗ.

В связи с вышесказанным определенным интерес представляла оценка иммуногенности пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09 по выработке специфических антител к НА у лиц, перенесших инфекцию, этиологически связанную с A(H1N1)pdm09. Для выявления специфических анти-НА была применена твердофазная РИНА, в которой в качестве антигена использовали диагностический реассортантный штамм, подготовленный на основе вируса гриппа лошади А/лошадь/Прага/1/56 (H7N7) – RN1/09-swine A(H7N1), содержащий НА от штамма A/California/07/2009 (H1N1)pdm09 [8]. Специфичность оценки антинейраминидазных антител с применением данного реассортанта, содержащего НА пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09, основана на антигенной удаленности НА H7 от НА пандемического вируса гриппа H1pdm09 [8].

Для исследования иммунного ответа к НА пандемического вируса гриппа были отобраны парные сыворотки крови пациентов ИКБ № 1 г. Москвы (в том числе бе-

Показатели анти-NA в реакции РИНА в группах наблюдения

Группа наблюдения	Число обследуемых	Сыворотки крови	Анти-NA к штамму вируса гриппа A(H1N1)pdm09, Me (Q1; Q3) log ₂	Совпадение приростов антител к HA и NA, %
Пациенты ИКБ № 1 (эпидсезоны 2009–2010 и 2010–2011 гг.)	26	Первая	4,3 (2,3; 6,3)*	57,7
		Вторая	6,9 (5,9; 8,2)*	
Беременные женщины (пациенты ИКБ № 1, эпидсезон 2010–2011 гг.)	9	Первая	6,4 (2,3; 7,5)**	55,6
		Вторая	8,0 (7,2; 8,7)**	
Воспитанники интерната	25	Март 2010 г.	7,2 (6,8; 8,2)	н. и.
Новорожденные дети	10	Март 2010 г.	6,5 (6,1; 7,9)	н. и.

Примечание. * – $p = 0,0001$ (тест Уилкоксона: $T = 25,0$; $Z = 3,82$); ** – $p = 0,04$ (тест Уилкоксона: $T = 5,0$; $Z = 2,07$); н. и. – не исследовали.

ременных), одинарные сыворотки крови воспитанников интерната и новорожденных детей, в отношении которых выявлены сероконверсии (парные пробы), и сыворотки с титрами анти-NA к A(H1N1)pdm09 не менее 1:40 (одинарные) (табл. 3).

В парных пробах выявлены приросты титров анти-NA, при этом кратность приростов составила у пациентов ИКБ № 1 1,6 раза, у беременных – 1,25 раза. Различия статистически значимы. Кроме того, в сыворотках воспитанников интерната и новорожденных детей уровни анти-NA были относительно высокими и сравнимыми с показателями у перенесших инфекцию, этиологически связанную с A(H1N1)pdm09 (ранговый дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса $H(3, n = 70) = 4,77$; $p = 0,19$). Одновременная положительная динамика анти-NA и анти-NA среди госпитализированных, а именно согласованность индивидуальных достоверных приростов антител к двум поверхностным антигенам пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09, была выявлена более чем у половины обследованных.

Нами не найдено описанных в литературе результатов исследования иммунного ответа к нейраминидазному антигену у лиц, инфицированных пандемическим штаммом вируса гриппа A(H1N1)pdm09. Ранее данным методом было проведено исследование парных сывороток крови людей, вакцинированных трехвалентной сезонной, моновалентной пандемической вакцинами и прототипом пандемической вакцины [15]. Результаты показали, что изучаемые живые вакцины стимулировали выработку гомологичных анти-NA у 20–47% волонтеров. Кроме того, в сыворотках крови 7–15 и 16–20% непривитых лиц, обследованных в 2005–2010 гг., присутствовали перекрестно реагирующие антитела к NA пандемического штамма A(H1N1)pdm09 и вируса гриппа птиц A(H5N1) соответственно, что, возможно, могло повлиять на их восприимчивость к этим вирусам.

Заключение

Несмотря на ретроспективность значения серологических методов в диагностике гриппозной инфекции, полученные результаты позволили не только выявить дополнительные случаи гриппа, «ускользавшие» при применении ПЦР в отношении носоглоточных смывов, но и установить некоторые особенности циркуляции штаммов в период 2009–2011 гг., этиологически связанных с появлением и активным распространением пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09.

Показатели анти-NA и анти-NA к A(H1N1)pdm09 и их динамика были определены в разных группах населения, различающихся по возрасту, месту и времени забора крови, что, безусловно, подтверждает их «контакт» со штаммами пандемического вируса гриппа. В частности, положительная динамика анти-NA выявля-

на среди госпитализированных пациентов как с ПЦР-положительным, так и ПЦР-отрицательным результатом на A(H1N1)pdm09. Полученные результаты позволяют сделать вывод и о «подстегиивании» антител к сезонному штамму вируса гриппа A(H1N1) у лиц, инфицированных A(H1N1)pdm09 на фоне отсутствия его активной циркуляции в исследуемый период. Положительной динамики в отношении штаммов вирусов гриппа A(H3N2) и B в сыворотках не обнаружено.

Результаты скрининга сывороток детей школьного возраста, проживающих в условиях интернатного типа, показали, что к марту 2010 г., т. е. после первой волны пандемии 2009 г., большинство детей приобрели специфические антитела к A(H1N1)pdm09, что еще раз подтверждает высокую способность вирусов гриппа к распространению в коллективах закрытого типа.

Подтверждена передача материнских антител новорожденным детям, в том числе антител к пандемическому штамму вируса гриппа A(H1N1)pdm09.

Результаты настоящего исследования показали, что иммунный ответ к поверхностным антигенам вируса гриппа, HA и NA в результате естественного инфицирования пандемическими штаммами вируса гриппа A(H1N1)pdm09 более чем в половине случаев формируется одновременно. Некоторая автономность ответа может быть связана со сроками забора материала, в частности при выявлении анти-NA.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2, 5, 9, 10 см. REFERENCES)

- Гендон Ю.З. Стратегия борьбы с гриппом с помощью вакцин. *Вакцинация*. 1999; 11 (5): 3.
- Бурцева Е.И., Львов Д.К., Щелканов М.Ю., Колобухина Л.В., Прилипов А.Г., Альховский С.В. и др. Особенности социркуляции вирусов гриппа в постпандемический период 2010–2011 гг. по итогам деятельности Центра экологии и эпидемиологии гриппа ФГУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского Минздрава-соцразвития России. *Вопросы вирусологии*. 2012; 57 (1): 20–8.
- Львов Д.К., Бурцева Е.И., Лаврищева В.В. Информация Центра экологии и эпидемиологии гриппа Института вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН об итогах эпидемического сезона 2009–2010 гг. по гриппу и ОРВИ (с 40-й недели 2009 г. по 22-ю неделю 2010 г.) в мире и в России. *Вопросы вирусологии*. 2011; 56 (1): 44–9.
- Михайлова Е.В., Салов И.А., Романовская А.В., Левин Д.Ю., Дубовицкая Н.А., Каральский С.А. Особенности течения ОРВИ и гриппа A/H1N1/2009 у беременных. *Инфекционные болезни*. 2011; 2: 89–92.
- МУ 3.3.2.1758-03. Методические указания. Методы определения показателей качества иммунобиологических препаратов для профилактики и диагностики гриппа. М.; 2005.
- Смолоногина Т.А., Дешева Ю.А., Шалджян А.А., Груднин М.П., Руденко Л.Г. Образование антител к нейраминидазе вируса гриппа A/Калифорния/07/2009 (H1N1) после иммунизации живой гриппозной моновалентной вакциной. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2011; 6: 72–6.
- Черданцев А.П., Костинов М.П., Кусельман А.И., Ерофеева М.К., Азизова Р.Ш., Демина Е.О. Уровень антител к вирусу

- гриппа у детей первых месяцев жизни, рожденных от матерей, вакцинированных во время беременности. *Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского*. 2013; 2: 86–91.
12. Бурцева Е.И., Власова Л.Н., Слепушкин А.Н., Беляев А.Л., Береговский Н.А. Нейраминидазная активность инактивированных гриппозных вакцин у лиц пожилого возраста. *Вопросы вирусологии*. 2002; 47 (5): 21–5.
 13. Найхин А.Н., Царицина И.М., Сыроедова Л.Г., Олейникова Е.В., Горев Н.Е. Антинейраминидазные антитела при естественном инфицировании гриппом А и иммунизации гриппозными вакцинами. *Вопросы вирусологии*. 1983; 2: 154–9.
 14. Найхин А.Н., Царицина И.М., Олейникова Е.В., Исмагулов А.Т., Резник В.И. Формирование и защитные функции антител к нейраминидазе вируса гриппа А. *Вопросы вирусологии*. 1985; 30 (1): 35–9.
 15. Смолоногина Т.А., Дешева Ю.А., Горева Н.Е., Руденко Л.Г. Оценка антинейраминидазных антител у волонтеров, привитых сезонной трехвалентной живой гриппозной вакциной. *Медицинский академический журнал*. 2011; 11 (3): 44–50.
- A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science*. 2009; 325: 197–201.
6. Mikhaylova E.V., Salov I.A., Romanovskaya A.V., Levin D.Yu., Dubovitskaya N.A., Karal'skiy S.A. Peculiarities of the process of ARVI and influenza A/H1N1/2009 in pregnant women. *Infektsionnye bolezni*. 2011; 2: 89–92. (in Russian)
 7. MU 3.3.2.1758-03. Methodical instructions. Methods for the determination of the criteria of the quality of immunobiological products for the prevention and diagnosis of influenza. Moscow; 2005. (in Russian)
 8. Smolnogina T.A., Desheva Yu.A., Shaldzhyan A.A., Grudin M.P., Rudenko L.G. Formation of antibodies against neuraminidase of A/California/07/2009 (H1N1) influenza virus after immunization with live monovalent influenza vaccine. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2011; 6: 72–6. (in Russian)
 9. Lambre C.R., Terzidis H., Greffard A., Webster R.G. Measurement of anti-influenza neuraminidase antibody using a peroxidase-linked lectin and microtitre plates coated with natural substrates. *J. Immunol. Methods*. 1990; 135 (1–2): 49–57.
 10. Tan S., Gordon D.L., Honda-Okubo Y., Petrovsky N., Phillips P., Huddlestone S. et al. Serological responses following influenza A H1N1 2009 infection in adults. *J. Infect.* 2011; 62 (5): 388–93.
 11. Cherdantsev A.P., Kostinov M.P., Kusel'man A.I., Erofeeva M.K., Azizova R.Sh., Demina E.O. The level of antibodies to influenza viruses in infants born by mothers vaccinated during pregnancy. *Pediatriya. Zhurnal im. G.N. Speranskogo*. 2013; 2: 86–91. (in Russian)
 12. Burtseva E.I., Vlasova L.N., Slepshkin A.N., Belyaev A.L., Beregovskiy N.A. Antineuraminidase activity of inactivated influenza vaccines in elderly people. *Voprosy virusologii*. 2002; 47 (5): 21–5. (in Russian)
 13. Naykhin A.N., Tsaritsina I.M., Syroedova L.G., Oleynikova E.V., Gorev N.E. Antineuraminidase serum antibodies in natural influenza A and immunization with influenza vaccines. *Voprosy virusologii*. 1983; 2: 154–9. (in Russian)
 14. Naykhin A.N., Tsaritsina I.M., Oleynikova E.V., Ismagulov A.T., Reznik V.I. Formation and protective functions of antibodies to neuraminidase of the influenza A virus. *Voprosy virusologii*. 1985; 30 (1): 35–9. (in Russian)
 15. Smolnogina T.A., Desheva Yu.A., Goreva N.E., Rudenko L.G. The assessment of antineuraminidase antibodies of volunteers vaccinated with seasonal trivalent live influenza vaccine. *Meditsinskiy akademicheskij zhurnal*. 2011; 11 (3): 44–50. (in Russian)

REFERENCES

1. Gendon Yu.Z. Strategy for the struggle of influenza with vaccines. *Vaksinatziya*. 1999; 11 (5): 3. (in Russian)
2. Chen M.I., Barr I.G., Koh G.C., Lee V.J., Lee C.P., Shaw R. et al. Serological Response in RT-PCR Confirmed H1N1-2009 Influenza A by Hemagglutination Inhibition and Virus Neutralization Assays: An Observational Study. *PLoS One*. 2010; 5 (8): e12474.
3. Burtseva E.I., L'vov D.K., Shchelkanov M.Yu., Kolobukhina L.V., Prilipov A.G., Al'khovskiy S.V. et al. The specific features of the cocirculation of influenza viruses in the 2010–2011 postpandemic period according to the results of activities of the D.I. Ivanovsky Research Institute of Virology, Ministry of Health and Social Development of Russia. *Voprosy virusologii*. 2012; 57 (1): 20–8. (in Russian)
4. L'vov D.K., Burtseva E.I., Lavrishcheva V.V. Information of the Center for Ecology and Epidemiology of Influenza, D.I. Ivanovsky Research Institute of Virology, Russian Academy of Medical Sciences, on the results of the 2009–2010 influenza and acute respiratory viral infection epidemic season (at week 40 of 2009 to week 22 of 2010) in the world and Russia. *Voprosy virusologii*. 2011; 56 (1): 44–9. (in Russian)
5. Garten R.J., Davis C.T., Russell C.A., Shu B., Lindstrom S., Balish A. et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009

Поступила 29.05.14

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015
УДК 615.373:578.248].036.8

Оспельникова Т.П., Исаева Е.И., Колодяжная Л.В., Козулина И.С., Андреева С.А., Полосков В.В., Ершов Ф.И.

Противовирусная активность препаратов интерферона бета 1а

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

Изучена противовирусная активность препаратов интерферона бета 1а Генфаксон® и Ребиф® при гриппе и герпесе. Впервые показан выраженный противовирусный эффект препаратов в отношении вирусов, вызывающих эти заболевания.

Ключевые слова: вирус; грипп; герпес; врожденный иммунитет; препарат интерферона бета.

Для цитирования: Вопросы вирусологии. 2015; 60 (6): 24–28.

Ospelnikova T.P., Isaeva E.I., Kolodyaznaya L.V., Kozulina I.S., Andreeva S.A., Poloskov V.V., Ershov F.I.

Antiviral activity of the interferon beta 1a

Federal State Budgetary Institution "Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya" of the Ministry of Health of the Russian Federation, 123098, Moscow, Russia
The antiviral activity of the interferon beta 1a was studied using the example of the antiviral activity of the drugs interferon beta 1a Genfaxon® and Rebif® for the influenza and herpes. A pronounced antiviral effect of the drugs against influenza and herpes viruses was shown for the first time.

Key words: virus; influenza; herpes; innate immunity; interferon beta.

Received 13.03.14

For correspondence: Tatiana Ospelnikova, MD, PhD; e-mail: ospelnikovat@mail.ru
Citation: Voprosy virusologii. 2015; 60(6): 24–28. (In Russ.)

Для корреспонденции: Оспельникова Татьяна Петровна, канд. мед. наук; e-mail: ospelnikovat@mail.ru

Введение

История клинического использования интерферона бета (ИФН-β) насчитывает почти 30 лет. Препараты на его основе наиболее эффективны для терапии рассеянного склероза (РС). РС – тяжелое аутоиммунное заболевание, проявляющееся агрессией собственного иммунитета хозяина к белкам клеток нервной системы (демиелинизация), осуществляемой с помощью антител, Т-лимфоцитов и цитокинов. Интерфероны бета обладают иммуномодулирующими, противовирусными и антипролиферативными свойствами.

В настоящее время в медицинской практике используется 7 препаратов ИФН-β: Ребиф, Авонекс, СинноВекс и Генфаксон – представители ИФН-β1а; Бетаферон, Ронбетал – представители ИФН-β1b. Седьмой препарат ИФН-β – Фрон – природный ИФН-β, имеющий в своем составе ИФН-β1а и ИФН-β1b.

Относительно новый по сравнению с Ребифом® препарат Генфаксон® (рекомбинантный человеческий ИФН-β1а) представляет собой природную аминокислотную последовательность ИФН-β человека, полученную методами генной инженерии с использованием культуры клеток яичника китайского хомячка.

Обладая противовоспалительным эффектом, препараты ИФН-β снижают выраженность аутоиммунных процессов, остроту, частоту и тяжесть обострений и в целом замедляют темпы прогрессирования РС, предотвращая развитие инвалидности [1].

Целью исследования было изучение противовирусной активности препаратов ИФН-β1а Генфаксон® и Ребиф® в отношении вирусов гриппа и герпеса человека на экспериментальной модели *in vitro*.

Задачи исследования:

- выявление цитотоксичности препаратов для культуры клеток почки обезьян (Vero), перевиваемой клеточной линии конъюнктивы человека (Chang Conjunctiva, клон 1-5C4), диплоидной культуры фибробластов легких эмбриона человека (ФЛЭЧ);

- изучение противовирусной активности препаратов Генфаксон® и Ребиф® *in vitro* на модели гриппа H3N2 (A/Aichi 1/68) в перmissive (чувствительной) клеточной культуре;

- изучение противовирусной активности препаратов Генфаксон® и Ребиф® *in vitro* в чувствительной клеточной культуре, инфицированной вирусом простого герпеса;

- изучение противовирусной активности препаратов Генфаксон® и Ребиф® *in vitro* в отношении классического тест-вируса энцефаломиокардита мышей (ЕМС) в клеточной культуре ФЛЭЧ 977.

Материалы и методы

Препараты представлены в виде аптечных упаковок (шприц с препаратом Генфаксон® или Ребиф®) в дозе 12 млн МЕ/0,5 мл (44 мкг/0,5 мл). Использовали Генфаксон® из лаборатории Тюттор С. А. С. И. Ф. И. А., «МР Фарма С.А.», Аргентина) и препарат сравнения Ребиф® («Мерк Сероно С.п.А.», Италия).

В качестве активного вещества Генфаксон и Ребиф содержат ИФН-β1а – рекомбинантный человеческий интерферон, полученный методом генной инженерии с использованием культуры клеток яичника китайского хомячка. Последовательность аминокислот в его молекуле идентична таковой эндогенного человеческого ИФН-β.

Вспомогательные вещества для Генфаксона: маннитол, альбумин человеческий, натрия ацетат, кислота уксусная. Вспомогательные ингредиенты для Ребифа: сывороточный альбумин человека, маннитол, натрия ацетат.

Биологические эффекты ИФН-β1а обусловлены связыванием со специфическими рецепторами на поверх-

ности клеток макроорганизма и запуском сложного каскада межклеточных взаимодействий, приводящих к ИФН-обусловленной экспрессии многочисленных генных продуктов и маркеров, в числе которых главный комплекс гистосовместимости I класса, белок Мх, 2'5'-олигоаденилатсинтаза, β2-микроглобулин и неоптелин. После внутримышечного введения 1 дозы концентрации указанных соединений в сыворотке крови остаются повышенной в течение 4 дней (до 1 нед).

Для внесения в культуру клеток препараты непосредственно перед этим разводили в культуральной среде без сыворотки. Препарат вносили в культуру клеток по трем схемам: за 2 ч до (профилактическая схема), одновременно и через 2 ч после инфицирования вирусом (лечебная схема) в концентрациях от 4,4 до 0,23 мкг/0,5 мл. Дозы препаратов определены по тесту на цитотоксичность.

Клетки. В исследование были включены перевиваемая культура Chang Conjunctiva, клон 1-5C4, перевиваемая культура клеток почки обезьян (Vero), полученные из коллекции культур тканей Института вирусологии им. Д.И. Ивановского, и 3 диплоидная культура ФЛЭЧ 977, полученная из Медико-генетического центра. Линии клеток культивировали в 96-луночных планшетах Costar в среде Игла MEM с добавлением 10% фетальной сыворотки телят, 10 мМ глутамин и антибиотиков.

Вирусы. Использованы вирус гриппа А (H3N2), адаптированный к размножению на клеточной линии Chang Conjunctiva; вирус простого герпеса (Herpes simplex virus) 1-го типа, штамм L₂, размноженный на клетках Vero; вирус ЕМС – тест-вирус на препараты ИФН, полученные из Государственной коллекции вирусов НИИ вирусологии.

Инфекционную активность вирусов определяли микроскопически по цитопатическому действию (ЦПД) вируса и рассчитывали по методу Рида и Менча при инфицировании монослоя клеточных культур 10-кратными разведениями вирусной суспензии [2]. При определении инфекционной активности вируса гриппа применяли реакцию геммагглютинации (РГА), активности вируса герпеса – полимеразную цепную реакцию (ПЦР).

Заражение монослоя культур клеток вирусом гриппа в дозе 100 ТЦИД₅₀ проводили по стандартной методике [3]. Вирус был инокулирован на 3-дневный монослой культуры клеток в среде, содержащей 5 мкг/мл трипсина. Исследование выполняли двукратно в трехкратном повторе общепринятым методом [4]. Монослой клеточной культуры Vero инфицировали Herpes simplex virus в дозе 100 ТЦИД₅₀. Инфицированные культуры клеток наблюдали в течение 48 ч при инкубировании при 37°C атмосфере 5% CO₂ и 98% влажности.

Определение цитотоксического действия препаратов. Токсичность препаратов изучали при внесении разных их концентраций (от 44 до 0,23 мкг/0,5 мл) на монослой культур клеток, предварительно выращенных в 96-луночных планшетах. Количество жизнеспособных клеток определяли по ЦПД клеток в инвертированном микроскопе либо по оптической плотности (ОП) супернатантов методом иммуоферментного анализа с нейтральным красным [2, 4]. Монослой культуры клеток Chang Conjunctiva/Vero культивировали в присутствии лекарственных препаратов, добавленных в соответствующих концентрациях, в течение 72 ч при 37°C, 5% CO₂. Концентрацию препарата, ингибирующую значение ОП на 50% по сравнению с клеточным контролем, принимали за 50% цитотоксическую дозу (ЦТД₅₀).

Определение противовирусной активности препаратов Генфаксон® и Ребиф® *in vitro*. Противовирусное действие препаратов изучали на перmissive линиях клеток для гриппа и герпеса. Система оценки противовирусного действия веществ в культуре клеток включала количественную оценку подавления развития ре-

Таблица 1

Жизнеспособность клеток (в %) при ингибции репродукции вируса гриппа А/Аichi 1/68 Генфаксоном® и Ребифом®

Доза препарата, мкг/0,5 мл	Схема внесения препаратов относительно инфицирования клеток					
	за 2 ч		одномоментно		через 2 ч	
	Ребиф®	Генфаксон®	Ребиф®	Генфаксон®	Ребиф®	Генфаксон®
4,4	40±5,6	0**	100	100	98±9,3	100
2,2	30±10,3	0**	100	100	86±6,9	97±5,3
1,1	24±8,1	0**	100	100	72±5,7	61±6,6**
0,55	0	0	100	72±5,6**	68±9,7	43±4,5*
0,46	0	0	89±7,7	43±7,9**	42±3,4	0*
0,23	0	0	0	0	0	0

Примечание. Здесь и в табл. 2: контроль вируса – 0% жизнеспособных клеток; контроль клеток – 100% жизнеспособных клеток (сохранение монослоя клеток на 90% и более); * – $p < 0,01$; ** – $p < 0,001$.

