

**РОССИЙСКАЯ  
АКАДЕМИЯ  
НАУК**

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

ЛР № 010215 от 29.04.97

**Почтовый адрес:**

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

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

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

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

**ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ**

Тел./факс +7-495-678-64-84

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

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

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

Редактор *Е.П. Мороз*

Художественный редактор  
*А. В. Минаичев*

Технический редактор  
*Л. В. Зюкина*

Корректор *В. С. Смирнова*

Переводчик *С. К. Чаморовский*

Верстка *Е. М. Архипова*

Сдано в набор 07.06.2016.

Подписано в печать 16.06.2016.

Формат 60 × 88%.

Печать офсетная.

Печ. л. 6,00.

Усл. печ. л. 5,88.

Уч.-изд. л. 6,36.

Заказ 346.

Отпечатано в типографии ООО

«Подольская Периодика»,

142110, г. Подольск, ул. Кирова, 15

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

Т. 61. № 4. 145–192

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

Свидетельство о регистрации № 1170  
от 11 декабря 1990 г.



**МОСКВА  
«ИЗДАТЕЛЬСТВО  
"МЕДИЦИНА"»**

# ВОПРОСЫ ВИРУСОЛОГИИ

## PROBLEMS OF VIROLOGY

ДВУХМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Основан в 1956 г.

**4**

**Том 61 · 2016**

### Редакционная коллегия

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

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

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

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

#### Члены редколлегии:

Баринский И.Ф. (д.м.н., проф.)

Белоусова Р.В. (д.в.н., проф.)

Галегов Г.А. (д.б.н., проф.)

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

Гурцевич В.Э. (д.м.н., проф.)

Ершов Ф.И. (д.м.н., проф., акад. РАН)

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

Зуев В.А. (д.м.н., проф.)

Иванова О.Е. (д.м.н., доцент)

Карганова Г.Г. (д.б.н., доцент)

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)

**Заседателев 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)

**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)

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

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

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

## ИНОСТРАННЫЕ ЧЛЕНЫ РЕДАКЦИОННОГО СОВЕТА

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**Golovljova I.** (PhD; Tallinn, Estonia)

**Goujgoulova G.** (PhD; Sofia, Bulgaria)

**Hoenen T.** (PhD; Hamilton, USA)

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

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

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

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

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

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

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

**Oxford J.** (DSc; London, UK)

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

**Roggendorf M.** (MD, Essen, Germany)

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

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

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

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

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

**Vainionpää R.** (Docent; Turku, Finland)

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

**Webby R.** (PhD, Memphis, USA)

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

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

RUSSIAN ACADEMY OF SCIENCES  
**VOPROSY VIROLOGII**  
(PROBLEMS OF VIROLOGY)

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

**Volume 61 • 4 • 2016**

**EDITORIAL BOARD**

**Editor-in-Chief: LVOV D.K.**, MD, PhD, DSc, Professor, Academician of RAS

Assistant editors in chief: **Deryabin P.G.**, MD, PhD, DSc, Professor

Executive secretary: **Grebennikova T.V.**, Doctor of Biological Sciences, Professor

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

*Members of editorial board:*

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

**Editorial council**

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

**Aliper T.I.** – Sc.D., Prof. (Moscow)

**Anan'ev V.Yu.** – MD, PhD (Vladivostok)

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

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

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

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

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

**Garbuz Yu.A.** – MD (Khabarovsk)

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

**Grigor'ev S.N.** – MD (Magadan)

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

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

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

**Ivanov L.I.** – MD (Khabarovsk)

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

**Lebedev G.B.** – MD (Anadyr')

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

**Lisitsin E.A.** – MD, PhD (Vladimir)

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

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

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

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

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

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

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

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

**Reznik V.I.** – MD, PhD (Khabarovsk)

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

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

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

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

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

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

**Yanovich V.A.** – MD, PhD (Birobidzhan)

**Yashkulov K.B.** – MD, PhD (Elista)

**Advisory Board**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**Golovljova I.** – PhD (Tallinn, Estonia)

**Goujgoulova G.** – PhD (Sofia, Bulgaria)

**Hoenen T.** – PhD (Hamilton, USA)

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

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

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

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

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

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

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

**Oxford J.** – DSc (London, UK)

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

**Roggendorf M.** – MD (Essen, Germany)

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

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

**Tashiro M.** – PhD, MD (Tokyo, Japan)

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

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

**Vainionpää R.** – Docent (Turku, Finland)

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

**Webby R.** – PhD (Memphis, USA)

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

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



Izdatel'stvo Meditsina

## СОДЕРЖАНИЕ

### ОБЗОРЫ

- Жирнов О.П.** Асимметричная структура вируса гриппа А и новая функция матричного белка М1 ..... 149
- Алексеев К.П., Кальнов С.Л., Гребенникова Т.В., Алипер Т.И.** Ротавирусная инфекция человека. Стратегии вакцинопрофилактики ..... 154

### ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Львов Д.К., Бурцева Е.И., Колобухина Л.В., Федякина И.Т., Кириллова Е.С., Трушакова С.В., Феодоритова Е.Л., Беляев А.Л., Меркулова Л.Н., Краснослободцев К.Г., Мукашева Е.А., Гарина Е.О., Оскерко Т.А., Аристова В.А., Вартамян Р.В., Кистенева Л.Б., Дерябин П.Г., Прилипов А.Г., Альховский С.В., Кружкова И.С., Базарова М.В., Девиаткин А.В.** Вирусологические, эпидемиологические, клинические, молекулярно-генетические особенности эпидемии гриппа 2015–2016 гг.: доминирование вируса гриппа А (H1N1)pdm09 в России и странах Северного полушария ..... 159
- Краснослободцев К.Г., Львов Д.К., Альховский С.В., Бурцева Е.И., Федякина И.Т., Колобухина Л.В., Кириллова Е.С., Трушакова С.В., Оскерко Т.А., Щелканов М.Ю., Дерябин П.Г.** Полиморфизм аминокислот в позиции 222 рецепторсвязывающего сайта гемагглютинаина вируса гриппа А (H1N1)pdm09 у пациентов с летальной вирусной пневмонией в 2012–2014 гг. .... 166
- Мальдов Д.Г., Андропова В.Л., Балакина А.А., Ильичев А.В., Галегов Г.А.** Влияние иммуномодулирующего препарата Стимфорте на гуморальный иммунный ответ при экспериментальной герпесвирусной инфекции ..... 172
- Корзаия Л.И., Кебурия В.В., Догадов Д.И., Лапин Б.А., Кюрегян К.К., Михайлов М.И.** Маркеры гепатита Е у населения Большого Сочи и обезьян Адлерского приматологического центра ..... 176
- Щелканов М.Ю., Девиаткин А.А., Ананьев В.Ю., Фролов Е.В., Домбровская И.Э., Дедков В.Г., Ардашев А.В., Коломеец С.А., Короткова И.П., Любченко Е.Н., Бандеев В.В., Просьянникова М.Н., Галкина И.В., Иванушко Е.С., Емельянова Н.П., Баранов Н.И., Ульянова С.А., Арамилев С.В., Фоменко П.В., Суворый А.Л., Порошин Н.А., Сокол Н.Н., Маслов Д.В., Махиня Е.Е., Шипулин Г.А.** Изоляция и секвенирование полноразмерного генома штамма вируса бешенства, выделенного от бурого медведя (*Ursus arctos*), напавшего на человека в Приморском крае (ноябрь 2014 г.) ..... 180
- Зайкова О.Н., Гребенникова Т.В., Елаков А.Л., Кочергин-Никитский К.С., Алипер Т.И., Чучалин С.Ф., Гулюкин А.М.** Молекулярно-генетическая характеристика геномов полевых изолятов вируса бешенства, циркулирующих на территории Кировской области ..... 186

### НЕКРОЛОГ

**Памяти С.В. Гребенчи** .....

## CONTENTS

### REVIEWS

- Zhirnov O.P.** Asymmetric structure of the influenza A virus and novel function of the matrix protein M1 ..... 149
- Alekseev K.P., Kalnov S.L., Grebennikova T.V., Aliper T.I.** Human rotavirus infection. Strategies for the vaccinal prevention ..... 154

### ORIGINAL RESEARCH

- Lvov D.K., Burtseva E.I., Kolobukhina L.V., Fedyakina I.T., Kirillova E.S., Trushakova S.V., Feodoritova E.L., Belyaev A.L., Merkulova L.N., Krasnoslobodtsev K.G., Mukasheva E.A., Garina E.O., Oskerko T.A., Aristova V.A., Vartanian R.V., Kisteneva L.B., Deryabin P.G., Prilipov A.G., Alkhovsky S.V., Kruzhkova I.S., Bazarova M.V., Deviatkin A.V.** Virological, epidemiological, clinic, and molecular genetic features of the influenza epidemic in 2015–2016: prevailing of the influenza A(H1N1)09 pdm virus in Russia and countries of the Northern hemisphere ..... 159
- Krasnoslobodtsev K.G., Lvov D.K., Alkhovsky S.V., Burtseva E.I., Fedyakina I.T., Kolobukhina L.V., Kirillova E.S., Trushakova S.V., Oskerko T.A., Shchelkanov M.Yu., Deryabin P.G.** Amino acid polymorphism at residue 222 of the receptor-binding site of the hemagglutinin of the pandemic influenza A(H1N1)pdm09 from patients with lethal virus pneumonia in 2012–2014 ..... 166
- Maldov D.G., Andronova V.L., Balakina A.A., Ilyichev A.V., Galegov G.A.** Influence of the immunomodulatory drug stimforte on the humoral immune response in the experimental herpes virus infection ..... 172
- Korzaia L.I., Keburia V.V., Dogadov D.I., Lapin B.A., Kyuregyan K.K., Mikhailov M.I.** Markers of hepatitis E among the population of the Greater Sochi and in monkeys of the Adler primate center ..... 176
- Shchelkanov M.Yu., Deviatkin A.A., Ananiev V.Yu., Frolov E.V., Dombrovskaya I.E., Dedkov V.G., Ardashev A.V., Kolomeets S.A., Korotkova I.P., Lyubchenko E.N., Bandedev V.V., Prosyannikova M.N., Galkina I.V., Ivanushko E.S., Emelyanova N.P., Baranov N.I., Ulyanova S.A., Aramilev S.V., Fomenko P.V., Surovy A.L., Poroshin N.A., Sokol N.N., Maslov D.V., Makhinya E.E., Shipulin G.A.** Isolation and complete genome sequencing of rabies virus strain isolated from a brown bear (*Ursus arctos*) that attacked a human in Primorsky krai (November, 2014) ..... 180
- Zaykova O.N., Grebennikova T.V., Elakov A.L., Kochergin-Nikitsky K.S., Aliper T.I., Chuchalin S.F., Gulyukin A.M.** Monitoring of rabies in wild animals in the Kirov region after oral immunization ..... 186

### OBITUARY

**S.V. Grebencha**

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

## ОБЗОРЫ

© ЖИРНОВ О.П., 2016  
УДК 578.832.1:578.32:581.1

*Жирнов О.П.*

### АСИММЕТРИЧНАЯ СТРУКТУРА ВИРУСА ГРИППА А И НОВАЯ ФУНКЦИЯ МАТРИКСНОГО БЕЛКА M1

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

Вирус гриппа А относится к оболочечным вирусам. Структура вируса включает 2 основных модуля: наружную липопротеидную оболочку и внутренний рибонуклеопротеид (РНП), содержащий геномную негативно-полярную РНК. В состав липопротеидной оболочки входят 4 вирусных белка: наружные гликопротеиды гемагглютинин (HA), нейраминидаза (NA), трансмембранный белок ионных каналов M2 и минорное количество белка ядерного экспорта NEP. РНП состоит из вирусной РНК и четырех полипептидов: главного нуклеокапсидного белка NP и трех полимеразных белков PB1, PB2, PA. Оба модуля соединены в вирусной частице сетью белкового матрикса M1, который поддерживает структурную целостность вириона – так называемая функция структурной интеграции вириона. В соответствии со структурной функцией белки NP и M1 доминируют в вирионе и содержатся в количестве 1000 и 3000 молекул соответственно. Помимо структурной функции матриксный белок выполняет ряд функций по регуляции внутриклеточного транспорта и ядерного экспорта вирусного РНП и сборки вирусных частиц (budding) на плазматической мембране в инфицированных клетках. В статье рассматривается биполярная структура вирусной частицы с асимметричной локализацией вирусных РНП и неравномерной сетью матрикса M1 и белка ионных каналов M2. Обсуждается роль матриксного белка M1 в поддержании асимметричной локализации вирусных РНП в вирусной частице и регуляции их транспорта внутри вирусной частицы из головного вирусного домена к месту выхода из вириона. Приведены первые экспериментальные данные о том, что транспорт вирусных РНП внутри вирусной частицы направляется белком M1, и этот транспорт необходим для завершения процесса “раздевания” вируса и инициации инфекционного процесса в клетке-мишени. Высказана идея о создании нового класса антивирусных химиопрепаратов, активирующих АТФазы ранних эндосом в клетке-мишени.

*Ключевые слова:* вирус гриппа; структура; проникновение вируса; M1; кислый pH.

*Для цитирования:* Жирнов О.П. Асимметричная структура вируса гриппа А и новая функция матриксного белка M1. *Вопросы вирусологии.* 2016; 61 (4): 149-154. DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-4-149-154

*Zhirnov O.P.*

### ASYMMETRIC STRUCTURE OF THE INFLUENZA A VIRUS AND NOVEL FUNCTION OF THE MATRIX PROTEIN M1

D.I. Ivanovsky Institute of Virology «Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation

Influenza virus is an enveloped virus. It comprises two major modules: external lipoprotein envelope and internal ribonucleoprotein (RNP) containing the genomic negative-strand RNA. Lipoprotein envelope contains four vital proteins: hemagglutinin (HA), neuraminidase (NA), transmembrane ionic channel M2, and minor amounts of nuclear export protein NEP. RNP contains RNA and four polypeptides: major nucleocapsid protein NP and three polymerase subunits PB1, PB2, PA. Both modules are linked with each other by matrix M1 maintaining the virus integrity. According to the structural function, NP and M1 are predominant in virus particle in the amounts of 1000 and 3000 molecules, respectively. In addition to the structural function, M1 plays a role in regulation of intracellular and nuclear migration of viral RNP and virus assembly, referred as budding process, at the plasma membrane in infected cells. The bipolar structure of the influenza virus characterized by asymmetric location of RNP and nonregular distribution of M1 and M2 inside the virion is reviewed. The role of M1 in maintaining the asymmetric structure of the virus particle and regulation of RNP transport inside virus particle is considered. First experimental data confirming (i) intravirion RNP transport and its outside exit directed by the M1 and (ii) the importance of this process in virus uncoating and initiation of infection in target cell are discussed. A novel class of antiviral agents activating ATP-ase of the early endosome compartment in the target cell is discussed.

*Key words:* influenza virus; structure; virus entry; M1; acidic pH.

This paper is dedicated to a great Russian scientist, Academician N.V. Kaverin.

*For citation:* Zhirnov O.P. Asymmetric structure of the influenza A virus and novel function of the matrix protein M1. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal).* 2016; 61(4): 149-154. (In Russ.).

DOI 10.18821/0507-4088-2016-61-4-149-154

*Для корреспонденции:* Жирнов Олег Петрович, д-р биол. наук, проф., зав. лаб. вирусного патогенеза, Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, E-mail: zhirnov@inbox.ru

**For correspondence:** Oleg P. Zhirnov, Doctor of Biological Sciences, professor, head of the laboratory of viral pathogenesis D.I. Ivanovsky Institute of Virology «Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation, E-mail: zhirnov@inbox.ru

**Acknowledgments.** The author is grateful to Professor A. A. Manykin for participation in electron microscopy studies.

**Funding.** This work was supported by grants RFBR No. 13-04-001824, 16-54-12063 .

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 23 July 2015  
Accepted 19 November 2015

## Введение

Структура вируса гриппа А включает 2 основных модуля: наружную липопротеидную оболочку и внутренний рибонуклеопротеид (РНП), содержащий вирусную РНК негативной полярности. Липопротеидная оболочка сформирована липидным бислоем, в который погружены 3 трансмембранных белка: гемагглютинин (НА), нейраминидаза (НА) и белок ионных каналов М2. РНП состоит из 8 сегментов РНК, упакованной основным вирусным белком NP и тремя полипептидами вирусной полимеразы PB1, PB2, PA. Белок NP является одним из главных структурных белков и присутствует в количестве около 1000 молекул на вирион [1]. Оба модуля связаны в вирусной частице белковым матриксом М1, который количественно превосходит другие вирусные белки и присутствует в виде 3000 молекул [1].

Вирус гриппа А имеет 2 класса частиц: сферические диаметром около 100 нм и филаментозные в виде тяжелой диаметром около 100 нм и длиной, достигающей 20 мкм [2]. Сферический и филаментозный фенотипы вируса обусловлены особенностями вирусного матрикса М1 и трансмембранного белка ионных каналов М2, которые влияют на взаимодействие вирусного РНП с липидной мембраной в составе вируса и клеточной мембраной при сборке вируса в инфицированных клетках [3–7], а также клеточными факторами Rab-11 [8]. Обе морфологические формы имеют высокую инфекционную активность [3]. Настоящая работа сфокусирована на рассмотрении структуры вируса гриппа А сферической формы. Этот тип вирионов доминирует в вирусных препаратах при пассировании вируса в клеточных культурах и куриных эмбрионах [9].

До настоящего времени модель строения вируса гриппа А представляется в форме симметричного шара. Согласно этой модели, вирус имеет шаровидную форму со случайным распределением компонентов как в липидной оболочке, так и во внутренней полости, которую, как считается, равномерно заполняют 8 сегментов РНП, а внутренняя сфера вириона симметрично выстлана матриксным белком М1 [10, 11]. На рис. 1 (см. вторую полосу обложки) изображена традиционная симметричная модель вируса гриппа А. Однако в последнее время накапливаются данные, позволяющие пересмотреть указанную симметричную модель. В этом плане можно рассматривать 3 группы наблюдений, которые ставят под сомнение симметричную модель вируса:

- данные о структурной перестройке вируса под влиянием кислого рН и ее влиянии на функциональные свойства вируса;

- данные о механизме почкования вирусных частиц в инфицированных клетках;
- данные о локализации сегментов РНП в вирусных частицах.

## 1. Структурные и функциональные превращения вируса гриппа под влиянием кислого рН

Вирус гриппа имеет 2 функциональных состояния, которые определены структурной формой поверхностного гликопротеида НА. Вирусный гликопротеид существует в форме нерасщепленного белка НА0 с мол. массой 75 кД и в расщепленной форме в виде двух субъединиц НА1 (55 кД) и НА2 (20 кД), связанных дисульфидной связью. Расщепление НА0 → НА1 + НА2 осуществляют мембранно-связанные протеазы клетки-хозяина. Вирионы, содержащие НА0, – неинфекционные и не могут инициировать инфекцию клеток-мишеней, а вирионы с НА1/НА2 обладают полноценной инфекционностью [12]. Оказалось, что эти классы вирионов по-разному чувствительны к обработке кислым рН в диапазоне 4,0–5,0 и различным образом изменяют свою структуру. После обработки кислым рН в вирионах обоих классов обнаруживались выпячивания (пузыри) липидной оболочки по одному на вирион, которые имели размер около 25–30 нм и были лишены наружных поверхностных шипов НА и NA [13, 14]. Через эти везикулы внутрь вириона входил краситель при инкубации в кислой среде, что указывало на их проницаемость для ионов. Важным оказалось наблюдение специфической проницаемости оболочки вируса только у вирионов класса НА1/НА2, тогда как вирионы с НА0 оказались непроницаемыми в кислой среде [14].

Возникал вопрос: будет ли закисление среды оказывать влияние на внутреннюю структуру вируса? Исследования с помощью электронной микроскопии показало

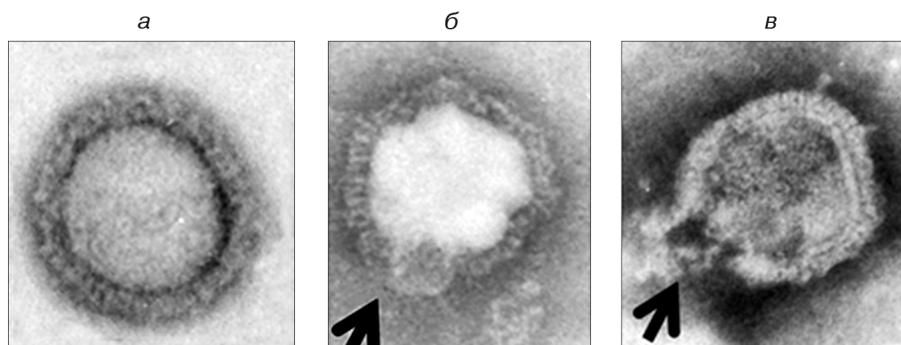


Рис. 2. Морфология вируса гриппа А после экспозиции в кислой среде.

Вирус A/Aichi/2/68 (H3N2) выращивали в культуре клеток МДСК-Н в присутствии трипсина для расщепления вирусного белка НА0 → НА1 + НА2 (НА1/НА2) и синтезированный вирус экспонировали при рН 4,5. Образцы исследовали в электронном микроскопе с помощью негативного контрастирования фосфорно-вольфрамовой кислотой (ФВК).

а – исходный вирус; б – начальное закисление и вход ФВК через наружный пузырь; в – терминальная стадия закисления и распад вириона в зоне пузыря. Стрелкой показана зона пузыря.

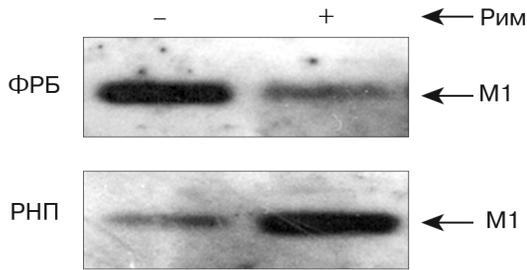


Рис. 3. Комплексообразование РНП с белком М1 в вирусе после экспозиции в кислой среде в присутствии римантадина.

Вирус A/Aichi/2/68 (H3N2) выращивали в культуре клеток МДСК-Н в присутствии трипсина для расщепления вирусного белка HA0 → HA1 + HA2 (HA1/HA2) и синтезированный вирус экспонировали при pH 4,5. Далее вирус инкубировали в кислой среде, разрушали липидную оболочку неионным детергентом NP-40 и разделяли на фракции РНП и фракцию растворимых белков (ФРБ). Белки идентифицировали с помощью метода вестерн-блот. При экспозиции в кислой среде белок переходит из фракции РНП во фракцию растворимых белков. При инкубации в присутствии римантадина М1 сохраняет связь с РНП и обнаруживается во фракции РНП.

ли, что внутренняя полость вируса с HA1/HA2 быстро закисляется, вызывая распад вирусных частиц в зоне пузыря (рис. 2). При распаде освобождались структуры свободного вирусного РНП, что говорило о разрушении связи М1-РНП внутри вируса. Напротив, вирионы с HA0 имели полную непроницаемость и сохраняли структурную целостность в кислой среде. Эти наблюдения дали основание считать, что ионные каналы М2 у вируса с HA0 находились в неактивном закрытом состоянии. У вируса с HA1/HA2 каналы М2 обладали проницаемостью для протонов, что приводило к закислению внутри вируса и потере структурной целостности внутренней структуры вируса.

Для проверки этого предположения проводили эксперименты с римантадином – ингибитором ионных каналов М2 вируса гриппа А [15]. В качестве критерия внутренней целостности исследовали комплексообразование РНП с белковым матриксом М1. Оказалось, что предобработка вируса HA1/HA2 с римантадином полностью предотвращала нарушение связи М1 с РНП при инкубации в кислой среде (рис. 3). Напротив, у вируса HA1/HA2, не обработанного римантадином, экспозиция в кислой среде полностью разрушала взаимодействие М1-РНП. Эти наблюдения указывают на то, что, во-первых, эффект внутреннего закисления вируса опосредован каналом М2, и, во-вторых, такое закисление приводит к дезинтеграции матрикса М1 с РНП внутри вирусной частицы.

Вполне естественно возник вопрос о влиянии кислого pH на биологические свойства вируса, в частности на инфекционную активность вируса и полимеразную активность его внутреннего РНП. Влияние кислого pH на эти активности оказалось зависимым от формы белка HA в вирусе. Вирус с HA0 сохранял инфекционность после кислотной обработки, тогда как вирус с HA1/HA2 быстро терял инфекционность уже после 5–10-минутной экспозиции в кислой среде. Кроме этого, такая кислотная экспозиция оказывала избирательное действие на полимеразную активность РНП внутри вируса. Если полимеразная активность РНП внутри вируса с HA0 была на низком уровне и практически не изменялась после кислотной обработки, активность РНП в вирусе с HA1/HA2 значительно возрастала в 5–10 раз (рис. 4). В со-

вокупности эти, на первый взгляд, парадоксальные данные имели следующее логическое объяснение. При кислотной обработке вируса с HA1/HA2 происходит закисление его внутреннего объема, которое ведет к распаду комплекса М1-РНП и освобождению вирусного РНП от ингибиторного воздействия белка М1 [16–18], что приводило к экзальтации его полимеразной активности. Напротив, у вируса с HA0 вследствие закупорки ионных каналов М2 не происходит внутреннего закисления и сохраняется контакт белка М1 с РНП, препятствующий полимеразной функции РНП.

Важный вопрос, требующий объяснения: почему вирус с HA1/HA2 и активированным РНП не имел инфекционной активности? Наиболее логичным представляется предположение о том, что РНП не может самостоятельно выходить из вириона в клетке-мишени. Для этого ему нужен контакт с матриксом М1. В этом процессе М1, вероятно, играет роль моторного белка, осуществляющего активный выход вирусного РНП из вириона. В вирусных частицах с асимметричной структурой сегменты РНП, локализованные в головном домене, должны выходить с противоположного (анального) полюса. Такой внутривирионный транспорт РНП может происходить по каналам белкового матрикса М1 посредством последовательного перескока. Возможно, вирусный белок NEP, который обнаруживается в вирионном матриксе М1 [19], участвует в этом транспорте в кооперации с М1. При нарушении М1-зависимого транспорта вирус терял инфекционность, несмотря на высокую полимеразную активность РНП. Схематично этот процесс проиллюстрирован на рис. 5 (см. на вторую полосу обложки).

**2. Формирование асимметричной структуры вируса гриппа А при его сборке и почковании на плазматической мембране клетки**

Важные данные, подтверждающие концепцию асимметричной структуры вируса гриппа, представлены в работе японских авторов [11, 20]. С помощью метода электронной томографии авторы установили неравномерное распределение сегментов РНП внутри вирусной частицы. Все сегменты группировались в виде грозди, которая прикреплялась к матриксу М1 в определенном сайте внутренней сферы вириона. Свободные концы РНП свешивались внутрь полости вириона на различную глубину в зависимости от длины сегмента. Асим-

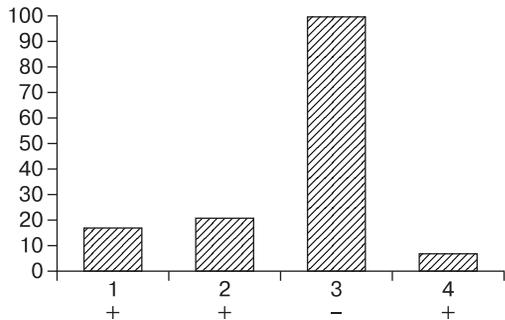


Рис. 4. Полимеразная и инфекционная активность вирусного РНП после экспозиции с кислым pH.

Вирус гриппа А с HA0 (1, 2) или HA1/HA2 (3, 4) инкубировали в кислой среде с pH 4,5 (1, 3). Далее исследовали полимеразную активность вирионного РНП. Знаками «+» и «-» показан инфекционный и неинфекционный вирус соответственно.

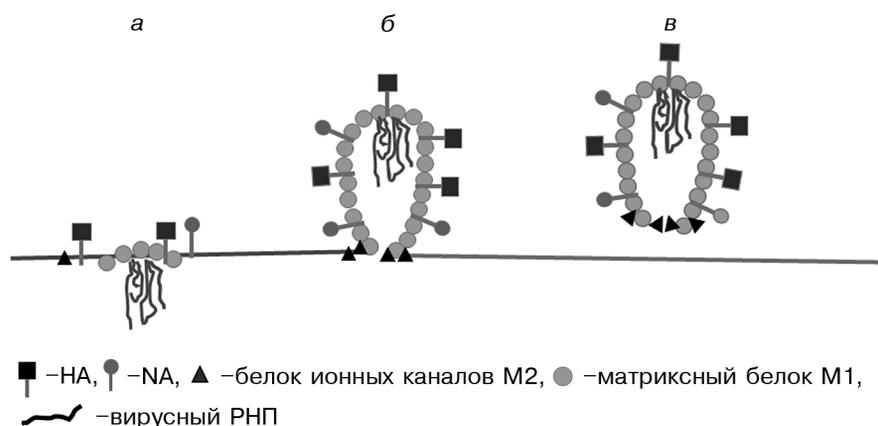


Рис. 7. Схема почкования вируса гриппа А на плазматической мембране клетки-мишени.

Показаны последовательные стадии асимметричного образования вириона: а — образование липидного микродомена на плазматической мембране; б — фаза инвагинации вирусного РНП; в — фаза отшнуровывания и почкования вириона.

метричная локализация сегментов РНП внутри вируса имеет важные характеристики, связанные с их функцией и процессом сборки вируса на клеточной мембране.

Как известно, сегменты РНП вируса гриппа, имеющие форму «сковородки с ручкой», формируются из закрученной самой на себя спирали РНК в комплексе с главным нуклеокапсидным белком NP. 3'- и 5'-концевые участки РНК сохранены на конце «ручки», и на них локализованы субъединицы вирусной полимеразы. Как сказано выше, сегменты РНП в составе вируса не активны в РНК-полимеразной реакции, и на этом основании можно предположить, что РНП-сегменты связаны с матриксом М1 посредством своей «ручки», содержащей субъединицы полимеразы. Такая связь М1 с полимеразой сохраняла РНП в неактивном состоянии. Инкубация вируса с НА1/НА2 в кислой среде разрушает этот комплекс, что ведет к активации полимеразной функции свободного РНП в составе вируса (см. рис. 4).

Вторая важная характеристика внутривирионной локализации комплексов РНП связана с их участием в сборке вируса (так называемом почковании) на плазматической мембране в инфицированной клетке. Известно, что процесс почкования начинается с подбора 8 сегментов и их концентрации на определенном участке плазматической мембраны, так называемом «плотике» [21–23]. Далее происходит инвагинация комплекса («грозди») РНП клеточной мембраной, содержащей вирусные белки НА, NA и М2. Завершается процесс выпячиванием (так называемый budding), замыканием липидной мембраны в кольцо и отшнуровыванием частицы вируса. В зоне отшнуровывания вириона концентрируется вирусный белок М2 (и, возможно, NA), которому приписывают ключевую роль в процессе отпочкования вириона от мембраны клетки (рис. 6, см. на второй полосе обложки). В результате почкования формируется асимметричная (ракетообразная) структура вируса, когда в головном домене сконцентрирован комплекс РНП, а в анальном полюсе сконцентрирован отшнуровывающий белок М2, повышенное количество NA и брешь в белковом матриксе М1 (рис. 6, 7).

Важная особенность асимметричной структуры вируса гриппа заключается в неравномерном распределении

белкового матрикса М1 в вирионе. В частности, внутри белкового матрикса обнаруживались небольшие брешь, лишенные белка М1 [24, 25]. Такую брешь авторы связывали с участком отшнуровывания при почковании вириона на плазматической мембране. Наши наблюдения формирования пузырей на поверхности вирионов в кислой среде полностью согласуются с таким предположением. Наиболее вероятно, такая брешь в М1-матриксе соответствует участку образования пузыря в вирионе при кислотной экспозиции. Именно по причине отсутствия белкового матрикса в зоне пузыря происходит его преимущественный разрыв по сравнению с соседними ригидными участками, покрытыми матриксом М1. Отсутствие матрикса М1 в зоне пузыря согласуется также с наблюдением отсутствия шипов НА и NA

на его поверхности, поскольку шипы этих гликопротеинов, как известно, закорены своими трансмембранными концами в белковый матрикс М1 [26].

### 3. Роль асимметричной структуры вируса на этапе внедрения в клетку и новые химиотерапевтические мишени

Главным механизмом внедрения вируса гриппа А в клетку-мишень при ее инфекции служит клатрин-зависимый клеточный рецепторный эндоцитоз [27]. В качестве возможных второстепенных механизмов для внедрения вируса гриппа А могут использоваться также пиноцитоз или кавеолин-зависимый путь [28]. В ходе рецепторного эндоцитоза вирус входит в фазу ранних эндосом, имеющих рН около 6,0, и далее переходит в поздние эндосомы с рН в диапазоне 4,4–5,0, где завершается процесс освобождения от липопротеидной оболочки и освобождения РНП. Вышедшие свободные РНП взаимодействуют с клеточными медиаторами («карго»), осуществляющими внутриядерный транспорт, и уже в ядре на матрице РНП начинается репликативная фаза синтеза вирусных РНК. Преодолевая последовательно фазу ранних и поздних эндосом, вирус гриппа претерпевает воздействие градиента рН от слабोकислого 6,0 до кислого 4,5. Более того, на этом маршруте вирус проходит смену концентрации  $K^+$  от низкой в ранних эндосомах до высокой в поздних эндосомах [29].

Преодолевая кислую среду эндосом и калиевый шифт, вирус гриппа должен избежать преждевременного закисления внутренней полости вириона, вызывающего дестабилизацию М1-РНП-связи и ингибирование его инфекционности (см. выше раздел 1). Чтобы согласовать эти, на первый взгляд, противоречивые данные, мы предположили, что М1-регулируемый транспорт РНП из головной части в анальный домен внутри вируса происходит на этапе ранних эндосом еще до момента более мощного закисления в поздних эндосомах (см. рис. 5). В поздних эндосомах происходит разрыв связи РНП с матриксом М1, который реализуется уже в анальном домене вириона в зоне пузыря и легко освобождает РНП для взаимодействия с клеточными белками-перевозчиками, осуществляющими его транспорт в клеточное ядро. Таким образом, асимметричная структура вируса позволя-

ет вирусному РНП до последнего момента оставаться в защищенном состоянии, что, вероятно, предохраняет его от контакта с клеточными антивирусными белками, так называемыми паттерн-распознающими рецепторами (PPR), включая RIG-I-хеликазы, TLR-рецепторы (toll-like receptors), NLR-рецепторы (nucleotide-binding and leucine-rich receptors) [30, 31].

Результаты, касающиеся быстрой потери инфекционности вируса под действием кислого pH 4,0–5,0, создают платформу для поиска и конструирования нового класса противовирусных химиопрепаратов, способных влиять на pH среды вне или внутри клетки-мишени. Это предположение вытекает из концепции об активной роли матричного белка M1 в выходе РНП из вирусной частицы и разрушения этого процесса при преждевременном закислении. К 1-й группе можно отнести вещества, способные понижать pH среды, в которой находится вирус, например в назобронхиальном сурфактанте, до 4,0–5,0. В этом случае продуцируемый эпителием вирус будет быстро инактивироваться и терять способность заражать новые клетки. 2-ю группу могут составить вещества, способные понижать кислотность ранних внутриклеточных эндосом. Логично предположить, что понижения pH эндосом можно достичь с помощью агентов, способных активировать АТФазный протонный насос ранних эндосом и уменьшать pH с 6,0 до 5,0 и ниже в этом клеточном компартменте. В этом случае у вируса гриппа при вхождении в клетку уже в зоне ранних эндосом будет реализовываться преждевременное разрушение связи M1-РНП, делающее невозможным выход РНП в поздних эндосомах и ведущее к инактивации вируса, как это представлено на рис. 5. По механизму действия активаторы протонного насоса можно рассматривать как патогенетические антагонисты таких препаратов, как амантадин и римантадин, которые, напротив, блокируя вирусные каналы M2, как бы замораживают дезинтеграцию вируса в клетке-мишени и останавливают инфекционный процесс [15].

### Заключение

Исследования последних лет позволяют рассматривать асимметричную структуру вируса гриппа А, состоящую из головного домена, в котором сконцентрирован комплекс из 8 сегментов вирусного РНП и локализованного на противоположном полюсе вириона кольцевого участка (анального домена), лишённого белкового матрикса M1 и окруженного по периферии скоплением белка M2 и, возможно, NA. Асимметричность структуры вируса гриппа А формируется в стадии сборки вируса на плазматической мембране клетки-мишени, когда комплекс РНП инициирует выпячивание и последующую инвагинацию вирусной частицы фрагментом клеточной липидной мембраны. Процесс выпячивания (budding) завершается перетяжкой мембраны и отшнуровыванием зрелой вирусной частицы от клеточной мембраны, его главным медиатором выступает вирусный белок ионного канала M2, а белок M1 образует кольцевую брешь (анус) в этом участке вирусной частицы. По этой причине зона ануса является наиболее слабым местом в вирусной оболочке. Анальный домен вируса может наиболее легко разрушаться при вхождении и разведении вируса в эндосоме клетки-мишени и через образовавшийся разрыв РНП выходит в цитоплазму и затем мигрирует в ядро, чтобы инициировать процесс вирусной репликации. Транспорт РНП из головного в анальный домен

вируса для выхода из вируса, вероятно, осуществляется матричным белком M1 (возможно, в кооперации с вирусным NEP). Этот транспорт РНП внутри вириона важен для запуска инфекции в клетке-мишени, и его повреждение ведет к потере вирусом инфекционности. Преждевременное закисление можно рассматривать как платформу для создания нового класса антивирусных химиопрепаратов.

*Автор благодарит проф. А.А. Манькина за помощь в проведении электронно-микроскопических исследований.*

**Автор посвящает статью памяти великого российского ученого – академика РАН Каверина Н.В.**

**Финансирование.** Работа поддержана грантами РФФИ № 13-04-001824, 16-54-12063.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### ЛИТЕРАТУРА (пп. 2–12, 14–15, 17–31 см. REFERENCES)

1. Жирнов О.П., Букринская А.Г. Белки вируса гриппа. Включение вновь синтезированных вирусных белков в вирионы. *Вопросы вирусологии.* 1982; (5): 549–56.
13. Жирнов О.П., Манькин А.А. pH-зависимые перестройки в структуре вируса гриппа А. *Вопросы вирусологии.* 2014; 59 (3): 41–6.
16. Жирнов О.П. Белки вируса гриппа: соллобилизация *in vitro* матричного белка M1 вириона зависит от протеолитического нарезания гематоглининина и от pH. В кн.: Каверин Н.В., ред. *Молекулярная биология и генетическая инженерия вирусос.* М.; 1989: 50–7.

### REFERENCES

1. Zhirnov O.P., Bukrinskaya A.G. The proteins of influenza virus. Inclusion of newly synthesized viral proteins into virions. *Voprosy Virusologii.* 1982; (5): 549–56. (in Russian)
2. Kilbourne E.D., Murphy J.S. Genetic studies of influenza viruses. I. Viral morphology and growth capacity as exchangeable genetic traits. Rapid *in ovo* adaptation of early passage Asian strain isolates by combination with PR8. *J. Exp. Med.* 1960; 111: 387–406.
3. Roberts P.C., Lamb R.A., Compans R.W. The M1 and M2 proteins of influenza A virus are important determinants in filamentous particle formation. *Virology.* 1998; 240 (1): 127–37.
4. McCown M.F., Pekosz A. The influenza A virus M2 cytoplasmic tail is required for infectious virus production and efficient genome packaging. *J. Virol.* 2005; 79 (6): 3595–605.
5. Iwatsuki-Horimoto K., Horimoto T., Noda T., Kiso M., Maeda J., Watanabe S. et al. The cytoplasmic tail of the influenza A virus M2 protein plays a role in viral assembly. *J. Virol.* 2006; 80 (11): 5233–40.
6. Elleman C.J., Barclay W.S. The M1 matrix protein controls the filamentous phenotype of influenza A virus. *Virology.* 2004; 321 (1): 144–53.
7. Roberts K.L., Leser G.P., Ma C., Lamb R.A. The amphipathic helix of influenza A virus M2 protein is required for filamentous bud formation and scission of filamentous and spherical particles. *J. Virol.* 2013; 87 (18): 9973–82.
8. Bruce E.A., Digard P., Stuart A.D. The Rab11 pathway is required for influenza A virus budding and filament formation. *J. Virol.* 2010; 84 (12): 5848–59.
9. Choppin P.W., Murphy J.S., Tamm I. Studies of two kinds of virus particles which comprise influenza A2 virus strains. III. Morphological characteristics: independence to morphological and functional traits. *J. Exp. Med.* 1960; 112: 945–52.
10. McHardy A.C., Adams B. The role of genomics in tracking the evolution of influenza A virus. *PLoS Pathog.* 2009; 5 (10): e1000566.
11. Einfeld A.J., Neumann G., Kawaoka Y. At the centre: influenza A virus ribonucleoproteins. *Nat. Rev. Microbiol.* 2015; 13 (1): 28–41.
12. Zhirnov O.P., Klenk H.D., Wright P.F. Aprotinin and similar protease inhibitors as drugs against influenza. *Antiviral. Res.* 2011; 92 (1): 27–36.
13. Zhirnov O.P., Manykin A.A. pH-dependent adjustment in the

- structure of the influenza virus A. *Voprosy virusologii*. 2014; 59 (3): 41–6. (in Russian)
14. Zhirnov O.P., Manykin A.A. Abnormal morphological vesicles in influenza A virus exposed to acid pH. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2015; 158 (6): 776–80.
  15. Pinto L.H., Lamb R.A. The M2 proton channels of influenza A and B viruses. *J. Biol. Chem.* 2006; 281 (14): 8997–9000.
  16. Zhirnov O.P. The proteins of influenza virus: solubilization in vitro matrix protein M1 virion depends on proteolytic cutting hemagglutinin and the pH. In: Kaverin N.V., ed. *Molecular Biology and Genetic Engineering of Viruses [Molekulyarnaya biologiya i geneticheskaya inzheneriya virusov]*. Moscow; 1989: 50–7. (in Russian)
  17. Zhirnov O.P. Solubilization of matrix protein M1/M from virions occurs at different pH for orthomyxo- and paramyxoviruses. *Virology*. 1990; 176 (1): 274–9.
  18. Zhirnov O.P. Isolation of matrix protein M1 from influenza viruses by acid-dependent extraction with nonionic detergent. *Virology*. 1992; 186 (1): 324–30.
  19. Yasuda J., Nakada S., Kato A., Toyoda T., Ishihama A. Molecular assembly of influenza virus: association of the NS2 protein with virion matrix. *Virology*. 1993; 196 (1): 249–55.
  20. Noda T., Sugita Y., Aoyama K., Hirase A., Kawakami E., Miyazawa A. et al. Three-dimensional analysis of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus. *Nat. Commun.* 2012; 3: 639.
  21. Nayak D.P., Balogun R.A., Yamada H., Zhou Z.H., Barman S. Influenza virus morphogenesis and budding. *Virus Res.* 2009; 143 (2): 147–61.
  22. Rossman J.S., Lamb R.A. Influenza virus assembly and budding. *Virology*. 2011; 411 (2): 229–36.
  23. Rossman J.S., Jing X., Leser G.P., Lamb R.A. Influenza virus M2 protein mediates ESCRT-independent membrane scission. *Cell*. 2010; 142 (6): 902–13.
  24. Harris A., Cardone G., Winkler D.C., Heymann J.B., Brecher M., White J.M. et al. Influenza virus pleiomorphy characterized by cryoelectron tomography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2006; 103 (50): 19123–7.
  25. Barman S., Nayak D.P. Lipid raft disruption by cholesterol depletion enhances influenza A virus budding from MDCK cells. *J. Virol.* 2007; 81 (22): 12 169–78.
  26. Ali A., Avalos R.T., Ponimaskin E., Nayak D.P. Influenza virus assembly: effect of influenza virus glycoproteins on the membrane association of M1 protein. *J. Virol.* 2000; 74 (18): 8709–19.
  27. Helenius A. Unpacking the incoming influenza virus. *Cell*. 1992; 69 (4): 577–8.
  28. Sieczkarski S.B., Whittaker G.R. Influenza virus can enter and infect cells in the absence of clathrin-mediated endocytosis. *J. Virol.* 2002; 76 (20): 10 455–64.
  29. Stauffer S., Feng Y., Nebioglu F., Heilig R., Picotti P., Helenius A. Stepwise priming by acidic pH and a high K<sup>+</sup> concentration is required for efficient uncoating of influenza A virus cores after penetration. *J. Virol.* 2014; 88 (22): 13 029–46.
  30. Akira S., Uematsu S., Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006; 124 (4): 783–801.
  31. Moore C.B., Ting J.P. Regulation of mitochondrial antiviral signaling pathways. *Immunity*. 2008; 28 (6): 735–9.

Поступила 23.07.15  
Принята в печать 19.11.15

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016  
УДК 615.371:578.823.91

*Алексеев К.П., Кальнов С.Л., Гребенникова Т.В., Алипер Т.И.*

## РОТАВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ ЧЕЛОВЕКА. СТРАТЕГИИ ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКИ

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

Ротавирус был впервые выделен в 1973 г. от больных диареей детей в Австралии. В развивающихся странах сотни тысяч детей ежегодно погибают от этого вируса, пик смертности приходится на самые бедные страны. По данным ВОЗ, ротавирусная инфекция уносит ежегодно около 440 тыс. детских жизней, являясь по важности третьей после пневмонии и малярии причиной смертности. Ротавирус распространен повсеместно и к 5 годам почти каждый ребенок на планете хотя бы раз сталкивался с этим патогеном. Ротавирус отличается высоким генетическим и антигенным разнообразием. Наибольшее значение для человека имеет ротавирус группы А, а наиболее распространенными на сегодняшний день генотипами являются G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8] и в меньшей степени G12P[8]. Выделяют 3 устойчивых сочетания генов ротавируса, обозначаемых Wa, Ds-1 и AU-1. Предполагают их происхождение от ротавирусов свиней, крупного рогатого скота (КРС), собак и кошек соответственно. Описаны случаи межвидовых переходов ротавируса от животных к человеку. Первые вакцины против ротавирусной инфекции были основаны на естественно аттенуированном вирусе животного происхождения. Их эффективность, особенно в развивающихся странах, оказалась недостаточной, однако сегодня в Китае и Индии применяются вакцины на основе ротавирусов животного происхождения. Методом реассортации на основе ротавируса КРС WC3 была получена успешно применяемая сегодня пентавалентная вакцина против основных серотипов ротавируса человека RotaTeq. Способность ротавируса обеспечивать защиту и против гетерологичных изолятов учли при разработке другой вакцины – Rotarix, созданной на основе генотипа G1P1A[8]. Эффективность этих вакцин в развивающихся странах значительно снижена (до 51%), стоимость дозы высока, поэтому поиски более эффективных, безопасных и недорогих вакцин против ротавирусной инфекции продолжают во всем мире.

Ключевые слова: обзор; ротавирус; вакцина; межвидовые переходы.

*Для цитирования:* Алексеев К.П., Кальнов С.Л., Гребенникова Т.В., Алипер Т.И. Ротавирусная инфекция человека. Стратегии вакцинопрофилактики. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61 (4): 154–159. DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-4-154-159

*Для корреспонденции:* Алексеев Константин Петрович, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. прикладной вирусологии и биотехнологии, Институт вирусологии им. Д.И. Иванковского ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, E-mail: kkendwell@mail.ru

Alekseev K.P., Kalnov S.L., Grebennikova T.V., Aliper T.I.

## HUMAN ROTAVIRUS INFECTION. STRATEGIES FOR THE VACCINAL PREVENTION

D.I. Ivanovsky Institute of Virology «Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation

Rotavirus was first isolated in 1973 in Australia from children with diarrhea. Hundreds of thousands of children die annually in developing countries from this virus with the mortality peaks in the most impoverished among them. According to WHO, rotavirus infection claims about 440 thousands children lives each year, being third in the mortality rate after pneumonia and malaria. Rotavirus is widely spread throughout the world and by the age of five years almost every child encountered this pathogen at least once.

Rotavirus has a high genetic and antigenic diversity. The most important for humans is the group A rotavirus, and the most common by far genotypes are G1P [8], G2P [4], G3P [8], G4P [8], G9P [8], and to a lesser extent G12P [8]. There are three gene constellations described in rotavirus designated Wa, Ds-1, and Au-1. It is believed that they originated from rotaviruses of pigs, cattle, dogs, and cats, respectively. Cases of rotavirus interspecies transmission from animal to humans were reported.

The first vaccines against rotavirus infection were based on naturally attenuated virus of the animal origin. Their efficiency, especially in developing countries, was inadequate, but today China and India use vaccines based on animal rotaviruses. Using the method of gene reassortation with the cattle rotavirus WC3 as a backbone, pentavalent vaccine against most common human rotavirus serotypes was developed and now successfully used as RotaTeq. The ability of rotavirus to protect against heterologous isolates was taken into account in the development of other vaccine, Rotarix, created on the basis of rotavirus genotype G1P1A [8]. The efficacy of these vaccines in developing countries is significantly reduced (51%), the cost of a dose is high, and so the search for more effective, safe, and inexpensive vaccines against rotavirus continues around the world.

**Key words:** review; rotavirus; vaccine; interspecies transmission.

**For citation:** Alekseev K.P., Kalnov S.L., Grebennikova T.V., Aliper T.I. Human rotavirus infection. Strategies for the vaccinal prevention. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2016; 61(4): 154-159. (In Russ.).

DOI 10.18821/0507-4088-2016-61-4-154-159

**For correspondence:** Konstantin P. Alekseev, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Applied Virology and Biotechnology, D.I. Ivanovsky Institute of Virology «Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation, E-mail: kkendwell@mail.ru

**Information about authors:** Grebennikova T.V., <http://orcid.org/0000-0002-6141-9361>

**Funding.** Work carried out with the support of the state budget funding.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 20 January 2016

Accepted 26 January 2016

Ротавирусы выделены в самостоятельный род *Rotavirus* в 1978 г. и входят в состав семейства Reoviridae [1]. Вирионы ротавирусов представляют собой сферические частицы диаметром около 100 нм, состоящие из трехслойного икосаэдрического капсида, внутри которого находятся 11 фрагментов двунитевой (дн) РНК (см. рисунок на второй полосе обложки)). Внутренний слой капсида состоит из 60 димеров белка VP2. Он окружает фрагменты геномной РНК и 2 структурных белка (VP1 и VP3), участвующих в транскрипции и репликации этих фрагментов. Внутренний слой капсида вместе с фрагментами РНК и ферментным комплексом обозначают как сердцевину (core). Промежуточный слой капсида состоит из 260 морфологических единиц, каждая из которых представлена тремя молекулами белка VP6. Наружный слой капсида построен из 260 тримеров белка VP7 и 60 тримеров белка VP4. Последние представляют собой шипы, которые взаимодействуют с белком VP6 и выступают над поверхностью вириона на 12 нм. Диаметр полных вирионов с шипами составляет около 100 нм, двухслойных частиц – 70,5 нм и однослойных частиц (сердцевин) – 51 нм. Под электронным микроскопом вирионы ротавирусов напоминают колесо, поэтому они и получили такое название (лат. *rota* – колесо). Инфекционной активностью обладают только частицы с трехслойным капсидом [2, 3].

Геном ротавирусов состоит из 11 фрагментов днРНК. Длина фрагментов РНК ротавируса обезьян SA11 колеблется от 667 до 3302 пар нуклеотидов (п. н.). Общая длина всех фрагментов РНК – 18 555 п. н. Фрагменты РНК 1, 2, 3, 4, 6 и 9 кодируют соответственно структурные вирусные белки VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 и VP7.

Фрагменты РНК 5, 7, 8 и 10 кодируют соответственно неструктурные вирусные белки NSP1, NSP3, NSP2 и NSP4. Одиннадцатый фрагмент РНК содержит 2 открытые рамки считывания и кодирует 2 неструктурных белка NSP5 и NSP6. Неструктурные вирусные белки необходимы для размножения вируса [4, 5].

В составе вирионов ротавирусов обнаружено 6 белков с мол. массой от 37 до 125 кДа [5]. Белки наружного слоя капсида VP4 (87 кДа) и VP7 (37 кДа) ответственны за адсорбцию и проникновение вирионов в клетку. Они содержат типоспецифические антигенные детерминанты и индуцируют синтез вируснейтрализующих антител. Под влиянием трипсина белок VP4 расщепляется на 2 белка с мол. массой 60 и 28 кДа и в результате увеличивается инфекционная активность вируса.

Основным белком вирионов является полипептид промежуточного слоя капсида VP6 (45 кДа), который составляет более половины массы всех белков. Он содержит группоспецифические и субгруппоспецифические антигенные детерминанты, не индуцирует синтез нейтрализующих антител, но играет важную роль в развитии протективного иммунитета.

Все ротавирусы по наличию группоспецифического антигена разделены на 7 антигенных групп: А, В, С, D, E, F, G. Наиболее многочисленна группа А, представители которой играют важную роль в патологии человека и животных. Ротавирусы групп А, В и С обнаружены у человека и животных, D, E, F и G – только у животных [6–8].

В перекрестной реакции нейтрализации с использованием гипериммунной сыворотки к прототипному штамму ротавирусы группы А разделены на G-серотипы (VP7 –

гликопротеин) и Р-серотипы (VP4 – протеазочувствительный белок), а на основании сходства последовательности нуклеотидов этих генов – на G- и Р-генотипы. Серотипы обозначают номерами, а генотипы – номерами в квадратных скобках. Номера G-серотипов и G-генотипов совпадают, а Р-серотипов и Р-генотипов различаются [3, 9].

В настоящее время все ротавирусы группы А подразделены на 27 G-серотипов/генотипов, 35 Р-генотипов и 73 комбинации G/Р-генотипов. Основным механизмом, отвечающим за возникновение новых штаммов ротавирусов, является рекомбинация (реассортация) геномных фрагментов при смешанной инфекции [10, 11].

Ротавирус человека впервые был выделен в начале 70-х годов прошлого века. В 1973 г. группа исследователей из Австралии опубликовала данные об обнаружении нового энтеровируса, выделенного от детей с тяжелой формой гастроэнтерита, поступивших в Королевский детский госпиталь Мельбурна. Авторы обследовали 9 детей в возрасте от 4 мес до 2,5 лет и у 6 из них при электронномикроскопическом обследовании слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки был выявлен неизвестный ранее возбудитель [12]. Вскоре было установлено, что ротавирус является одним из основных агентов, вызывающих острые гастроэнтериты у детей в возрасте до 5 лет во всем мире. В развивающихся странах сотни тысяч детей ежегодно погибают от этого вируса [13], а пик смертности приходится на самые бедные страны. Так, в Афганистане, Бурунди, Чаде и Сомали смертность детей от ротавирусной инфекции превышает 300 на 100 тыс. заболевших детей, тогда как в развитых странах этот показатель – не более 1 случая на 100 тыс. [14]. Ротавирус распространен повсеместно и к 5 годам почти каждый ребенок на планете хотя бы раз сталкивался с этим патогеном, распространение которого происходит даже при условии соблюдения строжайших норм гигиены, что свидетельствует о высокой трансмиссивности возбудителя. В глобальных цифрах каждый ребенок на Земле переносит ротавирусную инфекцию, каждый пятый ребенок посещал в связи с этим врача, 1 из 60 заболевших детей был госпитализирован и 1 из 293 детей скончался в результате инфекции [15]. Ежегодно регистрируют около 111 млн случаев заболевания, 25 млн амбулаторных обращений, 2 млн госпитализаций. По приблизительным оценкам, ротавирусная инфекция ежегодно уносит 440 тыс. детских жизней [16]. На сегодняшний день ротавирусная инфекция остается одной из основных угроз здоровью ребенка и, по данным ВОЗ, занимает третье место в перечне причин детской смертности от заболеваний, уступая лишь пневмонии и малярии [17]. Если в развитых странах эффективность вакцинации существующими вакцинами составляет 90–100%, эффективность тех же вакцин в странах третьего мира значительно ниже, и испытание одной из двух применяемых в настоящее время вакцин (RotaTeq, «Merck Pharmaceuticals») в наименее благополучных странах Азии и Африки показало ее эффективность на уровне 51 и 64% соответственно [18]. Предполагают, что сниженный иммунный статус, недоедание, вторичные инфекции и авитаминоз оказывают комплексное влияние на эффективность ротавирусной вакцины. Тем не менее ее применение снижает показатели смертности даже в самых бедных и неблагополучных странах. Большой проблемой является также высокое антигенное и генетическое разнообразие ротавируса, способность к преодолению межвидовых барьеров, связанные с тем, что аналогично вирусам гриппа его сегментированный геном

способствует образованию штаммов-реассортантов. На сегодняшний день генетическое и антигенное разнообразие ротавируса, а также поиск новых, более эффективных вакцин остаются в центре внимания исследователей.