продукции вирусов гриппа в культуре клеток в РГА [4]. Вирусную активность и противовирусный эффект после воздействия препаратов оценивали в ПЦР с тест-системами АмплиСенс (Россия) по инструкции производителя.

Противовирусную эффективность препаратов также определяли по ЦПД в инвертированном микроскопе.

Математическую обработку результатов исследований проводили с использованием статистических программ Biostat, позволяющих объективно оценить количественные результаты [5].

Результаты цитотоксичности препаратов *in vitro*

Изучение цитотоксического действия препаратов Генфаксон® и Ребиф®. Цитотоксичность препаратов оценивали по жизнеспособности трех культур клеток (рис. 1, а–в). Показано, что, начиная с концентрации 4,4 мкг/0,5 мл оба препарата не оказывали ЦТД на используемые клетки. Через 72 ч инкубации (см. рис. 1, в), начиная с концентрации 5,5 мкг/0,5 мл, препараты также не оказывали ЦТД на используемые клетки.

В целом концентрация 4,4 мкг/0,5 мл была определена как максимально переносимая доза препаратов для клеточных линий, на которых в дальнейшем исследовали противовирусное действие препаратов в отношении вирусов человека.

Противовирусная эффективность препаратов

Оценка противовирусной активности препаратов Генфаксон® и Ребиф® проведена в соответствии с ранее приведенными нами рекомендациями [4].

Влияние Генфаксона® и Ребифа® на репродукцию вируса гриппа. Показано, что защита клеток Chang Conjunctiva, клон 1-5C4 от ЦПД вируса гриппа зависит от концентрации и схем введения Генфаксона® и Ребифа®.

Препараты вводили в концентрациях от 4,4 мкг/0,5 мл до и после внесения вируса в дозе 100 ТЦИД₅₀. Полученные результаты представлены в табл. 1.

При использовании профилактической схемы (внесение препаратов за 2 ч до инфицирования) Генфаксон® в указанных концентрациях не защищал клетки от цитодеструктивного действия вируса гриппа, и через 48 ч инкубирования при 37°C наблюдалась 100% гибель клеток, как и в инфицированном контроле. Можно отметить очень слабовыраженное профилактическое действие препарата сравнения Ребиф® при концентрациях от 4,4 до 1,1 мкг/0,5 мл (от 40 до 24% соответственно; $p < 0,001$).

При одновременном внесении вируса и препаратов Ген-

факсон® и Ребиф® в культуру клеток Chang Conjunctiva 100% защитный эффект клеток от цитодеструктивного действия вируса гриппа был выявлен при концентрациях Генфаксона® от 4,4 до 1,1 мкг/0,5 мл. При концентрациях 0,55 и 0,46 мкг/0,5 мл эффективность препарата снижалась до 72 и 43% соответственно. При дозе 0,23 мкг/0,5 мл препарат не защищал от вируса. Для препарата сравнения Ребиф® в аналогичном эксперименте – 100% инфицированных клеток, их жизнеспособность на уровне неинфицированного контроля отмечена при концентрации от 4,4 до 0,55 мкг/0,5 мл. В дозе 0,46 мкг/0,5 мл 89% клеток не из-

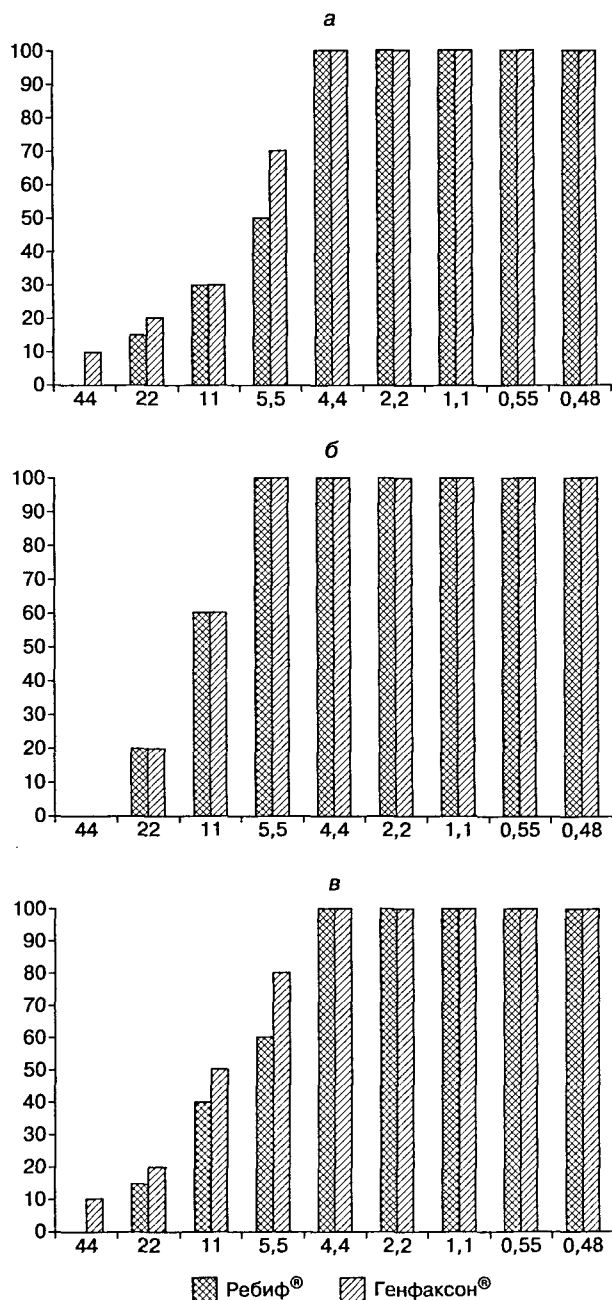


Рис. 1. Определение ЦТД препаратов Генфаксон® и Ребиф® на линиях клеток Chang Conjunctiva, клон 1-5C4 (а), Vero (б) и ФЛЭЧ (в).

По оси абсцисс – концентрация препаратов в мкг/0,5 мл; по оси ординат – процент жизнеспособных клеток; контроль клеток – 100% жизнеспособных клеток; сплошные столбики – Генфаксон®, заштрихованные столбики – Ребиф®.

Таблица 2

Жизнеспособность клеток (в %) при ингибции репродукции вируса герпеса Генфаксоном® и Ребифом®

Доза препарата, мкг/0,5 мл	Схема внесения препаратов относительно инфицирования клеток					
	за 24 ч		одномоментно		через 24 ч	
	Ребиф®	Генфаксон®	Ребиф®	Генфаксон®	Ребиф®	Генфаксон®
4,4	0	100**	50±4,5	83±8,7*	72±3,8	100**
2,2	0	49±7,9**	43±5,3	75±6,5*	45±6,3	100*
1,1	0	34±4,5**	35±4,8	48±9,1	38±4,9	64±6,7*
0,55	0	0	20±7,2	33±4,8	22±3,9	45±8,1*
0,46	0	0	0	0	0	0
0,23	0	0	0	0	0	0

меняли морфологию. Наблюдаемые различия между препаратами были статистически достоверны при дозах 0,55 и 0,46 мкг/0,5 мл; $p < 0,001$.

При лечебной схеме, когда внесение Генфаксона® и Ребифа® в культуру клеток Chang Conjunctiva осуществлялось через 2 ч после инфицирования монослоя вирусом, практически 100% защитный эффект клеток от цитодеструктивного действия вируса гриппа выявлен при концентрациях препаратов от 4,4 до 2,2 мкг/0,5 мл. Начиная с концентрации 1,1 до 0,55 мкг/0,5 мл эффективность препарата снижалась до 61% ($p < 0,001$) и 43% ($p < 0,01$) соответственно. С дозы 0,46 мкг/0,5 мл Генфаксон® не защищал клетки от ЦПД вируса гриппа ($p < 0,01$).

Различия между препаратами были статистически достоверны при дозах 1,1–0,55–0,46 мкг/0,5 мл; $p < 0,01$.

Таким образом, при использовании терапевтической схемы максимальное защитное действие Генфаксона® на клетки наблюдалось при концентрациях от 4,4 до 2,2 мкг/0,5 мл. Близкие данные получены с препаратом Ребиф®.

Влияние Генфаксона® и Ребифа® на репродукцию вируса простого герпеса. Препараты применяли в концентрациях от 4,4 до 0,23 мкг/0,5 мл согласно схемам за 24 ч до внесения одновременно с внесением и через 24 ч после внесения Herpes simplex virus в дозе 100 ТЦИД₅₀. Активность препаратов изучали на модели, чувствительной к вирусу герпеса тканевой культуре, – клетках Vero. Результаты опытов представлены в табл. 2.

При использовании профилактической схемы (введение препаратов за 24 ч до инфицирования монослоя культуры клеток) получены следующие результаты. Жизнеспособность инфицированных клеток оставалась на уровне неинфицированного контроля при применении максимальной дозы Генфаксона® 4,4 мкг/0,5 мл, что указывает на сильный противогерпетический эффект препарата в данной концентрации. При разведении препарата до 2,2 и 1,1 мкг/0,5 мл отмечено снижение защиты клеток до 49 и 34% соответственно. Начиная с концентрации 0,55 мкг/0,5 мл и ниже не отмечено защитного эффекта препарата от цитодеструктивного действия на клетки вируса герпеса, и через 48 ч инкубирования при 37°C наблюдалась 100% гибель клеток, как и в инфицированном контроле. Препарат сравнения Ребиф® не оказывал профилактического действия при использованных концентрациях ($p < 0,001$).

Защитный эффект Генфаксона® изучали при одновременном введении в культуру клеток вируса и препарата. При множественности инфицирующей дозы вируса (100 ТЦИД₅₀) в культуре клеток Vero препарат защищал клетки на 83 и 75% от ЦПД вируса герпеса при концентрациях 4,4 и 2,2 мкг/0,5 мл соответственно. Наблюдаемые различия между препаратами при указанных концентрациях были статистически достоверны; $p < 0,01$. При снижении концентрации до 1,1 мкг/0,5 мл эффективность препарата снижалась до 48%, при дозе 0,55 мкг/0,5 мл отмечен слабовыраженный 33% защитный эффект. Различия между препаратами при указанных концентрациях были статистически недостоверны. Начиная с концентрации 0,46 мкг/0,5 мл и ниже не отмечено защитного эффекта препарата от цитодеструктивного действия на клетки вируса герпеса, и через 48 ч инкубирования наблюдалась 100% гибель клеток, как и в инфицированном контроле. Препарат сравнения Ребиф® в указанных концентрациях также давал защитный эффект, который оказался несколько слабее, чем у Генфаксона®, – защита клеток лишь на 50–20% от ЦПД вируса.

При стандартной инфицирующей дозе вируса и терапевтической схеме применения Генфаксона® выражен

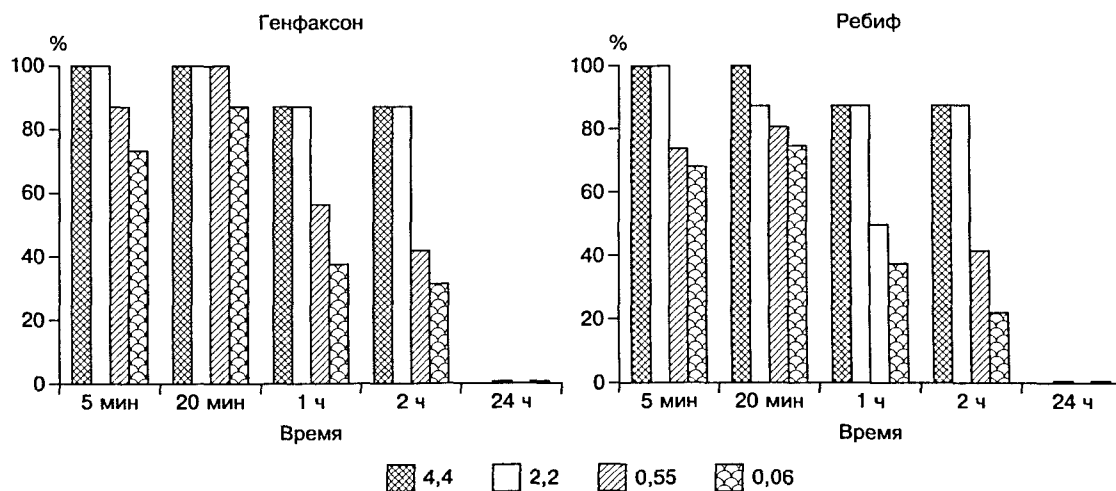


Рис. 2. Защитный терапевтический эффект препаратов Генфаксон® и Ребиф® в отношении вируса ЕСС.

По оси абсцисс – длительность воздействия ЕСС на монослой клеток ФЛЭЧ; по оси ординат – процент жизнеспособных клеток; контроль клеток – 100% жизнеспособных клеток; контроль вируса – 0% жизнеспособности клеток; разными штрихами и цветами обозначены концентрации препаратов (в мкг/мл).

ная защита клеток наблюдалась при концентрациях 4,4 и 2,2 мкг/0,5 мл. При внесении препарата в концентрациях 1,1 и 0,55 мкг/0,5 мл Генфаксон® обеспечивает защиту 64 и 45% клеток от ЦПД вируса соответственно. Аналогичное действие проявил и препарат сравнения Ребиф®, однако следует отметить его менее выраженный противогерпетический терапевтический потенциал по сравнению с Генфаксоном®. Различия между препаратами при указанных концентрациях были статистически достоверны; $p < 0,001$ и $p < 0,01$.

В целом исследуемый препарат защищал клетки от цитодеструктивного действия вируса простого герпеса в диапазоне концентраций от 4,4 до 1,1 мкг/0,5 мл.

Зависимость противовирусной активности препаратов Генфаксон® и Ребиф® от времени контакта клеток с вирусом. Генфаксон® и препарат сравнения Ребиф® титровали на монослой клеточной культуры ФЛЭЧ 977. Были проверены 3 серии препарата Генфаксон® и 1 серия препарата Ребиф®. По результатам эксперимента серии Генфаксона® между собой значимо не различались.

При лечебной схеме применения препарата в отношении вируса ЕМС использовали монослой клеток ФЛЭЧ. Длительность контакта клеток с вирусом составляла 5 и 20 мин, 1, 2 и 24 ч. Далее клетки обрабатывали в течение 24 ч препаратами в разных концентрациях от 4,4 до 0,06 мкг/0,5 мл.

Полученные результаты указывают на прямую зависимость эффективности препаратов от длительности контакта клеток с вирусом (рис. 2). Так, 5–20-минутный контакт вируса с клетками не успевает запустить полноценный разрушительный вирусный каскад, и 24-часовое воздействие препарата приводит к выраженному защитному эффекту препаратов во всех представленных концентрациях. Более продолжительное инфицирование вирусом (1–2 ч) снижает эффективность препаратов начиная с концентрации 0,55 мкг/0,5 мл. Еще более длительный (24-часовой) контакт вируса с монослоем приводит к полной деструкции клеток, и результаты сравнимы с вирусным контролем.

При профилактической схеме в течение 24-часового контакта Генфаксона® и Ребифа® с монослоем клеток ФЛЭЧ и последующего 24-часового инфицирования клеток классическим тест-вирусом ЕМС выявлен максимальный защитный потенциал (100%) сравниваемых препаратов при всех исследованных концентрациях вплоть до их нанозначений.

Обсуждение

Исследования последних лет показали, что ИФН типа I у позвоночных способны замедлить репликацию и распространение большинства вирусов в ранних стадиях инфекции [6]. В свою очередь вирусы гриппа и герпеса активно и изобретательно развивают “стратегии выживания” для подрыва этой врожденной защиты, чтобы обеспечить свое эффективное воспроизводство и вызвать тем самым заболевание [7].

При острых респираторных вирусных заболеваниях и хронических персистирующих герпетических инфекциях с постоянными рецидивами выявлен дефицит продукции ИФН лейкоцитами периферической крови, что требует скоординированного терапевтического подхода с включением в комплексное лечение иммуноактивных препаратов, таких как препараты ИФН, модуляторы/индукторы ИФН [8–13].

В настоящей работе впервые показано, что препараты ИФН-β1а Генфаксон® и Ребиф® дают противовирусный эффект в отношении вирусов гриппа и герпеса. Генфаксон® оказывает выраженное противовирусное действие в эксперименте *in vitro* на вирус герпеса при профилактической и терапевтической схемах применения.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 3, 5, 6 см. REFERENCES)

1. Бойко А.Н., Рябухина О.В., Давыдовская М.В., Гусев Е.И. Патогенетическое лечение рассеянного склероза. В кн. Гусев Е.И., Завалишин И.А., Бойко А.Н., ред. *Рассеянный склероз*. М.: Реал Тайм; 2011: 371–428.
2. Мейхи Б., ред. *Вирусология. Методы*. М.: Мир; 1988.
4. Ершов Ф.И., Тазулахова Э.Б., Наровлянский А.Н., Миронов А.Н., Меркулов В.А., Ленева И.А. и др. Методические рекомендации по доклиническому изучению специфической противовирусной активности лекарственных средств. В кн.: Миронов А.Н., ред. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*. Часть первая. М.: Гриф и К; 2012: 527–51.
7. Оспельникова Т.П. Роль интерферона при гриппе и генитальном герпесе. *Вопросы вирусологии*. 2013; 5: 4–10.
8. Ершов Ф.И., Оспельникова Т.П. Современный арсенал антигерпетических лекарственных средств. *Инфекции и антимикробная терапия*. 2001; 3 (4): 100–4.
9. Ершов Ф.И., Киселев О.И. *Интерфероны и их индукторы (от молекул до лекарств)*. М.: Гэотар-Медиа; 2005.
10. Машкова С.А. *Терапевтическая эффективность нового индуктора интерферона кагоцела и циклоферона при неосложненном гриппе и остром тонзиллите, протекающем на фоне острых респираторных вирусных инфекций*: Дисс. ... канд. мед. наук. М.; 2004.
11. Оспельникова Т.П. *Системы интерферона и иммунитета при воспалительных гинекологических заболеваниях. Коррекция нарушенных индукторами интерферона*: Дисс. ... канд. мед. наук. М.; 1998.
12. Оспельникова Т.П., Григорян С.С., Ершов Ф.И. Новый подход к отбору иммуноактивных препаратов для лечения. *Медицинская иммунология*. 2001; 3 (2): 332–3.
13. Полонский В.О. *Коррекция системы интерферона и клиническая эффективность препарата кагоцел при гриппе, других ОРВИ и генитальном герпесе*: Дисс. ... канд. мед. наук. М.; 2003.

REFERENCES

1. Boyko A.N., Ryabukhina O.V., Davydovskaya M.V., Gusev E.I. Pathogenetic treatment of multiple sclerosis. In: Gusev E.I., Zavalishin I.A., Boyko A.N., eds. *Multiple Sclerosis. [Rasseyannyi sclerоз]*. Moscow: Real Taym; 2011: 371–428. (in Russian)
2. Meykhi B., ed. *Virology. Methods. [Virusologiya. Metody]*. Moscow: Mir; 1988. (in Russian)
3. Davies H.W., Appleyard G., Cunningham P., Pereira M.S. The use of continuous cell line for the isolation of influenza virus. *Bull. World Health Organ*. 1978; 56 (6): 991–3.
4. Ershov F.I., Tazulakhova E.B., Narovlyanskiy A.N., Mironov A.N., Merkulov V.A., Leneva I.A. et al. Methodical recommendations on pre-clinical study of specific antiviral activity of medicines. In: Mironov A.N., ed. *User Manual for Conducting Pre-clinical Testing of Medicines. [Rukovodstvo po provedeniyu doclineskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv]*. Part one. Moscow: Grif i K; 2012: 527–51. (in Russian)
5. Glantz S.A. *Primer of Biostatistics*. 4th ed. McGraw-Hill; 1998.
6. Wolff T., Ludwig S. Influenza viruses control the vertebrate type I interferon system: factors, mechanisms, and consequences. *J. Interferon Cytokine Res*. 2009; 29 (9): 549–57.
7. Ospel'nikova T.P. The role of interferon in influenza and genital herpes. *Voprosy virusologii*. 2013; 5: 4–10. (in Russian)
8. Ershov F.I., Ospel'nikova T.P. Modern arsenal antiherpes medicines. *Infektsii i antimikrobnaya terapiya*. 2001; 3 (4): 100–4. (in Russian)
9. Ershov F.I., Kiselev O.I. *Interferons and their Inducers. [Interferony i ikh induktory]*. Moscow: Geotar-Media; 2005. (in Russian)
10. Mashkova S.A. *Therapeutic Effectiveness of the New Interferon Inducer Kagocel and Cycloferon in Uncomplicated Influenza and Acute Tonsillitis, Flowing Against the Background of Acute Respiratory Viral Infections*: Diss. Moscow; 2004. (in Russian)
11. Ospel'nikova T.P. *Interferon and Immunity Systems in Case of Inflammatory Gynecology Diseases. Correction of Interferon Inducers*: Diss. Moscow; 1998. (in Russian)
12. Ospel'nikova T.P., Grigoryan S.S., Ershov F.I. A new approach to the selection of immunactive drugs for treatment. *Meditsinskaya immunologiya*. 2001; 3 (2): 332–3. (in Russian)
13. Polonskiy V.O. *Correction of the System of Interferon and Clinical Efficiency of Kagocel in Influenza, Other Viral Infections and Genital Herpes*: Diss. Moscow; 2003. (in Russian)

Поступила 13.03.14

Распространенность и встречаемость инфекций у доноров крови в России

ФГБУ «Национальный медико-хирургический центр им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, 105203, г. Москва

Определяли распространенность и встречаемость инфекций у доноров крови в России в 2010–2012 гг. Расчетный остаточный риск трансфузионного инфицирования в 2012 г. составил для вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) 16,2, вируса гепатита С (ВГС) – 33,7, вируса гепатита В (ВГВ) – 97,1 на 1 млн донаций. В информационной системе службы крови АИСТ необходимо разделить учет положительных результатов скринингового и подтверждающего тестов на маркеры инфекций. Высокий риск трансфузионного инфицирования ВИЧ, ВГВ и ВГС стимулирует активное внедрение мер повышения безопасности крови: отбора доноров, повышения чувствительности методов скрининга инфекций, инактивации патогенов в компонентах крови и рационального назначения гемотрансфузий в клинике.

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

Для цитирования: Вопросы вирусологии. 2015; 60 (5): 29–31.

Gubanova M.N., Madzaev S.R., Zhiburt E.B.

Prevalence and incidence of the infections among blood donors in Russia

N.I. Pirogov National Medical Surgical Center, Moscow, Russia

The prevalence and incidence of the infections among Russian blood donors in 2010-2012 was determined. The estimated residual risk of the transfusion infection was as follows: for HIV – 16.2, HCV – 33.7; HBV – 97.1 per 1 million donations. In the information system of the blood service AIST data should be divided based on the positive results of screening and confirmatory tests for markers of the infection. High risk of the transfusion infection with HIV, hepatitis B and C stimulates the active implementation of the measures for increasing the safety of blood: the selection of donors, increasing the sensitivity of infections screening methods, inactivation of pathogens in blood components, and transfusion management appointment at the clinic.

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

Received 28.10.13

For correspondence: Evgeniy Zhiburt, MD, PhD, DSc, prof.; e-mail: ezhiburt@yandex.ru
Citation: Voprosy virusologii. 2015; 60(5): 29–31. (In Russ.)