Генотипы ротавируса G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8] и в меньшей степени G12P[8] на данный момент являются самыми распространенными у человека во всем мире [8, 19, 20]. Кроме классификации по группам на основе VP6- и G/Р-генотипов, выделяют типы ротавирусов на основе комбинации остальных генов. Благодаря новым технологиям секвенирования в последние годы экспоненциально выросло число полностью известных геномных последовательностей ротавирусов из различных частей земного шара. На основе сравнения ротавирусных геномов и исключения из сравнения G- и Р-генов были выделены 2 основных генотипа: I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1 (генотип Wa) и I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2 (генотип DS-1) [21, 22]. Геногруппа Wa в сочетании с P[8] и различными вариантами генотипа G является доминирующим типом ротавируса человека на протяжении трех десятилетий. Исследование 150 полногеномных последовательностей ротавирусов генотипа P[8] со всего мира выявило их принадлежность к Wa-группе [23]. Распространенные ротавирусы с генотипом P[4], а также редкие (иногда только однажды описанные) варианты P[6] и P[10] относятся к группе DS-1. Предполагают, что человеческие ротавирусы Wa-группы имеют общего предка с ротавирусами свиней, тогда как ротавирусы DS-1 имеют несколько геномных сегментов с общим предком с ротавирусом KPC [24]. Третье, распространенное значительно реже сочетание генов I3-R3-C3-M3-A3-N3-T3-E3-H3 обозначается AU-1 и, предположительно, пришло к человеку от кошек или собак [25], у человека встречается только в сочетании с генотипом P[9] [23].

В связи с возможностью межвидовых переходов ротавирусов следует отметить, что ротавирус крупного рогатого скота (KPC) оказался распространенным на всех континентах в популяции человека, хотя случаи его обнаружения редки. Типично бычьи генотипы G6, G8 и G10 сочетаются с P[14] на фоне сочетания генов I2-R2-C2-M2-A3/A11-N2-T6-E2-H3 [26]. Их сравнение с геномными комбинациями изолятов, выделенных от различных видов животных, позволило построить гипотезу о происхождении P[14]-изолятов ротавируса человека в результате межвидового перехода ротавирусов, циркулирующих среди отряда парнокопытных (Artiodactyla) [27]. Для проверки этой гипотезы были выделены дополнительные изоляты ротавируса от козы, буйвола, жирафа. Комбинация генов этих ротавирусов оказалась сходной с атипичными P[14]-изолятами ротавируса человека [28]. Эти данные свидетельствуют о легкости межвидовых переходов ротавируса от парнокопытных хозяев к человеку, однако следует отметить, что до сих пор нет данных о том, что атипичные ротавирусы P[14]-генотипа могут передаваться от человека к человеку.

Наибольшее распространение в мире, по данным ВОЗ, имеют генотипы ротавируса A G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] и G9P[8], из которых первые два являются самыми частыми причинами ротавирусной инфекции. Генотип G1P[8] преобладает, вызывая до половины случаев заболевания [29]. На территории Российской Федерации наблюдают те же генотипы, однако существенная разница состоит в преобладании как в России в среднем, так и на территории Москвы генотипа G4P[8] [30, 31]. Так, в отчете Референс-центра по мониторингу возбудителей

острых кишечных инфекций отмечена такая встречаемость пяти наиболее распространенных генотипов ротавируса А (в круглых скобках указано число случаев выявления генотипа): G4[P]8 (104), G1[P]8 (55), G2[P]4 (16), G3[P]8 (9), G9[P]8 (9) (31).

#### Стратегии вакцинации. История и современные тенденции.

Вскоре после идентификации ротавируса в 1973 г. были предприняты первые попытки разработать вакцину. Вначале прибегли к классическому «дженнеровскому» подходу, суть которого заключается в использовании изолятов вируса, выделенных от животных и являющихся естественно аттенуированными по отношению к человеку. В качестве вакцинных кандидатов исследовали 2 ротавируса КРС (RIT 4237 (G6P6[1]) и WC3 (G6P7[5])) и обезьяний ротавирус, выделенный от макаки резуса (MMU1006 (G3P5B[3])).

Первый из них, RIT 4237, был в итоге испытан компанией «SmithKline» в Финляндии. Вакцина SmithKline-RIT показала себя безопасной и эффективной, однако последовавшие испытания в Африке и Латинской Америке не выявили значимой эффективности в условиях этих регионов, и дальнейшая работа с этой вакциной была остановлена. Два других изолята также не дошли до стадии коммерческого препарата, однако стали основой для разработки первых зарегистрированных вакцин против ротавирусной инфекции человека: RotaShield (RRV) в 1998 г. и RotaTeq (WC3) в 2006 г. [29]. Моновалентная вакцина на основе ротавирусного изолята, выделенного от ягненка, была разработана в Китае и одобрена к применению. По данным, собранным в 2001–2008 гг., эффективность китайской вакцины оценивается в 73% [32].

Для преодоления проблемы недостаточной эффективности моновалентных вакцин была учтена способность ротавируса к реассортации. Вакцинные кандидаты второго поколения получали путем замещения в изолятах животного происхождения важных для выработки защитных антител генов генами ротавируса человека, причем использовали сразу несколько генов наиболее распространенных серотипов. Первая лицензированная ротавирусная вакцина RotaShield, или RRV-TV, была квадριвалентной на основе обезьяньего ротавируса и несла G-гены четырех наиболее распространенных ротавирусов человека: G1, G2, G3 и G4. Эффективность новой вакцины в разных экспериментах колебалась от 80 до 100%, однако через год после начала применения она была запрещена к использованию из-за 25-кратного увеличения риска инвагинации кишечника, связанного с введением первой дозы вакцины [33].

Проблема связанного с применением ротавирусной вакцины повышения риска инвагинации кишечника, в некоторых случаях приводящей к летальному исходу, не решена и сегодня. Это один из стимулов для поиска новых подходов к разработке вакцин следующего поколения. Тем не менее риск осложнений вследствие применения вакцин в неблагополучных странах третьего мира ничтожен в сравнении с количеством потенциально спасенных в случае массовой вакцинации детей [29].

Детский госпиталь Филадельфии совместно с компанией «Merck» продолжили исследование по созданию эффективной вакцины на основе ротавируса КРС WC3 с генами ротавируса человека. Пентавалентная вакцина была разработана и зарегистрирована в 2006 г. Геном выделенного от КРС ротавируса дополнен генами G1, G2, G3 или G4 (VP7) ротавируса человека и человеческим P

(8) (VP4) [34]. Вакцина зарегистрирована и применяется под коммерческим названием RotaTeq.

В то же время другая группа исследователей, изучая эффективность вакцинации, обратила внимание на то, что хотя вакцинный штамм может быть гетерологичным по G- или P-гену, если мы рассмотрим весь геном ротавируса, все остальные гены могут быть почти неотличимы у вакцинного и дикого вирусов, если они принадлежат к одному типу по комбинации генов. Естественная инфекция, перенесенная ребенком, обеспечивает защиту от острого течения инфекции даже против гетерологичных штаммов. Только в случае принадлежности изолятов ротавируса к разным типам комбинации генов (Wa, DS-1 или Au-1) мы можем подозревать отсутствие достаточного уровня перекрестной защиты. Этот подход привел к появлению моновалентной аттенуированной вакцины на основе самого распространенного человеческого изолята G1P1A[8], которая была зарегистрирована «GlaxoSmithKline» как Rotarix и прошла все необходимые испытания на безопасность и эффективность [35]. На сегодняшний день RotaTeq и Rotarix остаются двумя основными вакцинами, применяемыми повсеместно.

Обе вакцины эффективны в развитых странах (США, Западная Европа), где и до их использования смертность от ротавирусной инфекции измерялась десятками случаев в год. В Российской Федерации ротавирусная вакцина сегодня входит в календарь профилактических прививок по эпидемическим показаниям РФ (приказ Минздрава России № 125н от 21.03.2014 (приложение 2)). Благодаря высокому качеству медицинского обслуживания и доступности лекарственных препаратов РФ входит в число стран, благополучных по ротавирусной инфекции, с показателем смертности менее 10 на 100 тыс. [3]. В развивающихся странах эффективность вакцины, как мы отмечали выше, может снижаться до 51%. В настоящее время считается доказанным, что в значительной степени это снижение эффективности ротавирусных вакцин в неблагополучных странах связано с дефицитом витамина А [36]. Однако это не единственный недостаток, заставляющий исследователей искать пути создания новых вакцин. Стоимость современных вакцин слишком высока для бедных стран, которые не могут позволить себе выделение средств на программу поголовной вакцинации детей против ротавирусной инфекции. Кроме того, производители не могут обеспечить вакциной весь нуждающийся мир, даже если бы нашлись средства на такое количество вакцины. Также стоит отметить, что материнские антитела снижают эффективность вакцинации, по всей видимости, связывая значительное количество антигена, содержащегося в вакцине. Поэтому может потребоваться дву- или трехкратная вакцинация.

Вакцины нового поколения должны быть более эффективными, обеспечивая более длительный иммунитет и широкую перекрестную защиту, безопасными и при этом недорогими.

Для преодоления проблемы стоимости дозы и недостаточного количества вакцины в Индии разработали, испытали и лицензировали свою собственную вакцину, основанную на аттенуированном штамме диареи новорожденных 116-E (проникший в человеческую популяцию ротавирус КРС) с генотипом G9P[10]. Клинические испытания на 6800 новорожденных детях показали эффективность на уровне 56% [37].

Группа Bishop в Австралии, которая впервые описала ротавирус в 1973 г., также предложила использовать

штамм диареи новорожденных (G3P[6]), происходящий от ротавируса KPC, в качестве вакцинного для детей в возрасте 3 мес. Таким же путем пошли вьетнамские ученые, использовав в качестве основы вакцины штамм G1P[8]. Параллельно в Индии [38], Китае и Бразилии ведутся разработки пента- и тетравалентных вакцин на основе штамма ротавируса KPC по аналогии с продуктом компании «Merck».

Альтернативным путем разработки новых вакцинных препаратов является создание нереплицирующихся вакцин, в составе которых могут быть инактивированный ротавирус, вирусоподобные частицы (VLP) или отдельные рекомбинантные (или рекомбинантные химерные) белки. Сейчас проходит испытания вакцина, основанная на внешнем домене белка VP4–VP8, который содержит основную часть нейтрализующих эпитопов. VP8 экспрессируется в виде химеры вместе с эпитопом P2 столбнячного токсина для усиления иммуногенности. Испытания этой вакцины в фазе I на взрослых показали ее безопасность и способность вызывать образование достаточных титров нейтрализующих антител [39].

**Финансирование.** Работа осуществлена при поддержке государственного бюджетного финансирования.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 3–5, 7–15, 17–29, 32–39  
см. REFERENCES)

2. Львов Д.К. Ротавирусные инфекции. В кн.: Львов Д.К. *Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных*. М.: МИА; 2013: 520–2.
6. Сергеев В.А., Непоклонов Е.А., Алипер Т.И. *Ротавирусы. Вирусы и вирусные инфекции*. М.: Библионика; 2007: 365–9.
16. Таточенко В.К. *Ротавирусные вакцины. Вакцины и вакцинация*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2014: 432–9.
30. Бахтояров Г.Н., Файзулов Е.Б., Филатов Н.Н., Линок А.В., Курносова В.В., Зверев В.В. Генетическая структура штаммов ротавирусов Московского региона в период с 2009 по 2014 г. В кн.: *Материалы VII Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням с международным участием*. М.; 2015: 37.
31. Подколзин А.Т., Петухов Д.Н., Веселова О.А. *Отчет РЦКИ: Данные о циркуляции ротавирусов группы А в РФ в зимний сезон 2011–2012 гг. Публикация Референс-центра по мониторингу возбудителей кишечных инфекций. ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, РЦКИ*. М.; 2012.

REFERENCES

1. Matthews R.E. The classification and nomenclature of viruses. Summary of results of meetings of the International Committee on Taxonomy of Viruses in The Hague, September 1978. *Intervirology*. 1979; 11 (3): 133–5.
2. L'vov D.K. Rotavirus infections. In: L'vov D.K. *Manual on Virology. Viruses and Viral Diseases of Human and Animals [Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных]*. Moscow: MIA; 2013: 520–2. (in Russian)
3. Estes M.K., Greenberg H.B. Rotaviruses. In: Knipe D.M., Howley P.M., eds. *Fields Virology*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013: 1347–401.
4. Attoni H., Mertens P.P., Becnel J. et al. Genus Rotavirus. In: King A.M., Adams M.J., Castens E.B., Lefrowitz E.J., eds. *Virus Taxonomy. Ninth report of the international committee on taxonomy of viruses*. London: Elsevier Academic Press; 2012: 603–13.
5. Desselberger U. Rotaviruses. *Virus Res.* 2014; 190: 75–96.
6. Sergeev V.A., Nepoklonov E.A., Aliper T.I. *Rotaviruses. Viruses and Viral Infections [Rotavirusy. Virusy i virusnye infektsii]*. Moscow: Biblionika; 2007: 365–9. (in Russian)
7. Saif L.J. Nongroup A rotaviruses of humans and animals. In: Jiang B., Ramig R.F., eds. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Vol. 185. Berlin: Springer-Verlag; 1994: 339–71.
8. Santos N., Hoshino Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev. Med. Virol.* 2005; 15 (1): 29–56.

9. Koopmans M., Brown D. Seasonality and diversity of Group A rotaviruses in Europe. *Acta Paediatr. Suppl.* 1999; 88 (426): 14–9.
10. Matthijnssens J., Bilcke J., Ciarlet M., Martella V., Banyai K., Rahman M. et al. Rotavirus disease and vaccination: impact on genotype diversity. *Future Microbiol.* 2009; 4 (10): 1303–16.
11. Matthijnssens J., Ciarlet M., McDonald S.M., Attoui H., Banyai K., Brister J.R. et al. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch. Virol.* 2011; 156: 1397–413.
12. Bishop R.F., Davidson G.P., Holmes I.H., Ruck B.J. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute nonbacterial gastroenteritis. *Lancet*. 1973; 2 (7841): 1281–3.
13. Tate J.E., Burton A.H., Boschi-Pinto C., Steele A.D., Duque J., Parashar U.D. et al. 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* 2011; 12 (2): 136–41.
14. WHO. Rotavirus vaccines: an update. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 2012; 84: 533–40.
15. Parashar U.D., Hummelman E.G., Bresee J.S., Miller M.A., Glass R.I. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg. Infect. Dis.* 2003; 9 (5): 565–72.
16. Tatochenko V.K. *Rotavirus Vaccines. Vaccines and Vaccination [Rotavirusnye vaksiny. Vaksiny i vaksinatziya]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2014: 432–9. (in Russian)
17. Liu L., Johnson H.L., Cousens S., Perin J., Scott S., Lawn J.E. et al. Child Health Epidemiology Reference Group of WHO and UNICEF. Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *Lancet*. 2012; 379 (9832): 2151–61.
18. Zaman K., Dang D.A., Victor J.C., Shin S., Yunus M., Dallas M.J. et al. Efficacy of pentavalent rotavirus vaccine against severe rotavirus gastroenteritis in infants in developing countries in Asia: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2010; 376 (9741): 615–23.
19. Matthijnssens J., Rahman M., Ciarlet M., Van Ranst M. Emerging human rotavirus genotypes. In: Palombo E.A., Kirkwood C.D., eds. *Viruses in the Environment*. Kerala, India: Research Signpost; 2008: 171–219.
20. Rahman M., Matthijnssens J., Yang X., Delbeke T., Arijs I., Taniguchi K. et al. Evolutionary history and global spread of the emerging G12 human rotaviruses. *J. Virol.* 2007; 81 (5): 2382–90.
21. Heiman E.M., McDonald S.M., Barro M., Taraporewala Z.F., Bar-Magen T., Patton J.T. Group A human rotavirus genomics: evidence that gene constellations are influenced by viral protein interactions. *J. Virol.* 2008; 82: 11 106–16.
22. McDonald S.M., Matthijnssens J., McAllen J.K., Hine E., Overton L., Wang S. et al. Evolutionary dynamics of human rotaviruses: balancing assortment with preferred genome constellations. *PLoS Pathog.* 2009; 5 (10): e1000634.
23. Matthijnssens J., Van Ranst M. Genotype constellation and evolution of group A rotaviruses infecting humans. *Curr. Opin. Virol.* 2012; 2 (4): 426–33.
24. Matthijnssens J., Rahman M., Van Ranst M. Two out of the 11 genes of an unusual human G6P[6] rotavirus isolate are of bovine origin. *J. Gen. Virol.* 2008; 89 (Pt. 10): 2630–5.
25. Nakagomi O., Ohshima A., Aboudy Y., Shif I., Mochizuki M., Nakagomi T. et al. Molecular identification by RNA–RNA hybridization of a human rotavirus that is closely related to rotaviruses of feline and canine origin. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28: 1198–203.
26. Iturriza-Gómara M., Dallman T., Banyai K., Bottiger B., Buesa J., Diedrich S. et al. Rotavirus genotypes co-circulating in Europe between 2006 and 2009 as determined by EuroRotaNet, a pan-European collaborative strain surveillance network. *Epidemiol. Infect.* 2011; 139 (6): 895–909.
27. Matthijnssens J., Potgieter C.A., Ciarlet M., Parrenõ V., Martella V., Banyai K. et al. Are human P[14] rotavirus strains the result of interspecies transmissions from sheep or other ungulates that belong to the mammalian order Artiodactyla? *J. Virol.* 2009; 83 (7): 2917–29.
28. Ghosh S., Alam M.M., Ahmed M.U., Talukdar R.I., Paul S.K., Kobayashi N. Complete genome constellation of a caprine group A rotavirus strain reveals common evolution with ruminant and human rotavirus strains. *J. Gen. Virol.* 2010; 91 (Pt. 9): 2367–73.
29. WHO. Rotavirus vaccines. WHO position paper – January 2013. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 2013; 88 (5): 49–64.
30. Bakhtoyarov G.N., Fayzuloev E.B., Filatov N.N., Linok A.V., Kurnoсова V.V., Zverev V.V. Moscow region rotavirus genetic structure in a period from 2009 to 2014. In: *Proceedings of VII Annual All-Russian Congress on Infectious Diseases with International Participation [Materialy VII Ezhegodnogo Vserossiyskogo Kongressa po infektsionnym boleznyam s mezhdunarodnym uchastiem]*. Moscow; 2015: 37. (in Russian)
31. Podkolzin A.T., Petukhov D.N., Veselova O.A. *EPMG Report: Data*

- on Rotavirus Group A Circulation in Russian Federation in a Winter Season 2011–2012. Federal Service on Customers' Right Protection and Human Well-Being Surveillance, Central Research Institute for Epidemiology, Enteric Pathogens Monitoring Group (EPMG) [Otkhet RTsKI: Dannye o tsirkulyatsii rotavirusov gruppy A v RF v zimniy sezon 2011–2012 gg. Publikatsiya Referens-tsentra po monitoringu vozbuditeley kishhechnykh infektsiy. FBUN TsNII epidemiologii Rospotrebnadzora, RTsKI]. Moscow; 2012. (in Russian)
32. Fu C., Wang M., Liang J., He T., Wang D., Xu J. Effectiveness of Lanzhou lamb rotavirus vaccine against rotavirus gastroenteritis requiring hospitalization: a matched case-control study. *Vaccine*. 2007; 25 (52): 8756–61.
  33. CDC. Withdrawal of rotavirus vaccine recommendation. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 1999; 48 (43): 1007.
  34. Vesikari T.I., Matson D.O., Dennehy P., Van Damme P., Santosham M., Rodriguez Z. et al. Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine. *N. Engl. J. Med.* 2006; 354 (1): 23–33.
  35. Ruiz-Palacios G.M., Perez-Schael I., Velazquez F.R., Abate H., Breuer T. Clemens S.C. et al. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *N. Engl. J. Med.* 2006; 354 (1): 11–22.
  36. Kandasamy S., Chattha K.S., Vlasova A.N., Saif L.J. Prenatal vitamin A deficiency impairs adaptive immune responses to pentavalent rotavirus vaccine (RotaTeq®) in a neonatal gnotobiotic pig model. *Vaccine*. 2014; 32 (7): 816–24.
  37. Bhandari N., Rongsen-Chandola T., Bavdekar A., John J., Antony K., Taneja S. et al. Efficacy of monovalent human-bovine (116E) rotavirus vaccine in Indian infants: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2014; 383 (9935): 2136–43.
  38. Zade J.K., Kulkarni P.S., Desai S.A., Sabale R.N., Naik S.P., Dhare R.M. Bovine rotavirus pentavalent vaccine development in India. *Vaccine*. 2014; 32 (Suppl. 1): A124–8.
  39. Fix A., Harrow C., McNeal M., Dally L., Flores J., Robertson G. et al. Safety and immunogenicity of a parenterally administered rotavirus VP8 subunit vaccine in healthy adults. In: *Seventh International conference on Vaccines for Enteric Diseases*. Thailand, Nov 6–8. Bangkok; 2013.

Поступила 20.01.16

Принята в печать 26.01.16

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.921.5-036.22«2015-2016»

**Львов Д.К.<sup>1</sup>, Бурцева Е.И.<sup>1</sup>, Колобухина Л.В.<sup>1</sup>, Федякина И.Т.<sup>1</sup>, Кириллова Е.С.<sup>1</sup>, Трушакова С.В.<sup>1</sup>, Феодоритова Е.Л.<sup>1</sup>, Беляев А.Л.<sup>1</sup>, Меркулова Л.Н.<sup>1</sup>, Краснослободцев К.Г.<sup>1</sup>, Мукашева Е.А.<sup>1</sup>, Гарина Е.О.<sup>1</sup>, Оскерко Т.А.<sup>1</sup>, Аристов В.А.<sup>1</sup>, Вартамян Р.В.<sup>1</sup>, Кистенева Л.Б.<sup>1</sup>, Дерябин П.Г.<sup>1</sup>, Прилипов А.Г.<sup>1</sup>, Альховский С.В.<sup>1</sup>, Кружкова И.С.<sup>1</sup>, Базарова М.В.<sup>2</sup>, Десяткин А.В.<sup>2</sup>**

### ВИРУСОЛОГИЧЕСКИЕ, ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ, КЛИНИЧЕСКИЕ, МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЭПИДЕМИИ ГРИППА 2015–2016 гг.: ДОМИНИРОВАНИЕ ВИРУСА ГРИППА А (H1N1)PDM09 В РОССИИ И СТРАНАХ СЕВЕРНОГО ПОЛУШАРИЯ

<sup>1</sup>Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва; <sup>2</sup>ГБУЗ «Инфекционная клиническая больница №1» ДЗ г. Москвы, 125367, г. Москва

Представлены особенности циркуляции вирусов гриппа в период с октября 2015 г. по март 2016 г. в 10 городах России, опорных базах ЦЭЭГ Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. Подъем заболеваемости, этиологически связанный с вирусами гриппа, регистрировали в январе–феврале 2016 г. Максимальные показатели заболеваемости были отмечены на 4–5-й неделе года. Наиболее вовлеченными в эпидемию были дети в возрасте 3–6 лет, но частота госпитализации была наиболее высокой в группе 15–64 года (65%). В клинике преобладали среднетяжелые и тяжелые формы с высокой частотой госпитализаций, сравнимой с сезоном 2009–2010 гг., но существенно выше, чем в сезон 2014–2015 гг. Вирусные пневмонии, в половине случаев двусторонние, среди госпитализированных больных выявлены у 10% детей и 30% взрослых. Летальность по отделению реанимации достигла 46%. Практически все летальные случаи возникли при поздней госпитализации у непривитых больных, не прошедших ранний курс противовирусной терапии. Отмечено повсеместное доминирование (более 90%) штаммов вируса гриппа А (H1N1)pdm09 как в РФ, так и в большинстве стран Северного полушария. По результатам изучения антигенных свойств штаммов вируса гриппа А (H1N1)pdm09 не выявлены различия по отношению к вакцинному вирусу. При секвенировании обнаружены аминокислотные замены в гемагглютинине (рецепторсвязывающем и Sa-сайтах) и генах, кодирующих внутренние белки (PA, NP, M1, NS1). Штаммы были чувствительны к озельтамивиру и занамивиру, сохранили резистентность к ремантадину. Долевое участие возбудителей ОРВИ негриппозной этиологии было сравнимо с аналогичным показателем в предыдущие эпидемические сезоны.

**Ключевые слова:** эпидемический сезон 2015–2016; вирус гриппа А (H1N1)pdm09; заболеваемость ОРВИ; антигенные свойства; ПЦР-диагностика; аминокислотные замены; чувствительность; гриппозные вакцины.

**Для корреспонденции:** Бурцева Елена Ивановна, д-р мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. этиологии и эпидемиологии гриппа Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, E-mail: elena-burtseva@yandex.ru

*Для цитирования:* Львов Д.К., Бурцева Е.И., Колобухина Л.В., Федякина И.Т., Кириллова Е.С., Трушаклова С.В., Феодоритова Е.Л., Беляев А.Л., Меркулова Л.Н., Краснослободцев К.Г., Мукашева Е.А., Гарина Е.О., Оскерко Т.А., Аристова В.А., Вартанян Р.В., Кистенева Л.Б., Дерябин П.Г., Прилипов А.Г., Альховский С.В., Кружкова И.С., Базарова М.В., Девяткин А.В. Вирусологические, эпидемиологические, клинические, молекулярно-генетические особенности эпидемии гриппа 2015–2016 гг.: доминирование вируса гриппа А (H1N1)pdm09 в России и странах Северного полушария. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61 (4): 159-166. DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-4-159-166

**Lvov D.K.<sup>1</sup>, Burtseva E.I.<sup>1</sup>, Kolobukhina L.V.<sup>1</sup>, Fedyakina I.T.<sup>1</sup>, Kirillova E.S.<sup>1</sup>, Trushakova S.V.<sup>1</sup>, Feodoritova E.L.<sup>1</sup>, Belyaev A.L.<sup>1</sup>, Merkulova L.N.<sup>1</sup>, Krasnoslobodtsev K.G.<sup>1</sup>, Mukasheva E.A.<sup>1</sup>, Garina E.O.<sup>1</sup>, Oskerko T.A.<sup>1</sup>, Aristova V.A.<sup>1</sup>, Vartanian R.V.<sup>1</sup>, Kisteneva L.B.<sup>1</sup>, Deryabin P.G.<sup>1</sup>, Prilipov A.G.<sup>1</sup>, Alkhovsky S.V.<sup>1</sup>, Kruzhkova I.S.<sup>1</sup>, Bazarova M.V.<sup>2</sup>, Deviatkin A.V.<sup>2</sup>**

## VIROLOGICAL, EPIDEMIOLOGICAL, CLINIC, AND MOLECULAR GENETIC FEATURES OF THE INFLUENZA EPIDEMIC IN 2015-2016: PREVAILING OF THE INFLUENZA A(H1N1)09PDM VIRUS IN RUSSIA AND COUNTRIES OF THE NORTHERN HEMISPHERE

<sup>1</sup>D.I. Ivanovsky Institute of Virology «Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation; <sup>2</sup>FBIH Clinical Hospital for Infectious Diseases No 1, Moscow, 125367, Russian Federation

This work describes the specific features of the influenza virus circulating in the period from October 2015 to March 2016 in 10 cities of Russia, the basic laboratories of CEEI at the D.I. Ivanovsky Institute of Virology «Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya» of the Ministry of Health of the Russian Federation. The increase in the morbidity caused by influenza viruses was detected in January-February 2016. The duration of the morbidity peak was 4-5 weeks. The most vulnerable group included children at the age from 3 to 6; a high rate of hospitalization was also detected among people at the age of 15-64 (65%). In clinic symptoms there were middle and severe forms with high frequency of hospitalization as compared with the season of 2009-2010, but much higher in comparison with the season of 2014-2015. Some of the hospitalized patients had virus pneumonias, half of which were bilateral. Among these patients, 10% were children; 30%, adults. The mortality in the intensive care unit of the hospital was 46%. Almost all lethal cases were among unvaccinated patients in the case of late hospitalization and without early antiviral therapy. The predominance of the influenza A(H1N1)09pdm virus both in the Russian Federation and the major part of the countries in the Northern hemisphere was noted. The results of the study of the antigenic properties of influenza strains of A(H1N1)pdm09 virus did not reveal any differences with respect to the vaccine virus. The sequencing data showed the amino acid substitutions in hemagglutinin (receptor binding and Sa sites) and in genes encoding internal proteins (PA, NP, M1, NS1). Strains were sensitive to oseltamivir and zanamivir and maintained resistance to rimantadine. The participation of non-influenza ARI viruses was comparable to that in preliminary epidemic seasons.

**Key words:** epidemic season 2015-2016; influenza A(H1N1)pdm09 virus; ARVI morbidity; antigenic properties; PCR diagnostic; amino acid substitutions; susceptibility; influenza vaccines.

**For citation:** Lvov D.K., Burtseva E.I., Kolobukhina L.V., Fedyakina I.T., Kirillova E.S., Trushakova S.V., Feodoritova E.L., Belyaev A.L., Merkulova L.N., Krasnoslobodtsev K. G., Mukasheva E.A., Garina E.O., Oskerko T.A., Aristova V.A., Vartanian R.V., Kisteneva L.B., Deryabin P.G., Prilipov A.G., Alkhovsky S.V., Kruzhkova I.S., Bazarova M.V., Deviatkin A.V. Virological, epidemiological, clinic, and molecular genetic features of the influenza epidemic in 2015-2016: prevailing of the influenza A(H1N1)09pdm virus in Russia and countries of the Northern hemisphere. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2016; 61(4):159-166. (In Russ.).