Введение

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

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

Встречаемость, инцидентность – это количество случаев заболевания, возникших в течение определенного времени в определенной популяции, в трансфузиологии – выявление заболеваний у регулярных доноров [6].

Остаточный риск передачи гемотрансмиссивных инфекций рассчитывают как произведение продолжительности серонегативного периода инфекции и встречаемости [7]. По состоянию на 08.06.15 указанная статья G.V. Schreiber и соавт. процитирована в 853 публикациях.

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

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

В Астане расчетный остаточный риск трансфузионного инфицирования (ОРТИ) составил для вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) 1,2, вируса гепатита С (ВГС) 137,7, вируса гепатита В (ВГВ) 125,4 на 1 млн донаций [10].

Представляет интерес определить распространенность и встречаемость инфекций у российских доноров, а также ОРТИ.

Материалы и методы

В службе крови России создана информационная система, основанная на программе АИСТ. Разработчик программы А.И. Болотов специально для настоящего исследования создал приложение к программе, позволяющее подсчитать количество выявленных случаев инфекции у первичных и повторных доноров, за что авторы статьи приносят Андрею Исааковичу глубокую благодарность.

В исследовании приняли участие 48 организаций службы крови, представившие результаты обследования 773 185 доноров крови и ее компонентов в 2010–2012 гг.

Образец крови от каждой донации обследовали на маркеры 4 гемотрансмиссивных инфекций: ВИЧ (антиген р24 ВИЧ-1 и антитела к ВИЧ-1/2), ВГВ (поверхностный антиген ВГВ, HBsAg), ВГС (антитела к ВГС) и сифилиса (антитела к бледной трепонеме).

Доля доноров, включенных в исследование, составила 9–18% аналогичной категории доноров всей страны [11–13] (табл. 1).

Таблица 1

Доля доноров крови, включенных в исследование

Год	Первичные доноры			Повторные доноры		
	Россия		исследование	Россия		исследование
	абс.	абс.	%	абс.	абс.	%
2010	644 209	63 809	9,91	1108 627	191 007	17,23
2011	569 228	68 193	11,98	1099 547	193 942	17,64
2012	589 516	69 549	11,80	1016 252	186 685	18,37

При расчете встречаемости инфекций учли, что средняя частота донаций повторных доноров в России составляет 2,4 раза в год [13].

Распространенность рассчитывали на 100 тыс. доноров.

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

Результаты и обсуждение

Известно, что АИСТ не формирует установленную [14] российскую отчетную форму организации, заготавливающей кровь (№ 39) [15].

На результаты исследования также могло повлиять различие российских правил [16], в которых отсутствует алгоритм выбраковки крови и отвода донора. ВОЗ рекомендует браковать кровь после получения повторного положительного результата скрининга, а донора отводить по положительному результату подтверждающего теста [17].

Высокая частота регистрации ВИЧ-положительных результатов у доноров, включенных в исследование, может быть обусловлена учетом результатов скрининга, а не подтверждающего теста (табл. 2).

Показатели распространенности и встречаемости инфекций у доноров, включенных в исследование, представлены в табл. 3–5.

ОРТИ ВГВ, ВГС и ВИЧ являются основными объективными количественными показателями вирусной безопасности службы крови. Оценки ОРТИ ВГС, рассчитанные на основе анализа данных обследования (скрининга) доноров крови, мониторинга реципиентов множественных трансфузий и контрольного тестирования плазмы крови для производства ее препаратов, аналогичны полученным в настоящем исследовании и составляют 940, 1600 и 630 на 1 млн кроводач, трансфузий и единиц плазмы соответственно (табл. 6) [19].

Расчитанные классическим способом ОРТИ в США составили для ВИЧ 2,03, ВГС – 9,70, ВГВ – 15,83 на 1 млн донаций [7].

По нашим данным, ОРТИ при переливании крови доноров в России для ВИЧ, ВГВ и ВГС соответственно в 8,0, 3,5 и 6,1 раза выше, чем в США.

Таблица 2

Доля инфекций, зарегистрированных у доноров, включенных в исследование

Инфекция	2010 г.			2011 г.			2012 г.		
	Россия		исследование	Россия		исследование	Россия		исследование
	абс.	абс.	%	абс.	абс.	%	абс.	абс.	%
ВИЧ	1963	489	24,91	1933	555	28,71	1920	393	20,47
ВГВ	11 094	631	5,69	9128	886	9,71	7585	734	9,68
ВГС	19 980	2438	12,20	16 554	2354	14,22	12 424	2086	16,79
Сифилис	11 893	1625	13,66	9840	1642	16,69	8238	1398	16,97

Таблица 3

Инфекции у доноров крови в России в 2010 г.

Инфекция	Первичные (n = 63 809)		Повторные (n = 191 007)	
	абс.	распространенность	абс.	встречаемость
ВИЧ	231	362,0	258	324,24
ВГВ	514	805,5	117	147,12
ВГС	1822	2855,4	616	774
Сифилис	1140	1786,6	485	609,36
Всего...	3707	5809,5	991	1854,5

Таблица 4

Инфекции у доноров крови в России в 2011 г.

Инфекция	Первичные (n = 68 193)		Повторные (n = 193 942)	
	абс.	распространенность	абс.	встречаемость
ВИЧ	221	324,1	334	413,28
ВГВ	672	985,4	214	264,72
ВГС	1787	2620,5	567	701,76
Сифилис	1187	1740,6	455	563,04
Всего...	3867	5670,7	1140	1942,8

Таблица 5

Инфекции у доноров крови в России в 2012 г.

Инфекция	Первичные (n = 69 549)		Повторные (n = 186 685)	
	абс.	распространенность	абс.	встречаемость
ВИЧ	167	240,1	226	290,64
ВГВ	572	822,4	162	208,32
ВГС	1613	2319,2	473	608,16
Сифилис	1033	1485,3	365	469,2
Всего...	3385	4867,1	861	1576,1

Таблица 6

ОРТИ по результатам исследования в 2012 г.

Вирус	Период окна, дни	Встречаемость	ОРТИ на 1 млн донаций
ВИЧ	20,3*	290,64	16,2
ВГВ	59**	208,32	33,7
ВГС	58,3*	608,16	97,1

Примечание. * – по данным работы [18]; ** – по данным работы [7].

ОРТИ ВГВ в Казахстане в 3,7 раза, ВГС в 1,4 раза выше, чем в России. ОРТИ ВИЧ, напротив, в России в 13,4 раза выше, чем в Казахстане [10], что еще раз подтверждает возможность ошибочной автоматизированной регистрации российской информационной системой службы крови ВИЧ-ложноположительных результатов скрининга донорской крови.

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

Выводы

1. Впервые определены распространенность и встречаемость гемотрансмиссивных инфекций у доноров крови в России. Эти показатели целесо-

образно ввести в официальную отчетность организаций российской службы крови.

2. В российских нормативных документах нужно внедрить критерии выбраковки крови и отвода донора по результатам скрининга маркеров гемотрансмиссивных инфекций.

3. В информационной системе службы крови АИСТ необходимо разделить учет положительных результатов скринингового и подтверждающего тестов на маркеры инфекций.

4. Высокий ОРТИ ВИЧ, ВГВ и ВГС стимулирует активное внедрение мер повышения безопасности крови: отбора доноров, повышения чувствительности методов скрининга инфекций, инактивации патогенов в компонентах крови и рационального назначения гемотрансфузий в клинике.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 6–8, 18 см. REFERENCES)

1. Жибурт Е.Б., Бельгесов Н.В., Ващенко Т.Н., Бондаренко И.Г., Токмаков В.С., Василюк В.Б. Аланинаминотрансфераза – суррогатный маркер вирусного гепатита. *Вопросы вирусологии*. 1995; 40 (1): 25–7.
2. Жибурт Е.Б. Повышение вирусной безопасности препаратов крови. *Вопросы вирусологии*. 2004; 49 (4): 46–8.
3. Жибурт Е.Б. Аланинаминотрансфераза – суррогатный маркер вирусного гепатита. *Вопросы вирусологии*. 2005; 50 (6): 18–20.
4. Жибурт Е.Б., Губанова М.Н., Ключева Е.А., Коденев А.Т., Шестаков Е.А. Особенности национального скрининга маркеров инфекций в донорской крови. *Вестник Росздравнадзора*. 2010; 1: 75–9.
5. Зубкова Н.В., Филатова Е.В., Зубов С.В. Серологические и молекулярно-генетические маркеры вируса гепатита С у инфицированных доноров. *Вопросы вирусологии*. 2010; 55 (5): 34–6.
9. Жибурт Е.Б., Караваев А.В., Вайсман Д.А., Мадзаев С.Р. Особенности национальной оценки риска передачи инфекций при переливании крови. *Вестник Росздравнадзора*. 2013; 1: 75–7.
10. Скорикова С.В., Буркитбаев Ж.К., Савчук Т.Н., Жибурт Е.Б. Распространенность ВИЧ-, ВГС-, ВГВ-инфекций у доноров крови Астаны. *Вопросы вирусологии*. 2015; (1): 34–6.
11. Селиванов Е.А., Данилова Т.Н., Дегтерева И.Н., Григорьян М.Ш. Деятельность службы крови России в 2010 году. *Трансфузиология*. 2011; 12 (4): 3–14.
12. Селиванов Е.А., Четчин А.В., Григорьян М.Ш., Makeev A.B., Воробей Л.Г. Современное состояние донорства крови и ее компонентов в Российской Федерации. *Трансфузиология*. 2012; 13 (3): 3–13.
13. Четчин А.В., Григорьян М.Ш., Makeev A.B., Воробей Л.Г., Данильченко В.В. Служба крови Российской Федерации в 2012 году. *Трансфузиология*. 2013; 14 (3): 3–14.
14. Приказ Минздрава РФ от 20.11.1996 № 384 «Об утверждении отраслевой статистической отчетности». М.; 1996.
15. Бахметьев А.В., Свекло Л.С., Автономов С.Л., Малютин А.В., Купченко М.М. «АИСТ» с одним крылом. *Вестник службы крови России*. 2012; 1: 13–4.
16. Постановление Правительства РФ от 31 декабря 2010 г. № 1230 «Об утверждении правил и методов исследований и правил отбора образцов донорской крови, необходимых для применения и исполнения технического регламента о требованиях безопасности крови, ее продуктов, кровезамещающих растворов и технических средств, используемых в трансфузионно-инфузионной терапии». М.; 2010.
17. Всемирная организация здравоохранения. *Скрининг донорской крови на гемотрансмиссивные инфекции. Рекомендации Всемирной организации здравоохранения*. Женева; 2010.
19. Куликов С.М., Гармаева Т.Ц., Зингерман Б.В., Филатов Ф.П., Судариков А.Б., Михайлова Е.А. и др. Вирусная безопасность гемотрансфузии и методы ее оценки. *Гематология и трансфузиология*. 2011; 53 (4): 3–5.

REFERENCES

1. Zhiburt E.B., Bel'gesov N.V., Vashchenko T.N., Bondarenko I.G., Tokmakov V.S., Vasilyuk V.B. Alanin aminotransferase as viral hepatitis surrogate marker. *Voprosy virusologii*. 1995; 40 (1): 25–7. (in Russian)
2. Zhiburt E.B. Increasing of blood products viral safety. *Voprosy virusologii*. 2004; 49 (4): 46–8. (in Russian)
3. Zhiburt E.B. Alanin aminotransferase as viral hepatitis surrogate marker. *Voprosy virusologii*. 2005; 50 (6): 18–20. (in Russian)
4. Zhiburt E.B., Gubanova M.N., Klyueva E.A., Kodenev A.T., Shestakov E.A. Features of the national screening markers of infections in donated blood. *Vestnik Roszdravnadzora*. 2010; 1: 75–9. (in Russian)
5. Zubkova N.V., Filatova E.V., Zubov S.V. Serological and molecular genetic markers of hepatitis C virus from infected donors. *Voprosy virusologii*. 2010; 55 (5): 34–6. (in Russian)
6. Enticott J.C., Kandane-Rathnayake R.K. Prevalence versus incidence. *Transfusion*. 2012; 52 (9): 1868–70.
7. Schreiber G.B., Busch M.P., Kleinman S.H., Korelitz J.J. The risk of transfusion-transmitted viral infections. The Retrovirus Epidemiology Donor Study. *N. Engl. J. Med.* 1996; 334 (26): 1685–90.
8. Directive 2002/98/EC of the European Parliament and of the Council of 27 January 2003 setting standards of quality and safety for the collection, testing, processing, storage and distribution of human blood and blood components and amending Directive 2001/83/EC. The European Parliament and the Council of the European Union; 2003.
9. Zhiburt E.B., Karavaev A.V., Vaysman D.A., Madzaev S.R. Features of national risk assessment of transmission of infection through blood transfusion. *Vestnik Roszdravnadzora*. 2013; 1: 75–7. (in Russian)
10. Skorikova S.V., Burkitbaev Zh.K., Savchuk T.N., Zhiburt E.B. Prevalence and incidence of infections among blood donors in Astana. *Voprosy virusologii*. 2015; (1): 34–6. (in Russian)
11. Selivanov E.A., Danilola T.N., Degtereva I.N., Grigor'yan M.Sh. The activity of the blood of Russia in 2010. *Transfuziologiya*. 2011; 12 (4): 3–14. (in Russian)
12. Selivanov E.A., Chechetkin A.V., Grigor'yan M.Sh., Makeev A.B., Vorobey L.G. Sparrow Modern state of the donation of blood and blood components in the Russian Federation. *Transfuziologiya*. 2012; 13 (3): 3–13. (in Russian)
13. Chechetkin A.V., Grigor'yan M.Sh., Makeev A.B., Vorobey L.G., Danil'chenko V.V. Blood Service of the Russian Federation in 2012. *Transfuziologiya*. 2013; 14 (3): 3–14. (in Russian)
14. Order of the Ministry of Health of the Russian Federation of 20.11.1996 № 384 “On approval of the sectoral statistical reporting”. Moscow; 1996. (in Russian)
15. Bakhmet'ev A.V., Sveklo L.S., Avtonomov S.L., Malyutina A.V., Kupchenko M.M. “AIST” with one wing. *Vestnik sluzhby krovi Rossii*. 2012; 1: 13–4. (in Russian)
16. Government Decree of 31 December 2010 № 1230 “On approval of rules and regulations, and research methods for sampling of blood required for the application and enforcement of technical regulations on the requirements of the safety of blood and its products, blood substitute solutions and hardware used in transfusion- infusion therapy”. Moscow; 2010. (in Russian)
17. WHO. *Blood Donor Screening for Blood-transmitted Disease. WHO Guidelines [Skrining donorskoy krovi na gemotransmissivnye infektsii. Rekomendatsii Vsemirnoy organizatsii zdravookhraneniya]*. Zheneva; 2010. (in Russian)
18. Busch M.P., Glynn S.A., Stramer S.L., Strong D.M., Caglioti S., Wright D.J. et al. A new strategy for estimating risks of transfusion-transmitted viral infections based on rates of detection of recently infected donors. *Transfusion*. 2005; 45 (2): 254–64.
19. Kulikov S.M., Garmayeva T.Ts., Zingerman B.V., Filatov F.V., Sudarikov A.B., Mikhaylova E.A. et al. Viral safety of blood transfusions and its evaluation methods. *Gematologiya i transfuziologiya*. 2011; 53 (4): 3–5. (in Russian)

Поступила 28.10.13

Тюлько Ж.С.¹, Якименко В.В.²

Стратегия использования синонимичных кодонов в кодирующих последовательностях вируса клещевого энцефалита

¹ГБОУ ВПО «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 644043, г. Омск; ²Лаборатория арбовирусных инфекций отдела природно-очаговых вирусных инфекций ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора, 644080, г. Омск

Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) представлен тремя основными генотипами, имеющими широкое географическое распространение, и несколькими генотипами с локальным распространением. В представленной работе анализируются закономерности использования кодонов основными генотипами ВКЭ, т. е. изучается стратегия кодирования белков. С этой целью для полноразмерных кодирующих последовательностей ВКЭ определяли показатели относительного использования синонимичных кодонов, которые в дальнейшем изучали методами дискриминантного анализа. В результате был сделан вывод об имеющихся различиях в стратегиях кодирования различных генотипов ВКЭ.

Ключевые слова: вирус клещевого энцефалита; показатель относительного использования синонимичных кодонов; дискриминантный анализ; стратегия кодирования белков.

Для цитирования: Вопросы вирусологии. 2015; 59 (6): 32–37.

Tyulko J. S.¹, Yakimenko V. V.²

Strategy of synonymous codon usage in encoding sequences of the tick-borne encephalitis virus

¹Omsk State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, 644043, Omsk, Russia; ²Omsk Scientific-Research Institute of Natural Focal Infections, Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 644080, Omsk, Russia

Three basic genotypes of the tick-borne encephalitis virus have wide geographical spread; several strains have local spread. In this work, we studied the strategy of the synonymous codon usage in basic genotypes by means of calculation of relative synonymous codon usage values for each complete encoding sequences of viruses. Then, these values were analyzed by methods of the discriminant analysis. In the result of this work the conclusion about the available distinctions in the strategy of synonymous codon usage of various genotypes tick-borne encephalitis viruses was made.

Key words: tick-borne encephalitis virus; relative synonymous codon usage values; discriminant analysis; strategy of protein encoding.

Received 06.02.14

For correspondence: Janna Tyulko, candidate of biological Sciences ; e-mail: tjs@omsk-osma.ru
Citation: Voprosy virusologii. 2015; 60(6): 32–37. (In Russ.)

Введение

В последнее десятилетие прошлого века в целом сложились представления о генетическом разнообразии вируса клещевого энцефалита (ВКЭ), имеющего 3 основных генотипа с широким географическим распространением, и несколько генотипов с локальным распространением [1, 2]. Наиболее широкое распространение характерно для сибирского генотипа (субтипа) ВКЭ, ареал которого охватывает значительную часть территории Северной Евразии. Как вирусы данного субтипа, так и другие широко распространенные варианты в пределах своего ареала являются сочленами экосистем, характеризующихся различной структурой. Один из важнейших вопросов в экологии вирусов – каким образом возбудитель адаптируется к смене хозяев с различным уровнем организации (холоднокровные членистоногие – теплокровные позвоночные) и различным систематическим положением. В настоящее время появляется информация о хозяинзависимых изменениях в структуре генома ВКЭ [3]. Другая проблема – причины разнообразия биологических свойств вируса (в том числе нейровирулентности) сибирского генотипа в разных частях его ареала. Наличие связи патогенных свойств

ВКЭ с принадлежностью к различным генотипам дискуссионно, по крайней мере многообразие тяжести и клинического течения заболеваний КЭ характерны для разных генотипов [4, 5]. Одно из направлений при решении данных вопросов – изучение системы кодирования генома вирусов, частью которой является стратегия кодирования белка, под которой здесь понимаются закономерности использования кодонов в соответствующих кодирующих последовательностях ДНК и РНК [6–8]. Такое определение стратегии кодирования, обычно используемое в русскоязычной литературе, по нашему мнению, является более точным по сравнению с более широким англоязычным толкованием этого понятия, которое включает не только особенности кодирования аминокислот, но и организацию самой кодирующей последовательности (расположение рамок считывания, особенности механизмов, управляющих считыванием, и т. д.).

Исследования кодирующих генетических последовательностей различных организмов показали, что использование в них синонимичных кодонов не является случайным [6, 7, 9–12] и зависит от влияния различных факторов. Например, высказывались предположения о

том, что у разных флавивирусов использование кодонов связано с типом хозяев (позвоночные или беспозвоночные) в большей степени, чем с их эволюционной историей [10, 13]. Кроме того, было показано, что даже у одного и того же вируса (грипп А) стратегия использования кодонов разными его подтипами может различаться и зависеть от типичных хозяев данного подтипа [7]. Было также отмечено, что тип использования отдельных кодонов может быть связан с наличием отбора и эффективностью трансляции как у разных организмов, так и в различных тканях одного и того же организма [7, 11, 14]. Также выдвигались предположения о связи между предпочтениями в использовании кодонов и вирулентностью вируса [15] и о возможности терапевтического измене-

ния состава транспортной РНК (тРНК) хозяина для снижения скорости производства вирусных белков [16].

Во многих работах, посвященных стратегии кодирования, исследуется смещение нуклеотидного состава, чаще всего CG-содержание, как суммарное, так и в отдельных позициях кодона [6, 11]. GC-смещение в третьей позиции кодона обычно интерпретируют как результат действия отбора на уровне нуклеотидной последовательности [6, 10]. Такое смещение было обнаружено у флавивирусов, в том числе у ВКЭ [6, 8, 10], что свидетельствует о наличии отбора в пользу CG-содержащих кодонов и, возможно, о существовании некоторой стратегии в использовании синонимичных кодонов.

В целом использование кодонов не случайно [6, 7, 12, 17].

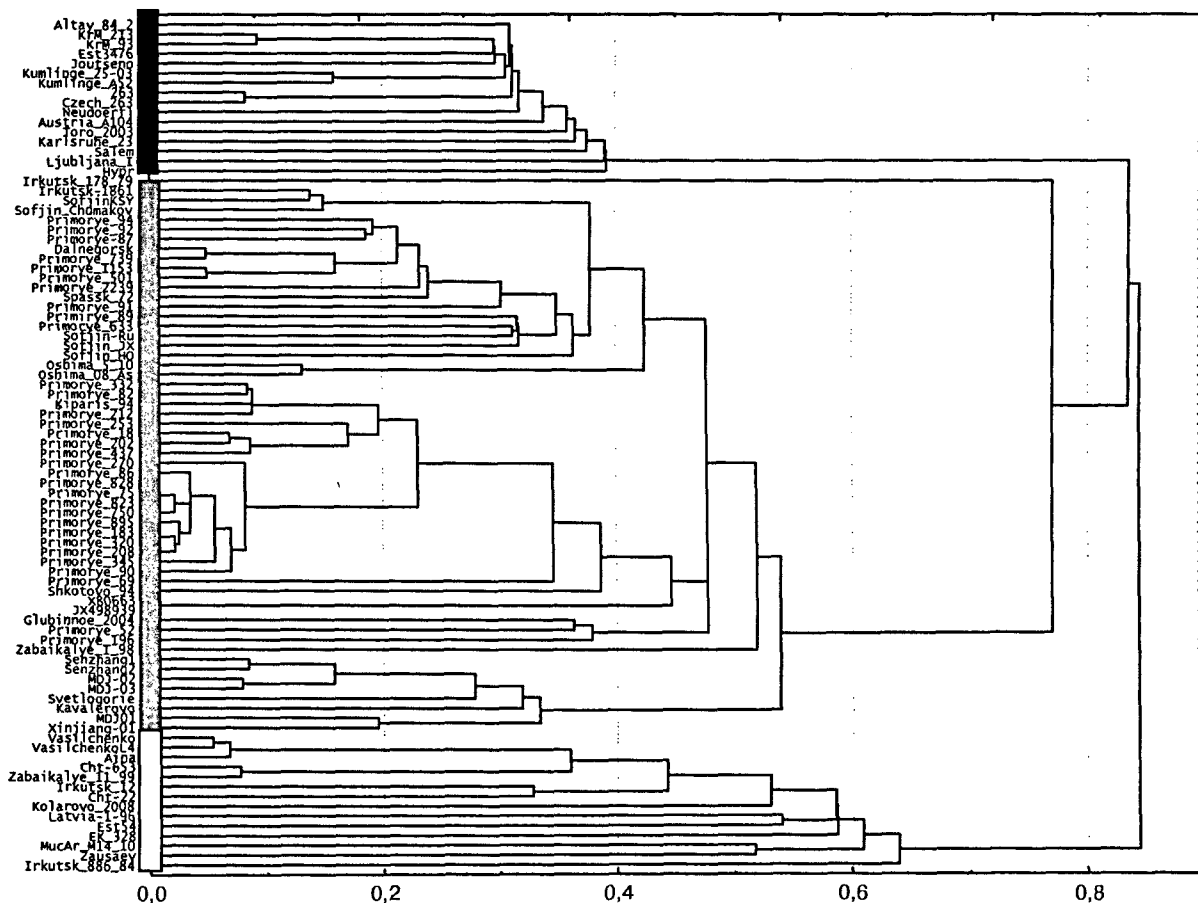


Рис. 1. Схема, построенная на основании сходства в использовании синонимичных кодонов последовательностями ВКЭ.