DOI 10.18821/0507-4088-2016-61-4-159-166

**For correspondence:** Elena I. Burtseva, lead researcher of influenza etiology and epidemiology laboratory of D.I. Ivanovsky Institute of Virology «Federal Research Center of Epidemiology and Microbiology named after honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation, E-mail: elena-burtseva@yandex.ru

### Information about authors:

Lvov D.K., <http://orcid.org/0000-0001-8176-6582>

Oskerko T.A., <http://orcid.org/0000-0003-1290-2661>

Burtseva E.I., <http://orcid.org/0000-0003-2518-6801>

Deryabin P.G., <http://orcid.org/0000-0002-8522-9554>

**Funding.** The work was supported by the Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA, CoAg:

U51HPOO0527-05.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 20 March 2016

Accepted 29 March 2016

## Введение

Появление на границе Мексики и США нового антигенного варианта вируса гриппа А (H1N1)pdm09 в марте–апреле 2009 г. и его быстрое превращение в пандемический стали причинами высокого уровня заболеваемости и смертности в течение нескольких месяцев [1, 2]. По оценке ряда исследователей, в отличие от сезонных вирусов гриппа, в период первой волны пандемии 2009 г. от гриппа умерло около 200 тыс. человек (от 105 700 до 395 000), его осложнений около 284 400 (от 151 700 до 575 400), в 80% – у лиц 65 лет и младше [3, 4].

Вызвав летом–осенью 2009 г. первую волну заболеваемости, пандемический вирус А (H1N1)pdm09 продолжил вызывать эпидемические подъемы заболеваемости при участии вирусов гриппа А (H3N2) и В, проявив наибольшую активность в сезоны 2010–2011 гг. (долевое участие составило 76%) и 2012–2013 гг. (50%) [5, 6].

Каждый из последующих сезонов имел свои особенности, которые определяли циркулировавшие штаммы вирусов гриппа. Например, одной из особенностей предыдущего эпидемического сезона 2014–2015 гг. стало доминирование новых дрейф-вариантов виру-

са гриппа А (H3N2) – А/Швейцария/9715293/2013 и А/Гонконг/4801/2014, отличных от вакцинного (А/Техас/50/2012), в большинстве стран Северного полушария [7]. Штаммы не только отличались от А/Техас/50/2012 по антигенным свойствам, но и определили новые генетические линии в его эволюции. Циркуляция этих дрейф-вариантов стала причиной эпидемии большей интенсивности как в России, так и в других странах мира, в период которой были отмечены случаи заболеваний у привитых людей, а также случаи гриппа с летальным исходом у детей и лиц пожилого возраста [8–10].

Начало эпидемического сезона 2015–2016 гг. также имело свои особенности, в частности, более ранний и резкий подъем заболеваемости уже в январе 2016 г., большее число тяжелых форм, регистрацию летальных случаев, что было связано с высокой активностью вируса гриппа А (H1N1)pdm09. В статье представлены предварительные данные о развитии эпидемий гриппа на отдельных территориях РФ и в странах Северного полушария, результаты изучения биологических и молекулярно-генетических свойств вируса гриппа А (H1N1)pdm09.

### Материал и методы

*Сбор данных о заболеваемости и лабораторной диагностике гриппа и ОРВИ.* В рамках эпидемиологического надзора за циркуляцией вирусов гриппа в РФ Центр экологии и эпидемиологии гриппа (ЦЭЭГ) Института вирусологии им. Д.И. Иванова ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России в сотрудничестве с 10 опорными базами, представленными территориальными управлениями и ФБУЗ «Центры гигиены и эпидемиологии» Роспотребнадзора в Европейской части, Сибири, на Урале и Дальнем Востоке, провели анализ биологических и молекулярно-генетических свойств вирусов гриппа А и В, вызвавших подъемы заболеваемости в сезон 2015–2016 гг. Ежедневно (с 40-й недели 2015 г. до 10-й недели 2016 г.) в ЦЭЭГ поступала информация о заболеваемости гриппом и ОРВИ, госпитализации и случаях с летальным исходом, этиологически связанных с вирусами гриппа, в различных возрастных группах населения, а также результаты диагностики гриппа и ОРВИ, полученные с использованием метода иммунофлюоресцирующих антител (МИФ), полимеразной цепной реакции (ПЦР), изоляции вирусов гриппа из 10 официальных опорных баз ЦЭЭГ. Кроме того, клинический материал (носоглоточные смывы, секционный материал, гемагглютинирующие изоляты) поступал для подтверждения результатов ПЦР-диагностики и изоляции штаммов вирусов гриппа из медицинских учреждений Москвы, Московской области и других территорий РФ.

*Отбор пациентов и взятие материала.* В исследование были включены пациенты, госпитализированные в Инфекционную клиническую больницу № 1 г. Москвы, а также амбулаторные и госпитализированные пациенты с опорных баз ЦЭЭГ. При подозрении на гриппозную инфекцию у заболевших проводили забор носоглоточных смывов не позднее 3–4-го дня от начала болезни. Кроме того, в случае летального исхода в ЦЭЭГ поступал секционный материал (ткани бронхов, трахеи, легких, селезенки) как из опорных баз ЦЭЭГ, так и из лечебных учреждений страны.

*Изоляцию вирусов гриппа* проводили из клинического

материала на клетках культуры ткани MDCK и куриных эмбрионах (КЭ) по общепринятым методикам [11].

*Типирование изолятов* выполняли в реакции торможения гемагглютинирующей активности (РТГА) по общепринятой методике с диагностическими сыворотками к эталонным и эпидемическим вирусам А/Калифорния/7/2009 (H1N1)pdm09, А/Швейцария/9715293/2013 (H3N2), А/Гонконг/5738/2014 (H3N2), В/Массачусетс/02/2012 (линия В/Ямагата-подобных) и В/Брисбен/60/08 (линия В/Виктория-подобных) [12].

*Выявление РНК вирусов гриппа А (H1N1)pdm09, А (H3N2) и В* проводили с помощью тест-систем АмплиСенс Influenza viruses А/В, АмплиСенс Influenza virus А/Н1-swine-FL, АмплиСенс Influenza virus А-тип-FL («ИнтерЛабСервис», Москва) согласно рекомендациям производителя.

*Секвенирование генома* выполняли по методике, описанной ранее [13]. Анализ данных проводили с использованием программного обеспечения DNASTAR-Lasergene v6. Часть РНК, выделенную из секционного материала, а также штаммов вируса гриппа А (H1N1)pdm09 исследовали методом полногеномного секвенирования на приборе MiSeq («Illumina»).

*Подготовка РНК-библиотек для полногеномного секвенирования* осуществлялась с помощью коммерческого набора TruSeq DNA Sample Preparation Kits v2 и NEB Next® mRNA Library Prep Reagent Set for Illumina® согласно инструкции производителя.

*Анализ полученных данных* осуществлялся при помощи программного обеспечения CLC Genomics Workbench (Дания).

### Результаты

Рост заболеваемости ОРВИ на территориях 10 опорных баз ЦЭЭГ начали регистрировать с 3-й недели 2016 г., причем отмечен высокий темп ее прироста: на 2-й неделе средний показатель по совокупному населению составил 49,7 случая на 10 тыс. населения, на 3-й неделе – 83,1, на 4-й – 136,6 и 5-й – 119,2 (табл. 1).

Отмечен рост числа заболевших и госпитализированных с клиническим диагнозом «грипп». По данным 10 городов, к началу марта 2016 г. их число составило 4912 (4484 в 2009 г.). Со среднетяжелыми и тяжелыми формами гриппа и ОРВИ госпитализировано 3164 пациента, среди которых 458 (15%) – дети до 2 лет, 455 (14%) – дошкольники, 204 (6%) – школьники и 2047 (65%) – лица 15 лет и старше.

Среди пациентов, госпитализированных в Инфекционную клиническую больницу № 1 г. Москвы с 15 декабря 2015 г. по 31 марта 2016 г. (1491 человек), 375 (25,2%) составили взрослые, 570 (38,2%) – беременные и 546 (36,6%) – дети от 0 до 15 лет. Грипп подтвержден у 113 (30,1%) взрослых, 227 (39,8%) беременных и 184 (33,7%) детей. Пневмония как наиболее часто регистрируемое осложнение при гриппе была отмечена у 28% взрослых, 9% детей и 5% беременных. При этом в горле взрослых у 48,4% диагностировали двустороннее поражение легких. Из 28 пациентов, поступивших в отделение реанимации с тяжелыми формами лабораторно подтвержденного гриппа, 13 умерли; летальность по отделению в этот период составила 46%; 65% погибших были в возрасте 50 лет и старше.

В ЦЭЭГ поступила информация и аутопсийный материал от 87 умерших от гриппа и тяжелых форм ОРВИ из

Диагностика гриппа в период с декабря 2015 г. по март 2016 г. в ЦЭЭГ и на 10 сотрудничающих с ним опорных базах

Регион РФ	Опорные базы, ФБУЗ	Декабрь 2015 г., недели					Январь 2016 г., недели				Февраль 2016 г., недели				Март 2016 г., недели	
		49-я	50-я	51-я	52-я	53-я	1-я	2-я	3-я	4-я	5-я	6-я	7-я	8-я	9-я	10-я
		Средняя заболеваемость (на 10 тыс.) по 10 опорным базам														
		61,1	60,1	61,9	58,5	45,3	27,0	49,7	83,1	136,6	119,2	94,2	76,4	62,5	59,2	50,5
Европейская часть	ЦЭЭГ, Москва	0/0	7/1	32/2	58/2	63/1	0/0	84/1	92/2	91/6	49/4	19/1	16/2	10/1	8/1	5/8
	В. Новгород	0/0	0/0	1/0	0/0	0/0	0/0	1/0	19/0	44/0	103/0	16/0	14/0	2/0	4/0	4/0
	Липецк	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	2/0	14/0	63/0	107/0	33/0	30/0	14/0	11/0	5/0
	Владимир	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	6/0	29/0	96/6	105/9	45/15	24/7	6/0	4/0	2/0
	Ярославль	0/0	0/0	0/0	1/0	4/0	0/0	4/0	19/0	93/3	161/11	89/1	30/1	26/3	9/1	3/2
	Пенза	0/0	0/0	0/0	1/0	0/0	0/0	6/0	6/0	16/0	13/1	15/2	6/0	5/0	7/2	6/2
	Чебоксары	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	3/0	8/0	18/1	31/0	28/0	30/0	17/0	10/0	4/0
	В целом по региону	0/0	7/1	33/2	60/2	67/1	0/0	106/1	187/2	421/16	569/16	245/19	150/10	80/4	53/4	29/12
Урал	Оренбург	0/0	0/0	0/0	0/2	1/0	0/0	6/0	12/0	17/0	40/0	19/0	8/0	4/0	6/0	0/0
Сибирь	Томск	0/0	0/0	1/0	1/0	2/0	0/0	5/0	12/0	17/0	14/0	11/1	4/0	3/0	2/0	2/0
	Восток	Владивосток	0/0	0/0	0/0	1/1	5/0	0/0	1/4	10/1	36/6	36/18	60/9	51/2	18/3	19/8
	Биробиджан	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/0	2/0	1/1	2/1	0/1	9/3	7/2
	В целом по региону	0/0	0/0	0/0	1/1	5/0	0/0	1/4	10/1	37/6	38/18	61/10	53/3	18/4	28/11	32/13
Число проб		204	222	336	361	244	0	528	657	1381	1913	1385	970	475	500	345
Число положительных на грипп		0/0	7/1	34/2	62/5	75/1	0	118/5	221/3	492/22	661/34	336/30	215/13	105/8	89/15	63/25
% положительных на грипп		0/0	3,2/0,4	10,1/0,6	17,2/1,4	30,7/0,4	0	22,3/0,9	33,6/0,5	35,6/1,6	34,5/1,8	24,3/2,2	22,2/1,3	22,1/1,7	17,8/3,0	18,3/7,2
Частота детекции ОРВИ		34,4	36,7	31,5	35,4	27,0	0	25,9	31,6	16,0	16,9	23,6	13,8	18,9	21,9	28,8

Примечание. 0/0 – пандемический/сезонный вирус.

Москвы (41), Владимира (10), Оренбурга (13), Тулы (15), Биробиджана (1), Пензы (2), Ярославля (5). В ЦЭЭГ также поступила информация и прижизненные носоглоточные смывы от 4 умерших из Москвы (3) и Пензы (1) и 1 штамм вируса гриппа А (H1N1)pdm09 – из Ярославля. Средний возраст пациентов составил 55,1 года (29 – 86), среди них был один ребенок (4 года). Количество дней болезни до летального исхода в среднем составило 9,9 (3 – 20).

В материалах от 65 (75%) умерших детектирована РНК вируса гриппа А (H1N1)pdm09, в том числе у 2 – только в прижизненных носоглоточных смывах. По предварительным данным, на клетках культуры ткани МДСК и КЭ выделено 13 штаммов вируса гриппа А (H1N1)pdm09 от 6 умерших (Москва, Оренбург, Ярославль, Пенза): большинство штаммов было выделено из

ткани легких (7), а также трахеи (3) и бронхов (3). Один штамм этого вируса получен из носоглоточного смыва, взятого при жизни в последующем умершего пациента; из аутопсийного материала от этого пациента штаммы выделить не удалось.

В анализируемый период отмечен рост детекции положительных проб на грипп, причем 31,1% детектировано к концу 2015 г., затем максимальные показатели регистрировали на 4-й (37,2%) и 5-й (36,4%) неделях 2016 г., что коррелирует с динамикой показателей заболеваемости. Несколько позже максимальное число положительных проб детектировали на Дальнем Востоке (6-я и 7-я недели 2016 г.) (см. табл. 1).

В ЦЭЭГ и на 10 сотрудничающих с ним опорных базах проведены исследования клинического материала для диагностики гриппа и ОРВИ: методом ПЦР – 9797

Таблица 2

Диагностика гриппа и ОРВИ в ЦЭЭГ и на 10 опорных базах в период с 40-й недели 2015 г. по 10-ю неделю 2016 г.

ОРВИ	Методы диагностики гриппа и ОРВИ, число положительных образцов/%		
	ОТ-ПЦР	МИФ	изоляция штаммов
Число образцов	9797	3030	1136
Грипп А, подтип не установлен	14/0,14	0	0
Грипп А (H1N1)pdm09	2436/24,9	168/5,5	357/31,4
Грипп А (H3N2)	140/1,4	0	13/1,14
Грипп В	24/0,24	0	5/0,44
Грипп в целом	2614/26,7	168/5,5	375/33,0
Парагрипп	76/0,8	578/19,1	н. и.
Аденовирусы	75/0,8	154/5,1	н. и.
РС-вирус	183/2,0	61/2,0	н. и.
Риновирусная инфекция	280/3,0	н. и.	н. и.
Другие ОРВИ	65/0,7*	н. и.	н. и.
ОРВИ в целом	614/6,3	793/26,2	н. и.

Примечание. 65/0,7\* – другие ОРВИ, в том числе 14 случаев метапневмовирусной инфекции, 26 – бокавирусной инфекции, 25 – коронавирусной инфекции; н. и. – не исследовали.

образцов, МИФ – 3030 образцов, изоляция штаммов на культуре ткани МДСК и КЭ – из 1136 образцов материала (носоглоточных смывов, бронхоальвеолярного лаважа, аутопсийного материала) (табл. 2).

В отличие от предыдущих эпидемических сезонов (2010–2015), определена абсолютно доминирующая роль вируса гриппа А (H1N1)pdm09, частота которого составила 94% (табл. 3). При этом на Дальнем Востоке активность вирусов гриппа А (H3N2) была несколько выше по сравнению с другими регионами (22%). В период сезона отмечена и крайне низкая активность вируса гриппа В, долевое участие которого составило 1%.

В целом выделено 337 штаммов, для большинства из которых проведено детальное типирование (см. табл. 3). Результаты антигенной характеристики 227 штаммов, выделенных в декабре 2015 г. – марте 2016 г., определили родство 215 (95%) штаммов с эталоном А/Калифорния/7/2009 (H1N1)pdm09 (вакцинный), при этом 12 штаммов (5%) реагировали с эталонной сывороткой до 1/16 гомологичного титра; 10 штаммов вируса гриппа А (H3N2) были типированы как А/Гонконг/5738/2014

(дрейф вакцинного) и взаимодействовали с сывороткой к этому вирусу до полного гомологичного титра, в то же время с сывороткой к А/Швейцария/9715293/2013 (вакцинный) штаммы реагировали до 1/4–1/16 гомологичного титра; 2 штамма вируса гриппа типа В были родственны В/Брисбен/60/2008 (не входил в состав вакцин) и реагировали с эталонной сывороткой до 1/2 и 1/8 гомологичного титра соответственно.

Методом высокопроизводительного секвенирования нового поколения была изучена последовательность аминокислотных замен в гемагглютинине (НА), нейраминидазе (NA) и неструктурном белке (NS1) вируса А (H1N1)pdm09 в клиническом материале (аутопсийный – 5 образцов) и в 20 выделенных штаммах (в том числе из аутопсийного материала – 7). Анализ аминокислотных замен в последовательности НА выявил наличие мутаций в рецепторсвязывающем сайте (D222Y и D222N) у 3 штаммов, выделенных из материалов, поступивших из Оренбурга (bronхи, легкое) и Москвы (легкое). В то же время результаты изучения штаммов, выделенных от пациентов с благоприятными исходами, аминокислотных замен не выявили.

Данные изучения последовательности аминокислот в NA 15 штаммов вируса А(H1N1)pdm09 свидетельствовали об отсутствии специфических замен, ответственных за резистентность к препаратам с антинейраминидазной активностью – озельтамивиру и занамивиру, в том числе в случаях с летальными исходами.

Анализ аминокислотных замен в последовательности белка NS1 выявил мутации у 3 штаммов вирусов (D2E и E125D), выделенных из тканей трахеи и бронхов.

### Обсуждение

Особенностью текущей эпидемии стала доминирующая роль в структуре циркулирующих вирусов гриппа А (H1N1)pdm09.

Эпидемический подъем характеризовался высокими показателями заболеваемости ОРВИ с большей вовлеченностью детей 3–6 лет, госпитализации с диагнозом «грипп» у лиц в возрасте 15–65 лет, развития осложнений и летальности у взрослых. По данным, полученным в настоящем исследовании, средний возраст погибших от гриппа и его осложнений составил 55,1 года, что выше по сравнению с предыдущими годами, когда активным также был вирус гриппа А (H1N1)pdm09: в 2009–2010 гг. средний возраст погибших составил 37,7 года, в 2010–2011 гг. – 44,5, в 2012–2013 гг. – 44,2 года [5, 7].

Пиковые показатели заболеваемости и госпитализации на 5–6-й неделях 2016 г. были на уровнях показателей

Таблица 3

Долевое участие вирусов гриппа в этиологии эпидемии 2015–2016 гг. на разных территориях России (к концу марта 2016 г.)

Регион	Число образцов	Число детектированных случаев гриппа по совокупности методов (%)*			Число выделенных штаммов			
		А (H1N1)pdm09	А (H3N2)	В	А (H1N1)pdm09	А (H3N2)	В/Ям	В/Вик
Европейская часть	7317	1995 (97,0)	66 (3,0)	24	183	10	1	4
Урал	1036	112 (98,0)	2 (2,0)	0	26	0	0	0
Сибирь	722	73 (99,0)	1 (1,0)	0	41	0	0	0
Дальний Восток	2054	256 (78,0)	71 (22,0)	0	70	2	0	0
Всего ...	11 129	2436 (94,0)	140 (5,0)	24 (1,0)	320	12	1	4

Примечание. \* – процент от числа положительных на грипп.

Таблица 4

**Аминокислотные замены в HA, PA, NP, M1 и NS1 штаммов вируса гриппа А (H1N1)pdm09 в сезон 2015–2016 гг.**

Белок	Аминокислотные замены в позициях	Функциональная роль
HA	S84N, серин – аспарагин S162N, серин – аспарагин K163Q, лизин – глутамин S84T, серин – треонин I216T, изолейцин – треонин K283E, лизин – глутаминовая кислота	Слияние вирусной оболочки с клеточной мембраной
PA	N204S, аспарагин – серин	Транскрипция и репликация генома
NP	M105T, метионин – треонин	Регуляция разных стадий вирусной инфекции: транскрипции, трансляции, созревания
M1	Q208K, глутамин – лизин	Регуляция вирусной репликации
NS1	E125D, глутаминовая кислота – аспарагиновая кислота	Противодействие антивиральному эффекту интерферона и прочих интерлейкинов, индукция апоптоза

ноября 2009 г., первой волны пандемии, и существенно выше по сравнению с предыдущим сезоном [5, 8].

Изучение антигенных свойств штаммов вируса гриппа А (H1N1)pdm09 не выявило значительных различий по отношению к вакцинному вирусу А/Калифорния/7/2009, который не изменился с 2009 г. и на протяжении 7 сезонов входил в состав гриппозных вакцин. Однако результаты генетического анализа HA, полученные в совместных исследованиях пандемических штаммов, выделенных в Москве и Санкт-Петербурге в декабре 2015 г. – январе 2016 г., с сотрудниками ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, а также зарубежными коллегами, показали, что в популяции этого вируса появились два новых субклайда в клайде 6В (6В1 и 6В2) (табл. 4) [13]. В большинстве стран долевое участие штаммов субклайда 6В1 достаточно быстро нарастало с октября 2015 г. и стало доминирующим в декабре 2015 г. – январе 2016 г. Для этого субклайда были отмечены характерные замены в антигенном сайте HA Sa, расположенного на глобуле белка, рядом с рецепторсвязывающим сайтом (S84N, S162N, K163Q и I216N). С заменой S162N связывают возникновение нового потенциального сайта гликозилирования, который позволяет вирусу «ускользнуть» от специфических антител после вакцинации или ранее перенесенной инфекции [14]. Нельзя исключить влияние появившихся аминокислотных замен на тяжесть клинического течения в сезон 2015–2016 гг.

Результаты настоящей работы подтвердили и полученные ранее данные по аминокислотным заменам в рецепторсвязывающем сайте HA [15–20]. В штаммах, выделенных из аутопсийного материала 3 из 6 пациентов, определены замены D222Y и D222N, с которыми связывают большую тропность вируса к эпителиальным клеткам нижних отделов респираторного тракта, позволяющих вирусу вызывать тяжелую вирусную пневмонию.

Была определена мутация в NS1-гене (E125D), с которой ассоциируется способность контролировать экспрессию генов, выключая транспорт мРНК клеток хозяина, а также противодействие антивиральному эффекту

интерферона и других интерлейкинов, индуцирование апоптоза.

По оценке Европейского бюро ВОЗ, в нескольких странах региона (Украина, Беларусь, Финляндия, Греция, Ирландия, Норвегия, Польша, Испания, Великобритания) в текущем сезоне также была отмечена очень высокая интенсивность эпидемии, несмотря на то, что практически во всех странах Северного полушария доминировал вирус гриппа А (H1N1)pdm09. Только в нескольких странах регистрировали высокую активность вирусов гриппа А (H3N2) и В (Израиль, Турция, Китай) [21].

Подтверждаются и результаты антигенного анализа, показавшие близкое антигенное родство штаммов вируса гриппа А (H1N1)pdm09 с вакцинным вирусом и гетерогенность в популяции штаммов вирусов гриппа А (H3N2) и В. Среди 3695 штаммов, изученных на принадлежность к филогенетическим группам, 2695 штаммов А (H1N1)pdm09 были подобны А/Южная Африка/3626/2013, 273 штамма А (H3N2) – А/Гонконг/4801/2014, 6 штаммов А (H3N2) – А/Самара/73/2013, 123 штамма – А/Швейцария/9715293/2013; среди вирусов типа В 96 штаммов были подобны В/Пхукет/3073/2013 (линия В/Ямагата, клайд 3), 492 штамма – В/Брисбен/60/2008 (линия В/Виктория, клайд 1А).

Изучение чувствительности штаммов вируса гриппа А (H1N1)pdm09, выделенных в ЦЭЭГ, не выявило среди них вирусов с пониженной чувствительностью к препаратам с антинейраминидазной активностью, что в целом регистрируют и в других странах Европейского региона: 1903 штамма вируса гриппа А (H1N1)pdm09, 88 штаммов вируса гриппа А (H3N2), 161 штамм гриппа В были тестированы на чувствительность к антинейраминидазным препаратам. Одиннадцать (0,6%) штаммов вируса гриппа А (H1N1)pdm09 и 1 штамм вируса гриппа А (H3N2) продемонстрировали пониженную чувствительность к ингибиторам NA и несли замены в NA в позициях H275Y и E119V соответственно.

В США в отличие от предыдущих лет эпидемия начала развиваться несколько позже и к началу марта 2016 г. еще не достигла пиковых показателей [22]. Кроме того, на фоне доминирующей роли вируса гриппа А (H1N1)pdm09 отмечена большая активность вирусов гриппа А (H3N2) и В.

В Женеве 23–24 февраля 2016 г. состоялось совещание экспертов ВОЗ по составу гриппозных вакцин для стран Северного полушария в сезон 2016–2017 гг. В состав трехвалентных вакцин рекомендованы следующие вирусы: А/Калифорния/7/2009 (H1N1)pdm09-подобный, А/Гонконг/4801/2014 (H3N2)-подобный, В/Брисбен/60/2008-подобный (линия В/Виктория). В состав четырехвалентных вакцин рекомендован вирус линии В/Ямагата-подобных В/Пхукет/3073/2013 [23].

С сентября 2015 г. продолжали детектировать случаи инфицирования людей вирусами гриппа птиц и свиней [24]. По данным ВОЗ, число случаев инфицирования вирусом гриппа А (H5N6) составило 5 (всего с мая 2014 г. детектировано 9 случаев, все из них – в Китае), вирусом гриппа А (H5N1) – 2 (всего с 2003 г. в 16 странах мира зарегистрировано 846 случаев, 449 (53%) из которых – с летальным исходом), вирусом гриппа А (H7N9) – 44 (всего с 2013 г. зарегистрировано не менее 694, 277

(35%) из которых закончились летально), вирусом гриппа А (H9N2) – 6, в том числе в Бангладеш (1) и Китае (6), вирусом гриппа свиней А (H1N1)v – 3, в том числе в Китае (2) и США (1), вирусом гриппа свиней А (H3N2)v – 1 случай в США.

Таким образом, в отличие от предыдущих 5 эпидемических сезонов доминирующая роль в этиологии эпидемий в странах Северного полушария принадлежала вирусу гриппа А (H1N1)pdm09, причем в ряде из них эпидемии характеризовались высокой и очень высокой интенсивностью и сопровождалась более высокими показателями заболеваемости, госпитализации и смертности. Причиной этого могли послужить молекулярно-генетические изменения белков вируса, произошедшие впервые с 2009 г., которые, по-видимому, «позволили» вирусу «ускользнуть» от действия специфических антител, а также противодействовать защитным свойствам интерферонов и других интерлейкинов. Наряду с этим необходимо отметить, что наибольшее число случаев госпитализации и летальных исходов было отмечено в возрастной группе 15–64 года, для которой во многих странах мира, в том числе в России, регистрируют низкий охват прививками. Следовательно, в периоды высокой активности вируса гриппа А (H1N1)pdm09 особое внимание необходимо уделять именно этой возрастной группе для своевременного назначения специфической противовирусной терапии и планировать мероприятия, направленные на снижение ущерба от тяжелых форм гриппозной инфекции.

Недостаточный охват населения РФ вакцинацией, острый дефицит этиотропных химиопрепаратов, поздние сроки госпитализации – все это в конечном счете ухудшило ситуацию. Уроки пандемии 2009–2010 гг. в полной мере учтены не были [25]. Невыученных уроков вирусы гриппа не прощают.

**Финансирование.** Исследование было частично финансировано Центром по контролю и профилактике заболеваний, Атланта, США, договор CoAg: U51P000527-05.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 3–5, 7, 9, 10, 12–14, 17–20, 23, 24 см. REFERENCES)

2. Львов Д.К., Бурцева Е.И., Прилипов А.Г., Колобухина Л.В., Меркулова Л.Н., Дерябин П.Г. и др. Изоляция 24.05.2009 г. и депонирование в Государственную коллекцию вирусов (ГКВ № 2452 от 24.05.2009 г.) первого штамма А/ИВ-Москва/01/2009 (H1N1)swl, подобного свиному вирусу А (H1N1) от первого выявленного 21.05.2009 г. больного в г. Москве. *Вопросы вирусологии.* 2009; 54 (5): 10–4.
6. Карпова Л.С., Соминина А.А., Бурцева Е.И., Пелих М.Ю., Феодоритова Е.Л., Поповцева Н.М. и др. Сравнение эпидемий гриппа в России, вызванных пандемическим вирусом гриппа А (H1N1)pdm09 в период с 2009 по 2013 г. *Вопросы вирусологии.* 2015; 60 (3): 19–25.
8. Львов Д.К., Бурцева Е.И., Колобухина Л.В., Дерябин П.Г., Кириллова Е.С., Трушаклова С.В. и др. Особенности эпидемического сезона 2014/2015 гг. по гриппу в разных регионах России. *Инфекционные болезни.* 2015; 13 (4): 59–67.
11. Выделение вирусов гриппа в клеточных культурах и куриных эмбрионах и их идентификация: Методические рекомендации (утверждены ФС по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 18 апреля 2006 г. N.0100/4430-06-34). М.: 2006.
15. Львов Д.К., Бурцева Е.И., Прилипов А.Г., Богданова В.С., Щелканов М.Ю., Бовин Н.В. и др. Возможная связь летальной пневмонии с мутациями пандемического вируса гриппа А/H1N1 swl в рецепторсвязывающем сайте субъединицы HA1 гемагглютина. *Вопросы вирусологии.* 2010; 55 (4): 4–9.
16. Львов Д.К., Яшкулов К.Б., Прилипов А.Г., Бурцева Е.И., Шляпникова О.В., Поглазов А.Б. и др. Обнаружение аминокислотных замен аспарагиновой кислоты на глицин и аспарагин в рецепторсвязывающем сайте гемагглютина в вариантах пандемического вируса гриппа А/H1N1 от больных с летальным исходом и со среднетяжелой формой заболевания. *Вопросы вирусологии.* 2010; 55 (3): 15–9.
21. Сайт Европейского ВОЗ. Available at: <http://flunewseurope.org>.
22. Сайт Центров по контролю за заболеваемостью и профилактике (CDC&P), Атланта США. Available at: <http://www.cdc.gov/flu/weekly/index.htm>.
25. Чучалин А.Г. Грипп: уроки пандемии (клинические аспекты). *Пульмонология.* 2010; Приложение 1: 3–8.

#### REFERENCES

1. Dawood F.S., Jain S., Finelli L., Shaw M.W., Lindstrom S., Garten R.J. et al. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N. Engl. J. Med.* 2009; 360 (25): 2605–15.
2. L'vov D.K., Burtseva E.I., Prilipov A.G., Kolobukhina L.V., Merkulova L.N., Deryabin P.G. et al. The 24 May, 2009 isolation of the first A/ИВ-Москва/01/2009 (H1N1)swl strain similar to swine A (H1N1) influenza virus from the first Moscow case detected on May 21, 2009, and the deposit in the state Collection of Viruses (SCV No. 2452 dated May 24, 2009). *Voprosy virusologii.* 2009; 54 (5): 10–4. (in Russian)
3. Dawood F.S., Iuliano A.D., Reed C., Meltzer M.I., Shay D.K., Cheng P.Y. et al. Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: a modeling study. *Lancet Infect. Dis.* 2012; 12 (9): 687–95.
4. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Estimates of deaths associated with seasonal influenza in United States, 1976–2007. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 2010; 59 (33): 1057–62.
5. Sominina A., Burtseva E., Eropkin M., Karpova L., Zarubaev V., Smorodintseva E. et al. Influenza surveillance in Russia based on epidemiological and laboratory data for the period from 2005 to 2012. *Am. J. Infect. Dis.* 2013; 9 (3): 77–93.
6. Karpova L.S., Sominina A.A., Burtseva E.I., Pelikh M.Yu., Feodoritova E.L., Popovtseva N.M. et al. Comparative studies of influenza epidemic in Russia caused by pandemic influenza A (H1N1)pdm09 during since 2009 till 2013. *Voprosy virusologii.* 2015; 60 (3): 19–25. (in Russian)
7. Review of the 2014–2015 influenza season in the northern hemisphere. Available at: <http://www.who.int/wer/2015/wer9023.pdf>.
8. L'vov D.K., Burtseva E.I., Kolobukhina L.V., Deryabin P.G., Kirillova E.S., Trushakova S.V. et al. Features epidemic season 2014/2015 gg. Influenza in different regions of Russia. *Infektsionnye bolezni.* 2015; 13 (4): 59–67. (in Russian)
9. Skowronski D., Chambers C., Sabaiduc S., Serres G. De., Dickinson J.A., Winter A.L. et al. Interim estimates of 2014/2015 vaccine effectiveness against influenza A (H3N2) from Canada's Sentinel Physician Surveillance network, January 2015. *Euro Surveill.* 2015; 20 (4): pii=21022.
10. Pebody R., Warburton F., Ellis J., Andrews N., Thompson C., von Wissmann B. et al. Low effectiveness of seasonal influenza vaccine in preventing laboratory confirmed influenza in primary care in the United Kingdom: 2014/2015 mid-season results. *Euro Surveill.* 2015; 20 (5): pii=21025.
11. Isolation of influenza viruses in cell culture and embryonated eggs and their identification: Methodical recommendation (approved by the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare on April 18, 2006 N.0100/4430-06-34). Moscow; 2006. (in Russian)
12. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2015–2016 northern hemisphere. Available at: [http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2015\\_16\\_north/en](http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2015_16_north/en).
13. Komissarov A., Fadeev A., Petrov S., Sergeeva M., Sintsova K., Egorova A. et al. Rapid spread of influenza A (H1N1)pdm09 viruses with a new set of specific mutations in the internal genes in the beginning of 2015/2016 epidemic season in Moscow and Saint-Petersburg (Russian Federation). *Influenza Other Respir. Viruses.* 2016. Available at: <http://dx.doi.org/10.1111/irv.12389>.
14. Raymond F.L., Caton A.J., Cox N.J., Kendal A.P., Brownlee G.G. The antigenicity and evolution of influenza H1 Haemagglutinin from

- 1950–1957 and 1977–1983: two pathways from one gene. *Virology*. 1986; 148: 257–87.
15. L'vov D.K., Burtseva E.I., Prilipov A.G., Bogdanova V.S., Shchelkanov M.Yu., Bovin N.V. et al. A possible association of fatal pneumonia with mutations of pandemic influenza A/H1N1swl virus in the receptor-binding site of the HA1 subunit. *Voprosy virusologii*. 2010; 55 (4): 4–9. (in Russian)
16. L'vov D.K., Yashkulov K.B., Prilipov A.G., Burtseva E.I., Shlyapnikova O.V., Poglazov A.B. et al. Detection of amino acid substitutions of asparaginic acid for glycine and asparagine at the receptor-binding site of hemagglutinin in the variants of pandemic influenza A/H1N1 virus from patients with fatal outcome and moderate form of the disease. *Voprosy virusologii*. 2010; 55 (3): 15–9. (in Russian)
17. Puzelli S., Facchini M., Spagnolo D., De Marco M.A., Calzoletti L., Zanetti A. et al. Transmission of hemagglutinin D222G mutant strain of pandemic (H1N1)2009 virus. *Emerg. Infect. Dis.* 2010; 16 (5): 863–5.
18. Rogers G.N., Paulson J.C., Daniels R.S., Skehel J.J., Wilson I.A., Wiley D.C. Single amino acid substitutions in influenza hemagglutinin change receptor binding specificity. *Nature*. 1983; 304 (5921): 76–8.
19. Valli M.B., Selleri M., Meschi S., Zaccaro P., Vincenti D., Lalle E. et al. Hemagglutinin 222 variants in pandemic (H1N1) 2009 virus. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17 (4): 749–51.
20. WHO. Preliminary review of D222G amino acid substitution in hemagglutinin of pandemic influenza A (H1N1) 2009 viruses. WHO Report 28 December 2009. Available at: [http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/h1n1\\_d222g/en/index.html](http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/h1n1_d222g/en/index.html).
21. Flu News Europe. World Health Organization. Available at: <http://flunewseurope.org>.
22. Centers for Disease Control and Prevention (CDC & P). Atlanta, USA. Weekly U.S. Influenza Surveillance Report. Available at: <http://www.cdc.gov/flu/weekly/index.htm>.
23. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2016–2017 northern hemisphere. Available at: <http://www.who.int/wer/2016/wer9110.pdf?ua=1>.
24. Zoonotic influenza viruses: antigenic and genetic characteristics and development of candidate vaccine viruses for pandemic preparedness. Available at: <http://www.who.int/wer/2016/wer9111.pdf?ua=1>.
25. Chuchalin A.G. Influenza: lessons of pandemic (clinical aspects). *Pulmonology*. 2010; Suppl. 1: 3–8. (in Russian)

Поступила 20.03.16

Принята в печать 29.03.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.921.5-06:616.24-002-0221-036.88-091.8

*Краснободцев К.Г., Львов Д.К., Альховский С.В., Бурцева Е.И., Федякина И.Т., Колобухина Л.В., Кириллова Е.С., Трушакова С.В., Оскерко Т.А., Щелканов М.Ю., Дерябин П. Г.*

## ПОЛИМОРФИЗМ АМИНОКИСЛОТ В ПОЗИЦИИ 222 РЕЦЕПТОРСВЯЗЫВАЮЩЕГО САЙТА ГЕМАГГЛЮТИНИНА ВИРУСА ГРИППА А (H1N1)PDM09 У ПАЦИЕНТОВ С ЛЕТАЛЬНОЙ ВИРУСНОЙ ПНЕВМОНИЕЙ В 2012–2014 гг.

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

Представлены данные исследования секционного материала от пациентов, погибших от пневмонии, ассоциированной с вирусом гриппа А (H1N1)pdm09, в 2012–2014 гг., на наличие мутантных (позиция 222 в рецепторсвязывающем сайте гемагглютинина (НА)) форм вируса. Всего, по совокупным данным, полученным тремя различными методами (секвенирование, next-generation sequencing (NGS), изоляция вируса), мутантные варианты вируса выявлены у 17 (41%) из 41 пациента. Доля мутантных форм в составе вирусной популяции колебалась от 1 до 69,2%. Наиболее часто встречалась смесь дикого (D222) и мутантного (D222G) варианта, доля которого варьировала от 3,3 до 69,2% вирусной популяции. Реже в смеси обнаруживалась мутация D222N (от 1,1 до 5,5%). У одного из пациентов состав вирусной популяции был крайне неоднороден. Так, если в образце левого легкого выявлен только дикий тип D222, в правом легком обнаружена смесь вариантов 222D/G/N (65,4/32,5/1,1%), в трахее – смесь 222D/G/Y/A (61,8/35,6/1,2/1,4% соответственно). В бронхах данного пациента выявлена смесь 222D/G/N/A (64,3/33,7/1/1% соответственно). Полученные данные свидетельствуют о том, что процесс адаптации вируса в нижних отделах респираторного тракта сопряжен с появлением различных вариантов вируса с мутациями в рецепторсвязывающем сайте НА. Образование мутантных форм вируса в тканях нижнего отдела респираторного тракта, видимо, приводит в большинстве случаев к вирусной летальной пневмонии. Однако если они представляют минорную часть популяции, их не удается выявить методом конвекционного секвенирования, но они могут быть обнаружены с помощью метода NGS.

К л ю ч е в ы е с л о в а : *грипп; гемагглютинин; А (H1N1)pdm09; next-generation sequencing; рецепторная специфичность; рецепторсвязывающий регион; α2–3-сиалозиды; вирусная пневмония.*

*Для цитирования:* Краснободцев К.Г., Львов Д.К., Альховский С.В., Бурцева Е.И., Федякина И.Т., Колобухина Л.В., Кириллова Е.С., Трушакова С.В., Оскерко Т.А., Щелканов М.Ю., Дерябин П.Г. Полиморфизм аминокислот в позиции 222 рецепторсвязывающего сайта гемагглютинина вируса гриппа А (H1N1)pdm09 у пациентов с летальной вирусной пневмонией в 2012–2014 гг. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61 (4): 166–171.

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-4-166-171

*Для корреспонденции:* Краснободцев Кирилл Геннадьевич, науч. сотр. лаб. этиологии и эпидемиологии гриппа Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, E-mail: kkg\_87@mail.ru

*Krasnoslobodtsev K.G., Lvov D.K., Alkhovsky S.V., Burtseva E.I., Fedyakina I.T., Kolobukhina L.V., Kirillova E.S., Trushakova S.V., Oskerko T.A., Shchelkanov M.Yu., Deryabin P.G.*

**AMINO ACID POLYMORPHISM AT RESIDUE 222 OF THE RECEPTOR-BINDING SITE OF THE HEMAGGLUTININ OF THE PANDEMIC INFLUENZA A(H1N1)PDM09 FROM PATIENTS WITH LETHAL VIRUS PNEUMONIA IN 2012-2014**

D.I. Ivanovsky Institute of Virology «Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation

Survey data from autopsy specimens from patients who died from pneumonia caused by the influenza A(H1N1) pdm09 in 2012-2014 and mutant forms of influenza virus in these patients (position 222 in the receptor-binding region of hemagglutinin) were presented. In total, according to aggregate data, obtained with three different methods (sequencing, next-generation sequencing (NGS), virus isolation) mutant viruses were detected in 17 (41%) from 41 patients. The proportion of the mutant forms in viral populations ranged from 1% to 69.2%. The most frequent mixture was the wild type (D222) and mutant (D222G), with proportion of mutant type ranged from 3.3% to 69.2% in the viral population. Mutation D222N (from 1.1% to 5.5%) was found rarely. Composition of the viral population from one patient is extremely heterogeneous: in left lung there was only wild type D222, meantime in right lung – mixture of mutant forms 222D/N/G (65.4/32.5/1.1%), in trachea – mixture 222D/G/Y/A (61.8/35.6/1.2/1.4%, respectively), and in bronchi compound of 222D/G/N/A (64.3/33.7/1/1%, respectively) were detected. The obtained data indicate that the process of adaptation of the virus in the lower respiratory tract is coupled with the appearance of different virus variants with mutations in the receptor-binding region. Mutant forms of the virus are observed in the lower respiratory tract of the majority of patients with lethal viral pneumonia. However, if they are a minor part of the population, they cannot be detected by the method of conventional sequencing. They can be identified using the NGS methods.

**Key words:** influenza; hemagglutinin; A(H1N1)pdm09; next-generation sequencing; receptor specificity; receptor-binding site;  $\alpha$ 2-3-sialosides; viral pneumonia.

**For citation:** Krasnoslobodtsev K.G., Lvov D.K., Alkhovsky S.V., Burtseva E.I., Fedyakina I.T., Kolobukhina L.V., Kirillova E.S., Trushakova S.V., Oskerko T.A., Shchelkanov M.Yu., Deryabin P.G. Amino acid polymorphism at residue 222 of the receptor-binding site of the hemagglutinin of the pandemic influenza A(H1N1)pdm09 from patients with lethal virus pneumonia in 2012-2014. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2016; 61(4):166-171. (In Russ.).

DOI 10.18821/0507-4088-2016-61-4-166-171

**For correspondence:** Kirill G. Krasnoslobodtsev, researcher of influenza etiology and epidemiology laboratory of D.I. Ivanovsky Institute of Virology «Federal Research Center of Epidemiology and Microbiology named after honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation, E-mail: kkg\_87@mail.ru

**Information about authors:**

Krasnoslobodtsev K.G., <http://orcid.org/0000-0003-1745-9128> Oskerko T.A., <http://orcid.org/0000-0003-1290-2661>  
Lvov D. K., <http://orcid.org/0000-0001-8176-6582> Shchelkanov M.Yu., <http://orcid.org/0000-0001-8610-7623>  
Alkhovsky S.V., <http://orcid.org/0000-0001-6913-5841> Deryabin P. G., <http://orcid.org/0000-0002-8522-9554>

**Funding.** The work was supported by the Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA. CoAg: U51PO00527-02.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 15 January 2016

Accepted 26 January 2016

## Введение

Появление в 2009 г. и широкое распространение нового антигенного варианта вируса гриппа А (H1N1) pdm09 изменили характер эпидемического процесса по долевого участию субтипов вируса гриппа, интенсивности подъёмов заболеваемости, вовлечению разных возрастных групп, заболеваемости и смертности. В эпидемические сезоны его активной циркуляции (2009–2010, 2010–2011, 2012–2013) регистрировали более высокие показатели заболеваемости среди взрослых, обострились проблемы тяжелого течения гриппозной инфекции у беременных, лиц с иммунологическими расстройствами и ожирением, нередко с летальными исходами [1–5].

С 2009 г. в НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России проводится надзор за циркуляцией этого вируса, в том числе с целью изучения причинно-следственных связей тяжелых и летальных форм гриппозной инфекции с генетическими свойствами вируса гриппа А (H1N1) pdm09. Результаты, полученные в 2009–2011 гг., указывали на связь мутации D222G в рецепторсвязывающем сайте гемогглиутина вируса (HA1) с повышенной специфичностью к  $\alpha$ 2–3-сиалозидам рецепторов эпителиальных клеток, выстилающих нижние отделы респираторного

тракта. При этом мутантные формы вируса были выявлены в тканях пациентов с тяжелой вирусной пневмонией с летальным исходом [1, 2, 6–9].

Особый интерес представляло определить возможное разнообразие структуры популяции вируса гриппа А (H1N1) pdm09 с аминокислотными заменами в позиции 222 HA в материале от пациентов с летальными исходами и возможную роль минорных вариантов в развитии тяжелого течения гриппозной инфекции и первичной летальной вирусной пневмонии.

В настоящей работе представлены результаты исследований материала от пациентов, погибших от тяжелой вирусной пневмонии, этиологически связанной с вирусом гриппа А (H1N1) pdm09, в 2012–2014 гг. В результате анализа мутации в позиции 222 в HA обнаружены у 41% пациентов (17 из 41). При этом в ряде случаев мутантные формы вируса, представляющие минорную часть вирусной популяции, были выявлены только при помощи метода next-generation sequencing (NGS). NGS-секвенирование обладает рядом преимуществ перед секвенированием предыдущего поколения, позволяя определять последовательности генома неизвестных возбудителей, а также предоставлять более точные данные о структуре популяции возбудителя, в том числе о минорных вариантах.

## Материал и методы

*Клинический материал и изоляция вируса гриппа А (H1N1)pdm09.* В период 2012–2014 гг. получен аутопсийный материал (фрагменты легких, трахеи и бронхов) от 46 пациентов, у которых при жизни или посмертно был детектирован грипп А (H1N1)pdm09. Материалы для исследований были получены из Москвы, Твери, Брянска, Великого Новгорода, Владимира, Ярославля, Оренбурга, Майкопа, Екатеринбурга и Хабаровска. Пробы от 41 пациента исследовали молекулярно-генетическими и вирусологическими методами.

Из полученного секционного материала на куриных эмбрионах (КЭ) и клетках культуры ткани MDCK были изолированы 8 штаммов вируса гриппа А (H1N1)pdm09. По антигенным свойствам штаммы оказались близкородственными эталону А/Калифорния/7/2009 (H1N1)pdm09 и взаимодействовали с референс-сывороткой до 1/4–1 гомологичного титра.

*Выделение суммарной РНК из секционного материала.* Для выделения суммарной РНК из аутопсийного материала замороженные (-70°C) кусочки ткани в количестве около 50 мг были гомогенизированы с использованием гомогенизатора TissueLyser LT («Qiagen», Германия) в 1 мл реагента TRIzol («Invitrogen», США). Далее выделяли РНК в соответствии с инструкцией производителя. Полученный препарат РНК растворяли в 100 мкл воды. Для дополнительной очистки, а также удаления низкомолекулярных форм (5S рРНК, тРНК) РНК была очищена с помощью набора RNeasy Mini Kit («Qiagen», Германия).

*Детекция РНК вируса гриппа А (H1N1)pdm09 в секционном материале.* Детекцию проводили методом ПЦР в реальном времени (прибор Rotor-Gene 6000HRM, «Corbet») с использованием лабораторного варианта тест-системы с праймерами (SWH1F GTGCTATAAACACCAGCCTYCCA, SWH1R CGG-GATATTCSTTAATCCTGTRGC, SWH1P) и зондом ((FAM)-CAGAATATACA(T-BHQ1)CCRTGCACAATTGGARAA), рекомендованными Центром по надзору за заболеваниями (CDC) в 2009 г. Синтез кДНК перед ПЦР выполняли с использованием универсального праймера 5'Upi(5'-AGCRAAAGCAGG-3'), комплементарного 3'-концевым последовательностям сегментов генома вирусов гриппа А, и обратной транскриптазы RevertAid Premium («Thermo Scientific», США). Для ПЦР использовали готовую двукратную ПЦР-смесь 2x SsoFast Supermix («Bio-Rad», США).

Участок гена НА, содержащий сайт связывания рецептора, был амплифицирован с использованием праймеров swH1\_379F (5'-TGTA AACGACGGCCA GTACRTGTTACCCAGGRGATTTC-3') и H1sw\_1138R (5'-TGACCCCTGCTCATTTTGATGG-3'). Для получения фрагментов использовали полимеразу Phusion («Thermo Scientific»), которая обладает высокой точностью синтеза. Если титр вируса в пробе был низким и фрагмент было невозможно получить в первом раунде ПЦР, проводили второй раунд амплификации с использованием праймеров swH1\_379F и swH1\_882R (5'-TGTA TTGCAATCGTGGACTGGTG-3'). Фрагменты визуализировали в 2% агарозном геле. Полученные ПЦР-фрагменты очищали набором QIAquick PCR Purification Kit («Qiagen») для последующего секвенирования.

*Секвенирование ПЦР-фрагментов.* Реакцию секвенирования проводили с использованием набора Big-

Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100 («Thermo Scientific») в соответствии с инструкцией. Продукты реакции очищали с помощью набора ZR DNA Sequencing Clean-up Kit («Zymo Research»). Электрофорез продуктов реакции секвенирования и их первичный анализ выполняли на автоматическом секвенаторе ABI Prism 3130 («Applied Biosystems») согласно рекомендациям производителя.

*Подготовка ДНК-библиотек и секвенирование.* Для получения кДНК около 100 нг РНК фрагментировали в 15 мкл реакционной смеси для обратной транскриптазы с гексапраймером при 85°C в течение 5 мин, после чего помещали в лед. К фрагментированной РНК добавляли 200 ед. фермента RevertAid Premium («Thermo Scientific», США) и 20 ед. ингибитора RNase RNasin («Promega», США). Инкубировали при 25°C 10 мин, далее при 42°C 60 мин. Реакцию останавливали прогреванием при 70°C 10 мин. Синтез второй цепи кДНК проводили с использованием набора NEBNext<sup>®</sup> mRNA Second Strand Synthesis Module («NEB», США) в соответствии с инструкцией. Полученную дцДНК очищали с использованием набора MinElute PCR Purification Kit («Qiagen», Германия) на автоматической станции QIAcube.

Для получения ДНК-библиотек из дцДНК использовали набор TruSeq DNA Sample Prep Kits v2 («Illumina», США) в соответствии с инструкцией. Для селекции ДНК по размеру применяли реагент AMPure XP («Beckman Coulter», США) с расчетом получения ДНК-библиотек длиной более 270 нуклеотидных оснований (н. о.), что соответствует размеру вставки около 150 н. о. Данные требования к размеру ДНК-библиотек связаны с использованием для секвенирования набора, позволяющего секвенировать не более 150 н. о. в одну сторону. Полученные библиотеки визуализировали на станции автоматического электрофореза QIAxcel Advanced System («Qiagen», Германия). Молярность библиотек измеряли методом ПЦР в реальном времени (2x SsoFast EvaGreen Supermix («Bio-Rad», США), прибор Bio-Rad CFX1000) согласно рекомендациям, изложенным в руководстве *Sequencing Library qPCR Quantification Guide* («Illumina», США).

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

*Биоинформационный анализ.* Анализ полученных данных полногеномного секвенирования проводили при помощи программного обеспечения CLC Genomics Workbench 7.0. Для анализа полученных последовательностей, их выравнивания и выявления мутаций использовали пакет программ DNASTAR-Lasergene v6.

*Животные.* В работе использовали белых беспородных мышей (самки) массой 10–12 г из питомника «Андреевка» (Московская область), которых содержали на стандартном рационе в регламентированных условиях вивария. Для инфицирования мышей использовали пандемический штамм вируса гриппа А/Калифорния/7/09 (H1N1)pdm09, адаптированный к мышам, полученный из Государственной коллекции вирусов ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи».

## Результаты

В период 2012–2014 г. на исследование в рамках надзора за циркуляцией вирусов гриппа поступил секционный материал от 46 пациентов, у которых у

прижизненном клиническом материале (носоглоточные смывы, бронхоальвеолярный лаваж) или секционном материале (ткань трахеи, бронхов, легкого) была выявлена РНК вируса гриппа А (H1N1)pdm09. Были получены и проанализированы последовательности рецепторсвязывающей области HA от 41 пациента, в том числе полученные из тканей трахеи (25 положительных образцов), бронхов (15 образцов), легких (56 образцов), а также смешанного пула бронхов и легких (2 образца) (табл. 1, 2).

Мутантные варианты вируса в секционном материале были найдены у 8 (19,5%) погибших пациентов из 41 (см. табл. 1). При этом чаще всего выявляли замену D222G (6 пациентов), тогда как замены D222N и D222Y были найдены в единичных случаях. Как правило, мутантные формы обнаруживали во всех образцах от одного пациента за исключением трех пациентов, у которых в различных тканях выявляли дикие или мутантные варианты (см. табл. 1).

Для более подробного анализа вирусной популяции в тканях погибших пациентов применен метод высокопроизводительного секвенирования NGS. Проанализированы 15 образцов (ткани легкого, бронхов или трахеи) от 7 пациентов. Все образцы, по данным конвекционного секвенирования (методом Сэнгера), имели дикий генотип D222. Однако результаты «глубокого секвенирования» показали, что у четырех из них в составе вирусной популяции присутствуют мутантные формы. Доля мутантных форм в вирусной популяции составляла от 1 до 69,2%. При этом наличие минорных мутантных вариантов вируса часто определяли только в части образцов от одного пациента. Так, мутантные формы могли быть обнаружены только в трахее или бронхах, тогда

как в тканях легкого определяли только дикий вариант (см. табл. 2). В таблице приведены данные только для пациентов, у которых были обнаружены мутантные варианты вируса.

Долевой состав минорных мутантных форм вируса в разных тканях также различался. Наиболее часто выявляли смесь дикого (D222) и мутантного (D222G) варианта, доля которого в вирусной популяции варьировала от 3,3 до 69,2%. Реже в смеси обнаруживали мутацию D222N (от 1,1 до 5,5% в составе популяции). У одного из пациентов (M27) состав вирусной популяции был крайне неоднороден. Так, если в образце левого легкого выявлен только дикий тип D222, в правом легком обнаружена смесь вариантов 222D/G/N (65,4/32,5/1,1%), в трахее – смесь 222D/G/Y/A (61,8/35,6/1,2/1,4% соответственно). В бронхах данного пациента выявлена смесь 222D/G/N/A (64,3/33,7/1/1% соответственно).

Из секционного материала в эпидемическом сезоне 2012–2013 гг. были изолированы 8 штаммов вируса гриппа А (H1N1)pdm09 на культуре клеток MDCK или развивающихся КЭ. Штаммы выделены из секционного материала, в котором мутантных вариантов вируса при конвекционном секвенировании обнаружено не было. Из 8 изолированных штаммов 3 сохранили дикий генотип D222, а у 5 штаммов выявлена мутация D222G, причем 4 штамма имели смешанную популяцию 222D/G. Важно отметить, что при изоляции на клетках MDCK вируса гриппа А (H1N1)pdm09 из носоглоточных смывов мутантные варианты D222G практически не встречаются. Это свидетельствует о том, что их образование не связано с культивированием вируса на данном типе клеток [6, 10]. Однако высокая частота изоляции мутантных форм вируса из тканей респираторного тракта позволяет пред-

Таблица 1

Штаммы вируса гриппа А (H1N1)pdm09, выделенные из секционного материала (сезон 2012–2013), с указанием аминокислоты в позиции 222 рецепторсвязывающего сайта HA

Пациент	Клинический материал	Штамм	Система выделения штамма, пассаж, титр, АЕ	Секвенирование штамма на MiSeq (HA 222)	Секвенирование секционного материала по Сэнгеру (HA 222)
R1	Трахея	A/IV-Orenburg/83/2012	MDCK, 2-й, 8	D(GAT)/G (GGT)	D(GAT)
	Легкое				D(GAT)
R2	Левое легкое	A/IV-Orenburg/52/2013	MDCK, 3-й, 8	G (GGT)	D(GAT)
	Трахея Бронхи				D(GAT) D(GAT)
YA2	Левое легкое	A/IV-Yaroslavl/96/2013	MDCK, 2-й, 8	D(GAT)	D(GAT)
	Правое легкое		Штамм не выделен		Y(TAT)
MP_1	Левое легкое	A/IV-Maykop/97/2013	MDCK, 1-й, 32	D(GAT)	н. д.
MP_2	То же	A/IV-Maykop/116/2013	MDCK, 2-й, 8	D(GAT)/G (GGT)	н. д.
H1	Трахея		Штамм не выделен		D(GAT)
	Бронхи	A/IV-Chabarovsk/98/2013	MDCK, 2-й, 32	D(GAT)/G (GGT)	D(GAT)
E3	Легкое		Штамм не выделен		D(GAT)
	Трахея	A/IV-Yekaterinburg/107/2013	MDCK, 2-й, 8	D(GAT)	D(GAT)
M21	Тимус				D(GAT)
	Левое легкое		Штамм не выделен		D(GAT)
	Правое легкое		То же		D(GAT)
	Трахея		" "		D(GAT)
	Бронхи	A/IV-Moscow/115/2013	КЭ, 2-й, 16	D(GAT)/G (GGT)/N (AAT)	D(GAT)

Примечание. Здесь и в табл. 2: н. д. – нет данных.