Схема построена с помощью групповых методов анализа программы Statistica (Joining (tree-clustering)) и ее команд построения иерархических деревьев. По горизонтали указаны значения евклидовых расстояний. Вдоль вертикальной оси черным прямоугольником отмечены изоляты, относящиеся к европейскому генотипу, серым – к дальневосточному, белым – к сибирскому. Обозначения последовательностей на графе соответствуют последовательностям из банка данных EMBL с кодами доступа, указанными в скобках: 205g (DQ989336), 263 (U27491), Aina (JN003206), Altay_84_2 (HM120875), Amberg (GQ266392), Austria_A104 (KF151173), Cht-22 (JN003208), Cht-653 (JN003207), Czech_263 (DQ153877), Dalnegorsk (FJ402886), EK_328 (DQ486861), Est3476 (GU183383), Est54 (GU183384), Glubinnoe_2004 (DQ862460), Hypr (U39292), Irkutsk_12 (JN003209), Irkutsk_178_79 (EF469661), Irkutsk_886_84 (EF469662), Irkutsk-1861 (JN003205), Joutseno (GU183381), JX498939 (JX498939), Karlsruhe_23 (AM600965), Kavalerovo (FJ402885), Kiparis_94 (JQ825146), Kolarovo_2008 (FJ968751), KrM_213 (HM535610), KrM_93 (HM535611), Kumlinge_25-03 (GU183379), Kumlinge_A52 (GU183380), Latvia-1-96 (GU183382), Ljubljana_1 (JQ654701), MDJ-01 (AY217093), MDJ01 (JQ650522), MDJ-02 (JF316707), MDJ-03 (JF316708), Primorye_18 (GQ228395), Primorye_183 (JQ825153), Primorye_196 (JQ825155), Primorye_202 (JQ825157), Primorye_208 (JQ825158), Primorye_212 (EU816450), Primorye_2239 (HM859895), Primorye_253 (EU816451), Primorye_270 (EU816452), Primorye_320 (JQ825160), Primorye_332 (AY169390), Primorye_345 (JQ825161), Primorye_437 (JQ825162), Primorye_501 (HQ901367), Primorye_52 (JQ825154), Primorye_633 (HM859894), Primorye_691 (EU816453), Primorye_739 (JQ825156), Primorye_75 (JQ825152), Primorye_750 (JQ825163), Primorye_82 (JQ825148), Primorye_823 (JQ825164), Primorye_828 (JQ825144), Primorye_86 (EU816455), Primorye_895 (JQ825145), Primorye_90 (FJ997899), Primorye_91 (JQ825150), Primorye_92 (HQ201303), Primorye_941 (EU816454), Primorye-87 (JQ825149), Salem (FJ572210), Senzhang1 (AY182009), Senzhang2 (JQ650523), Shkotovo_94 (JQ825147), Sofjin_Chumakov (KC806252), Sofjin_HO (AB062064), Sofjin_JX (JX498940), SofjinKSY (JF819648), Sofjin-Ru (JN229223), Spassk_72 (JQ825151), Svetlogorie (GU121642), Toro_2003 (DQ401140), Vasilchenko (AF069066), Vasilchenko (L40361), Xinjiang-01 (JX534167), Zabaikalye_1_98 (JX968560), Zabaikalye_11_99 (KC414090), Zausaev (AF527415).

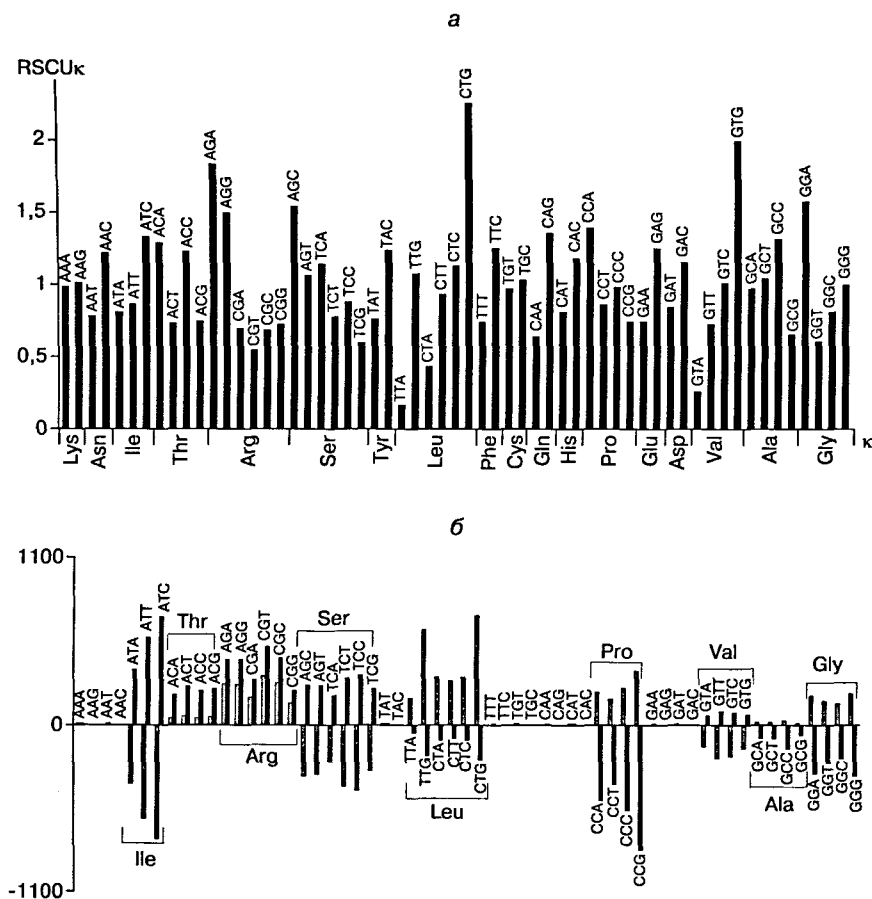


Рис. 2. Использование синонимичных кодонов в геноме ВКЭ.

a – средние значения $RSCU_k$. Высота столбцов на рисунке соответствует средним значениям $RSCU_k$, рассчитанным для каждого кодона k по всем анализируемым последовательностям. У вершины каждого столбца указан нуклеотидный состав кодона k . Вдоль горизонтальной оси обозначены аминокислоты, кодируемые каждым кодоном; *b* – значения использования отдельных кодонов для дискриминации. По вертикали отложены значения стандартизованных коэффициентов канонических дискриминантных функций f_1 и f_2 : серые столбцы – f_1 , черные – f_2 . Синонимичные кодоны сгруппированы вдоль горизонтальной оси в соответствии с тем, какую аминокислоту они кодируют (обозначения соответствующих аминокислот указаны у вершин фигурных скобок).

Это явление, проявляющееся на уровне синонимичных замен, обычно называют смещением в использовании кодонов (codon usage bias – CUB). Главными эволюционными факторами, приводящими к возникновению CUB, считаются смещение в нуклеотидном составе последовательности (возникающее по многим причинам) и предпочтение некоторых кодонов, связанное с различиями во внутриклеточном содержании тРНК, специфичных для этих кодонов (трансляционное смещение) [6, 9, 18]. С 80-х годов прошлого века разработано достаточное количество математических методов, позволяющих выявить наличие смещения в использовании кодонов [6, 7, 11, 12, 17]. Эти методы активно применяются для анализа вирусных последовательностей, и ограничением к их применению в случае ВКЭ служило лишь недостаточное количество секвенированных полноразмерных кодирующих последовательностей большинства генотипов этого вируса, так как анализ коротких последовательностей может привести к ошибкам, особенно в случае редко используемых аминокислот [6, 11]. В настоящее время это затруднение постепенно устраняется, и в данной работе была предпринята попытка выявления закономерностей использования кодонов, т. е. изучения стратегии кодирования белков у ВКЭ. Для этого определяли частотные характеристики использования кодонов,

такие как показатели относительного использования синонимичных кодонов для каждой полноразмерной кодирующей последовательности ВКЭ. В результате было показано, что различные генотипы ВКЭ неодинаково используют значительную часть синонимичных кодонов, т. е. их стратегии кодирования различаются.

Материалы и методы

В работе анализировали все полноразмерные нуклеотидные последовательности ВКЭ различных генотипов из банка данных EMBL, а также кодирующие последовательности ВКЭ длиной более 9000 оснований (по состоянию банка EMBL на сентябрь 2013 г. всего 87 последовательностей, коды доступа приведены в подписи к рис. 1). Из рассмотрения были исключены последовательности, включающие коды IUPAC, предполагающие неоднозначное кодирование.

Для каждой кодирующей последовательности ВКЭ из выборки рассчитывали показатели относительного использования синонимичных кодонов ($RSCU_k$ – показатель относительного использования каждого кодона k ; стоп-кодона и кодоны, кодирующиеся одним триплетом, исключались из рассмотрения). Показатель $RSCU_k$ обычно применяется для проведения корректных сравнений частот использования синонимичных кодонов в различных сериях [9, 11, 19, 20]. Он помогает оценить неслучайность появления конкретного кодона k при кодировании соответствующей аминокислоты, а также сравнить схемы кодирования в разных генах. Большие значения $RSCU_k$ соответствуют более частому использованию кодона.

Показатели $RSCU_k$ были рассчитаны с помощью программ, реализованных на базе пакета статистического анализа R. Далее рассчитанные значения показателя $RSCU_k$ для всех типов кодонов нуклеотидной последовательности каждого вируса сравнивали с аналогичными значениями с помощью модулей «Групповой анализ» (Cluster analysis) и «Общие модели дискриминантного анализа» (General discriminant analysis) программы Statistica 6.

Результаты и обсуждение

Анализ рассчитанных значений $RSCU_k$ для кодирующих последовательностей ВКЭ позволил установить, что в пределах одного генотипа наблюдается большее сходство в использовании синонимичных кодонов, чем между разными генотипами ВКЭ, независимо от способа изоляции штамма вируса и его последующего культивирования. Это иллюстрирует схема (см. рис. 1), построенная по результатам сравнения значений $RSCU_k$ для кодонов нуклеотидной последовательности каждого вируса с аналогичными значениями остальных вирусов. Сравнение проводили с помощью модуля «Групповой анализ» программы Statistica (Joining (tree-clustering))

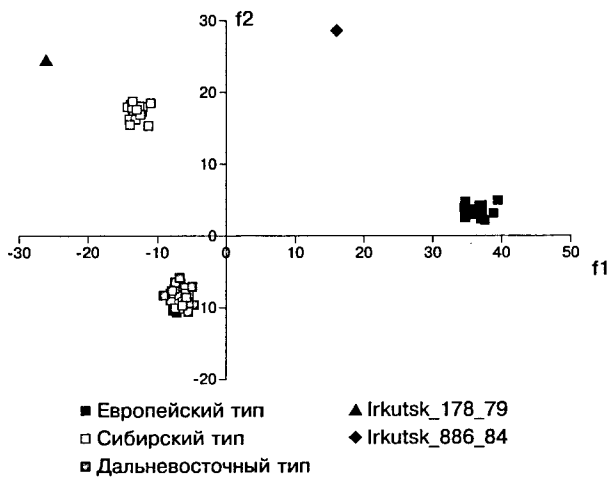


Рис. 3. Диаграмма рассеяния значений дискриминантных функций, рассчитанных для геномных последовательностей ВКЭ.

По горизонтали отложены значения дискриминантной функции f_1 , по вертикали – f_2 . Каждый маркер на схеме соответствует определенной последовательности из банка данных: черным отмечены случаи, относящиеся к европейскому генотипу, серым – к дальневосточному, белым – к сибирскому.

с использованием различных метрик для расчета расстояний (данные не приведены), но топология дерева сравнительно с приведенной на рис. 1 при этом не менялась.

Схема на рис. 1 показывает, что стратегии кодирования у различных генотипов ВКЭ различаются, так как при ее построении мы не закладывали эволюционных моделей при расчете дистанций и анализировали только частотные характеристики использования синонимичных кодонов, а не их расположение в последовательности. Однако разбиение на кластеры в полученной схеме соответствует разделению вирусов на подтипы сибирский, дальневосточный и европейский. Данный результат позволяет предположить, что отбор конкретных синонимичных кодонов может быть важной частью процесса микроэволюции ВКЭ, который отражается в структуре филогении вируса. При этом, как показал анализ схем, построенных для наборов гомологичных фрагментов, вырезанных из кодирующих последовательностей, использованных для схемы на рис. 1, вид схемы не менялся в зависимости от того, какие координаты имел набор использованных гомологичных фрагментов в геноме ВКЭ, если длина фрагментов была не меньше 1000 нуклеотидов. При меньших длинах начинали сказываться особенности аминокислотного состава, кодируемого последовательностями разных генов (например, случаи редко используемых аминокислот [6, 11]). Такой результат тоже предполагает наличие однотипного отбора кодонов, не связанного со структурой конкретного гена, при кодировании всего полипротеина в рамках каждого генотипа.

Следующим шагом был анализ того, как именно использует синонимичные кодоны каждый генотип. Общую картину использования кодонов у ВКЭ можно получить, рассчитав по всем анализируемым последовательностям разных генотипов средние значения $RSCU_k$ для каждого кодона k (рис. 2, а). Схожая схема использования кодонов с некоторыми вариациями в случае отдельных кодонов наблюдается и при расчете средних значений $RSCU_k$ для каждого генотипа в отдельности. Синонимичные кодоны, кодирующие одну и ту же аминокислоту, используются неодинаково вне зависимо-

сти от того, сколько синонимичных кодонов ей соответствует (см. рис. 2, а). Неодинаковое использование синонимичных кодонов может быть вызвано разными причинами, и однозначный вывод о существовании значимых различий в стратегии кодирования между всеми генотипами сделать невозможно. Важно понять, могут ли различия в использовании конкретных кодонов быть связаны с различиями в общей стратегии кодирования генотипов или они вызваны случайными причинами либо действиями независимых факторов. Например, низкое значение $RSCU_{TTA}$ (см. рис. 2, а) с большой вероятностью объясняется тем, что TTA – претерминальный кодон, а отбор против таких кодонов выявлен у многих организмов [6, 20].

Дискриминантный анализ позволяет изучать различия между двумя и более группами объектов по нескольким переменным одновременно [21, 22], а также интерпретировать межгрупповые различия и определять вклад каждой переменной при классификации объектов. Поэтому имеет смысл применить его для анализа наблюдаемых различий в частотных характеристиках использования синонимичных кодонов у каждого генотипа. При этом каждая последовательность выступает в роли объекта, генотип – в роли группы объектов, а значения $RSCU_k$ – в роли значений переменных. Определив в ходе такого анализа канонические дискриминантные функции (f_1 и f_2), число которых на единицу меньше числа выделяемых групп, мы можем оптимально разделить группы и определить вклад каждой переменной в дискриминацию. Стандартизованные коэффициенты функций f_1 и f_2 позволяют оценить как вклады, так и направления вкладов переменных в каждую каноническую функцию, так как они рассчитаны по стандартизованным переменным и принадлежат к абсолютной шкале измерений [21]. Как видно из рис. 2, б, различия в использовании кодонов AAA, AAG, AAT, AAC, TAT, TAC, TTT, TTC, TGT, TGC, CAA, CAC, GAG, GAT, GAA, GAG, GAT, GAC не вносят вклада в дискриминацию генотипов, в то время как различия в использовании остальных кодонов позволяют провести такую дискриминацию. Эти значимые для дискриминации кодоны соответствуют аминокислотам Ile, Thr, Arg, Ser, Leu, Pro, Val, Ala, Gly. Как и следовало ожидать, наибольшее значение для дискриминации имеют кодоны аминокислот с наибольшей вырожденностью. Ранее эти аминокислоты (кроме Pro) уже упоминались как генотипспецифические признаки в отдельных позициях вирусной последовательности [23]. В этой же работе упоминалось наличие генотипических различий на уровне синонимичных мутаций в положении третьего нуклеотида кодона.

На рис. 3 представлена диаграмма рассеяния для значений дискриминантных функций, рассчитанных для каждой последовательности. Видно, что все случаи хорошо разделяются на 3 группы в соответствии с тремя генотипами, причем функция f_1 вносит основной вклад в дискриминацию европейского субтипа от дальневосточного и сибирского, а функция f_2 позволяет наиболее достоверно разделить сибирский и дальневосточный субтипы. Из рис. 2, б следует, что наибольший вклад в дискриминантную функцию f_1 вносят кодоны CTG, TTG, CCG, CGT, CTC, CTA, CTT, CGC, AGA, AGG, CCC, CCA, GGG, присутствие которых увеличивает ее значения (на рис. 3 это соответствует смещению вправо к европейским субтипам), и кодоны GTC, GTT, TCA, TCG, AGT, AGC, ATA, TCT, TCC, ATT, ATC, присутствие которых уменьшает ее значения (на рис. 3 это соответствует смещению влево к сибирским и дальневосточным субтипам).

В случае функции f_2 наибольший вклад в увеличение ее значения (на рис. 3 это соответствует смещению

вверх к сибирским субтипам) вносят кодоны АТС, АТТ, СGT, СGC, АGА, АGГ, АТА, ТСС, ТСТ, СGА, АGС, АСТ, АGТ, ТСG, АСG, СGГ, АСС, в уменьшение – кодоны ТТG, GGC, СТG, GGT, GGA, GGG, ССТ, ССА, ССС, СССG.

Качество классификации (см. рис. 3), построенной по результатам проведенного дискриминантного анализа, оказалось хорошим (λ Уилкса = 0,0081). Локализация на рис. 3 включенных в кросс-проверочную выборку геновариантов Irkutsk_886_84 и Irkutsk_178_79 подтверждает выделение их в самостоятельные генотипы [23]. Полученные классификационные функции можно применять для типирования полноразмерных и/или протяженных (более 1000 нуклеотидов) фрагментов кодирующих нуклеотидных последовательностей ВКЭ и по мере увеличения их количества уточнять значения коэффициентов функций.

Таким образом, мы видим, что разные генотипы ВКЭ имеют неодинаковые (см. рис. 2, б и рис. 3), хотя и схожие (см. рис. 2, а), стратегии использования кодонов. Поэтому появление одних и тех же синонимичных замен в последовательностях со схожей стратегией можно объяснить только наличием этой стратегии без дополнительных предположений об их эволюционной истории. При этом объяснения выявленных предпочтений в использовании кодонов могут быть различными.

Наше исследование не показало различий при использовании синонимичных кодонов в зависимости от способа изоляции штамма вируса и его последующего культивирования, возможно, из-за особенностей выборки. Однако считается, что неодинаковое по частоте использование синонимичных кодонов не случайно и может отражать количественную представленность отдельных изоакцепторных тРНК в клетках организма. Показано, что родственные организмы часто имеют сходный тип предпочтения кодонов [6, 13, 20]. Частота использования кодонов в разных генах одного и того же организма иногда является фактором, регулирующим уровень экспрессии этих генов в процессе трансляции [24, 25]. Чем реже тот или иной кодон используется для кодирования аминокислоты в данном организме, с тем меньшей скоростью он будет транслироваться рибосомами вследствие низкой внутриклеточной концентрации тРНК, узнающей такой кодон. Вирусы являются внутриклеточными паразитами и для воспроизводства используют тРНК хозяина, поэтому можно предположить, что их стратегия кодирования в целях эффективного размножения должна отражать состав пула тРНК клетки-хозяина и в этом случае генотипы с различающейся стратегией могут иметь различия по степени приспособленности к организму-хозяину.

Возможно и другое объяснение. Было показано [26], что для вируса Чикунгунья искусственная перекодировка нуклеотидной последовательности в случае синонимичных замен приводила к снижению приспособленности вируса, понимаемой как способность к эффективному воспроизводству вируса. Однако возврат к первоначальной кодировке измененных кодонов происходил редко (0,4%), а дальнейшая приспособительная эволюция вирусов шла путем накопления компенсаторных замен, как синонимичных, так и несинонимичных. При предположительном наличии подобного механизма у ВКЭ, в пользу чего свидетельствует выявленное ранее [27] наличие корреляций при возникновении нуклеотидных замен у ВКЭ, возникновение мутаций в определенных участках последовательности может индуцировать ряд компенсаторных замен. Типы таких замен будут неслучайными и могут определяться требованиями отбора по сохранению вторичной или третичной структуры вирусной РНК, формируя опре-

деленную стратегию кодирования данного вирусного генотипа.

Возможно, разные генотипы ВКЭ, выработавшие разные стратегии использования кодонов, по-разному приспособлялись к организмам своих хозяев (позвоночных и беспозвоночных). Этот вопрос, очевидно, требует дальнейшего более подробного изучения.

Выводы

1. Стратегии кодирования у различных генотипов ВКЭ различаются, т. е. не все синонимичные кодоны используются разными генотипами одинаково.

2. Отбор конкретных синонимичных кодонов может быть важной частью процесса микроэволюции ВКЭ, который отражается в филогении вируса.