Таблица 2

**Обнаружение мутантных форм вируса А (H1N1)pdm09 по позиции 222 НА в секционном материале от пациентов с летальной пневмонией в 2012–2014 гг.**

Сезон	Пациент	Материал	Полиморфизм по 222 НА, %				
			D	G	N	Y	A
2012–2013	M7	Правое легкое	-	-	+	-	-
		Левое легкое	-	-	+	-	-
	M15	Правое легкое	+	-	-	-	-
		Левое легкое	-	+	-	-	-
		Трахея	-	+	-	-	-
		Бронхи	+	-	-	-	-
	H2	Легкое	-	+	-	-	-
		Трахея	+	-	-	-	-
		Бронхи	-	+	-	-	-
	P1	Трахея	-	+	-	-	-
		Легкое	н. д.	н. д.	н. д.	н. д.	н. д.
	YA2	Правое легкое	+	-	-	-	-
		Левое легкое	-	-	-	+	-
	R2	Левое легкое	100	0	0	0	0
		Трахея	30,8	69,2	0	0	0
		Бронх	95,5	4,5	0	0	0
M21	Трахея	96,7	3,3	0	0	0	
	Бронх	80,8	13,7	5,5	0	0	
H7	Бронхи	-	+	-	-	-	
	Легкое	-	+	-	-	-	
M27	Левое легкое	100	0	0	0	0	
	Правое легкое	65,4	32,5	1,1	0	2	
	Трахея	61,8	35,6	0	1,2	1,4	
	Бронх	64,3	33,7	1	0	1	
2013–2014	L1	Легкое	100	0	0	0	0
		Трахея	100	0	0	0	0
	V1	Легкое	100	0	0	0	0
		Бронхи, легкое	-	+	-	-	-
	V4	Легкое	100	0	0	0	0
		Трахея	72,5	27,5	0	0	0
	V5	Легкое	100	0	0	0	0
		Легкое	-	+	-	-	-

Примечание. Серым цветом выделены образцы, исследованные методом глубокого секвенирования (NGS). Остальные образцы исследованы конвекционным секвенированием по методу Сэнгера. Обнаружение или отсутствие аминокислоты в образце методом конвекционного секвенирования указаны знаками «+» и «-» соответственно. н. д. – нет данных.

положить, что при культивировании вируса на клетках MDCK происходит отбор мутантных вариантов 222G, которые присутствовали в вирусной популяции в минорном количестве. Таким образом, можно сделать вывод, что образование мутантных форм вируса в тканях нижнего отдела респираторного тракта происходит в

большинстве случаев при тяжелой вирусной пневмонии, но если они представляют минорную часть популяции, их не удастся выявить методом конвекционного секвенирования. Решить эту проблему позволяет применение метода NGS. По данным, полученным в ходе исследования, число пациентов, у которых были обнаружены мутантные формы вируса, составило 17 (41%) из 41.

### Обсуждение

Ранее было показано, что ряд штаммов вируса гриппа А (H1N1)pdm09, ассоциированных с летальными случаями, часто несет мутацию в позиции 222 рецепторсвязывающего сайта НА. Замены D222G/N/E предположительно повышают сродство вируса к  $\alpha 2$ -3-рецепторам, что в свою очередь повышает эффективность репликации вируса в нижних отделах респираторного тракта [1, 2, 6–8, 11–13]. Так, мутация D222G приводит к разрыву солевого мостика между D222 и K219 и ослаблению петли 220, открывая ключевой доступ для связывания с  $\alpha 2$ -3-рецепторами [14]. *In vitro* мутация D222G приводила к усилению связывания вируса с клетками тканевого нижнего отдела респираторного тракта человека, в частности с макрофагами и пневмоцитами II типа в альвеолах, а также с железистыми клетками в трахее и бронхах [15]. Кроме того, мутантный вариант D222G усиливал вирулентность вируса А (H1N1)pdm09 для мышей [14].

Учитывая полученные данные, можно сделать вывод, что процесс адаптации вируса в нижних отделах респираторного тракта сопряжен с появлением различных вариантов вируса с мутациями в рецепторсвязывающем сайте НА. Этот процесс, вероятно, лежит в основе отбора наиболее адаптированных к репликации в определенных тканях вариантов, что способствует более тяжелому течению вирусной пневмонии. Таким образом, примененный метод глубокого секвенирования позволил выявить мутантные варианты вируса, представляющие минорную часть вирусной популяции.

Процесс адаптации вируса гриппа А (H1N1)pdm09 к тканям нижних отделов респираторного тракта был изучен на модели летальной пневмонии у мышей. Для моделирования данного процесса использовали штамм А/California/7/2009, адаптированный к мышам в течение 5 пассажей. Адаптированный вариант вируса пассировали на КЭ и использовали для заражения мышей. Результаты анализа генома адаптированного варианта вируса, проведенного методом NGS, показали, что он имеет дикий генотип 222D, но в соседней позиции выявлена мутация Q223R. Q223R часто выявляется у вирусов А (H1N1)pdm09, культивируемых на КЭ, и отражает его адаптацию к данной модели [16]. Однако при анализе вируса, выделенного из тканей легкого мышей, зараженных адаптированным вирусом, были выявлены смеси диких и мутантных форм 222D/G (82 и 18% соответственно) и 223R/Q (81 и 19% соответственно).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что процесс адаптации вируса к тканям легких человека и мышей имеет схожий механизм, связанный с формированием мутантных вариантов в позиции 222. Таким образом, наши данные указывают на то, что мутантные варианты вируса гриппа А (H1N1)pdm09 появляются непосредственно в нижних отделах респираторного тракта. Следовательно, в процессе инфекции в верхних и нижних отделах респираторного тракта формируются две различные вирусные популяции. В верхних отделах респираторного тракта мутантные варианты вируса

практически не выявляются, вследствие чего затрудняется их передача от человека к человеку в ходе эпидемического процесса [17, 18]. Важно отметить, что в активной циркуляции мутантные формы в чистом виде не встречаются и всегда присутствуют только вместе с диким типом вируса [18]. Появление мутантных форм вируса, обладающих повышенным сродством к  $\alpha 2$ -3-рецепторам, может являться одним из факторов, способствующих возникновению и более тяжелому течению пневмонии при данной форме гриппа.

**Финансирование.** Исследование было частично финансировано Центром по контролю и предотвращению заболеваний, Атланта, США, договор CoAg: U51P000527-02.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ЛИТЕРАТУРА (пп. 4, 5, 8, 9, 11–18 см. REFERENCES)

1. Львов Д.К., Бурцева Е.И., Прилипов А.Г., Богданова В.С., Щелканов М.Ю., Бовин Н.В. и др. Возможная связь летальной пневмонии с мутациями пандемического вируса гриппа A/H1N1sw1 в рецепторсвязывающем сайте субъединицы HA1 гемагглютини-на. *Вопросы вирусологии.* 2010; (4): 4–9.
2. Львов Д.К., Малышев Н.А., Колобухина Л.В., Меркулова Л.Н., Бурцева Е.И., Щелканов М.Ю. и др. *Грипп, вызванный новым пандемическим вирусом A/H1N1sw1: клиника, диагностика, лечение. Методические рекомендации.* М.; 2009.
3. Львов Д.К., Бурцева Е.И., Прилипов А.Г., Богданова В.С., Щелканов М.Ю., Бовин Н.В. и др. Распространение нового пандемического вируса гриппа А (H1N1)v в России. *Вопросы вирусологии.* 2010; 55 (3): 4–9.
6. Львов Д.К., Щелканов М.Ю., Бовин Н.В., Малышев Н.А., Чучалин А.Г., Колобухина Л.В. и др. Корреляция между рецепторной специфичностью штаммов пандемического вируса гриппа А (H1N1) pdm09, изолированных в 2009–2011 гг., структурой рецепторсвязывающего сайта и вероятностью развития летальной первичной вирусной пневмонии. *Вопросы вирусологии.* 2012; 57 (1): 14–7.
7. Львов Д.К., Яшкуллов К.Б., Прилипов А.Г., Бурцева Е.И., Щелканов М.Ю., Шляпникова О.В. и др. Обнаружение аминокислотных замен аспарагиновой кислоты на глицин и аспарагин в рецепторсвязывающем сайте гемагглютини-на в вариантах пандемического вируса гриппа А/H1N1 от больных с летальным исходом и со среднетяжелой формой заболевания. *Вопросы вирусологии.* 2010; 55 (3): 15–9.
10. Соминина А.А., Бурцева Е.И., Лобова Т.Г., Коновалова Н.И., Гудкова Т.М., Литвинова О.М. и др. *Выделение вирусов гриппа в клеточных культурах и куриных эмбрионах и их идентификация. Методические рекомендации.* М.; 2006.
4. Gilca R., De Serres G., Boulianne N., Ouhoumane N., Papenburg J., Douville-Fradet M. et al. Risk factors for hospitalization and severe outcomes of 2009 pandemic H1N1 influenza in Quebec, Canada. *Influenza Other Respir. Viruses.* 2011; 5 (4): 247–55.
5. Laura G.M., Sonja A.R., Denise J.J. 2009 pandemic influenza A (H1N1) in pregnancy: a systematic review of the literature. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2011; 205 (1): 10–8.
6. L'vov D.K., Shchelkanov M.Yu., Bovin N.V., Malyshev N.A., Chuchalin A.G., Kolobukhina L.V. et al. Correlation between the receptor specificity of pandemic influenza A (H1N1)pdm09 virus strains isolated in 2009–2011 and the structure of the receptor-binding site and the probability of fatal primary viral pneumonia. *Voprosy virusologii.* 2012; 57 (1): 14–7. (in Russian)
7. L'vov D.K., Yashkulov K.B., Prilipov A.G., Burtseva E.I., Shchelkanov M.Yu., Shlyapnikova O.V. et al. Detection of amino acid substitutions of asparaginic acid for glycine and asparagine at the receptor-binding site of hemagglutinin in the variants of pandemic influenza A/H1N1 virus from patients with fatal outcome and moderate form of the disease. *Voprosy virusologii.* 2010; 55 (3): 15–9. (in Russian)
8. Ruggiero T., Rosa F., Cerutti F., Pagani N., Allice T., Stella M.L. et al. A (H1N1) pdm09 hemagglutinin D222G and D222N variants are frequently harbored by patients requiring extracorporeal membrane oxygenation and advanced respiratory assistance for severe A (H1N1) pdm09 infection. *Influenza Other Respir. Viruses.* 2013; 7 (6): 1416–26.
9. Shinya K., Ebina M., Yamada S., Ono M., Kasai N., Kawakawa Y. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. *Nature.* 2006; 440 (7083): 435–6.
10. Sominina A.A., Burtseva E.I., Lobova T.G., Koновалова N.I., Gudkova T.M., Litvinova O.M. et al. *Virus Isolation on Cell Culture and Chicken Embryos and their Identification. Guidelines [Vydelenie virusov grippa v kletochnykh kul'turakh i kurinykh embrionakh i ikh identifikatsiya. Metodicheskie rekomendatsii].* Moscow; 2006. (in Russian)
11. Chunli W., Xiaowen C., Xin W., Xing L., Fan Y., Tao L. et al. Clinical and molecular characteristics of the 2009 pandemic influenza H1N1 infection with severe or fatal disease from 2009 to 2011 in Shenzhen, China. *J. Med. Virol.* 2013; 85 (3): 405–12.
12. Zehender G., Pariani E., Piralla A., Lai A., Gabanelli E., Rangihero A. et al. Reconstruction of the evolutionary dynamics of the A (H1N1) pdm09 influenza virus in Italy during the pandemic and post-pandemic phases. *PLoS One.* 2012; 7 (11): e47517.
13. Kong W., Liu L., Wang Y., Gao H., Wei K., Sun H. et al. Hemagglutinin mutation D222N of the 2009 pandemic H1N1 influenza virus alters receptor specificity without affecting virulence in mice. *Virus Res.* 2014; 189: 79–86.
14. Zhang W., Shi Y., Qi J., Gao F., Li Q., Fan Z. et al. Molecular basis of the receptor binding specificity switch of the hemagglutinins from both the 1918 and 2009 pandemic influenza A viruses by a D225G substitution. *J. Virol.* 2013; 87 (10): 5949–58.
15. Chutinimitkul S., Herfst S., Steel J., Lowen A.C., Ye J., van Riel D. et al. Virulence-associated substitution D222G in the hemagglutinin of 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus affects receptor binding. *J. Virol.* 2010; 84 (22): 11 802–13.
16. Chen Z., Wang W., Zhou H., Suguitan A.L., Shambaugh C., Kim L. et al. Generation of live attenuated novel influenza virus A/California/7/09 (H1N1) vaccines with high yield in embryonated chicken eggs. *J. Virol.* 2009; 84 (1): 44–51.
17. Kilander A., Rykkvin R., Dudman S.G., Hungnes O. Observed association between the HA1 mutation D222G in the 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus and severe clinical outcome, Norway 2009–2010. *Euro Surveill.* 2010; 15 (9): pii: 19498.
18. Wedde M., Wählisch S., Wolff T., Schweiger B. Predominance of HA-222D/G polymorphism in influenza A (H1N1)pdm09 viruses associated with fatal and severe outcomes recently circulating in Germany. *PLoS One.* 2013; 8 (2): e57059.

Поступила 15.01.16

Принята в печать 26.01.16

Мальдов Д.Г.<sup>1</sup>, Андронова В.Л.<sup>2</sup>, Балакина А.А.<sup>3</sup>, Ильичев А.В.<sup>1</sup>, Галегов Г.А.<sup>1</sup>

## ВЛИЯНИЕ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕГО ПРЕПАРАТА СТИМФОРТЕ НА ГУМОРАЛЬНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГЕРПЕСВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

<sup>1</sup>ЗАО «СКАЙ ЛТД», 129301, г. Москва; <sup>2</sup>Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалея» Минздрава России, 123098, г. Москва; <sup>3</sup>ФГБУ «Институт проблем химической физики» РАН, 142432, Московская область

При изучении иммуномодулирующего препарата Стимфорте на модели герпесвирусной инфекции мышей BALB/c было установлено, что сыворотки мышей, получавших препарат, на 4-й и 7-й день после инфицирования, по данным дот-блот-анализа, обладали в 3 раза большей способностью специфично связываться с культуральным вирусом простого герпеса 1-го типа (ВПГ-1) (в культуре клеток Vero) по сравнению с сыворотками контрольной группы зараженных мышей, полученными в те же сроки. Показано также, что эти сыворотки имели в 5 раз более высокий индекс нейтрализации. На основании вестерн-блота установлено, что антитела из сывороток мышей, получавших Стимфорте, значительно лучше связывались с gB- и gC-гликопротеинами ВПГ-1. Таким образом, Стимфорте как один из самых сильнодействующих на иммунную память препаратов может применяться для лечения хронических вирусных заболеваний.

Ключевые слова: *Стимфорте; вирус простого герпеса; иммуностимулятор; гуморальный ответ; подавление репликации вируса.*

*Для цитирования:* Мальдов Д.Г., Андронова В.Л., Балакина А.А., Ильичев А.В., Галегов Г.А. Влияние иммуномодулирующего препарата стимфорте на гуморальный иммунный ответ при экспериментальной герпесвирусной инфекции. *Вопросы вирусологии.* 2016; 61 (4): 172-175. DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-4-172-175

Maldov D.G.<sup>1</sup>, Andronova V.L.<sup>2</sup>, Balakina A.A.<sup>3</sup>, Ilyichev A.V.<sup>1</sup>, Galegov G.A.<sup>2</sup>

## INFLUENCE OF THE IMMUNOMODULATORY DRUG STIMFORTE ON THE HUMORAL IMMUNE RESPONSE IN THE EXPERIMENTAL HERPES VIRUS INFECTION

<sup>1</sup>ZAO «SKY LTD», Moscow, 129301, Russian Federation; <sup>2</sup>D.I. Ivanovsky Institute of Virology «Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation; <sup>3</sup>Institute of Problems of Chemical Physics, Moscow region, 142432, Russian Federation

In the study of the immunostimulation preparation Stimforte activity using the model of the experimental herpes virus infection BALB/c, mice has shown that sera from mice treated with the drug on the 4th and 7th day after infection possessed a 3 times greater capability of specifically binding to the culture of HSV-1 (on cells Vero) according to dot blot analysis, as compared with intact infected mice sera obtained at the same time. It was also shown that these sera had a 5 times higher index of neutralization. On the basis of Western blots, it was detected that antibodies from sera of mice treated with Stimforte contacted the glycoproteins gB and gC of HSV-1 significantly better. Thus, Stimforte stimulates one of the strongest modulatory effects on the immune memory and is a promising drug for the treatment of chronic viral diseases.

Keywords: *Stimforte; herpes simplex virus; immunostimulator; humoral response; inhibition of viral replication.*

*For citation:* Maldov D.G., Andronova V.L., Balakina A.A., Ilyichev A.V., Galegov G.A. Influence of the immunomodulatory drug stimforte on the humoral immune response in the experimental herpes virus infection. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal).* 2016; 61(4):172-175. (In Russ.).

DOI 10.18821/0507-4088-2016-61-4-172-175

*For correspondence:* Dmitry G. Maldov, Candidate of Biological Sciences ZAO «SKY LTD», Moscow, 129301, Russia Federation, E-mail: maldov-dv@yandex.ru

### Information about authors:

Maldov D.G., <http://orcid.org/0000-0002-8214-0538>

Andronova V.L., <http://orcid.org/0000-0002-2467-0282>

Balakina A.A., <http://orcid.org/0000-0002-5952-9211>

Ilyichev A.V., <http://orcid.org/0000-0003-4675-0766>

Galegov G.A., <http://orcid.org/0000-0001-6162-1650>

**Funding.** The study had no sponsorship.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 07 August 2015

Accepted 19 November 2015

## Введение

Вирусы простого герпеса 1-го и 2-го типов (ВПГ-1 и ВПГ-2) характеризуются чрезвычайно широким распространением в человеческой популяции – до 90% населения земного шара серопозитивны к ВПГ-1, ВПГ-2 или

обоим вирусам одновременно [1]. После первичного инфицирования ВПГ устанавливает пожизненную латентную инфекцию с периодическими рецидивами заболевания [2].

Наиболее перспективным путем предотвращения ре-

*Для корреспонденции:* Мальдов Дмитрий Григорьевич, канд. биол. наук, зав. лаб. фармакологии департамента высоких технологий ЗАО «СКАЙ ЛТД», 129301, г. Москва, E-mail: maldov-dv@yandex.ru

цидива инфекции и быстрого его купирования может являться создание пула высокоспецифичных антител, способных подавить продукцию вируса. При отсутствии выработки достаточного количества авидных антител или недостаточно быстром их появлении целесообразно стимулировать их продукцию и формирование клеток иммунной памяти в процессе первичного иммунного ответа с помощью препаратов – иммуномодуляторов. Одним из таких препаратов является Стимфорте [3]. Содержащиеся в препарате низкомолекулярные гликозаминогликаны [4], вероятно, и являются тем действующим началом, которое способствует более сильному и быстрому иммунному ответу при воспалении [5, 6] и активации образования антител у экспериментальных животных, что показано для таких гликозаминогликанов, как гиалуроновая кислота и гепараны [7, 8], входящих в состав Стимфорте [4, 9].

В данной работе изучается возможность стимуляции образования специфических антител, блокирующих развитие герпесвирусной инфекции, препаратом Стимфорте при экспериментальной инфекции ВПГ-1 у мышей.

### Материал и методы

**Клетки.** В работе использовали культуру клеток почек зеленой маргышки Vero E6.

**Вирус.** Эталонный штамм вируса простого герпеса 1-го типа (ВПГ-1/L<sub>2</sub>) получен из Государственной коллекции Института вирусологии им. Д.И. Ивановского.

**Животные.** В исследовании использовали самцов белых линейных мышей BALB/c массой тела 12 г по 4 животных в группе. Инфекционный материал вводили внутрибрюшинно в дозе  $3,0 \cdot 10^4$  БОЕ/0,2 мл/мышь. Животные были получены из питомника Научного центра биомедицинских технологий ФМБА, филиал «Столбовая» (Московская область, Чеховский район, пос. Столбовая). Животные были здоровы, имели ветеринарный сертификат качества и состояния здоровья. Все процедуры на животных выполняли строго в соответствии с требованиями, изложенными в «Правилах проведения работ с использованием экспериментальных животных» за № 755 от 12.08.1977.

**Препарат Стимфорте** (ЗАО «СКАЙ ЛТД») в разовой дозе 100 мг/мышь вводили внутрибрюшинно в объеме 0,2 мл двукратно: первое введение через 2 ч после заражения животных, затем вторично через 48 ч.

**Инфекционный титр** вируса определяли методом бляшкообразования [5].

**Сыворотку крови животных** получали стандартным методом на 4-й и 7-й дни после заражения. Контрольная группа – здоровые мыши, которым двукратно вводили физиологический раствор. Сыворотки каждой мыши тестировали отдельно в реакции нейтрализации и параллельно в вестерн-блоте и дот-блоте.

**При постановке реакции нейтрализации** сыворотку разводили с кратностью 2. Для разведения использовали среду поддержки. Вирус и сыворотку соединяли в объемных соотношениях 1:1, выдерживали полученную смесь в течение 1 ч при 37°C и использовали для заражения клеточных культур.

**Дот-блот реакция.** Разведения каждого образца сыворотки в 1X TBS-твин-буфере («Sigma Chemical Co.») готовили с кратностью 100, 300 и 1000. Монослойные культуры клеток Vero E6 инфицировали ВПГ-1 с множественностью 0,1 БОЕ/кл и инкубировали в течение 48 ч, когда вирусиндуцированный цитопатический эффект полностью поражал весь клеточный монослой. В качестве контроля использовали неинфицированную культуру

клеток, инкубированную в тех же условиях. Полученный материал (инфицированные (опыт) и неинфицированные (контроль) клетки) после трехкратного замораживания – оттаивания центрифугировали (5000 об/мин в течение 5 мин). Титр вируса в супернатанте составил  $5 \cdot 10^8$  БОЕ/мл. Опытные образцы с титром  $5 \cdot 10^6$  и  $5 \cdot 10^8$  БОЕ/мл наносили на фильтры Hybond PVDF («Amersham GE Healthcare», США) в объеме 3 мкл. Контрольный образец (неинфицированная культура) наносился в тех же разведениях по белку (2 мг/мл), что и зараженная ВПГ-1 культура. Фильтры высушивали и помещали в буфер 100 mM Tris HCl (pH 7,5) + 20% метанол на 2 ч. Затем фильтры промывали в деионизированной воде и помещали в блокирующий буфер TBS + твин-20 + BSA на 15 мин. Полученный таким образом материал переносили в разведения сыворотки (по одной параллели в каждое разведение) на 15 ч при комнатной температуре. Отмывку, инкубацию с вторичными антителами к мышинным иммуноглобулинам («Santa Cruz Biotechnology») и проявление проводили, как описано ранее [10].

**Вестерн-блот** выполняли по описанной ранее методике [10]. В качестве первичных антител использовали сыворотки «B4 – 4-й день Вирус», «BC4 – 4-й день Ви-

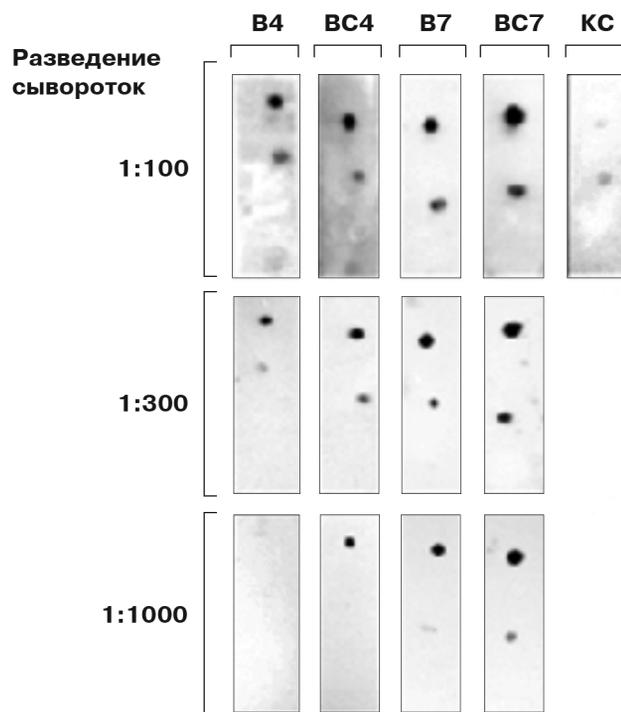


Рис. 1. Дот-блот-анализ сывороток мышей, зараженных ВПГ-1 и леченных Стимфорте.

Для дот-блот-анализа использовали культуральный вирус с исходным титром  $10^6$  БОЕ/мл (пятно в центре каждого фильтра) и  $10^8$  БОЕ/мл (пятно в верхней части каждого фильтра). В качестве контроля использовали клетки Vero E6, выращенные и инкубированные в тех же условиях, что и культура-продукент, и в тех же количествах (по белку), – пятно в нижней части каждого фильтра. Объем нанесения 3 мкл/пятно.

KC – сыворотка неинфицированных животных; B4 – сыворотка животных через 4 сут после инфицирования. Здесь и на рис. 2: BC4 – сыворотка животных, получавших Стимфорте, через 4 сут после инфицирования; B7 – сыворотка через 7 сут после инфицирования; BC7 – сыворотка животных, получавших Стимфорте, через 7 сут после инфицирования.

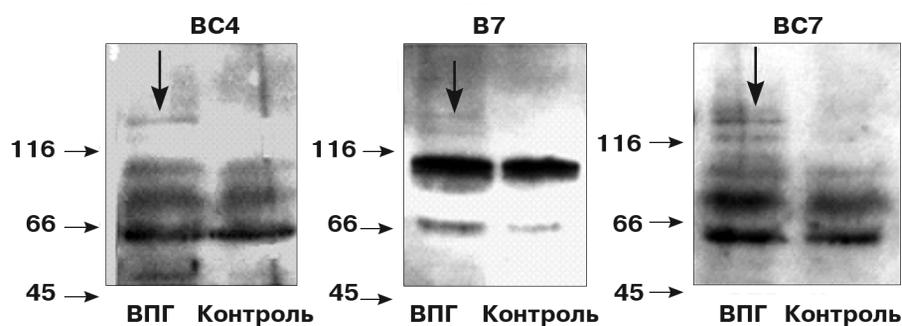


Рис. 2. Вестерн-блот-анализ сывороток мышей, зараженных ВПГ-1 и леченных Стимфорте.

Для вестерн-блот-анализа использовали культуру клеток Vero E6 с титром ВПГ-1  $10^8$  БОЕ (внизу). В качестве контроля использовали клетки Vero, выращенные и инкубированные в тех же условиях, – Контроль (внизу). Слева от блотов обозначены мол. массы метчиков. Стрелкой обозначены белки, присутствующие только в зараженной культуре.

рус + Стимфорте», «B7 – 7-й день Вирус» и «BC7 – 7-й день Вирус + Стимфорте» в разведении 1:100.

### Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлен дот-блот-анализ мышинных сывороток, полученных на 4-е сутки инфекции, когда впервые появляются антитела к ВПГ в детектируемых количествах, и на 7-е сутки, когда антигенный ответ достигает максимального значения. Кроме того, для контроля использовали нормальную сыворотку неинфицированных животных (КС – контроль сыворотки).