3. Можно рекомендовать анализ частотных характеристик использования кодонов с помощью методов дискриминантного анализа для классификации протяженных (более 1000 нуклеотидов) гомологичных фрагментов вирусного генома как быстрый метод классификации в тех случаях, когда из-за большого количества и длины анализируемых последовательностей их выравнивание и расчет филогенетических деревьев затруднительны.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 7–19, 25, 26 с.м. REFERENCES)

1. Вотяков В.И., Злобин В.И., Мишаева Н.П. *Клещевые энцефалиты Евразии*. Новосибирск: Наука; 2002.
2. Козлова И.В., Верхозина М.М., Демина Т.В., Дзюев Ю.П., Ткачев С.Е., Карань Л.С. и др. Комплексная характеристика оригинальной группы штаммов вируса клещевого энцефалита, изолированных с территории Восточной Сибири. *Сибирский медицинский журнал (Иркутск)*. 2012; 111 (4): 80–5.
3. Карганова Г.Г. Хозяин-специфические детерминанты в геноме вируса клещевого энцефалита. В кн.: *Фундаментальные и прикладные аспекты изучения паразитических членистоногих в XXI в: материалы международной конференции*. СПб.; 2013: 71–3.
4. Леонова Г.Н. *Клещевой энцефалит в Приморском крае*. Владивосток: Дальнаука; 1997.
5. Погодина В.В., Карань Л.С., Колясникова Н.М., Левина Л.С., Герасимов С.Г., Маленко Г.В. и др. Сибирский подтип вируса клещевого энцефалита, доминирующий на территории России. Распространение и патогенность. *Медицинская вирусология*. 2013; 27 (1): 36.
6. Лукашев В.В. *Молекулярная эволюция и филогенетический анализ*. М.: БИНОМ; 2009.
20. Бутвиловский А.В., Бутвиловский В.Э., Черноус Е.А. Изучение стратегии кодирования белков. *Медицинский журнал*. 2009; 2 (28): 29–33.
21. Халафян А.А. *Учебник STATISTICA 6. Статистический анализ данных*. М.: Бинном; 2007.
22. Орлов А.И. *Прикладная статистика: учебник*. М.: Экзамен; 2006.
23. Демина Т.В. *Вопросы генотипирования и анализ генетической вариабельности вируса клещевого энцефалита: Дисс. ... д-ра биол. наук*. Иркутск; 2012.
24. Стародуб З.Ф., Рачков А.Э. Избирательность трансляции матричных рнк эукариот. *Биополимеры и клетка*. 1986; 2 (4): 167–78.
27. Тюлько Ж.С., Якименко В.В. Вариабельность нуклеотидных последовательностей геномов вируса клещевого энцефалита, связанная с их структурой. *Сибирский медицинский журнал (Иркутск)*. 2012; 111 (4): 27–30.

REFERENCES

1. Votyakov V.I., Zlobin V.I., Mishaeva N.P. *Tick-borne Encephalitis of Eurasia. [Kleshchevye entsefality Evrazii]*. Novosibirsk: Nauka; 2002. (in Russian)
2. Kozlova I.V., Verkhozina M.M., Demina T.K., Dzioev Yu.P., Tkachev S.E., Karan L.S. et al. Complex characteristic of original strains group of TBE virus, which obtained in territory of East Siberia. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal (Irkutsk)*. 2012; 111 (4): 80–5. (in Russian)
3. Karganova G.G. Host-specific determinants in the genome of TBE. In: *Fundamental and Applied Aspects of the Study of Parasitic Arthropods in the XXI Century: Proceedings of the International Con-*

- ference [Fundamental'nye i prikladnye aspekty izucheniya paraziticheskikh chlenistonogikh v XXI v.: materialy mezhdunarodnoy konferentsii]. St. Petersburg; 2013; 71–3. (in Russian)
- Leonova G.N. Tick-borne Encephalitis in the Primorsky Territory. [Kleshchevoy entsefalit v Primorskoy krae]. Vladivostok: Dal'nauka; 1997. (in Russian)
 - Pogodina V.V., Karan L.S., Kolyasnikova N.M., Levina L.S., Gerasimov S.G., Malenko G.V. et al. Siberian subtype of TBE virus dominating in Russia. Distribution and pathogenicity. *Meditsinskaya virusologiya*. 2013; 27 (1): 36. (in Russian)
 - Lukashev V.V. *Molecular Evolution and Phylogenetic Analysis [Molekulyarnaya evolyutsiya i filogeneticheskiy analiz]*. Moscow: BINOM; 2009. (in Russian)
 - Wong E.H.M., Smith D.K., Rabadan R., Peiris M., Poon L.L.M. Codon usage bias and the evolution of influenza A viruses. Codon Usage Biases of Influenza Virus. *BMC Evol. Biol.* 2010; 10: 253. Available at: <http://www.biomedcentral.com/1471-2148/10/253>.
 - Belalov I.S., Lukashev A.N. Causes and Implications of Codon Usage Bias in RNA Viruses. *PLoS One*. 2013; 8 (2). Available at: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0056642>.
 - Qian W., Yang J.R., Pearson N.M., Maclean C., Zhang J. Balanced Codon Usage Optimizes Eukaryotic Translational Efficiency. *PLoS Genet.* 2012; 8 (3). Available at: <http://www.plosgenetics.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pgen.1002603>.
 - Schubert A.M., Putonti C. Evolution of the sequence composition of Flaviviruses. *Infect. Genet. Evol.* 2010; 10 (1): 129–36.
 - Perriere G., Thioulouse J. Use and misuse of correspondence analysis in codon usage studies. *Nucleic Acids Research*. 2002; 30 (20): 4548–55.
 - Shah P., Gilchrist M.A. Explaining complex codon usage patterns with selection for translational efficiency, mutation bias, and genetic drift. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011; 108 (25): 10 231–6.
 - Su M.W., Lin H.M., Yuan H.S., Chu W.C. Categorizing host-dependent RNA viruses by principal component analysis of their codon usage preferences. *J. Comput. Biol.* 2009; 16 (11): 1539–47.
 - Plotkin J.B., Robins H., Levine A.J. Tissue-specific codon usage and the expression of human genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004; 101: 12 588–91.
 - Tello M., Saavedra J.M., Spencer E. Analysis of the use of codon pairs in the HE gene of the ISA virus shows a correlation between bias in HPR codon-pair use and mortality rates caused by the virus. *Virol. J.* 2013; 10. Available at: <http://www.virologyj.com/content/10/1/180>.
 - Frias D., Monteiro-Cunha J.P., Mota-Miranda A.C., Fonseca V.S., Oliveira T., Galvao-Castro B. et al. Human Retrovirus codon Usage from tRNA point of View: Therapeutic Insights. *Bioinform. Biol. Insights*. 2013; 7: 335–45.
 - Grantham R., Gouy M., Mercier R., Pave A. Codon catalog usage and the genome hypothesis. *Nucleic Acids Res.* 1980; 8 (1): 49–62.
 - Cardinale D.J., DeRosa K., Duffy S. Base composition and translational selection are insufficient to explain codon usage bias in plant viruses. *Viruses*. 2013; 5 (1): 162–81.
 - Sharp P.M., Tuohy T.M., Mosurski K.R. Codon usage in yeast: cluster analysis clearly differentiates highly and lowly expressed genes. *Nucleic Acids Res.* 1986; 14 (13): 5125–43.
 - Butvilovskiy A.V., Butvilovskiy V.E., Chernous E.A. Studies of protein's coding strategies. *Meditsinskiy zhurnal*. 2009; 2 (28): 29–33. (in Russian)
 - Khalyafyan A.A. *Tutorial STATISTIKA 6. Statistical Analysis of Data. [Uchebnik STATISTIKA 6. Statisticheskii analiz dannykh]*. Moscow: Binom; 2007. (in Russian)
 - Orlov A.I. *Applied Statistics: a Textbook [Prikladnaya statistika: uchebnik]*. Moscow: Ekzamen; 2006. (in Russian)
 - Demina T.V. *The Questions and Analysis of Genetic Variability of Genotyping of Virus Encephalitis: Diss.* Irkutsk; 2012. (in Russian)
 - Starodub N.F., Rachkov A.E. Competition in the translation of eucariotic messenger RNAs. *Biopolimery i kletka*. 1986; 2 (4): 167–78. (in Russian)
 - Dittmar K.A., Goodenbour J.M., Pan T. Tissue-Specific Differences in Human Transfer RNA Expression. *PLoS Genetics*. 2006; 2 (12). Available at: <http://www.plosgenetics.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pgen.0020221>.
 - Nougaiere A., Fabritus L., Aubry F., Gould E.A., Holmes E.C., Lamballerie X. Random codon re-encoding induces stable reduction of replicative fitness of Chikungunya virus in primate and mosquito cells. *PLOS Pathog.* 2013; 9 (2). Available at: <http://www.plospathogens.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.ppat.1003172>.
 - Tyul'ko Zh.S., Yakimenko V.V. The nucleotide sequences variability of genomes of tick-borne encephalitis virus associated with their structure. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal (Irkutsk)*. 2012; 111 (4): 27–30. (in Russian)

Поступила 06.02.14

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015
УДК 616.98:578.821-036.1:619

Сергеев А.А., Кабанов А.С., Бульчев Л.Е., Сергеев А.А., Пьянков О.В., Боднев С.А., Галахова Д.О.,
Замедянская А.С., Титова К.А., Шишукина Л.Н., Агафонов А.П., Сергеев А.Н.

Течение заболевания у сурков при интраназальном заражении вирусом оспы обезьян

ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», 630559, пос. Кольцово, Новосибирская область

В экспериментах по изучению чувствительности сурков породы байбак к вирусу оспы обезьян (ВОО) при интраназальном (и/н) заражении было установлено, что 50% инфицирующая доза (ИД₅₀) ВОО по внешним клиническим признакам заболевания составила 2,2 десятичного логарифма бляшкообразующих единиц (lg БОЕ). Процент летальности сурков слабо зависит от заражающей дозы ВОО, что не позволяет корректно определить величину летальной 50% дозы (ЛД₅₀) у этого вида животных. У сурков были отмечены выраженные внешние клинические признаки заболевания: осподобная сыпь на коже по всей поверхности тела и слизистых оболочках, гнойные выделения из носовой полости, лимфаденит, нарушение координации, тремор конечностей, лихорадка, повышенная агрессивность, взъерошенность шерсти. В ходе экспериментов по определению динамики накопления ВОО в различных органах, тканях и сыворотке крови сурков, зараженных и/н дозой 3,7 lg БОЕ, обнаружено, что первичными органами-мишенями являются трахея, легкие и бифуркационные лимфоузлы. Органы максимальной продукции вируса – трахея, легкие, слизистая оболочка полости носа и кожа, что было зафиксировано через 5, 7, 9 и 12 сут после заражения. Перенос ВОО в вторичным органам-мишеням (слизистая оболочка полости носа, головной мозг, селезенка, двенадцатиперстная кишка, надпочечники и кожа) у сурков осуществляется по лимфогенному и гематогенному путям распространения инфекции.

Ключевые слова: вирус оспы обезьян; сурок; интраназальное заражение; чувствительность; клинические признаки заболевания; динамика накопления; диссеминация.

Для цитирования: Вопросы вирусологии. 2015; 60 (6): 37–41.

Для корреспонденции: Сергеев Александр Александрович; науч. сотр.; e-mail: sergeev_ala@vector.nsc.ru

Development of the disease in marmot at the intranasal infection with the monkeypox virus

State Research Center for Virology and Biotechnology "Vector", 630559, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia

In experimental study the sensitivity of the Marmota bobak species to the monkeypox virus (MPXV) with the intranasal (i/n) infection was tested. It was demonstrated that 50% of the infective dose (ID₅₀) of the MPXV on external clinical signs of the disease was 2.2 lg plaque forming units (PFU). The percentage of the marmot mortality is slightly dependent on the infecting dose of the MPXV, therefore it is not possible to correctly determine the value of 50 % fatal dose (FD₅₀) for these animals. The most pronounced external clinical signs of the disease were obtained in the marmots: pox-like skin rash throughout the surface of the body and mucous membranes, purulent discharge from the nose, lymphadenitis, discoordination, tremor of the extremities, fever, increased aggression, and ruffled fur. In the course of experiments intended to determine the dynamics of the accumulation of the MPXV in various organs, tissues, and blood serum of marmot infected i/n with dose of 3.7 lg PFU, it was found that the trachea, lungs, and the bifurcation lymph nodes are the primary target organs. The trachea, lungs, nasal mucosa membrane, and skin are the organs with maximal virus replication recorded at 5, 7, 9, and 12 days after the infection. The transfer of the MPXV into the secondary target organs (nasal mucosa membrane, brain, spleen, duodenum, adrenal glands, and skin) was carried out in marmots with lymphogenic and hematogenic ways of the dissemination of the infection.

This work was supported by FBUN GNC VB Vector and Russian Ministry of Education and Science (Project No 14.518.11.7035).

Key words: monkeypox virus; marmot; intranasal infection; susceptibility; clinical signs of disease; dynamics of accumulation; dissemination.

Received 27.03.14

For correspondence: Sergeev Aleksandr, research assistant; e-mail: sergeev_ala@vector.nsc.ru
Citation: Voprosy virusologii. 2015; 60(6): 37–41. (In Russ.)

При разработке препаратов против оспы обезьян некоторые зарубежные ученые используют различные виды животных, моделирующих данную инфекцию у человека (нечеловекообразные приматы, луговые собачки и другие) [1, 2]. Однако для ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», работающего в России с вирусами натуральной оспы и оспы обезьян, использование этих видов модельных животных крайне затруднительно (это связано с чрезвычайно высокой стоимостью нечеловекообразных обезьян и большими сложностями, возникающими при доставке животных из стран дальнего зарубежья). В связи с этим с целью поиска наиболее приемлемых модельных животных в наших предыдущих экспериментах выбраны доступные для нас виды животных (белые мыши, кролики, мини-свиньи и сурки). При изучении их чувствительности к вирусу оспы обезьян (ВОО) самыми восприимчивыми к данной инфекции оказались мыши и сурки [3]. Позже в научной литературе нами были представлены результаты различных экспериментов на мышатах, интраназально (и/н) зараженных ВОО: данные о чувствительности к ВОО, клинической картине заболевания, диссеминации ВОО в их организме, электронной микроскопии органов и тканей, а также показана возможность их применения в качестве модельных животных для оценки эффективности лечебно-профилактического действия разрабатываемых препаратов против данной инфекции [4, 5]. В то же время аналогичные исследования не проводились на сурках, которые проявили высокую чувствительность к данному возбудителю заболевания при подкожном (п/к) введении [3].

Целью исследований, связанных с поиском модельных животных для ВОО, является изучение чувствительности сурков к данному возбудителю заболевания при и/н заражении, клинической картины заболевания и диссеминации ВОО в организме этого вида животных.

Материалы и методы

Все эксперименты были проведены в лаборатории с максимальным уровнем биологической защиты (BSL-4) с использованием изолирующих пневмокапсюлов на базе ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», Россия.

Вирус. В работе использовали центральноафриканский

штамм ВОО V79-1-005, полученный из Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». При культивировании данного штамма в монослое клеток Vero была приготовлена вирусосодержащая суспензия, которую в дальнейшем использовали для инфицирования сурков. Концентрацию вируса в культуральной жидкости определяли путем титрования методом бляшек в культуре клеток Vero, рассчитывали и выражали в десятичных логарифмах бляшкообразующих единиц в 1 мл (lg БОЕ/мл) или в БОЕ/мл [6]. Концентрация вируса в наработанных для инфицирования образцах составляла $5,0 \cdot 10^6$ и $1,3 \cdot 10^7$ БОЕ/мл. Вирусосодержащий материал был расфасован в индивидуальные пробирки и хранился при -70°C .

Животные. В исследованиях использовали 1–2-летних степных сурков вида байбак (*Marmota bobak*) обоего пола (массой 3–4 кг), полученных из Пушкинского питомника Московской области. Животных содержали на стандартном рационе с достаточным количеством воды согласно ветеринарному законодательству и требованиям по гуманному содержанию и использованию животных в экспериментальных исследованиях [7].

Метод инфицирования сурков. В проводимых нами экспериментах сурков заражали и/н, при этом вирусосодержащую жидкость животным вводили по 1 мл суммарно в обе ноздри. Перед данной процедурой животных наркотизировали внутримышечно (в/м) с помощью ветеринарного раствора для анестезии, состоящего из смеси действующих веществ в соотношении 1:1 тилетамин гидрохлорида и золазепам гидрохлорида, в дозе 60 мкг/гол. В опытах по изучению чувствительности животных к ВОО инфицировали по 4 головы на дозу (-1,8 – 4,2 lg БОЕ/гол.), используя разведения с 100-кратным шагом. При этом 50% инфицирующую дозу (ИД₅₀) ВОО у сурков определяли по клиническим признакам заболевания. Кроме того, была сделана попытка определить 50% летальную дозу (ЛД₅₀) ВОО у животных. При изучении динамики накопления ВОО в органах и тканях инфицированных сурков использовали дозу вируса 3,7 lg БОЕ/гол. За инфицированными сурками наблюдали в течение 21 сут после заражения (п/з).

Изучение накопления вируса в органах сурков. При изучении динамики накопления ВОО в органах, тканях и сыворотке крови сурков (клетки крови, сыворотка крови, слизистая оболочка полости носа, головной мозг, трахея, бифуркационные лимфоузлы, легкие, печень, селезенка, поджелудочная железа, мезентериальные лимфоузлы, двенадцатиперстная кишка, почки, надпочечники и кожа) взято по 1 животному на каждую временную точку: 2, 3, 5, 7, 9 и 12 сут п/з. При заборе крови сурков наркотизировали в/м с помощью вышеуказанного раствора для анестезии в дозе 60 мкг/гол. Из крови путем центрифугирования получали сыворотку и ступок форменных элементов. При заборе органов и тканей сурков подвергали эвтаназии, вводя в/м летальную дозу (200 мкг/гол.) того же анестетика, затем готовили 5% гомогенаты путем механической дезинтеграции в ступке с речным песком и раствором Хенкса. Перед титрованием гомогенаты от инфицированных сурков хранили при -70°C .

Вирусологический анализ проб. Концентрацию жизнеспособного вируса в гомогенатах органов и тканей, а также в сыворотке крови животных определяли традиционным методом титрования и подсчета количества бляшек в монослое клеток Vero, инфицированных разными разведениями [6]. Минимальное количество вируса, которое могло быть выявлено в гомогенатах органов и тканях, а также в сыворотке крови при использованном нами методе титрования, составляло 0,4 lg БОЕ/мл.

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку результатов осуществляли стандартными методами [8]. Концентрацию ВОО в органах сурков определяли в 4 повторах для каждого гомогената органа и представляли как среднее значение $\pm 95\%$ доверительный интервал ($M \pm I_{95}$). ID_{50} рассчитывали с использованием формулы Спирмена-Кербера [8].

Результаты и обсуждение

На первом этапе при изучении чувствительности сурков к центральноафриканскому штамму (V79-1-005) ВОО при и/н заражении была определена ID_{50} по внешним клиническим признакам заболевания, которая составила 2,2 lg БОЕ/гол. При этом у животных регистрировали ряд клинических проявлений заболевания (осподообразная сыпь на коже по всей поверхности тела и слизистых оболочках, гнойные выделения из носовой полости, лимфаденит, нарушение координации, тремор конечностей, лихорадка, повышенная агрессивность, взъерошенность шерсти) через 10–13 сут п/з, а через 13–22 сут п/з 5 сурков, имеющих клинические признаки заболевания, погибли. Сыпь на теле сурков имела дискретный характер с постепенно сменяющимися форменными элементами: макулой, папулой, везикулой, пустулой (см. рисунок). Следует отметить, что нам не удалось определить LD_{50} ВОО для этих животных, вероятно, из-за того, что процент летальности сурков слабо зависит от величины заражающей дозы. Так, при использовании ВОО в дозе $4 \cdot 10^6$ БОЕ/гол. погибло 50% сурков (1 из 2), в дозе 10^5 БОЕ/гол. – 25% (1 из 4), $1,5 \cdot 10^4$ БОЕ/гол. – 25% (1 из 4), $1,5 \cdot 10^2$ БОЕ/гол. – 50% (2 из 4), 1,5 БОЕ/гол. – 0% (0 из 4), 0,015 БОЕ/гол. – 0% (0 из 4). При этом процент инфицированности сурков имел четкую зависимость доза – эффект.

В зарубежной научной литературе имеются данные о высокой чувствительности к ВОО луговых собак, относящихся к семейству беличьих [1]. Кроме того, клиническая картина заболевания у этих животных напоминает таковую у человека. В наших исследованиях был взят другой представитель этого же семейства – сурок. Этот вид животных из семейства беличьих оказался наиболее доступным для нас, так как сурков в настоящее время выращивают в некоторых зверохозяйствах

России. Проведенные эксперименты с использованием сурков показали их высокую чувствительность к ВОО, причем, кроме летального эффекта, у них наблюдалась клиническая картина соответствующего заболевания, в общем виде напоминающая таковую у луговых собак. Следует отметить, что зарубежные исследователи также обнаружили, что процент летальности луговых собак (как и сурков в нашем случае) мало зависит от заражающей дозы ВОО [1].

На втором этапе была изучена динамика накопления центральноафриканского штамма (V79-1-005) ВОО в органах, тканях и сыворотке крови сурков через 2, 3, 5, 7, 9 и 12 сут п/з. Результаты представлены в таблице. Из таблицы видно, что через 2 и 3 сут п/з возбудитель заболевания не был обнаружен в органах, тканях и сыворотке крови сурков. Только через 5 сут п/з вирус впервые был зарегистрирован сразу в нескольких первичных органах-мишенях: трахее, бифуркационных лимфоузлах и легких, где он оставался вплоть до 12-х суток п/з. В селезенке патоген обнаружен через 7 сут п/з, а в последующие сроки уже не выявлялся. Через 9 сут п/з ВОО зарегистрирован в слизистой оболочке полости носа, головном мозге, двенадцатиперстной кишке, надпочечниках и коже, причем через 12 сут п/з в головном мозге и двенадцатиперстной кишке вирус не обнаружили, а в слизистой оболочке полости носа, надпочечниках и коже он присутствовал. Более того, через 12 сут п/з в оспинах кожи его концентрация достигала максимального уровня (см. рисунок, таблицу). Также было отмечено, что органами и тканями максимального накопления ВОО являются трахея и легкие (5 сут п/з), слизистая оболочка полости носа (9 сут п/з) и кожа (12 сут п/з). В то же время во все сроки исследования в клетках и сыворотке крови, печени, поджелудочной железе, мезентериальных лимфоузлах и почках ВОО вообще не удалось обнаружить при использованном нами методе титрования.

Во всех представленных выше экспериментах мы применяли и/н способ инфицирования ВОО сурков, который связан с первичным попаданием инфекционного материала в респираторный тракт, как это обычно наблюдается во время эпидемических вспышек заболевания. При этом мы ожидали обнаружить первичное размножение ВОО во всех органах дыхательного тракта, однако данный возбудитель был зарегистрирован только в трахее и легких, а в слизистой оболочке полости носа не выявлялся на начальном этапе развития инфекции. Примечательно, что через 5 сут п/з, т. е. в то же время, что в легких и трахее, ВОО появлялся в бифуркационных лимфоузлах. Это свидетельствовало о том, что они тоже являются первичными органами размножения данного вируса у сурков. По-видимому, диссеминация ВОО в организме сурков сначала происходит по лимфогенному пути с вовлечением бифуркационных лимфоузлов, где осуществляется несколько циклов его размножения, а затем при поступлении лимфы в венозные кровотоки – по гематогенному пути распространения инфекции [9]. При этом нам не удалось обнаружить ВОО ни в сыворотке крови, ни в ее форменных элементах с помощью использованного метода титрования (минимальный предел обнаружения вируса 0,4 lg БОЕ/мл). Эти обстоятельства указывают на присутствие вируса в крови у сурков в предельно малом количестве, но достаточном для заражения вторичных органов-мишеней. Факт наличия вируса в минимальных концентрациях в крови подтверждается отсутствием одновременного инфицирования большинства вторичных органов, имеющих чувствительные клетки к этому патогену. Так, у сурка, эвтаназированного через 7 сут п/з, вирус обнаруживался только в селезенке; у сурка, эвтаназированного через 9 сут п/з, он обнаруживался в головном мозге, двенад-

Динамика накопления штамма V79-1-005 ВОО в органах, тканях и сыворотке крови сурков, и/н инфицированных дозой 3,7 lg БОЕ/гол.

Органы и ткани сурков (n = 4)	Концентрация ВОО в органах и тканях через раз- личное время п/з, lg БОЕ/мл, М±1 ₉₅					
	2 сут	3 сут	5 сут	7 сут	9 сут	12 сут
Клетки крови	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4
Сыворотка	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4
Слизистая оболочка полости носа	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	6,7±0,1	2,6±0,3
Головной мозг	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	1,6±0,6	< 0,4
Трахея	< 0,4	< 0,4	6,5±0,3	1,7±0,1	2,9±0,1	4,5±0,1
Бифуркационные лимфоузлы	< 0,4	< 0,4	2,0±0,1	3,1±0,3	3,9±0,3	2,5±0,1
Легкие	< 0,4	< 0,4	6,5±0,3	5,9±0,3	3,2±0,3	6,5±0,1
Печень	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4
Селезенка	< 0,4	< 0,4	< 0,4	1,3±0,1	< 0,4	< 0,4
Поджелудочная железа	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4
Мезентериальные лимфоузлы	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4
Двенадцатиперстная кишка	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	3,8±0,3	< 0,4
Почки	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4
Надпочечники	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	1,6±0,3	1,4±0,6
Кожа	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	3,0±0,1	6,6±0,3

Примечание. n – число повторов определения; < 0,4: в случаях, когда в гомогенатах органов инфицированных сурков вирус ВОО не выявлялся из-за существующего порога чувствительности метода титрования, использовали значение минимального количества вируса, выявляемого при данном методе титрования (0,4 lg БОЕ/мл).

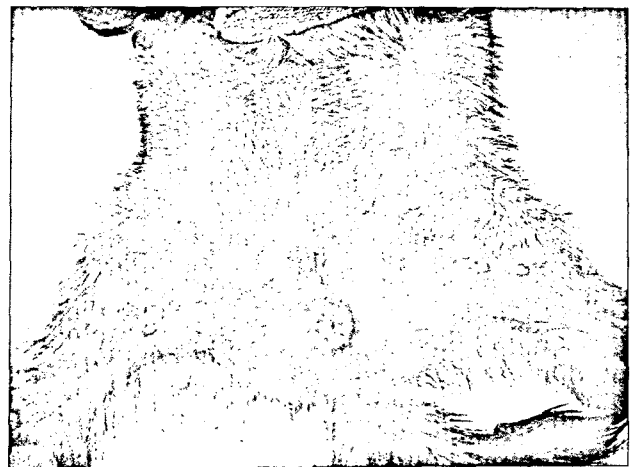
цатиперстной кишке, слизистой оболочке полости носа, надпочечниках и коже, а у сурка, эвтаназированного через 12 сут п/з, – в слизистой оболочке полости носа, надпочечниках и коже. Такая хаотичность инфицирования вторичных органов-мишеней свидетельствует о наличии элемента случайности попадания в них патогена и может быть обусловлена присутствием вируса в крови в предельно низкой концентрации, а также его распространением по разветвленной глубокой и поверхностной сети лимфатических сосудов из легких и трахеи в другие части организма, в том числе в кожу и слизистую оболочку носовой полости [9, 10].

В зарубежной научной литературе имеется некоторая информация о накоплении ВОО в организме различных видов животных [11, 12]. Так, в образцах крови, взятых у луговых собачек (наиболее близкого к суркам вида животных) через 3, 6, 9, 12, 15, 18 и 21 сут п/з западноафриканским штаммом МРХV-2003-004 или центральноафриканским (бассейна р. Конго) штаммом МРХV-2003-358 ВОО, выявляли только ДНК вируса, но не жизнеспособный (бляшкообразующий) вирус [12]. Накопление этого патогена в органах и тканях было изучено только у погибших луговых собачек через 11 и 12 сут после скарификационного (2 особи из 4) и через 13 сут после и/н (1 особь из 4) заражения штаммом МРХV-2003-358 [12]. В сыворотке крови у погибших луговых собачек авторы обнаружили вирус

в высокой концентрации (более 6lg БОЕ/мл), тогда как в наших экспериментах у инфицированных ВОО сурков не удалось зарегистрировать вирус в сыворотке и форменных элементах крови. Вероятно, это связано с различиями между использованными в экспериментах штаммами вируса и видами животных, а также с особенностями развития генерализованной инфекции ВОО, приводящей к летальному исходу. Кроме того, в отличие от зарубежных исследований в нашей работе изучение размножения ВОО в органах и тканях сурков осуществлялось не у погибших, а у эвтаназированных животных в разные сроки после их и/н инфицирования.

Таким образом, в ходе проведенных экспериментов по изучению чувствительности сурков породы байбак к ВОО при и/н заражении установлено, что ИД₅₀ ВОО по внешним клиническим признакам заболевания составила 2,2 lg БОЕ/гол. Процент летальности сурков мало зависит от заражающей дозы ВОО, что не позволяет корректно определить величину ЛД₅₀ у этого вида животных. У сурков были отмечены выраженные внешние клинические признаки заболевания: оспоподобная сыпь на коже по всей поверхности тела и слизистых оболочках, гнойные выделения из носовой полости, лимфаденит, нарушение координации, тремор конечностей, лихорадка, повышенная агрессивность, взъерошенность шерсти. В ходе экспериментов по определению динамики накопления ВОО в различных органах, тканях и крови сурков, зараженных и/н дозой 3,7 lg БОЕ/гол., обнаружено, что первичными органами-мишенями являются трахея, легкие и бифуркационные лимфоузлы. Органы максимальной продукции вируса – трахея, легкие, слизистая оболочка полости носа и кожа, что было зафиксировано в период с 5-х по 12-е сутки п/з. Перенос ВОО к вторичным органам-мишеням сурков (слизистая оболочка полости носа, головной мозг, селезенка, двенадцатиперстная кишка, надпочечники и кожа) осуществляется по лимфогенному (с размножением в бифуркационных лимфоузлах) и гематогенному (без размножения в клетках крови) путям распространения инфекции.

Полученная нами информация о чувствительности сурков к ВОО при и/н заражении, клинической картине заболевания и распространении ВОО в организме этих животных может внести определенный вклад в решение вопросов, касающихся поиска перспективных модельных животных для оценки эффективности разрабатываемых лечебно-профилактических препаратов.



Сыпь на коже сурка после его и/н заражения центральноафриканским штаммом V79-1-005 ВОО.

Данная научная работа проведена при финансовой поддержке ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» и Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках Государственного контракта № 14.518.11.7035.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 2, 6, 11, 12 см.
REFERENCES)

3. Сергеев Ал.А., Булычев Л.Е., Пьянков О.В., Сергеев Ар.А., Боднев С.А., Кабанов А.С. и др. Чувствительность различных видов животных к вирусу оспы обезьян. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2012; 1 (111): 88–92.

4. Кабанов А.С., Сергеев Ал.А., Шишкина Л.Н., Булычев Л.Е., Скарнович М.О., Сергеев Ар.А. и др. Сравнительное изучение противовирусной активности химических соединений в отношении ортопоксвирусов в экспериментах in vivo. *Вопросы вирусологии*. 2013; 4: 39–43.

5. Сергеев Ал.А., Кабанов А.С., Булычев Л.Е., Пьянков О.В., Сергеев Ар.А., Таранов О.С. и др. Использование мышей в качестве модельного животного для оценки эффективности лечебно-профилактического действия разрабатываемых препаратов против оспы обезьян. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2013; 2: 60–5.

7. *Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных*: Пер. с англ. Вашингтон: National Academy Press; 1996.

8. Закс Л. *Статистическое оценивание*. М.: Статистика; 1976.

9. Струков А.И. Инфекционные болезни. Available at: http://vmede.org/sait/?page=28&id=Anatomija_patologicheskaja_strukov_2010&menu=Anatomija_patologicheskaja_strukov_2010. (Дата обращения 16.12.2013).

10. Бороноев С.А. *Клиническая оториноларингология. Учебно-методическое пособие*. Улан-Удэ: Издательство Бурятского государственного университета; 2008.

REFERENCES

1. Hutson C.L., Carroll D.S., Self J., Weiss S., Hughes C.M., Braden Z. et al. Dosage comparison of Congo Basin and West African strains of monkeypox virus using a prairie dog animal model of systemic orthopoxvirus disease. *Virology*. 2010; 402 (1): 72–82.

2. Zaucha G., Jahrling P., Geisbert T., Swearingen J., Hensley L. The pathology of experimental aerosolized monkeypox virus infection in

cynomolgus monkeys (*macaca fascicularis*). *Lab. Invest.* 2001; 81: 1581–600.

3. Sergeev Al.A., Bulychev L.E., Piankov O.V., Sergeev Ar.A., Bodnev S.A., Kabanov A.S. et al. Sensitivity of different animal types to monkeypox virus. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2012; 1 (111): 88–92. (in Russian)

4. Kabanov A.S., Sergeev Al.A., Shishkina L.N., Bulychev L.E., Skarnovich M.O., Sergeev Ar.A. et al. Comparative studying antiviral activity of chemical compounds concerning of orthopoxviruses in vivo experiments. *Voprosy virusologii*. 2013; 4: 39–43. (in Russian).

5. Sergeev Al.A., Kabanov A.S., Bulychev L.E., Piankov O.V., Sergeev Ar.A., Taranov O.S. et al. Exploitation of mouse model for assessment of therapeutic and prophylactic efficacy of drugs against monkeypox. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2013; 2: 60–5. (in Russian)

6. Lepar-Goffart I., Poirier B., Garin D., Tissier M.H., Fuchs F., Crance J.M. Standardization of a neutralizing anti-vaccinia antibodies titration method: an essential step for titration of vaccinia immunoglobulins and smallpox vaccines evaluation. *J. Clin. Virol.* 2005; 32 (1): 47–52.

7. *The Guide to the Care and Use of Laboratory Animals. [Rukovodstvo po soderzhaniyu i ispol'zovaniyu laboratornykh zhivotnykh]*: Transl. from Engl. Washington: National Academy Press; 1996. (in Russian)

8. Zaks L. *Statistical Estimation [Statisticheskoe otsenivanie]*. Moscow: Statistika; 1976. (in Russian)

9. Strukov A.I. Infectious diseases. Available at: http://vmede.org/sait/?page=28&id=Anatomija_patologicheskaja_strukov_2010&menu=Anatomija_patologicheskaja_strukov_2010. (Access 16 December 2013) (in Russian)

10. Boronoev S.A. *Clinical Otolaryngology. Teaching Aid. [Klinicheskaya otorinolaringologiya. Uchebno-metodicheskoe posobie]*. Ulan-Ude: Izdatel'stvo Buryatskogo gosuniversiteta; 2008. (in Russian)

11. Americo J.L., Moss B., Earl P.L. Identification of wild-derived inbred mouse strains highly susceptible to monkeypox virus infection for use as small animal models. *J. Virol.* 2010; 84 (16): 8172–80.

12. Hutson C.L., Olson V.A., Carroll D.S., Abel J.A., Hughes C.M., Braden Z.H. et al. A prairie dog animal model of systemic orthopoxvirus disease using West African and Congo Basin strains of monkeypox virus. *J. Gen. Virol.* 2009; 90 (Pt. 2): 323–33.

Поступила 27.03.14

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 578.831.1/578.832.083.3

Виткова О.Н.¹, Капустина О.В.², Лобова Т.П.¹, Михайлова В.В.¹, Сафонов Г.А.⁵, Власова Н.Н.³, Белоусова Р.В.⁴

Сравнительное изучение чувствительности и специфичности иммуноферментного анализа с хемилюминесцентной и колориметрической детекцией для выявления антигенов и антител к вирусам гриппа птиц и болезни Ньюкасла

¹ФГБУ «Центральная научно-методическая ветеринарная лаборатория» Россельхознадзора, 111622, г. Москва; ²ГНУ «Всероссийский НИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии» Российской академии сельскохозяйственных наук, 601120, г. Покров; ³ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ») Россельхознадзора, 600901, г. Владимир; ⁴ФГБОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии» Министерства сельского хозяйства Российской Федерации, 109472, г. Москва;

⁵Российская академия наук, 117334, г. Москва

В статье представлены результаты исследований по разработке твердофазного иммуноферментного анализа (ТФ ИФА) с иммунохемилюминесцентной (ИХА) и колориметрической детекцией для выявления специфических вирусных антигенов и антител при диагностике гриппа птиц и болезни Ньюкасла. Показана высокая специфичность и чувствительность ИХА, которая в 10–50 раз превышает таковую ИФА с колориметрическим методом детекции. Высокая результативность наряду с автоматизацией процесса лабораторного исследования (использование планшетного люминометра) позволяют рекомендовать ИХА для включения в число методов для первичного скрининга указанных инфекций.

Ключевые слова: иммуноферментный анализ; хемилюминесцентная детекция; иммунохемилюминесцентный анализ; твердофазный иммуноферментный анализ; грипп птиц; болезнь Ньюкасла; пероксидаза хрена; люминометрический метод; люминол.

Для цитирования: Вопросы вирусологии. 2015; 60 (6): 41–45.

Для корреспонденции: Виткова Ольга Николаевна, канд. вет. наук, зам. директора по диагностической работе; e-mail: olgavitkova@mail.ru

Comparative research into sensitivity and specificity of immune-enzyme analysis with chemiluminescence and colorimetric detection for detecting antigens and antibodies to avian influenza viruses and newcastle disease

¹Central Scientific-Methodological Veterinary Laboratory, Federal Service for Veterinary and Phytosanitary Surveillance, 111662, Moscow, Russia; ²All-Russia Scientific-Research Institute of Veterinary Virology and Microbiology, Russian Academy of Agricultural Sciences, 601120, Pokrov, Russia; ³Federal Center for Animal Health Protection, Federal Service for Veterinary and Phytosanitary Surveillance, 600901, Vladimir, Russia; ⁴Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Ministry of Agriculture of the Russian Federation, 109472, Moscow, Russia; ⁵Russian Academy of Sciences, 117334, Moscow, Russia

The goal of this work was to demonstrate the results of the development of the enzyme-linked immunosorbent tests with chemiluminescence detection and colorimetric detection of specific viral antigens and antibodies for identifying the avian influenza and the Newcastle disease viruses: high sensitivity and specificity of the immuno-chemiluminescence assay, which are 10-50 times higher than those of the ELISA colorimetric method. The high effectiveness of the results and the automation of the process of laboratory testing (using a luminometer) allow these methods to be recommended for including in primary screening tests for these infectious diseases.

Key words: enzyme immunoassay; chemiluminescence detection; immuno-chemiluminescence analysis; enzyme-linked immunosorbent assay; avian influenza; Newcastle disease; horseradish peroxidase; luminometric method; luminol.

Received 24.03.14

For correspondence: Olga Vitkova, Candidate of veterinary Sciences; e-mail:olgavitkova@mail.ru

Citation: Voprosy virusologii. 2015; 60(6): 41–45. (In Russ.)

Введение

Грипп птиц (ГП) и болезнь Ньюкасла (БН) являются значимыми высококонтагиозными инфекционными болезнями птиц, которые остаются актуальной проблемой птицеводства [1–4]. В последние годы ГП типа А регистрировали в различных странах мира. В 2013 г., по данным МЭБ, вспышки ГП отмечались в 13 странах – наибольшее количество в Китае, Камбодже, Австралии, Мексике, Непале, Италии, в 2014 г. в 11 странах – наибольшее в Китае, Вьетнаме, Корее. В 2013–2014 гг. часто выявляли подтипы вируса, имеющие антигенные формулы H5N1, H5N2, H5N6, H5N8, H7N2, H7N3, H7N7, H7N9 [5–7].

Эпизоотологический и серологический мониторинг – важное звено в контроле распространения инфекционных болезней [8, 9]. В лаборатории Российской Федерации для диагностики ГП и БН поступают тысячи проб патологического материала и сывороток крови от птиц различных видов. Так, в 2013 г. в целях выявления вируса БН и специфических антител к нему исследовано 3635 проб патматериала и более 52 тыс. проб сыворотки крови. Для диагностики ГП исследовано 107 457 проб патологических и биологических материалов и более 570 тыс. проб сыворотки. В ветеринарных лабораториях России для диагностики данных инфекций используют классические методы – вирусологический и реакцию торможения гемагглютинации (РТГА), а также современные методы иммуноферментного анализа (ИФА) и полимеразную цепную реакцию.

Современные тенденции разработки новых и совершенствования существующих методов и диагностических тест-систем направлены на повышение чувствительности и специфичности при выявлении вирусных антигенов и соответствующих специфических антител. Перспективными представляются исследования по повышению чувствительности ИФА при использовании флюоресцентных и хемилуминесцентных субстратов. Одним из современных методов лабораторной диагностики иммунологического профиля является иммунохемилуминесцентный анализ (ИХА) [9, 10].

Принцип метода заключается во взаимодействии люминола и перекиси водорода в присутствии пероксидазы хрена, конъюгированной с вторичными антителами, что приводит к образованию окисленного люминола, который обладает люминесцентным свечением. Интенсивность хемилуминесценции пропорциональна количеству исследуемого белка (антигена, антител) в пробе. Использо-

вание люминометрического метода исследований в ветеринарии находится только на начальном этапе.

В задачи исследований входили разработка ИФА с хемилуминесцентной детекцией; сравнительное изучение чувствительности и специфичности ИХА и ИФА с колориметрической детекцией при выявлении специфических антигенов и антител для диагностики ГП и БН.

Материалы и методы

Для исследования использовали компоненты, входящие в набор препаратов на основе моноклональных антител (МКА) для дифференциальной диагностики ГП и БН твердофазным иммуноферментным методом серии № 2 от 2012 г. производства ГНУ ВНИИВиМ; компоненты, входящие в набор для выявления антител к вирусу ГП с помощью ТФ ИФА серии № 3 от 2013 г. производства НПП «Авивак»; антигены вирусов ГП и БН; пероксидазные конъюгаты соответствующих МКА; нативные антигены в виде инактивированной 0,1% теотропином экстраэмбриональной жидкости эмбрионов кур (ЭЭЖ ЭК), инфицированных вирусами ГП (антиген 1) штамм A/tern/South Africa/61/ H5N3; ГП штамм A/цыпленок/Росток/34/H7N1 (антиген 2); вирусом БН штамм велогенный Томилинский-53 (антиген 3); лентогенный штамм Ла-Сота (антиген 4); 20% суспензию внутренних органов птиц, экспериментально зараженных вирусом БН штамм Томилинский-53, осветленную низкоскоростным центрифугированием (антиген 5); смесь антигенов ГП и БН (антиген 6); рекомбинантный нуклеопротеин (Rek NP) вируса гриппа типа А, полученный в прокариотической системе экспрессии, и концентрированный культуральный антиген вируса инфекционной бурсальной болезни (ИББ) штамм Winterfield 2512. Используемые специфические антигены имели активность в твердофазном ИФА (ТФ ИФА) не ниже 1:1024.

Для отработки оптимальных параметров анализа в качестве модельной тест-системы выбран двойной антителный сэндвич-вариант ТФ ИФА (ДАС ТФ ИФА) на основе неконкурирующих между собой МКА к нуклеопротеинам вирусов ГП и БН, иммобилизованных на поверхности полистиролового планшета, и антитела, меченные ферментом, – пероксидазой хрена. Эта система является одной из наиболее распространенных для анализа поливалентных антигенов.

В качестве окислителя использовали перекись водорода, а активность пероксидазы оценивали по интенсивности

Выявление специфических антигенов вирусов ГП и БН в ДАС ТИФА с хемилюминесцентной детекцией

Исследуемая проба	Рабочая доза конъюгата МКА*			
	RLU-1000		в разведении 1:10 RLU-1000	
	ГП	БН	ГП	БН
Антиген БН лиофилизированный**	551±0,10	70484±0,15	86±0,09	6982±0,20
Антиген ГП лиофилизированный**	1187±0,12	5883±0,10	66078±0,10	761±0,17
Антиген 1 ГП Н5Н3 ЭЭЖ ЭК (нативный)	2966±0,01	3294±0,07	415±0,14	396±0,21
Антиген 2 ГП Н7Н1 ЭЭЖ ЭК (нативный)	3251±0,15	2587±0,10	385±0,12	417±0,15
Антиген 3 БН ЭЭЖ ЭК (нативный)	345±0,20	40605±0,12	78±0,30	3187±0,10
Антиген 4 БН + ГП ЭЭЖ ЭК (нативный)	626±0,14	43139±0,20	198±0,07	5197±0,30
Антиген 5 БН - суспензия внутренних органов (нативный)	814±0,08	15679±0,15	81±0,15	2654±0,07
Контроль конъюгата	522±0,05	5588±0,10	95±0,09	816±0,04

Примечание. * – использована рабочая доза конъюгата МКА к нуклеопротеину вирусов ГП и БН, отработанная для колориметрического ТФ ИФА; ** – компоненты из набора препаратов на основе МКА для дифференциальной диагностики ГП и БН; в таблице приведены средние данные по трем повторам ($n = 3$).

образующейся хемилюминесценции. Учет реакции проводили с помощью детектора – низкошумового фотоумножителя (многоканальный планшетный люминометр LB 960 Centro XS3, “Berthold Technologies”) и выражали в световых единицах RLU. Учет реакции при колориметрическом методе детекции осуществляли с помощью Multiskan MCC 340 (“LabSystems”, Финляндия) при $\lambda = 405$ нм. Реакцию считали положительной и специфичной, если показания оптической плотности (ОП) в лунках с испытуемыми сыворотками (антигеном) превышали показания ОП в лунках с нормальной сывороткой (антигеном) в 2,1 раза и более.

Для постановки ИХА и ТФ ИФА использовали соответственно непрозрачные белые и прозрачные полистироловые 96-луночные планшеты для ИФА (Unifilter и Nunc immunoplate).

Дозу сенсibilизации планшет соответствующими МКА или специфическими антигенами, рабочую дозу специфического или антивидового конъюгатов определяли методом перекрестного (шахматного) титрования.

Для выявления специфических антител использовали гипериммунные сыворотки крови кур (SS) против ГП, БН и ИББ, а также пробы сыворотки крови от домашней птицы Можайского района Московской области, привитой инактивированной вакциной (Покровский завод биопрепаратов) против ГП подтипа Н5 (S Н5), и пробы сыворотки крови птиц, присланные из различных регионов Российской Федерации для мониторинговых исследований в ФГБУ ЦНМВЛ (SS); сыворотку специфическую (SS) свиней к Н5Н1; сыворотку специфическую (SS) свиней к вирусу классической чумы свиней (КЧС).

Относительное содержание специфических антител в сыворотках крови животных выражали в международных ИФА-единицах EU и определяли по формуле:

$$EU = [(\sum ОП \text{ пробы} - \sum ОП К) / (\sum ОП \text{ стандарт} - \sum ОП К)] \cdot 100,$$

где $\sum ОП$ – сумма значений ОП при определенной длине волны в зависимости от субстрата; ОП К – ОП отрицательного контроля; стандарт – эталонная специфическая положительная сыворотка.

$$EU = [(\sum RLU \text{ пробы} - \sum RLU К) / (\sum RLU \text{ стандарт} - \sum RLU К)] \cdot 100,$$

где $\sum RLU$ – сумма значений световых единиц; RLU К – RLU отрицательного контроля; стандарт – эталонная специфическая положительная сыворотка.