Видно, что КС не связывает ни зараженный, ни незараженный материал. Следовательно, связывание, обнаруженное в остальных образцах, специфическое. Пятно из незараженной культуры также визуально не обнаруживается на блоте. На фильтре, обработанном сывороткой В4, полученной на 4-й день после заражения животных, при количестве вируса  $1,5 \cdot 10^4$  БОЕ/проба пятно отчетливо видно при разведении сыворотки в 100 и 300 раз и едва различимы при разведении сыворотки в 1000 раз. При увеличении количества вируса до  $1,5 \cdot 10^6$  БОЕ/проба пятно видно и при разведении в 1000 раз. Вид блотов с сывороткой В7 практически неотличим от такового для ВС4. Самая активная сыворотка – ВС7: при ее разведении в 1000 раз пятно вируса еще видно даже при низкой дозе вируса  $1,5 \cdot 10^4$  БОЕ/проба.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что специфическая иммуногенность сывороток крови мышей, получавших Стимфорте, примерно в 3 раза выше, чем у зараженных, но не леченных животных.

В таблице представлены результаты изучения нейтрализующей активности сывороток крови инфицированных ВПГ-1 мышей, получавших препарат Стимфорте (BC4 и BC7), по сравнению с контрольными сыворотками, полученными из крови инфицированных, но не леченных животных (B4 и B7).

Так как сыворотка крови незараженных животных (КС) может содержать неспецифические антитела, способные повлиять на конечный результат титрования вируса даже в отсутствие специфических антител, в качестве контроля использовали физиологический раствор, а КС – в качестве референс-пробы при определении нейтрализующей активности сывороток крови мышей, инфицированных ВПГ-1. Результаты, приведенные в таблице, показывают, что титр инфекционного материала,

обработанного КС, не отличается существенно от титра вируса, обработанного в тех же условиях физиологическим раствором. Следовательно, нейтрализующую активность сыворотки интактных животных можно признать несущественной.

При титровании сыворотки крови, полученной через 4 сут после инфицирования, установлено, что ее способность нейтрализовать ВПГ-1 значительно выше в группе животных, получавших Стимфорте (группа BC4), по сравнению с B4 (мыши, которые не получали препарат).

Аналогичный результат был получен при изучении нейтрализующей активности сыворотки крови животных, полученной через 7 сут после инфицирования (группы B7

и BC7). Наиболее выраженной способностью нейтрализовать ВПГ-1 обладала сыворотка крови, полученная от леченых животных через 7 сут после инфицирования (группа BC7).

После вычитания величины неспецифической сорбции (сыворотка КС) видно, что индекс нейтрализации сывороток от мышей, получавших Стимфорте, примерно в 5 раз выше, чем у нелеченых животных (0,95 против 4,57 через 4 ч и 5,03 против 27,1 через 7 ч). Это позволяет предположить, что Стимфорте стимулирует выработку антител, значительно увеличивает не только специфичность сывороток, но и их avidность.

Результаты вестерн-блота также указывают на увеличение специфического связывания антител из сывороток крови мышей, получавших Стимфорте. Как видно на рис. 2, на блоттинге с сывороткой BC4 единственный белок, который определяется в пробе зараженных клеток Vero E6, но не определяется в неинфицированных клетках, – это белок с мол. массой 130 кДа. Сывороткой B7 выявляется, кроме этого, еще один полипептид

Влияние препарата Стимфорте на нейтрализующую активность сыворотки крови мышей BALB/c, инфицированных ВПГ-1

Сыворотка	Условия эксперимента	Титр вируса, Ig БОЕ/мл	Индекс нейтрализации
К	Физиологический раствор	4,51±0,03	Нет
КС	Сыворотка крови неинфицированных животных	4,27±0,03	1,74
B4	Сыворотка крови животных через 4 сут после инфицирования	4,08±0,01	2,69
BC4	Сыворотка крови животных, получавших Стимфорте, через 4 сут после инфицирования	3,68±0,03	6,77
B7	Сыворотка крови животных через 7 сут после инфицирования	3,71±0,03	6,31
BC7	Сыворотка крови животных, получавших Стимфорте, через 7 сут после инфицирования	3,05±0,05	28,84

Примечание. Индекс нейтрализации вычисляли как антилогарифм показателя снижения величины инфекционного титра вируса относительно контроля.

с близкой мол. массой 120 кДа, оба слабо проявляются в данной сыворотке. Наконец, оба этих белка очень хорошо видны при использовании ВС7. Белки с 120 и 130 кДа хорошо известны как поверхностные прикрепительные гликопротеины ВПГ-1 – gB и gC соответственно [11]. Они обеспечивают связывание вируса с клеточными рецепторами на наружной мембране клеток. Кроме того, gB является белком слияния и отвечает за проникновение в клетку, а gC (как gE и gI) относится к иммунным белкам «уклонения». Антитела к белку gC являются специфическими для распознавания клеток, зараженных ВПГ, Т-киллерами, и их элиминации [12].

Таким образом, антитела сывороток крови мышей, леченных Стимфорте, более аффинны к вирусспецифическим поверхностным белкам ВПГ-1, раньше специализируются и достигают более высоких нейтрализующих титров, чем сыворотки крови нелеченных животных.

Известно, что первичная инфекция ВПГ протекает тяжелее, чем рецидив [13]. Снижение тяжести клинического течения инфекционного процесса при повторной инфекции, вероятно, обуславливается присутствием специфических антител, быстротой и уровнем специфического гуморального ответа [14]. Так как IgM появляются в крови в течение первых 5 дней после заражения, а IgA и IgG к VP5, gB, gD и gC/gE определяются у большинства пациентов в течение 2 и 3 нед соответственно [15], стимуляция процесса антителообразования может препятствовать распространению вируса с кровью- и лимфотоком и способствовать ускорению клинического разрешения острой инфекции.

Особенно важно при хронических заболеваниях воздействие на иммунную память, так как активированная против определенного генотипа иммунная система очень быстро мобилизуется, причем это касается всей системы адаптивного иммунитета. Одним из путей купирования очередного рецидива может являться быстрая нейтрализация начавшего репродуцироваться вируса. Этим можно объяснить ряд наблюдений при применении Стимфорте в клинике. Так, в ходе клинических испытаний Стимфорте у пациентов с хронической герпесвирусной инфекцией наблюдалось сокращение сроков затухания рецидивов под действием этого препарата [16]. При проведении клинических испытаний Стимфорте при хроническом гепатите В также наблюдалось быстрое купирование рецидивов и снижение количества вирусных антигенов и ДНК в организме пациентов, а также ферментов-маркеров, свидетельствующих о поражении печени [17], а в ходе испытаний Стимфорте против острого гепатита В отмечено полное отсутствие хронизации заболевания у 50 пациентов [18].

**Финансирование.** Работа выполнена без дополнительной финансовой поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 2, 5–8, 11–15 см. REFERENCES)

3. Мальдов Д.Г., Чирвон Е.А., Ильичев А.В., Бабаян С.С. Активация препаратом «Стимфорте» моноцитов и макрофагов. *Иммунология*. 2011; (5): 105–12.
4. Мальдов Д.Г., Григорян С.С., Муругин В., Ильичев А.В., Чубарова Г.Д., Бельков А.П. Гликозаминогликаны в составе Стимфорте. *Фармация*. 2014; (8): 27–31.
9. Мальдов Д.Г., Муругин В., Ильичев А.В., Чубарова Г.Д., Иванова Н.Е., Бельков А.П. Гиалуроновая кислота в составе Стимфорте. *Фармация*. 2013; (4): 40–3.

10. Ступина Т.С., Пархоменко И.И., Балалаева И.В., Костюк Г.В., Санина Н.А., Терентьев А. А. Цитотоксические свойства нитрозильного комплекса железа с фенилтиолом. *Известия Академии наук. Серия химическая*. 2011; (7): 1464–9.
16. Зуйкова И.Н., Шульженко А.Е., Мальдов Д.Г., Ильичев А.В., Пинегин Б.В. Применение препарата «Стимфорте» в комплексной терапии рецидивирующей герпес-вирусной инфекции. *Герпес*. 2009; (2): 30–6.
17. Погорельская Л.В., Хлопова И.Н., Григорян С.С., Трякина И.П., Рик Н.А., Мальдов Д.Г. Перспективы использования «Стимфорте» при хроническом гепатите В. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2013; (5): 15–20.
18. Погорельская Л.В., Хлопова И.Н., Григорян С.С., Трякина И.П., Рик Н.А., Мальдов Д.Г. Клинико-иммунологическая и вирусологическая оценка препарата «Стимфорте» при остром гепатите В. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2013; (3): 14–8.

#### REFERENCES

1. Díaz-Ramón J.L., DÍaz-Pérez J.L. Skin diseases with high public health impact. Herpes simplex and zoster. *Eur. J. Dermatol.* 2008; 18 (1): 108–11.
2. Pereira F.A. Herpes simplex: evolving concepts. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1996; 35 (4): 503–20.
3. Mal'dov D.G., Chirvon E.A., Il'ichev A.V., Babayan S.S. Monocytes and macrophages are activated by «Stimforte» medicine. *Immunologiya*. 2011; (5): 105–12. (in Russian)
4. Mal'dov D.G., Grigoryan S.S., Murugin V., Il'ichev A.V., Chubarova G.D., Bel'kov A.P. Glycosaminoglycans composed Stimforte. *Farmatsiya*. 2014; (8): 27–31. (in Russian)
5. Akbarshahi H., Axelsson J.B., Said K., Malmström A., Fischer H., Andersson R. TLR4 dependent 1galisulphate-induced pancreatic inflammatory response is IRF3-mediated. *J. Transl. Med.* 2011; 9: 219.
6. Kumar S., Iyer S., Bauer H., Coenen M., Bahn R.S. A stimulatory thyrotropin receptor antibody enhances hyaluronic acid synthesis in graves' orbital fibroblasts: inhibition by an IGF-I receptor blocking antibody. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2012; 97 (5): 1681–7.
7. Ma L., Qiao H., He C., Yang Q., Cheung C.H., Kanwar J.R. et al. Modulating the interaction of CXCR4 and CXCL12 by low-molecular-weight heparin inhibits hepatic metastasis of colon cancer. *Invest. New Drugs*. 2012; 30 (2): 508–17.
8. Scott R.A., Panitch A. Glycosaminoglycans in biomedicine. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 2013; 5 (4): 388–98.
9. Mal'dov D.G., Murugin V., Il'ichev A.V., Chubarova G.D., Ivanova N.E., Bel'kov A.P. The hyaluronic acid in the Stimforte composition. *Farmatsiya*. 2013; (4): 40–3. (in Russian)
10. Stupina T.S., Parkhomenko I.I., Balalaeva I.V., Kostyuk G.V., Sanina N.A., Terent'ev A. A. Cytotoxic properties of nitrosyl iron complex with fenitil. *Izvestiya Akademii nauk. Seriya khimicheskaya*. 2011; (7): 1464–9. (in Russian)
11. Grandi P., Wang S., Schuback D., Krasnykh V., Spear M., Curiel D.T. et al. HSV-1 virions engineered for specific binding to cell surface receptors. *Mol. Ther.* 2004; 9 (3): 419–27.
12. Glorioso J., Kees U., Kumel G., Kirchner H., Krammer P.H. Identification of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) glycoprotein gC as the immunodominant antigen for HSV-1-specific memory cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol.* 1985; 135 (1): 575–82.
13. Kishore J., Misra R., Paisal A., Pradeep Y. Adverse reproductive outcome induced by Parvovirus B19 and TORCH infections in women with high-risk pregnancy. *J. Infect. Dev. Ctries.* 2011; 5 (12): 868–73.
14. Stanberry L.R., Cunningham A.L., Mindel A., Scott L.L., Spruance S.L., Aoki F.Y. et al. Prospects for control of herpes simplex virus disease through immunization. *Clin. Infect. Dis.* 2000; 30 (3): 549–66.
15. Ashley R.L., Corey L., Dalessio J., Wilson P., Remington M., Barnum G. et al. Protein-specific cervical antibody responses to primary genital herpes simplex virus type 2 infections. *J. Infect. Dis.* 1994; 170 (1): 20–6.
16. Zuykova I.N., Shul'zhenko A.E., Mal'dov D.G., Il'ichev A.V., Pinegin B.V. Use of the drug «Stimforte» in the complex treatment of recurrent herpes virus infection. *Herpes*. 2009; (2): 30–6. (in Russian)
17. Pogorel'skaya L.V., Khlopova I.N., Grigoryan S.S., Ttryakina I.P., Rik N.A., Mal'dov D.G. Prospects for the use «Stimforte» in chronic hepatitis B. *Epidemiologiya i infektzionnye bolezni*. 2013; (5): 15–20. (in Russian)
18. Pogorel'skaya L.V., Khlopova I.N., Grigoryan S.S., Ttryakina I.P., Rik N.A., Mal'dov D.G. Clinical, immunological and virological assessment of the drug «Stimforte» acute hepatitis B. *Epidemiologiya i infektzionnye bolezni*. 2013; (3): 14–8. (in Russian)

Корзая Л.И.<sup>1</sup>, Кебурия В.В.<sup>1</sup>, Догадов Д.И.<sup>1</sup>, Лапин Б.А.<sup>1</sup>, Кюрегян К.К.<sup>2</sup>, Михайлов М.И.<sup>2</sup>

## МАРКЕРЫ ГЕПАТИТА Е У НАСЕЛЕНИЯ БОЛЬШОГО СОЧИ И ОБЕЗЬЯН АДЛЕРСКОГО ПРИМАТОЛОГИЧЕСКОГО ЦЕНТРА

<sup>1</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии», 354376, г. Сочи; <sup>2</sup>ФГБНУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова», 142782, г. Москва

Методом иммуноферментного анализа исследованы сыворотки от людей ( $n = 646$ ) и обезьян ( $n = 1867$ ), собранные в период 1999–2013 гг. Всего проверено 2478 сывороток. Антитела к вирусу гепатита Е (анти-ВГЕ) IgG обнаруживали достоверно чаще ( $p \geq 0,001$ ) у макак резусов (*Macaca mulatta*) –  $45,1 \pm 1,6\%$  ( $n = 1001$ ), чем у макак яванских (*M. fascicularis*) –  $16,2 \pm 1,8\%$  ( $n = 426$ ). Единичные серопозитивные особи встречались среди макак лапундеров (*M. nemestrina*) –  $4,0 \pm 2,8\%$  ( $n = 50$ ). Анти-ВГЕ не обнаруживали в сыворотках зеленых мартышек (*Chlorocebus aethiops*) ( $n = 162$ ), павианов гамадрилов (*Papio hamadryas*) ( $n = 124$ ) и павианов анубисов (*Papio anubis*) ( $n = 104$ ). Важен факт присутствия анти-ВГЕ IgM, свидетельствующих о «свежей» инфекции, у макак резусов –  $2,1 \pm 0,5\%$  ( $n = 717$ ) и макак яванских –  $3,5 \pm 1,3\%$  ( $n = 266$ ). Общая частота обнаружения анти-ВГЕ IgG среди сотрудников приматологического центра  $6,8 \pm 2,3\%$  ( $n = 118$ ) оказалась значительно ниже ( $p \leq 0,001$ ), чем среди населения Большого Сочи –  $15,9 \pm 1,6\%$  ( $n = 528$ ). Важно, что только у пациентов лечебно-профилактических учреждений (поликлиника, больница, онкологический диспансер) наряду с анти-ВГЕ IgG ( $15\text{--}23,5\%$ ) обнаруживали и анти-ВГЕ IgM ( $2,7\text{--}11,8\%$ ), что указывает на наличие острых случаев ВГЕ-инфекции среди этой категории населения. РНК ВГЕ не обнаружена в сыворотках анти-ВГЕ IgM-позитивных людей и обезьян. Сероэпидемиологические данные не подтверждают предположение о способности серопозитивных обезьян рода макак быть естественным резервуаром ВГЕ-инфекции для человека.

Ключевые слова: анти-ВГЕ (IgG и IgM); РНК ВГЕ; население; обезьяны Старого Света.

Для цитирования: Корзая Л.И., Кебурия В.В., Догадов Д.И., Лапин Б.А., Кюрегян К.К., Михайлов М.И. Маркеры гепатита Е у населения Большого Сочи и обезьян Адлерского приматологического центра. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61 (4): 176-180.

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-4-176-180

## Korzaia L.I.<sup>1</sup>, Keburia V.V.<sup>1</sup>, Dogadov D.I.<sup>1</sup>, Lapin B.A.<sup>1</sup>, Kyuregyan K.K.<sup>2</sup>, Mikhailov M.I.<sup>2</sup> MARKERS OF HEPATITIS E AMONG THE POPULATION OF THE GREATER SOCHI AND IN MONKEYS OF THE ADLER PRIMATE CENTER

<sup>1</sup> Research Institute of Medical Primatology, Sochi, 354376, Russian Federation; <sup>2</sup> Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalites, Moscow, 142782, Russian Federation

Serum from humans ( $n = 646$ ) and monkeys ( $n = 1867$ ) collected during the period 1999-2013 was tested by enzyme immunoassay. Anti-HEV IgG was detected significantly more frequently ( $P \geq 0.001$ ) in rhesus macaques (*Macaca mulatta*) –  $45.1 \pm 1.6\%$  ( $n = 1001$ ) than in cynomolgus macaques (*M. fascicularis*)  $16.2 \pm 1.8\%$  ( $n = 426$ ). Single seropositive individuals were found among *M. nemestrina* –  $4.0 \pm 2.8\%$  ( $n = 50$ ). Anti-HEV was not detected in the sera of green monkeys (*Chlorocebus aethiops*) –  $n = 162$ , *Papio hamadryas* ( $n = 124$ ), and *Papio anubis* –  $n = 104$ . The presence of the anti-HEV IgM indicating the cases of fresh infection in *Macaca mulatta* –  $2.1 \pm 0.5\%$  ( $n = 717$ ) and *M. fascicularis* –  $3.5 \pm 1.3\%$  ( $n = 266$ ) is of great significance. The overall frequency of detection of the anti-HEV IgG among the staff of the Adler Primate Center –  $6.8 \pm 2.3\%$  ( $n = 118$ ) was significantly lower ( $P \leq 0.001$ ) than among the population of the Greater Sochi –  $15.9\% \pm 1.6$  ( $n = 528$ ). It is important that only in patients of medical institutions (clinic, hospital, cancer center), anti-HEV IgM were detected ( $2.7\text{--}11.8\%$ ) along with anti-HEV IgG ( $15\text{--}23.5\%$ ), thereby indicating the presence of acute cases of HEV infection among this population.

HEV RNA was not detected in the serum of anti-HEV IgM-positive people and monkeys.

Seroepidemiological data do not confirm the assumption on the ability of seropositive monkeys of *Macaca* genus to be a natural reservoir of HEV infection for humans.

Key words: anti-HEV (IgG and IgM), HEV RNA, population, Old World monkeys

For citation: Korzaia L.I., Keburia V.V., Dogadov D.I., Lapin B.A., Kyuregyan K.K., Mikhailov M.I. Markers of hepatitis E among the population of the Greater Sochi and in monkeys of the Adler primate center. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2016; 61(4): 176-180. (In Russ.).

DOI 10.18821/0507-4088-2016-61-4-176-180

For correspondence: Lidia I. Korzaia, MD, PhD, DSc Research Institute of Medical Primatology, Sochi, 354376, Russian Federation, E-mail: likorzaya@rambler.ru

Funding. The work was partially supported by grant RFBR № 06-04-96794 r\_South\_a.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 13 July 2015  
Accepted 19 November 2015

Гепатит E (ГЕ) – зоонозное заболевание, вызываемое РНК-содержащим вирусом семейства *Hepeviridae* рода *Hepevirus*.

В настоящее время большое внимание исследователей направлено на поиск резервуара инфекции, вызванной вирусом гепатита E (ВГЕ) в природе. Это связано с частым обнаружением антител к вирусу (анти-ВГЕ) среди населения неэндемичных по ГЕ регионов мира, в том числе в России [1–7]. Результаты широких сероэпидемиологических и молекулярно-биологических исследований позволили охарактеризовать инфицированность ВГЕ людей и животных в различных странах и составить список животных, которые могут иметь значение в распространении ВГЕ-инфекции в человеческой популяции (свиньи, крысы, куры, дикие кабаны, олени, кролики, летучие мыши, хорьки) [1, 4, 8, 10]. Известно также, что 1-й и 2-й генотипы ВГЕ выделены только от человека, а 3-й и 4-й – от людей и животных [8]. Наибольшее число работ подтверждает эпидемиологическое значение свиней в распространении ГЕ (3-й генотип).

Актуальность работы связана с необходимостью выяснения вопроса о способности обезьян рода макак быть естественным резервуаром ВГЕ-инфекции, поскольку среди них выявлена значительная частота распространения анти-ВГЕ IgG [9–15].

Ранее нами были опубликованы данные об обнаружении анти-ВГЕ (IgG и IgM) у макак резусов и яванских макак Адлерского приматологического центра, а также анти-ВГЕ (IgG) у нескольких сотрудников по уходу за обезьянами [5], что позволило предположить возможность передачи ВГЕ-инфекции от обезьян к человеку.

Целью настоящего исследования являлось проведение широкого сероэпидемиологического обследования на гепатит E не только обезьян, но и населения окружающего региона (Большой Сочи). Это позволило бы оценить эпидемическую ситуацию на юге России в условиях усилившихся процессов миграции населения, а также выяснить, являются ли обезьяны источником ВГЕ-инфекции для человека.

### Материал и методы

Серологическое обследование людей и обезьян проводили с использованием сывороток, собранных в 1999–2013 гг. Всего исследовано 2513 сывороток, в том числе 646 от людей и 1867 от обезьян.

*Сыворотки от человека.* Исследовано 646 сывороток от населения Большого Сочи (жителей города и сельских округов). Проверено 118 сывороток от сотрудников НИИ медицинской приматологии (Адлер и Адлерский район), 29 сывороток от студентов Сочинского института Российского университета дружбы народов (Адлер), 63 сыворотки от сотрудников учебно-воспитательных учреждений (Адлерский район), 300 сывороток от пациентов городской поликлиники № 2 (Адлер), 17 сывороток от пациентов Адлерской районной больницы № 6, 119 сывороток от пациентов онкологического диспансера г. Сочи, обслуживающего все его районы, а также Туапсе и Туапсинский район. Возраст обследуемых лиц варьировал от 18 до 65 лет.

*Сыворотки от обезьян.* Исследованы сыворотки от 1867 обезьян, в том числе 1001 от макак резусов (*Macaca mulatta*), 426 – от макак яванских (*M. fascicularis*), 50 – от макак лапундеров (*M. nemestrina*), 162 – от зеленых мартышек (*Chlorocebus aethiops*), 124 – от павианов гамадрилов (*Papio hamadryas*), 104 – от павианов ану-

сов (*Papio anubis*). Возраст животных варьировал от 1 года до 25 лет. Все обезьяны были рождены в питомнике либо длительное время содержались в неволе после перемещения их из мест естественного обитания.

*Определение антител к ВГЕ (анти-ВГЕ).* Использовали коммерческие иммуноферментные диагностические тест-системы ДС-ИФА-АНТИ-НЕV-G и ДС-ИФА-АНТИ-НЕV-M производства НПО «Диагностические системы» (Нижний Новгород).

Результаты иммуноферментного анализа (ИФА) учитывали на спектрофотометрах Униплан отечественного производства и Immunochem-2100 производства «High Technology Inc.», США, с использованием фильтра с длиной волны 450 нм. Реактивность сывороток в отношении ВГЕ оценивали по значениям ОП450 (оптическая плотность исследуемых образцов сывороток при длине волны 450 нм в ИФА).

*Выявление РНК ВГЕ* проводили методом обратнотранскриптазной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) с использованием тест-системы GenePak TM RNA PCR test для обнаружения ВГЕ (ООО «Биоком», Москва). Детекцию ПЦР-продукта выполняли электрофорезом в агарозном геле.

Кроме того, часть образцов были исследованы в ФГБНУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова» в лаборатории этиологии, диагностики, эпидемиологии и профилактики вирусных гепатитов. РНК ВГЕ обнаруживали с использованием специфических праймеров по описанной методике [16].

*Статистическую обработку результатов* проводили с определением средней арифметической ( $M$ ) и стандартной ошибки ( $m$ ). Достоверность различий между явлениями оценивали с помощью  $t$ -критерия Стьюдента. Расчет показателей осуществляли по формулам с использованием программы Microsoft Office Excel 2007. Достоверными считали различия при  $p \leq 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Общая частота распространения анти-ВГЕ среди обезьян Адлерского приматологического центра представлена в табл. 1. Анти-ВГЕ IgG обнаруживали достоверно чаще ( $p \geq 0,001$ ) у макак резусов (45,1±1,6%), чем у макак яванских (16,2±1,8%). Единичные серопозитивные особи встречались среди макак лапундеров (4,0%). Анти-ВГЕ не обнаруживали в сыворотках павианов гамадрилов и павианов анубисов. Важен факт присутствия анти-ВГЕ IgM, свидетельствующих о «свежей» инфекции, у макак резусов (2,1±0,5%) и макак яванских (3,5±1,3%). Реактивность таких сывороток варьировала от 0,389 до 1,200 ОП450. Возраст серопозитивных обезьян составил 1–24 года. Как правило, такие животные содержались преимущественно по 2–3 особи в вольере. Следует отметить, что 11 (55,0%) из 20 сывороток макак содержали как анти-ВГЕ IgM, так и анти-ВГЕ IgG, а 9 (45,0%) из 20 сывороток – только анти-ВГЕ IgM.

Была изучена динамика выявления анти-ВГЕ IgG и анти-ВГЕ IgM среди макак резусов и макак яванских за период с 1999 по 2013 г. (см. рисунок).

Следует отметить, что среди макак резусов при общей частоте распространения анти-ВГЕ Ig 45,1±1,6% отмечено наибольшее число позитивных к ВГЕ животных в 1999–2001 гг. – 53,9±3,6% ( $n = 193$ ) и в 2002–2004 гг. – 55,6±3,2% ( $n = 248$ ). Обращает на себя внимание достоверное снижение ( $p \leq 0,05$ ) уровня серопозитивности к ВГЕ среди макак резусов, обследованных в 2005–2013 гг.,

Таблица 1

Частота обнаружения анти-ВГЕ (IgG и IgM) в сыворотках обезьян различных видов

Вид обезьян	Анти-ВГЕ	
	IgG	IgM
Макаки резусы ( <i>Macaca mulatta</i> )	451/1001* (45,1±1,6)	15/717 (2,1±0,5)
Макаки яванские ( <i>M. fascicularis</i> )	69/426 (16,2±1,8)	12/266 (3,5±1,3)
Макаки лапундеры ( <i>M. nemestrina</i> )	2/50 (4,0±2,8)	0/16 (0)
Зеленые мартышки ( <i>Chlorocebus aethiops</i> )	0/162 (0)	0/18 (0)
Павианы гамадрилы ( <i>Papio hamadryas</i> )	0/124 (0)	0/7 (0)
Павианы анубисы ( <i>Papio anubis</i> )	0/104 (0)	0/8 (0)

Примечание. Здесь и в табл. 2: \* – число позитивных сывороток/число исследованных (% ± m).

по сравнению с периодом 1999–2004 гг. Так, в 2005–2007 гг. количество серопозитивных животных составило 42,3±2,7% (n = 331), в 2011–2013 гг. – 38,5±4,7% (n = 109), а в 2008–2010 гг. оно было наименьшим – 22,5±3,8% (n = 120).

Среди макак яванских число анти-ВГЕ IgG-позитивных особей варьировало от 10,3±2,9% в 2005–2007 гг. (n = 107) до 23,9±5,2% – в 2008–2010 гг. (n = 67). В остальные периоды число таких животных значительно не различалось: 16,2–17,1%.

Что касается обезьян, содержащих анти-ВГЕ IgM, свидетельствующих о «свежей» инфекции, среди макак резусов этот показатель варьировал от 1,4% (1999–2001) до 5,5% (2011–2013), а среди макак яванских – от 4,5% (1999–2001) до 9,6% (2002–2004).

РНК ВГЕ не была обнаружена в сыворотках (n = 13) и фекалиях (n = 5) серопозитивных по анти-ВГЕ IgM обезьян.