Результаты и обсуждение

Изучена возможность применения в аналитической практике катионной пероксидазы хрена в ИФА с хемилюминесцентной детекцией.

Результаты исследований по выявлению специфических

антигенов вирусов ГП и БН в ДАС ТФ ИФА представлены в табл. 1. Они свидетельствуют о том, что ИХА является специфическим чувствительным методом для выявления антигенных детерминант вирусов. Расчет соотношения значений сигнал/фон показал, что при использовании конъюгата в рабочей дозе для ДАС ТФ ИФА с колориметрической детекцией оно составило для вируса гриппа от 2,1 до 5,4. При разведении рабочей дозы конъюгата МКА в 10 раз происходит снижение фоновой реакции и повышение специфического взаимодействия антиген/антитело. Соотношение сигнал/фон увеличилось на порядок и составило 4,4–6,9 и 3,2–8,5 для вируса ГП и БН соответственно.

Для сравнительного изучения чувствительности методов нами была использована ЭЭЖ ЭК, инфицированных вирусом БН штамм Томилинский-53 и вирусом ГП подтипа Н5 (A/tern/South Africa/61/ Н5Н3) с исходным титром инфекционной активности 8,5 lg ЭЛД_{50/см³}. В табл. 2 показаны результаты выявления антигенов нуклеопротеина вирусов методом ДАС ТФ ИФА при колориметрическом и хемилюминесцентном методах детекции.

Полученные данные указывают на то, что ИФА с хемилюминесцентной детекцией позволяет выявлять специфический антиген как вируса ГП, так и вируса БН в разведении пробы до 10⁻⁷, что на порядок выше, чем при колориметрическом методе детекции, т. е. методом ИХА можно выявлять инфицированный материал с титром инфекционной активности 1–1,5 lg ЭЛД_{50/см³} и выше.

Сравнительное изучение чувствительности и специфичности непрямого ТФ ИФА с колориметрической детекцией и ИХА для выявления специфических антител

В опыте по обработке оптимальных параметров по-

Таблица 2

Сравнительная чувствительность ДАС ТФ ИФА при различных методах детекции

Разведение пробы	ТФ ИФА ОП ₄₀₅ , колориметрический метод детекции		ИХА, RLU-1000	
	ГП	БН	ГП	БН
10 ⁻²	0,554±0,02	0,678±0,07	797±0,01	16640±0,04
10 ⁻³	0,421±0,05	0,541±0,04	574±0,02	15760±0,07
10 ⁻⁴	0,401±0,01	0,403±0,02	538±0,05	14439±0,03
10 ⁻⁵	0,321±0,06	0,379±0,01	439±0,06	13398±0,04
10 ⁻⁶	0,327±0,04	0,307±0,04	351±0,1	12685±0,01
10 ⁻⁷	0,203±0,02	0,167±0,03	332±0,05	7326±0,04
10 ⁻⁸	0,158±0,04	0,150±0,05	101±0,2	5589±0,02
Контроль конъюгата	0,146±0,03	0,152±0,05	95±0,09	3236±0,04

Таблица 3

Чувствительность и специфичность непрямого ТФ ИФА и ИХА при колориметрическом и хемилюминесцентном методах детекции для выявления антител к вирусу ГП и БН в сыворотках крови птиц

Сыворотка	Метод детекции: ОП и хемилюминесцентного свечения Sag/Nag		Относительное содержание антител, ИФА-единицы EU	
	ТФ ИФА ОП ₄₀₅	ИХА RLU-1000	ТФ ИФА	ИХА
Нормальная сыворотка NS	0,152	6,0	0	0
SS стандарт к ГП "Авивак"	0,691/0,18**	44,7/13,4	100	100
Сыворотка к ИББ	0,208	10,3	0	0
Сыворотка к ГП	0,49/0,2	42,1/9,8	69	65
Сыворотка штамма Ла-Сота БН	0,6*/0,13	69,7*/11	90	91
Контроль конъюгата анти-IgG кур	0,16	9,5	0	0

Примечание. * – реакция с антигеном вируса БН; $p \leq 0,05$; ** – в числителе ОП со специфическим антигеном, в знаменателе – с нормальным антигеном; Sag – специфический антиген; Nag – отрицательный антиген.

становки непрямого ТФ ИФА с колориметрической детекцией и ИХА для выявления специфических антител использовали гипериммунные сыворотки крови кур против ГП, БН, ИББ; компоненты коммерческого набора для выявления специфических антител к вирусу гриппа в сыворотке крови птиц НПП «Авивак». Сыворотки ис-

следовали в одном разведении 1:800, т. е. в 4 раза превышающем разведение отрицательной контрольной сыворотки (1:150–1:200), имеющей ОП₄₀₅, равную фоновому уровню антивидового пероксидазного конъюгата (анти-IgG кур).

Результаты сравнительного изучения чувствительности и специфичности непрямого ТФ ИФА и ИХА представлены в табл. 3. Они свидетельствуют о том, что используемые методы выявления антител чувствительны и специфичны. Результаты расчета относительного содержания в сыворотках крови антител в EU ИФА практически совпадают.

В дальнейшем нами проведено сравнительное изучение чувствительности и специфичности различных форматов ИФА, разработанных для выявления специфических антител. С использованием методов ТФ ИФА (непрямой и конкурентный) были исследованы 334 пробы сывороток крови от домашней птицы, привитой против ГП подтипа H5, и пробы сывороток крови от диких птиц, присланные для мониторинговых исследований в ФГБУ ЦНМВЛ. Для контроля специфичности антигена, адсорбированного на полистироле, использовали конъюгаты МКА 5C10 к нуклеопротеину вируса ГП и 3G4 к вирусу БН. На каждом планшете ставили контроль заведомо положительной и отрицательной сыворотки в 4 повторях, исследуемых сывороток в 2 повторях. Результаты представлены в табл. 4.

Результаты ИХА совпадали с результатами ТФ ИФА с колориметрической детекцией и РТГА. Исследования показали, что по чувствительности и специфичности раз-

Таблица 4

Чувствительность и специфичность различных методов выявления антител к вирусу ГП и БН в сыворотках крови животных

Сыворотка и МКА	Значения ОП в					РТГА, ГАЕ/см ³	Относительное содержание АТ в ТФ ИФА/ИХА, EU
	непрямом ТФ ИФА		конкурентном ТФ ИФА				
	антиген						
	ЭЭЖ ЭК (грипп А)			Rek NP (грипп А)			
нИХА, RLU-1000	нТФ ИФА, ОП405	нТФ ИФА, ОП405 (из набора "Авивак")	нТФ ИФА, ОП405	ТФ ИФА, ОП405			
SS к ГП, стандарт [#]	54,7	0,736	0,691	1,200	0,04	512	100
Конъюгат МКА 5C10 ^{##}	–	0,700	0,600	0,600	0,070	–	–
Конъюгат анти-IgG кур [#]	9,5	0,160	0,100	0,100	–	–	–
SS ГП (гипериммунная)	49,1	0,642	0,490	1,500	0,070	512	84/87
Алтайский край** – пробы от дикой птицы (мониторинг UG типа А подтипа H5)							
S 1.28	44,6	0,684	0,514	0,934	0,080	2048	73/81
S 1.16	44,4	0,583	0,475	0,980	0,050	1024	73/73
S 1.19	42,3	0,452	0,382	0,600	0,100	512	68/51
Можайский район Московской области** – пробы от вакцинированной птицы против ГП типа А подтипа H5N1							
S H5-1	29,9	0,200	0,173	0,100	0,510	0	45/10
S H5-30	26,8	0,138	0,182	0,300	0,570	0	37/10
S H5-9	27,8	0,140	0,163	0,180	0,550	0	35/10
S H5-8	28,8	0,162	0,13	0,190	0,512	0	37/20
S H5-2.3	46,8	0,979	0,935	1,600	0,040	2048	82/95
S H5-с. Бородино	69,7	0,712	0,597	1,800	0,040	1024–2048	120/94
S H5-с. Иващино	55,8	0,674	0,583	1,300	0,060	1024–2048	100/88
S H5-Троицк	48,3	0,592	0,504	1,000	0,070	512–1024	85/74
S H5-с. Голеново	46,2	0,624	0,603	1,200	0,050	512–1024	81/80
Конъюгат МКА 3G4 ^{##}	–	0,639	0,150	0,050	–	–	–
SS БН* (гипериммунная)	69,7	0,600	0,130	0,140	0,620	1024	–
SS свиней к H5N1***	57,3	0,594	н/и	1,400	0,060	1024	100/80
SS ИББ	10,5	0,140	0,208	0,120	0,500	0	0
SS свиней к вирусу КЧС***	25,2	0,230	0,09	0,130	0,583	0	30/10

Примечание. * – в реакциях использовали антиген вируса БН; ** – показаны результаты исследования объединенных проб отрицательных сывороток и положительных в РТГА, имеющих титр в пределах 512–2048; *** – для выявления комплекса антиген – антитело использовали конъюгат протеина G; # – компоненты набора для выявления специфических антител к вирусу гриппа в сыворотке крови птиц НПП «Авивак»; ## – компоненты набора препаратов на основе МКА для дифференциальной диагностики ГП и БН методом ТИФА.

работанные методы ИФА не уступают коммерческому набору для выявления специфических антител к вирусу гриппа в сыворотке крови птиц НПП «Авивак». Применение рекомбинантного белка нуклеопротеина гриппа А в качестве специфического антигена в непрямом ТФ ИФА ведет к снижению фонового уровня, увеличению в 1,5–2 раза чувствительности и специфичности метода. Соотношение сигнал/фон выше в случае использования рекомбинантного белка нуклеопротеина гриппа А даже для самых низких значений ОП₄₀₅: «Авивак» – 2,4–8,4; непрямой ТИФА – 2,1–6,9; непрямой ТИФА на основе рекомбинантного белка – 3,3–17.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что определение пероксидазной метки с помощью усиленной хемилюминесценции отличается высокой чувствительностью, специфичностью и может быть положено в основу разработки удобных и быстрых методов ИФА.

ИХА может быть рекомендован для диагностики инфекционных болезней как высокочувствительный и специфичный метод. Его явное преимущество заключается в простоте использования, полной автоматизации, использовании высококачественных стандартизованных реагентов. Этот метод отличается высокой чувствительностью (белки определяются в пикограммовых количествах), низким уровнем фоновой реакции с неспецифическим антигеном при детектируемом уровне реакции со специфическим антигеном, экономичностью: требуется минимальное количество МКА.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 3–8, 10 см. REFERENCES)

1. Львов Д.К. Новые и возвращающиеся инфекции – дремлющий вулкан. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2008; 2 (96): 5–8.
2. Силко Н.Ю., Глушенко Ю.Г., Шестопалова Л.В., Юрченко К.С. Биологические свойства велегенных штаммов вируса болезни

Ньюкасла, изолированных от птиц на Северном Кавказе. *Вопросы вирусологии*. 2013; 58 (1): 45–8.

9. Владимиров Ю.А. Активированная хемилюминесценция и биолюминесценция как инструмент в медико-биологических исследованиях. *Соросовский образовательный журнал*. 2001; 7 (1): 16–23.

REFERENCES

1. L'vov D.K. New and emerging infections – a dormant volcano. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2008; 2 (96): 5–8. (in Russian)
2. Silko N.Yu., Glushchenko Yu.G., Shestopalova L.V., Yurchenko K.S. Biological properties velegenny strains of Newcastle disease virus isolated from birds in the Northern Caucasus. *Voprosy virusologii*. 2013; 58 (1): 45–8. (in Russian)
3. Umali D.V., Ito H., Suzuki T., Shiota K., Katoh H., Ito T. Molecular epidemiology of Newcastle disease virus isolates from vaccinated commercial poultry farms in non-epidemic areas of Japan. *Virology*. 2013; 10:330.
4. Aldous E.W., Mynn J.K., Banks J., Alexander D.J. A molecular epidemiological study of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates by phylogenetic analysis of a partial nucleotide sequence of the fusion protein gene. *Avian Pathol*. 2003; 32 (3): 239–56.
5. Fiore A.E., Shay D.K., Broder K., Iskander J.K., Uyeki T.M., Mootrey G. et al. Prevention and control of influenza: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2008. *MMWR Recomm. Rep*. 2008; 57 (RR-7): 1–60.
6. Naffakh N., Tomoiu A., Rameix-Welti M.A., van der Werf S. Host restriction of avian influenza viruses at the level of the ribonucleoproteins. *Annu. Rev. Microbiol*. 2008; 62: 403–24.
7. Peiris J.S., Tu W.W., Yen H.L. A novel H1N1 virus causes the first pandemic of the 21st century. *Eur. J. Immunol*. 2009; 39: 2946–54.
8. O.I.E. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. 6th ed. Paris; 2008.
9. Vladimirov Yu.A. Activated Chemiluminescence and bioluminescence as a tool in biomedical research. *Sorosovskiy obrazovatel'nyy zhurnal*. 2001; 7 (1): 16–23. (in Russian)
10. Barnard G.J.R., Kim J.B., Williams J.L. *Alternative Immunoassays*. New York; 1985: 123–52.

Поступила 24.03.14

В ПОМОЩЬ ВИРУСОЛОГУ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015
УДК 617.7-002-022:578.825.11]-078

Слепова О.С.¹, Светлова Е.В.¹, Ковалева Л.А.¹, Макаров П.В.¹, Кузусева А.Э.¹, Денисова Е.В.¹, Вахова Е.С.¹,
Захарова Г.Ю.¹, Кондратьева Ю.А.¹, Андрушин А.Е.¹, Демкин В.В.²

Исследования вируса герпеса человека 6-го типа и других герпес-вирусов, вызывающих заболевания глаз, методом полимеразной цепной реакции

¹ФГБУ «МНИИ ГБ им. Гельмгольца» Минздрава России, 105062, г. Москва; ²Институт молекулярной генетики РАН, 123182, г. Москва

С целью изучения роли вируса герпеса человека 6-го типа (ВГЧ-6) в развитии заболеваний глаз проведено ПЦР-исследование крови (152), биоптатов роговицы (61) и внутриглазных жидкостей (11) на ВГЧ-6 и другие вирусы группы герпеса: вирус простого герпеса 1-го и 2-го типа, цитомегаловирус, вирус Эпштейна–Барр. Установлено, что ДНК ВГЧ-6 наряду с другими представителями семейства Herpesviridae может выявляться как в крови, так и непосредственно в тканях и жидкостях глаза у пациентов с различными клиническими формами офтальмопатологии (всего обследовано 174 человека). Полученные данные позволяют считать ВГЧ-6 одной из возможных причин офтальмогерпеса и делают поиск ДНК этого вируса неотъемлемым этапом на пути постановки этиологического диагноза офтальмологическим больным.

К л ю ч е в ы е с л о в а: вирус герпеса человека 6-го типа; заболевания глаз; роговица; кровь; полимеразная цепная реакция.

Для цитирования: Вопросы вирусологии. 2015; 60 (4): 45–48.

Для корреспонденции: Слепова Ольга Семеновна, д-р биол. наук, проф., рук. лаб. иммунологии и вирусологии; e-mail: slepowaolga@yandex.ru

PCR study of the human herpes virus type 6 and other viruses of the herpes group in eye diseases

¹ Moscow Helmholtz Research Institute of Eye Diseases, 105062, Moscow, Russia; ²Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, 123182, Moscow, Russia

To study the role of the HHV-6 type in the development of eye diseases PCR tests of blood (152), cornea biopsies (61), and intraocular fluids (11) for HHV-6 and other viruses of the herpes group (HSV type 1 and 2, CMV, EBV) were conducted. It was found that the HHV-6, along with other representatives of the Herpesviridae, can be detected in patients with different clinical forms of ophthalmopathology (174 patients were surveyed). Viral DNA was detected in blood, cornea, and in the anterior chamber fluid. The obtained data allow that the HHV-6 to be suggested as a possible cause of the ophthalmic herpes along with the other viruses of this group. It makes finding the virus DNA an essential step towards setting the etiologic diagnosis of the ophthalmological patients.

Key words: human herpes virus type 6; eye diseases; cornea; blood; polymerase chain reaction.

Received 15.08.14

For correspondence: Ol'ga Slepova, MD, PhD, ScD, prof.; e-mail: slepowaolga@yandex.ru

Citation: Voprosy virusologii. 2015; 60(6): 45–48. (In Russ.)

Введение

Вирусы группы герпеса – возбудители оппортунистических инфекций, которые активируются под действием различных внутренних и внешних факторов. Роль некоторых типов герпес-вирусов в возникновении глазных заболеваний неоспоримо доказана [1, 2]. Вирус простого герпеса 1-го и 2-го типа (ВПГ-1, ВПГ-2), цитомегаловирус (ЦМВ), вирусы Эпштейна–Барр (ВЭБ) и Варицелла-зостер (ВВЗ) могут быть этиологическим фактором поражения глаз в виде офтальмогерпеса, а также сопутствовать развитию и осложнять течение других воспалительных заболеваний глаз [1, 3]. Длительная репликативная активность герпес-вирусов в тканях пораженных органов обуславливает рецидивы инфекции. Возможно внутриутробное заражение ВПГ и ЦМВ, что может стать причиной врожденных поражений ЦНС и органа зрения.

ВПГ-1 – наиболее частая причина поражения роговицы и других структур глаза. В переднем отделе, помимо конъюнктивитов, поверхностных кератитов и эрозий роговицы, возникают стромальные кератиты с изъязвлениями и без них, а также иридоциклиты. ВПГ-инфекция задних отделов глаза проявляется хориоретинитами, острым некрозом сетчатки, что приводит к потере зрения [1, 4].

ЦМВ – наиболее частая причина ретинитов и острых некрозов сетчатки. Проявляя тропизм к сетчатке, вирус может играть пусковую роль в манифестации диабетической ретинопатии, а также поражении глаз при СПИДе [1]. ЦМВ-ретинит развивается у 70% больных с тяжелым иммунодефицитом, 7–20% пациентов теряют зрение вследствие острого ретинального некроза ЦМВ-этиологии [5]. В настоящее время все чаще обсуждается вопрос о том, что причиной СПИД-ассоциированных ретинитов выступает не только ЦМВ, но и микст-инфекция ВПГ-1 и ВГЧ-6 [6, 7].

ВЭБ поражает передние и задние отделы глаза в виде кератитов, иридоциклитов и хориоретинитов. При этом инфекция глаз обнаруживается у людей, перенесших мононуклеоз, а также может быть первичной и поражать орган зрения [1].

ВВЗ по частоте встречаемости в офтальмологической практике уступает лишь ВПГ. Этот вирус поражает глаза людей, больных ветряной оспой, в 5–7 % случаев. Кроме того, ВВЗ может манифестировать в форме изолированной глазной патологии. Клиническая картина полиморфна и представлена поверхностными и глубокими кератитами, иритами и иридоциклитами. Наиболее часто встречаются стромальные кератиты с изъязвлением и кератоувеиты (до 60%). Различные формы нередко сочетаются друг с другом, что приводит к длительному течению болезни и осложняет лечение [1].

Согласно анализу, проведенному в МНИИ ГБ им. Гельмгольца, с герпетической инфекцией связано 66,6% случаев роговичной патологии и более 60% случаев роговичной слепоты (рассматривались различные представители семейства, кроме ВГЧ 6–8-го типа). Герпес роговицы среди взрослых, по разным источникам, составляет 20–75%, среди детей – 70–80% от числа всех воспалительных заболеваний роговицы.

В последние годы обсуждается влияние герпетической инфекции на исход сквозной кератопластики высокого риска (СКП) [8]. В наших ранее проведенных исследованиях с помощью ПЦР установлено, что при наличии ДНК какого-либо из вирусов группы герпеса в роговице реципиента, особенно донора, риск развития послеоперационных осложнений, в частности персистирующих эрозий и язв трансплантата, как и частота неблагоприятных исходов СКП, повышается в 2–3 раза [9, 10]. При этом особое внимание привлекает ВГЧ-6 [10].

ВГЧ-6 относительно недавно внесен в список известных человеческих патогенов и является серьезным претендентом на роль этиологического агента рассеянного склероза и лихорадки новорожденных с судорожным синдромом, инфекционных мононуклеозов и ВГЧ-6-ассоциированного энцефалита [11]. ВГЧ-6 – кофактор некоторых форм карцином шейки матки и назофарингеальных карцином [12].

Роль ВГЧ-6 в аспекте офтальмопатологии только начинает изучаться. В настоящее время обсуждается участие этого вируса в развитии и течении увеитов [13–15], кератитов [16] и невритов зрительного нерва [17–19]. В результате ПЦР-исследования влаги передней камеры и стекловидного тела пациентов с кератитами и эндофтальмитами ДНК вируса была обнаружена в высоких концентрациях у 2% (7 из 350) обследованных; у 0,3% (1 из 350) нашли мРНК вируса, что допускает возможность его размножения непосредственно в органе зрения [20].

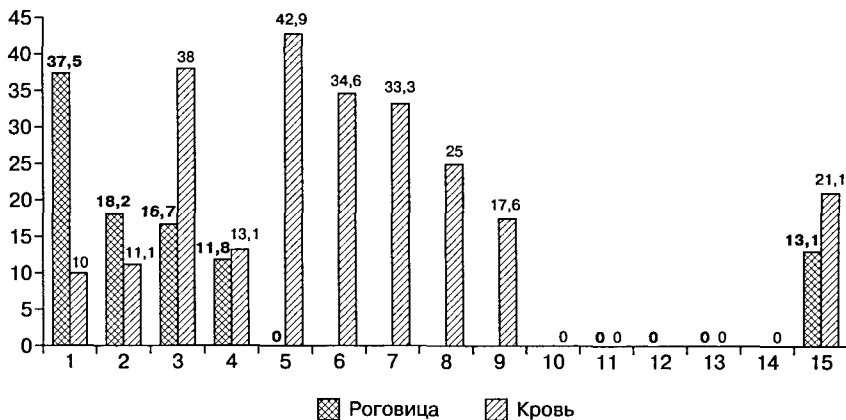
Таким образом, в настоящее время представители вирусов группы герпеса признаны как важнейший этиологический и/или отягощающий фактор офтальмопатологии, поражающий как передние, так и задние отделы глаза. Однако наряду с такими широко известными офтальмотропными вирусами, как ВПГ-1 и ВПГ-2, ЦМВ, ВЭБ, ВВЗ, до сих пор остаются малоизученными вирусы герпеса 6, 7 и 8-го типов, в частности их роль в возникновении и развитии заболеваний различных оболочек глаза.

Цель работы – ПЦР-исследование крови, тканевых биоптатов и внутриглазных жидкостей на ВГЧ-6 в сравнении с другими вирусами группы герпеса при разных клинических формах офтальмопатологии.

Материалы и методы

Всего обследовано 174 человека (94 мужского пола и 80-женского в возрасте от 4 до 82 лет) с заболеваниями глаз разной природы (посттравматической у 36, ревматоидной у 26, дистрофической у 10, герпетической у 10, бактериальной у 9, неясной этиологии у 83 пациентов). Распределение по клиническим формам: язвы роговицы у 54 человек, в том числе центральные у 42, бельмо роговицы у 33, эпителиально-эндотелиальная дистрофия роговицы у 6, болезнь керато-трансплантата у 13, увеиты у 56, в том числе кератоувеиты у 4, передние у 43, периферические у 9, отслойка сетчатки у 4, травмы глаза у 8 человек.

Было проведено ПЦР-исследование на 5 вирусов группы герпеса (ВПГ-1 и ВПГ-2, ЦМВ, ВЭБ, ВГЧ-6). Объектом ис-



Частота выявления ДНК ВГЧ 6-го типа в крови и роговице пациентов с разными клиническими формами офтальмопатологии.

По оси ординат – % выявляемости ДНК вируса; по оси абсцисс – форма офтальмопатологии: 1 – язва роговицы постоперационная, 2 – болезнь трансплантата, 3 – центральная язва роговицы неизвестной этиологии, 4 – бельмо поствоспалительное, 5 – травмы глаза, 6 – передний ревматоидный увеит, 7 – центральная язва роговицы бактериальная, 8 – РОС, 9 – передний увеит неизвестной этиологии, 10 – центральная язва роговицы герпетическая, 11 – бельмо постожоговое, 12 – эпителиально-эндотелиальная дистрофия роговицы, 13 – кератоувеит, 14 – периферический увеит неясной этиологии, 15 – всего.

следования были пробы крови ($n = 152$), фрагменты роговицы ($n = 61$), пробы внутриглазных жидкостей ($n = 11$).

Забор венозной крови осуществляли в стандартные 4,5-миллилитровые пробирки Vacuette с ЭДТА-КЗ. Образцы ткани роговицы забирали в пробирки типа эппендорф с 500 мкл ТЕ-буфера. Весь биоматериал был заморожен и хранился при -70°C .

ПЦР проводили в реальном времени (система CFX96TM в комплексе с термоциклером С1000). Для выделения ДНК из биоматериала использовали тест-системы РеалБест ДНК-экстракция (кровь, субретинальная жидкость, влага передней камеры) и РеалБест ДНК-экспресс (роговица, стекловидное тело). Для определения ДНК вирусов применяли тест-системы РеалБест ДНК ЦМВ/ВПГ-1,2, РеалБест ВЭБ, РеалБест ВГЧ-6 (“Вектор-Бест”, Россия). Часть материала исследовали на базе лаборатории молекулярной диагностики Института молекулярной генетики РАН. Из крови ДНК выделяли с использованием набора ДНК-сорб-В (“АмплиСенс”, ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора РФ) согласно инструкции производителя. ДНК вирусов из образцов роговицы выделяли по протоколу лаборатории.

Статистическая обработка полученных данных проведена по системе BIOSTATD-1998 (описательная статистика, критерии χ^2 , Фишера и Стьюдента).

Результаты и обсуждение

В целом ПЦР-положительными оказалось около 1/3 образцов крови (46 из 152; 30,3%), более половины роговичных биоптатов (33 из 61; 54,1%) и 9,1% проб (1 из 11) внутриглазных жидкостей. В крови явно преобладала ДНК ВГЧ-6 (21%) по сравнению с ВЭБ (8,6%; $p = 0,004$) и особенно ВПГ (0,66%; $p < 0,001$), причем все они выявлялись преимущественно как моноинфекции (40 из 46 ПЦР-позитивных проб; 86,9%). ДНК ЦМВ в крови обследованных больных выявлена не была. В роговице чаще других вирусов обнаруживали – ДНК ВЭБ (14 из 61 пробы, 22,9%), заметно реже ДНК ВГЧ-6 и ВПГ (по 8 из 61; 13,1% в обоих случаях) и особенно ЦМВ (3 из 61 пробы; 4,9%), но статистически достоверная разница отсутствовала. При этом в роговице в отличие от крови ($p = 0,019$) преобладала микст-инфекция (20 из 33 ПЦР-позитивных проб; 60,6%). Следует отметить, что наличие ДНК ВГЧ-6 в обоих тест-пробах одновременно в целом отмечалось редко: только в 2 (5,1%) из 39 случаев при параллельном исследовании крови и роговицы.

Скрининг результатов ПЦР-диагностики на ВГЧ-6 в зависимости от нозологической формы офтальмопатологии представлен на рисунке.

В крови ДНК ВГЧ-6 обнаруживали в самых разных клинических группах (от 10 до 42,9%). При этом только в 3 (9,4%) из 32 ПЦР-положительных на ВГЧ-6 проб была выявлена микст-инфекция (только с ВЭБ). Привлекло внимание то, что у пациентов с клинически диагностированным офтальмогерпесом (центральная герпетическая язва) ДНК ВГЧ-6 в крови обнаружена не была, а частота выявления ВПГ и ВЭБ в общем не превысила 20%. Возможно, это явилось следствием применения этиотропной терапии. Следует отметить, что биоптаты собственно роговицы в этой группе больных не исследовали, поэтому судить о наличии ДНК вирусов непосредственно в пораженной ткани мы не могли. Лишь в трех клинических группах (давние послеожоговые бельма роговицы, кератоувеиты и периферические увеиты неясной этиологии) не было ни одного случая обнаружения в крови ДНК вирусов группы герпеса, включая ВГЧ-6.

В биоптатах ткани роговицы ДНК ВГЧ-6 выявлялся чаще всего у пациентов с тяжелыми исходами кератопластики – язвами роговицы (37,5%) и болезнью трансплантата (18,2%), а также у больных с центральными язвами роговицы (16,7%) и поствоспалительными бельмами (11,8%) неясной этиологии. При этом, как отмечалось выше, чаще имела место микст-инфекция с другими вирусами: всего в 5 из 8 ПЦР-положительных на ВГЧ-6 проб (с ВЭБ – 4, с ВПГ – 1). Характерно, что частота обнаружения ДНК ВГЧ-6 в роговице была такой же, как и ВПГ (по 8 из 61 пробы, 13,1%), и заметно выше, чем ЦМВ (3 из 61 пробы, 4,9%). Как известно, последние, как и ВЭБ, считаются «главными» офтальмотропными вирусами.

Следует отметить, что мы не обнаружили ВГЧ-6 во фрагментах роговицы, а также в крови у больных с кератоувеитами неясной этиологии и давними послеожоговыми бельмами, хотя другие вирусы в тех же образцах ткани выявлялись: микст-инфекция ВПГ и ВЭБ при кератоувеитах (50%) и ЦМВ при ожогах (12,5%).

Только при бытовых травмах глаза и эпителиально-эндотелиальных дистрофиях роговицы в образцах роговицы не удалось обнаружить ДНК ни одного из исследованных вирусов герпеса, включая ВГЧ-6, хотя в крови этих больных последний выявлялся довольно часто (44,4%), причем в основном в виде моноинфекции (33,3%).

При исследовании внутриглазных жидкостей ДНК ВГЧ-6 была обнаружена только во влаге передней камеры (в 1 из 7 проб; 14,3%) у ребенка с передним ревматоидным увеитом; другие вирусы при этом выявлены не были. Единичные пробы стекловидного тела ($n = 2$) и субретинальной жидкости ($n = 2$) у больных с увеитами и регматогенной отслойкой сетчатки (РОС) дали полностью отрицательный результат.

Таким образом, результаты исследования свидетельствуют о том, что ВГЧ-6 наряду с другими представителями семейства Herpesviridae может выявляться у пациентов с разными клиническими формами заболевания глаз. ДНК вируса обнаруживали как в крови, так и непосредственно в тканях и жидкостях глаза (в данной работе – в роговице и во влаге передней камеры). Исходя из полученных данных можно думать, что ВГЧ-6 может быть основной причиной (в случаях моноинфекции) или одним из этиологических факторов (в случаях микст-инфекции) офтальмогерпеса либо сопутствующим и, вероятно, отягощающим фактором при заболеваниях глаз другой природы (бактериальной, ревматоидной), как и при послеоперационных осложнениях (при кератопластике).

Заключение

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что независимо от нозологической формы заболевания глаз па-

циентам с подозрением на инфекционную этиологию или с осложненным течением послеоперационного периода следует проводить ПЦР-исследование на инфицированность не только широкоизвестными в качестве офтальмотропных агентов вирусами группы герпеса, но и менее известным офтальмологом ВГЧ-6 с целью повышения точности этиологической диагностики заболевания, что необходимо для адекватного выбора терапии.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 6, 7, 11–20 см. REFERENCES)

1. Каспаров А.А. *Офтальмогерпес*. М.: Медицина; 1994.
2. Майчук Ю.Ф. Герпесвирусные заболевания глаз. В кн.: *Неизвестная эпидемия: герпес*. Смоленск; 1997: 62–74.
3. Кускова Т.К., Белова Е.Г. Семейство герпесвирусов на современном этапе. *Лечащий врач*. 2004; 5: 3–6.
4. Кричевская Г.И., Анджелов В.О., Катаргина Л.А., Старикова А.В., Денисова Е.В., Звонарев А.Ю. и др. Реактивация персистентных герпесвирусных инфекций как фактор патогенеза эндогенных увеитов у детей. *Вестник офтальмологии*. 2005; 121 (2): 22–4.
5. Шевчук Н.Е., Мальханов В.Б., Матюхина Е.Н. Диагностика и лечение цитомегаловирусного хориоретинита. В кн.: *Материалы научно-практической конференции Восток-Запад 2012*. Уфа: ДизайнПресс; 2012: 360.
6. Слепова О.С., Быковская Г.Н., Макаров П.В., Балаян Т.Г., Оганесян О.Г., Илуридзе С.Л. Исследование эффективности применения циклоsporина у больных с высоким риском отторжения кератотрансплантата. Сообщение 2. Результаты иммунологического исследования. *Вестник офтальмологии*. 2007; 4: 19–22.
7. Миронкова Е.А., Демкин В.В., Слепова О.С., Садохина Т.С., Макаров П.В., Кугушева А.Э. Диагностика и роль ВГЧ-6 инфекции при кератопластике высокого риска. *Российский офтальмологический журнал*. 2012; 3: 30–4.
8. Миронкова Е.А., Макаров П.В., Слепова О.С., Гундорова Р.А., Кугушева А.Э., Демкин В.В. и др. Инфицированность донорского материала вирусами группы герпеса как возможная причина развития болезни трансплантата при сквозной кератопластике. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2012; 4: 48–51.

REFERENCES

1. Kasparov A.A. *Ophthalmoherpes [Ofial'mogerpes]*. Moscow: Meditsina; 1994. (in Russian)
2. Maychuk Yu.F. Herpesvirus diseases of the eye. In: *Unknown Epidemic: Herpes. [Neizvestnaya epidemiy: herpes]*. Smolensk; 1997: 62–74. (in Russian)
3. Kuskova T.K., Belova E.G. Herpesvirus family at the present stage. *Lechashchiy vrach*. 2004; 5: 3–6. (in Russian)
4. Krichevskaya G.I., Andzhelov V.O., Katargina L.A., Starikova A.V., Denisova E.V., Zvonarev A.Yu. et al. Reactivation of persistent herpesvirus infections as a factor in the pathogenesis of endogenous uveitis in children. *Vestnik oftal'mologii*. 2005; 121 (2): 22–4. (in Russian)
5. Shevchuk N.E., Mal'khanov V.B., Matyukhina E.N. Diagnosis and treatment of cytomegalovirus chorioretinitis. In: *Materials of Scientific and Practical Conference East-West 2012. [Materialy Nauchno-prakticheskoy konferentsii Vostok-Zapad 2012]*. Ufa: DizaynPress; 2012: 360. (in Russian)

6. Fillet A.M., Reux I., Joberty C., Fournier J.G., Hauw J.J., Le Hoang P. et al. Detection of human herpes virus 6 in AIDS-associated retinitis by means of in situ hybridization, polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *J. Med. Virol.* 1996; 49: 289–95.
7. Mitchell S.M., Fox J.D., Tedder R.S., Gazzard B.G., Lightman S. Vitreous fluid sampling and viral genome detection for the diagnosis of viral retinitis in patients with AIDS. *J. Med. Virol.* 1994; 4: 336–40.
8. Slepova O.S., Bykovskaya G.N., Makarov P.V., Balayan T.G., Oganeyan O.G., Iluridze S.L. Study of the efficacy of cyclosporine in patients with a high risk of rejection keratoplasty. Message 2. The results of immunological research. *Vestnik oftal'mologii*. 2007; 4: 19–22. (in Russian)
9. Mironkova E.A., Demkin V.V., Slepova O.S., Sadokhina T.S., Makarov P.V., Kugusheva A.E. Diagnostics and role of HHV-6 infection in high-risk keratoplasty. *Rossiyskiy oftal'mologicheskii zhurnal*. 2012; 3: 30–4. (in Russian)
10. Mironkova E.A., Makarov P.V., Slepova O.S., Gundorova R.A., Kugusheva A.E., Demkin V.V. et al. Herpes virus contamination of donor's tissue as a potential etiology of corneal graft disease after penetrating keratoplasty. *Vestnik transplantologii i iskusstvennykh organov*. 2012; 4: 48–51. (in Russian)
11. Barone S.R., Kaplan M.H., Krilov L.R. Human herpesvirus-6 infection in children with first febrile seizures. *J. Pediatr.* 1995; 127 (1): 95–7.
12. Amirian E.S., Adler-Storthz K., Scheurer M.E. Associations between human herpesvirus-6, human papillomavirus and cervical cancer. *Cancer Lett.* 2013; 336 (1): 18–23.
13. de Boer J.H., Verhagen C., Bruinenberg M., Rothova A., de Jong P.T., Baarsma G.S. et al. Serologic and polymerase chain reaction analysis of intraocular fluids in the diagnosis of infectious uveitis. *Am. J. Ophthalmol.* 1996; 121 (6): 650–8.
14. de Groot-Mijnes J.D., de Visser L., Zuurveen S., Martinus R.A., Völker R., ten Dam-van Loon N.H. et al. Identification of new pathogens in the intraocular fluid of patients with uveitis. *Am. J. Ophthalmol.* 2010; 150 (5): 628–36.
15. Maslin J., Bigaillon C., Froussard F., Enouf V., Nicand E. Acute bilateral uveitis associated with an active human herpesvirus-6 infection. *J. Infect.* 2007; 54 (4): 237–40.
16. Okuno T., Hooper L.C., Ursea R., Smith J., Nussenblatt R., Hooks J.J. et al. Role of human herpes virus 6 in corneal inflammation alone or with human herpesviruses. *Cornea*. 2011; 30 (2): 204–7.
17. Mechai F., Boutolleau D., Manceron V., Gasnault J., Quertainmont Y., Brosseau J.P. et al. Human herpesvirus 6-associated retrobulbar optic neuritis in an HIV-infected patient: response to anti-herpesvirus therapy and long-term outcome. *J. Med. Virol.* 2007; 79 (7): 931–4.
18. Moschetti D., Franceschini R., Vaccaro N.M., Cermelli C., Pezzini F., Balestrieri M. et al. Human herpesvirus-6B active infection associated with relapsing bilateral anterior optic neuritis. *J. Clin. Virol.* 2006; 37 (4): 244–7.
19. Oberacher-Velten I.M., Jonas J.B., Jünemann A., Schmidt B. Bilateral optic neuropathy and unilateral tonic pupil associated with acute human herpesvirus 6 infection: a case report. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 2005; 243 (2): 175–7.
20. Sugita S., Shimizu N., Watanabe K., Ogawa M., Maruyama K., Usui N. et al. Virological analysis in patients with human herpes virus 6-associated ocular inflammatory disorders. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2012; 53 (8): 4692–8.

Поступила 15.08.14

- Михайлов М.И., Мамедов М.К., Дадашева А.Э.** Вирусологические показатели повышенной эпидемической опасности у лиц с высоким риском парентерального инфицирования вирусом гепатита С 2, 38–40
- Москалейчик Ф.Ф., Лага В.Ю., Дельгадо Е., Вега И., Фернандес-Гарсия А., Перес-Альварес Л., Корнилаева Г.В., Пронин А.Ю., Жернов Ю.В., Томсон М.М., Бобкова М.Р., Карамов Э.В.** Стремительное распространение циркулирующей рекомбинантной формы CRF02-AG ВИЧ-1 на территории России и сопредельных стран 6, 14–19
- Мукашева Е.А., Колобухина Л.В., Меркулова Л.В., Кистенева Л.Б., Заплатников А.П., Смолоногина Т.А., Дешева Ю.А., Михайлова Е.В., Романовская А.В., Дубовицкая Н.А., Бурцева Е.И.** Серодиагностика в надзоре за циркуляцией вирусов гриппа в период пандемии, вызванной А(Н1N1)рdт09 6, 19–24
- Наровлянский А.Н., Иванова А.М., Шевлягина Н.В., Диденко Л.В., Боровая Т.Г., Измestьева А.В., Санин А.В., Пронин А.В., Ершов Ф.И.** Эффективность применения полипренилфосфатов в экспериментальной модели генитального герпеса 4, 9–13
- Носик М.Н., Киселева И.А., Бочкова М.С., Рыжов К.А., Кравченко А.В., Покровский В.В.** Создание панели изолятов вируса иммунодефицита 1-го типа, резистентных к антиретровирусным препаратам 1, 24–27
- Осидак Л.В., Гончар В.В., Волощук Л.В., Головачева Е.Г., Куликова Н.А., Дондурей Е.А., Афанасьева О.И., Суховецкая В.Ф., Милькинт К.К., Образцова Е.В., Мушкатина А.Л., Коновалова Н.И., Писарева М.М., Гончарова Е.С., Галкина С.Н., Дринецкий В.П., Го А.** Клинико-лабораторная характеристика гриппа А (Н1N1-рdт 2009) у детей и взрослых в период 2009–2013 гг. в Санкт-Петербурге 4, 23–28
- Оспельникова Т.П., Исаева Е.И., Колодяжная Л.В., Козулина И.С., Андреева С.А., Полосков В.В., Ершов Ф.И.** Противовирусная активность препаратов интерферона бета 1а 6, 24–28
- Рыжов К.А., Носик М.Н., Кравченко А.В.** Изменчивость регуляторных генов ВИЧ-1, выявляемых с помощью полимеразной цепной реакции 3, 41–44
- Садикалиева С.О., Султанкулова К.Т., Шораева 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 4, 18–23
- Сейбиль В.Б., Малышкина Л.П., Агеева О.Т., Косолапова Е.И., Множина Е.Г., Грошенкова Е.В., Кривоцов Н.В., Гурьянова Н.И., Дальцаева М.К., Фомина Н.С.** Коллективный иммунитет к полиомиелиту у населения отдельных регионов России 4, 37–40
- Селимова Л.М., Серебровская Л.В., Иванова Л.А., Кравченко А.В., Бурацкова Е.В.** Показатели CD4–клеток и вирусной нагрузки у пациентов, инфицированных вирусом иммунодефицита человека 1-го типа (ВИЧ-1) 2, 31–34
- Сергеев А.А., Кабанов А.С., Булычев Л.Е., Сергеев А.А., Пьянков О.В., Боднее С.А., Галахова Д.О., Замедянская А.С., Титова К.А., Шишкина Л.Н., Агафонов А.П., Сергеев А.Н.** Течение заболевания у сурков при интраназальном заражении вирусом оспы обезьян 6, 37–41
- Скорикова С.В., Буркитбаев Ж.К., Савчук Т.Н., Жибурт Е.Б.** Распространенность ВИЧ-, ВГС-, ВГВ-инфекций у доноров крови г. Астаны 1, 34–36
- Сычев Д.А., Байкова О.Ю., Иванов А.П., Еремеева Т.П., Иванова О.Е.** Гуморальный иммунитет к вирусу полиомиелита у трудовых мигрантов в Российской Федерации 5, 16–21
- Тюлько Ж.С., Якименко В.В.** Стратегия использования синонимичных кодонов в кодирующих последовательностях вируса клещевого энцефалита 6, 32–37
- Фазылов В.Х., Ткачева С.В., Манапова Э.Р., Якупова Ф.М.** Эффективность противовирусной терапии хронического гепатита С у пациентов, не ответивших на лечение, с учетом генотипирования по интерлейкину-28В 1, 28–31
- Хисматуллина Н.А., Гулюкин А.М., Гулюкин М.И., Иванов А.В., Сабирова В.В., Южаков А.Г., Александрова Н.М., Самерханов И.И., Алипер Т.И.** Два случая гидрофобии в Республике Татарстан: прижизненная и постмортальная лабораторная диагностика 2, 18–24
- Чичерина Г.С., Морозова О.В., Панов В.В., Романенко В.Н., Бахвалов С.А., Бахвалова В.Н.** Особенности инфекции вирусом клещевого энцефалита *Ixodes persulcatus* Schulze и *Ixodes pavlovskyi* Pomerantsev в период роста численности и трансформации видовой структуры сообщества иксодид 5, 42–46
- Шибнев В.А., Гараев Т.М., Финогенова М.П., Калнина Л.Б., Носик Д.Н.** Противовирусное действие водных экстрактов березового гриба *Inopatus obliquus* на вирус иммунодефицита человека 2, 35–38
- Эспер С.А., Гребенникова Т.В., Исагулянц М.Г., Кюрегян К.К., Прилипов А.Г., Ходорович А.М.** Исследование внутрибольничной и внутрилабораторной контаминации вирусами гепатита А и С 5, 37–41

В ПОМОЩЬ ВИРУСОЛОГУ

- Ерш А.В., Полтавченко А.Г., Пьянков С.А., Агафонов А.П., Кривенчук Н.А., Буторин Д.В.** Метод комплексной оценки гуморального иммунитета к детским вакциноуправляемым вирусным инфекциям 1, 41–45
- Львов Н.Д., Абдулмеджидова А.Г.** Иммунные критерии активации герпесвирусной инфекции у женщин с физиологическим течением беременности 1, 37–40
- Пирожков А.П., Тимофеев М.А., Борисевич И.В., Сырмаятникова С.И., Шатохина И.В., Пантюхов В.Б., Ковальчук А.В., Борисевич С.В.** Чувствительность и специфичность набора реагентов для выявления антител к вирусу Хунина методом иммуноферментного анализа 1, 46–49
- Слепова О.С., Светлова Е.В., Ковалева Л.А., Макаров П.В., Кугушева А.Э., Денисова Е.В., Вахова Е.С., Захарова Г.Ю., Кондратьева Ю.А., Андрушин А.Е., Демкин В.В.** Исследования вируса герпеса человека 6-го типа и других герпес-вирусов, вызывающих заболевания глаз, методом полимеразной цепной реакции 6, 45–48

РЕЦЕНЗИИ

- Кононов А.В., Галегов Г.А., Дерябин П.Г. – Рецензия на: В.В. Покровский, А.В. Кравченко, О.Г. Юрин, В.В. Воронин, Т.Н. Ермак, В.В. Беляева, Н.Н. Ладная, В.И. Шахгильдян, Л.Ю. Афонина, С.Н. Потеев, Ю.А. Фомин, В.Н. Зимица, О.П. Фролова, Г.А. Шипулин, Е.В. Богославская.** ВИЧ-инфекция и СПИД: национальное руководство 5, 47

ЮБИЛЕИ

- О.И. Киселев (к 70-летию со дня рождения) 5, 48
В.В. Малиновская (к 80-летию со дня рождения) 2, 48