Частота распространения анти-ВГЕ среди населения Большого Сочи (табл. 2). Вопреки нашему предполо-

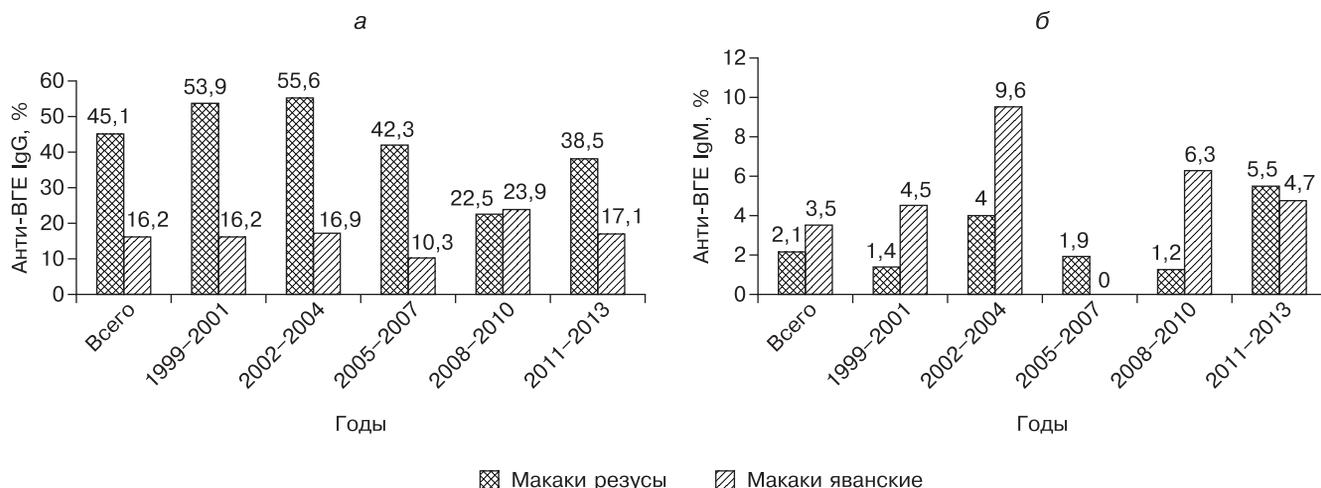
жению, общая частота обнаружения анти-ВГЕ IgG как среди всех сотрудников НИИ медицинской приматологии (6,8%), так и среди обслуживающего персонала питомника (6,3%) оказалась значительно ниже (p ≤ 0,001), чем аналогичный показатель среди населения окружающего региона (15,9%).

Следует отметить, что среди научных сотрудников и лаборантов научных подразделений, которые также имели контакт с обезьянами либо с материалами от них, серопозитивные к ВГЕ лица отсутствовали. Процент анти-ВГЕ IgG-позитивных лиц среди обслуживающего персонала питомника был ниже (1,59; p ≥ 0,1), чем среди сотрудников, не связанных по роду своей деятельности с обезьянами, – административного и технического персонала (6,3±3,1 и 23,5±10,3% соответственно). Возраст содержащих анти-ВГЕ сотрудников варьировал от 22 до 78 лет. Показатели реактивности сывороток в отношении ВГЕ были достаточно высокими. Средняя арифметическая значений ОП450 составила 1,208. Особенно важно отметить, что среди сотрудников НИИ медицинской приматологии отсутствовали лица с анти-ВГЕ IgM – маркером острой инфекции.

При общей частоте распространения анти-ВГЕ IgG (15,9±1,6%) среди взрослого населения Большого Сочи доля серопозитивных лиц колебалась от 6,3 до 23,5% в зависимости от обследуемой группы (см. табл. 2). Наиболее высоким этот показатель был среди пациентов лечебно-профилактических учреждений – Адлерской районной больницы № 6 (23,5±10,3%), пациентов онкологического диспансера г. Сочи (22,7±3,8%) и пациентов городской поликлиники № 2 (15±2,1%). В сыворотках именно этих трех групп населения были обнаружены и анти-ВГЕ IgM (11,8±7,8, 7,6±2,4 и 2,7±1,0% соответственно), свидетельствующие о «свежей» инфекции. Серопозитивные к ВГЕ лица были обнаружены также среди «клинически здоровых» групп населения – студентов СИ РУДН и сотрудников учебно-воспитательных учреждений, однако их доля была ниже (6,9±4,7 и 9,5±3,75% соответственно), при этом анти-ВГЕ IgM отсутствовали.

Получены отрицательные результаты обследования на наличие РНК ВГЕ в сыворотках серопозитивных по анти-ВГЕ IgM пациентов лечебно-профилактических учреждений (n = 20).

Таким образом, в результате проведенной работы на



Частота выявления анти-ВГЕ классов IgG (а) и IgM (б) у макак резусов и макак яванских в различные годы.

Таблица 2

Частота распространения анти-ВГЕ (IgG и IgM) среди населения Сочи

Категория населения	№ группы	Группы обследованных лиц	Анти-ВГЕ	
			IgG	IgM
Сотрудники НИИ медицинской приматологии	1	В с е г о, в том числе:	8/118* (6,8±2,3)	0/108 (0)
	2	Научные сотрудники и лаборанты научных подразделений, имеющие контакт с обезьянами, либо с материалами от них	0/38 (0)	0/38 (0)
	3	Обслуживающий персонал питомника (рабочие по уходу за обезьянами, зоотехники, ветеринарные врачи и фельдшера, работающие с обезьянами)	4/63 (6,3±3,1)	0/55 (0)
	4	Категории сотрудников, не связанные с обезьянами (административный, технический персонал, охрана территории)	4/17 (23,5±10,3)	0/15 (0)
Население окружающего региона	5	В с е г о, в том числе:	84/528 (15,9±1,6)	17/432 (3,9±0,9)
	6	Сотрудники учебно-воспитательных учреждений (декретированный контингент)	6/63 (9,5±3,7)	0/12 (0)
	7	Студенты СИ РУДН	2/29 (6,9±4,7)	0/29 (0)
	8	Пациенты городской поликлиники № 2	45/300 (15±2,1)	7/255 (2,7±1,0)
	9	Пациенты районной больницы № 6	4/17 (23,5±10,3)	2/17 (11,8±7,8)
	10	Пациенты онкологического диспансера г. Сочи	27/119 (22,7±3,8)	8/119 (7,6±2,4)
И т о г о ...			92/646 (14,2±1,4)	17/540 (3,1 ±0,7)

Примечание. Достоверная разница между группами: 1 и 5 ( $t = 3,24; p \leq 0,001$ ); 1 и 8 ( $t = 2,63; p \leq 0,001$ ); 1 и 10 ( $t = 3,58; p \leq 0,001$ ); 3 и 5 ( $t = 2,75; p \leq 0,001$ ); 3 и 8 ( $t = 2,32; p \leq 0,02$ ); 3 и 10 ( $t = 3,34; p \leq 0,001$ ).

большом материале подтверждены данные о серопозитивности к ВГЕ обезьян рода макак (резусы, яванские), которые относятся к животным азиатского происхождения [9–14]. Впервые показано, что обезьяны африканского происхождения – зеленые маргышки и павианы (гамдрилы, анубисы) оказались ВГЕ-серонегативными.

Не выявлена связь между частотой распространения анти-ВГЕ среди обезьян рода макак и лиц, имеющих непосредственный контакт с животными или материалами от них. Сероэпидемиологические данные свидетельствуют о том, что макаки, по-видимому, не являются источником ВГЕ-инфекции для человека, как это было установлено для другого вида животных – свиней [8]. К такому же мнению пришли и другие исследователи [13–15], представив в качестве аргумента факт отсутствия РНК ВГЕ в сыворотках серопозитивных макак.

Впервые охарактеризована инфицированность ВГЕ населения Большого Сочи, которая оказалась значительно выше, чем у обслуживающего персонала питомника обезьян. Это также не подтверждает предположение о способности серопозитивных обезьян рода макак быть естественным резервуаром ВГЕ-инфекции.

Факт обнаружения анти-ВГЕ IgM у пациентов лечебно-профилактических учреждений (больница, поликлиника, онкологический диспансер) указывает на наличие случаев острого ГЕ у лиц со сниженной иммунной реактивностью организма.

Отсутствие РНК ВГЕ в сыворотках анти-ВГЕ IgM-позитивных людей и обезьян, выявленных нами при скрининговом обследовании, связано, по-видимому, с очень коротким периодом вирусемии при бессимптомной ВГЕ-инфекции и малой вероятностью взятия материала в этот период. Вопрос выделения и идентификации штаммов ВГЕ, циркулирующих в человеческой популяции южного региона России и среди обезьян Адлерского приматологического центра, требует специального изучения.

**Финансирование.** Работа частично поддержана грантом РФФИ № 06-04-96794 p\_юг\_a.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (П. П. 1, 8–15)  
СМ. REFERENCES)

- Кузин С.Н., Алаторцева Г.И., Буриев А.Я., Умиров С.Е., Хасанов А.Х. Гольцов В.А. и др. Особенности распространения вируса гепатита Е в эндемичном и неэндемичном регионах. *Вопросы вирусологии.* 2002; 47 (2): 18–21.
- Федорова О.Е., Алаторцева Г.И., Павлов Н.Н., Борзых О.А., Тленкопачев Р.С., Суханова Л.Л. и др. Частота встречаемости антител к вирусу гепатита Е у населения различных климатогеографических зон Российской Федерации. *Вопросы вирусологии.* 2004; 49 (2): 4–7.
- Михайлов М.И., Замятина М.А., Полещук В.Ф. Вирусный гепатит Е. Проблемы изучения. *Вопросы вирусологии.* 2005; 50 (3): 20–2.
- Корзая Л.И., Лапин Б.А., Кебурия В.В., Лазарева И.Я. Частота выявления антител к вирусу гепатита Е у обслуживающего персонала и у макак Адлерского питомника обезьян. *Вопросы вирусологии.* 2007; 52 (1): 36–40.
- Быстрова Т.Н., Полянина А.В., Княгина О.Н. Качественные и количественные параметры эпидемического процесса гепатит Е-инфекции на территории Среднеевропейского региона России. *Мир вирусных гепатитов.* 2010; (1): 15–9.
- Потемкин И.А., Лопаткина М.А., Гаджиева О.А., Прохорова Е.Л., Дьяррассуба А., Исаева О.В. и др. Распространенность маркеров гепатита Е у детей. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2015; (2): 38–46.
- Кюрегян К.К., Михайлов М.И. *Молекулярно-биологические основы контроля вирусных гепатитов.* М.: Издательство Икар; 2013.

REFERENCES

- Balayan M.S. Epidemiology of hepatitis E virus infection. *J. Viral Hepat.* 1997; 4 (3): 155–65.
- Kuzin S.N., Alatorseva G.I., Buriev A.Ya., Umirov S.E., Khasanov A.Kh. Gol'tsov V.A. et al. Propagation of hepatitis E virus in an endemic and nonendemic regions. *Voprosy virusologii.* 2002; 47 (2): 18–21. (in Russian)

- Fedorova O.E., Alatorseva G.I., Pavlov N.N., Borzykh O.A., Tlenkopachev R.S., Sukhanova L.L. et al. Prevalence of antibodies to hepatitis E virus among residents of different climate and geographic zones of Russia Federation. *Voprosy virusologii*. 2004; 49 (2): 4–7. (in Russian)
- Mikhaylov M.I., Zamyatina M.A., Poleshchuk V.F. Viral hepatitis E. Problems of study. *Voprosy virusologii*. 2005; 50 (3): 20–2. (in Russian)
- Korzaya L.I., Lapin B.A., Keburiya V.V., Lazareva I.Ya. Hepatitis E virus antibodies in the macaques and in the personnel serving the macaques of the Adler apery. *Voprosy virusologii*. 2007; 52 (1): 36–40. (in Russian)
- Bystrova T.N., Polyanina A.V., Knyagina O.N. Qualitative and quantitative parameters of epidemic process of hepatitis E infection in the territory of the Central European region of Russia. *Mir virusnykh gepatitov*. 2010; (1): 15–9. (in Russian)
- Potemkin I.A., Lopatkina M.A., Gadzhieva O.A., Prokhorova E.L., D'yarrassuba A., Isaeva O.V. et al. Prevalence of hepatitis E markers in children. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2015; (2): 38–46. (in Russian)
- Meng X.J. Hepatitis E virus: Animal reservoirs and zoonotic risk. *Vet. Microbiol.* 2010; 140 (3–4): 256–65.
- Arankalle V.A., Goverdhan M.K., Banerjee K. Antibodies against hepatitis E virus in Old World monkeys. *J. Viral. Hepat.* 1994; 1 (2): 125–9.
- Purcell R.H., Emerson S.U. Animal models of hepatitis A and E. *ILAR J.* 2001; 42 (2): 161–77.
- Hirano M., Ding X., Tran H.T., Li T.C., Takeda N., Sata T. et al. Prevalence of antibody against Hepatitis E virus in various species of non-human primates: Widespread infection in Japanese monkeys (*Macaca fuscata*). *Jpn. J. Infect. Dis.* 2003; 56 (1): 8–11.
- Yamamoto H., Li T.C., Koshimoto C., Ito K., Kita M., Miyashita N. et al. Serological evidence for hepatitis E virus infection in laboratory monkeys and pigs in animal facilities in Japan. *Exp. Anim.* 2008; 57 (4): 367–76.
- Huang F., Yu W., Hua X., Jing S., Zeng W., He Z. Seroepidemiology and molecular characterization of hepatitis E virus in Macaca mulatta from a village in Yunnan, China, where infection with this virus is endemic. *Hepat. Mon.* 2011; 11 (9): 745–9.
- Dastgerdi E.S., Amini-Bavil-Olyae S. Hepatitis E virus infection in macaca mulatta. *Hepat. Mon.* 2011; 11 (10): 852–3.
- Nakamura S., Tsuchiya H., Okahara N., Nakagawa T., Ohara N., Yamamoto H. et al. Epidemiology of hepatitis E virus in indoor-captive cynomolgus monkey colony. Epidemiology of hepatitis E virus in indoor-captive cynomolgus monkey colony. *J. Vet. Med. Sci.* 2012; 74 (3): 279–83.
- Kyuregyan K.K., Mikhaylov M.I. *Molecular-biological Bases of Control of Viral Hepatitis [Molekulyarno-biologicheskie osnovy kontrolya virusnykh gepatitov]*. Moscow: Izdatel'stvo Ikar; 2013. (in Russian)

Поступила 13.07.15

Принята в печать 19.11.15

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016  
УДК 578.824.11:578.51.083.2

**Щелканов М.Ю.<sup>1,2,13</sup>, Девяткин А.А.<sup>3</sup>, Ананьев В.Ю.<sup>2</sup>, Фролов Е.В.<sup>4</sup>, Домбровская И.Э.<sup>4</sup>, Дедков В.Г.<sup>3</sup>, Ардашев А.В.<sup>2</sup>, Коломеец С.А.<sup>5</sup>, Короткова И.П.<sup>6</sup>, Любченко Е.Н.<sup>6</sup>, Бандеев В.В.<sup>7</sup>, Просяникова М.Н.<sup>2</sup>, Галкина И.В.<sup>1</sup>, Иванушко Е.С.<sup>8</sup>, Емельянова Н.П.<sup>8</sup>, Баранов Н.И.<sup>2</sup>, Ульянова С.А.<sup>2</sup>, Арамилев С.В.<sup>9</sup>, Фоменко П.В.<sup>10</sup>, Суровый А.Л.<sup>11</sup>, Порошин Н.А.<sup>4</sup>, Сокол Н.Н.<sup>4</sup>, Маслов Д.В.<sup>5</sup>, Махиня Е.Е.<sup>12</sup>, Шипулин Г.А.<sup>3</sup>**

## **ИЗОЛЯЦИЯ И СЕКВЕНИРОВАНИЕ ПОЛНОРАЗМЕРНОГО ГЕНОМА ШТАММА ВИРУСА БЕШЕНСТВА, ВЫДЕЛЕННОГО ОТ БУРОГО МЕДВЕДЯ (*URSUS ARCTOS*), НАПАВШЕГО НА ЧЕЛОВЕКА В ПРИМОРСКОМ КРАЕ (НОЯБРЬ 2014 г.)**

<sup>1</sup>ГАОУ ВПО «Дальневосточный федеральный университет», 690091, г. Владивосток; <sup>2</sup>ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Приморском крае», 690091, г. Владивосток; <sup>3</sup>ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, 111123, г. Москва; <sup>4</sup>ФГБУ «Приморская межобластная ветеринарная лаборатория» Россельхознадзора, 692502, г. Уссурийск, Приморский край; <sup>5</sup>Управление Роспотребнадзора по Приморскому краю, 690087, г. Владивосток; <sup>6</sup>Приморская государственная сельскохозяйственная академия, 692510, г. Уссурийск, Приморский край; <sup>7</sup>Хасанская станция по борьбе с болезнями животных, 692701, пос. Славянка, Приморский край; <sup>8</sup>ГБОУ ВПО «Тихоокеанский государственный медицинский университет», 690002, г. Владивосток; <sup>9</sup>Приморский филиал АНО «Центр «Амурский тигр»», 690091, г. Владивосток; <sup>10</sup>Амурский филиал Всемирного фонда дикой природы, 690003, г. Владивосток; <sup>11</sup>Департамент по охране, контролю и регулированию использования объектов животного мира администрации Приморского края, 690091, г. Владивосток; <sup>12</sup>КГБУЗ «Хасанская центральная районная больница», 692701, пос. Славянка, Приморский край; <sup>13</sup>ФГБУН «Биолого-почвенный институт» ДВО РАН, 690022, г. Владивосток

В ноябре 2014 г. в с. Барабаш (Хасанский район Приморского края), расположенном в непосредственной близости к национальному парку «Земля леопарда», произошло нападение бурого медведя (*Ursus arctos*) на человека. Девиантное поведение медведя позволило предположить бешенство, которое было подтверждено после его отстрела с помощью лабораторных методов. Из головного мозга медведя был изолирован штамм RABV/*Ursus arctos*/Russia/Primorye/PO-01/2014 (далее – PO-01). Штамм PO-01 является первым полностью секвенированным дальневосточным штаммом вируса бешенства и может считаться топотипным. PO-01 значительно отличается от вакцинного штамма RV-97 (GeneBank EF542830), на основе которого выпускается живая аттенуированная вакцина, применявшаяся для профилактики бешенства в «Земле леопарда». Вместе с тем иммунодоминантные сайты в белках PO-01 и RV-97 отличаются незначительно, и применение вакцины может быть рекомендовано к продолжению. Анализ генома PO-01 (GeneBank KR997032) выявил его принадлежность к евразийской генетической подгруппе генотипа 1 (уличного бешенства). Таким образом, эта генетическая подгруппа распространяется на восток вплоть до окраины материка. Расширение трансграничных охраняемых территорий России и Китая на Дальнем Востоке требует корректного учета циркуляции лиссавиринов.

Ключевые слова: вирус бешенства; *Rhabdoviridae*; *Lyssavirus*; генотип 1; генетические группы; бурый медведь; Приморский край.

**Для корреспонденции:** Щелканов Михаил Юрьевич, зав. науч. лаб. экологии микроорганизмов ДВФУ, вед. науч. сотр. БПИ ДВО РАН, эксперт ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Приморском крае», 690091, г. Владивосток, E-mail: adorob@mail.ru

**Для цитирования:** Щелканов М.Ю., Десяткин А.А., Ананьев В.Ю., Фролов Е.В., Домбровская И.Э., Дедков В.Г., Ардашев А.В., Коломеец С.А., Короткова И.П., Любченко Е.Н., Бандеев В.В., Просянникова М.Н., Галкина И.В., Иванушко Е.С., Емельянова Н.П., Баранов Н.И., Ульянова С.А., Арамилев С.В., Фоменко П.В., Суворый А.Л., Порошин Н.А., Сокол Н.Н., Маслов Д.В., Махиня Е.Е., Шипулин Г.А. Изоляция и секвенирование полноразмерного генома штамма вируса бешенства, изолированного от бурого медведя (*Ursus arctos*), напавшего на человека в Приморском крае (ноябрь 2014 г.). *Вопросы вирусологии*. 2016; 61 (4): 180-186. DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-4-180-186

**Shchelkanov M.Yu.<sup>1,2,13</sup>, Deviatkin A.A.<sup>3</sup>, Ananiev V.Yu.<sup>2</sup>, Frolov E.V.<sup>4</sup>, Dombrovskaya I.E.<sup>4</sup>, Dedkov V.G.<sup>3</sup>, Ardashev A.V.<sup>2</sup>, Kolomeets S.A.<sup>5</sup>, Korotkova I.P.<sup>6</sup>, Lyubchenko E.N.<sup>6</sup>, Bandedev V.V.<sup>7</sup>, Prosyannikova M.N.<sup>2</sup>, Galkina I.V.<sup>1</sup>, Ivanushko E.S.<sup>8</sup>, Emelyanova N.P.<sup>8</sup>, Baranov N.I.<sup>2</sup>, Ulyanova S.A.<sup>2</sup>, Aramilev S.V.<sup>9</sup>, Fomenko P.V.<sup>10</sup>, Surovy A.L.<sup>11</sup>, Poroshin N.A.<sup>4</sup>, Sokol N.N.<sup>4</sup>, Maslov D.V.<sup>5</sup>, Makhinya E.E.<sup>12</sup>, Shipulin G.A.<sup>3</sup>**

#### ISOLATION AND COMPLETE GENOME SEQUENCING OF RABIES VIRUS STRAIN ISOLATED FROM A BROWN BEAR (*URSUS ARCTOS*) THAT ATTACKED A HUMAN IN PRIMORSKI KRAI (NOVEMBER, 2014)

<sup>1</sup>Far Eastern Federal University, Vladivostok, 690091, Russian Federation; <sup>2</sup>Hygienic and Epidemiological Center in Primorsky krai, Vladivostok, 690091, Russian Federation; <sup>3</sup>Central Scientific-Research Institute for Epidemiology, Moscow, 111123, Russian Federation; <sup>4</sup>Inter-regional Veterinary Laboratory in Primorsky krai, Ussuriisk, Primorsky krai, 692502, Russian Federation; <sup>5</sup>Regional offices of Rospotrebnadzor in Primorsky krai, Vladivostok, 690087, Russian Federation; <sup>6</sup>Primorskaya State Academy of Agriculture, Ussuriisk, Primorsky krai, 692510, Russian Federation; <sup>7</sup>Khasan Station for Animal Disease Control, Slavyanka, Primorsky krai, 692701, Russian Federation; <sup>8</sup>Pacific State Medical University, Vladivostok, 690002, Russian Federation; <sup>9</sup>Primorsky branch of Non-Commercial Organization "Amur tiger", Vladivostok, 690091, Russian Federation; <sup>10</sup>Amur branch of «World Wide Fund for Nature», Vladivostok, 690003, Russian Federation; <sup>11</sup>Department on Protection, Control and Regulation of Fauna Use of the Administration of Primorsky krai, Vladivostok, 690091, Russian Federation; <sup>12</sup>Khasan Central Regional Hospital, Slavyanka, Primorsky krai, 692701, Russian Federation; <sup>13</sup>Institute of Biological and Soil Science, Vladivostok, 690022, Russian Federation

An attack of a brown bear (*Ursus arctos*) on human was detected in November, 2014 in the Barabash village (Khasan region of the Primorski krai) located in close proximity to the national park Land of the Leopard. The bear was shot. The deviant behavior of the bear indicated the possibility of rabies. The diagnosis was confirmed by means of laboratory methods. The strain RABV/*Ursus arctos*/Russia/Primorye/PO 01/2014 (further PO 01) was isolated from the brain of the bear. PO 01 is the first completely sequenced Far Eastern strain of RABV. It can be considered as topotypic. PO 01 considerably differs from the vaccine strain RV 97 (GenBank EF542830) that is the basis of attenuated vaccine applied in the Land of the Leopard. At the same time, the immunodominant sites in PO 01 and RV 97 proteins differ slightly. It can be recommended to continue application of the vaccine. The analysis of the PO 01 genome (GenBank KP997032) revealed its belonging to the Eurasian genetic subgroup of the genotype 1 (street rage). Thus, this genetic subgroup stretches to the East. Expansion of the cross-border protected territories of Russia and China in the Far East demands the correct statistics of circulation of the lyssaviruses to be kept.

**Key words:** rabies virus; *Rhabdoviridae*; *Lyssavirus*; genotype 1; genetic groups; brown bear; Primorski krai.

**For citation:** Shchelkanov M.Yu., Deviatkin A.A., Ananiev V.Yu., Frolov E.V., Dombrovskaya I.E., Dedkov V.G., Ardashev A.V., Kolomeets S.A., Korotkova I.P., Lyubchenko E.N., Bandedev V.V., Prosyannikova M.N., Galkina I.V., Ivanushko E.S., Emelyanova N.P., Baranov N.I., Ulyanova S.A., Aramilev S.V., Fomenko P.V., Surovy A.L., Poroshin N.A., Sokol N.N., Maslov D.V., Makhinya E.E., Shipulin G.A. Isolation and complete genome sequencing of rabies virus strain isolated from a brown bear (*Ursus Arctos*) that attacked a human in Primorski krai (November, 2014). *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2016; 61(4):180-186. (In Russ.).

DOI 10.18821/0507-4088-2016-61-4-180-186

**For correspondence:** Mikhail Yu. Shchelkanov, head of scientific laboratory for microorganism ecology of FEFU, head of laboratory for virological investigations of Hygienic and Epidemiological Center in Primorsky krai Vladivostok, 690091, Russian Federation, E-mail: adorob@mail.ru

**Information about authors:** Shchelkanov M.Yu., <http://orcid.org/0000-0001-8610-7623>

**Funding.** The study had no sponsorship.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 1 November 2015

Accepted 19 November 2015

Бешенство – абсолютно летальное в отсутствие вакцинации природно-очаговое зоонозное заболевание, этиологически связанное с вирусами рода *Lyssavirus* (семейство *Rhabdoviridae*, отряд *Mononegavirales*): бешенства (RABV – rabies virus rhabdovirus) (прототипный), Араван (ARAV – Aravan virus), вирусом западнокавказских летучих мышей (WCBV – West Caucasian bat virus), Иркут (IRKV – Irkut virus), Худжанд (KHUV – Khujand virus). Для RABV выявлено 7 генотипов, 6 из которых ранее считались самостоятельными вирусами и до сих пор сохранили собственные названия: вирус уличного бешенства, Лагос-бат (LBV – Lagos bat virus), Моккола (MOKV – Mokola virus), Дувенхаге (DUVV – Duvenhage virus), лиссавирус европейских летучих мышей типа 1 (EBLV 1 – European bat lyssavirus type 1), лиссавирус европейских летучих мышей типа 2 (EBLV 2 – European bat lyssavirus type

2), лиссавирус австралийских летучих мышей (ABLV – Australian bat lyssavirus) [1–3].

В Российской Федерации в начале XXI века ситуация по бешенству остается напряженной: ежегодная смертность составляет 3–22 человека (рис. 1) и 250–450 тыс. ежегодно получают антирабическую вакцинацию для предотвращения заболевания [2, 4–7]. Дальний Восток относится к территориям с низким риском заражения бешенством людей и домашних животных [3–8]. Однако интенсификация освоения природных ресурсов и рекреационного потенциала этого региона приводит к закономерному усилению антропогенного воздействия на природные биоценозы, что приводит к изменению характера популяционных взаимодействий и увеличивает риск активации природных очагов. Кроме того, помимо широко распространенного в Северной Евразии уличного бешенства, на Дальнем Востоке [3, 9,

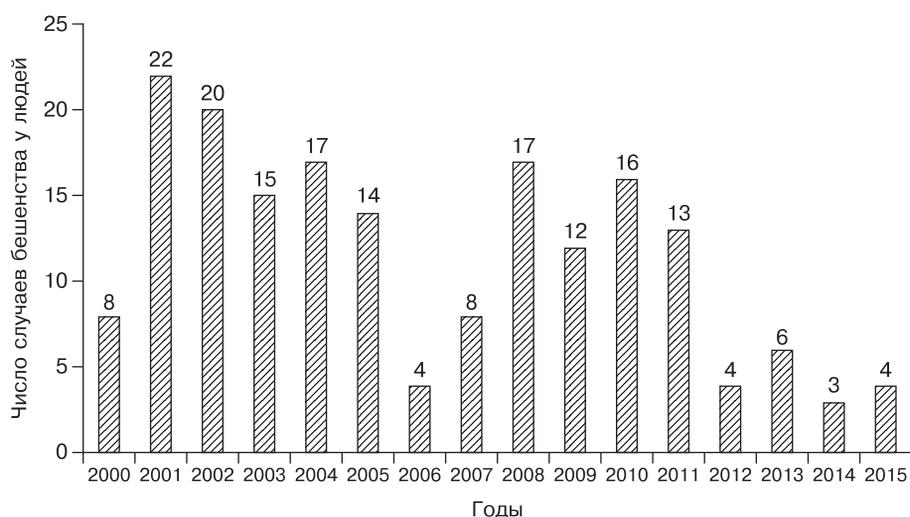


Рис. 1. Заболеваемость и смертность от бешенства в Российской Федерации за период 2000–2015 гг. (данные 2015 гг. – за период с января по сентябрь).

10] и в сопредельных провинциях КНР [3, 10] встречается IRKV (топотипный штамм Озерное), экология которого здесь изучена недостаточно. Поэтому исследование дальневосточных лисса-вирусов имеет важное значение для корректного планирования мероприятий по профилактике бешенства у людей, домашних, сельскохозяйственных и охраняемых диких животных.

В настоящей работе представлены результаты молекулярно-генетической идентификации на основе полноразмерного секвенирования генома RABV от бурого медведя (*Ursus arctos*), напавшего на человека в с. Барабаш (Хасанский район Приморского края) в непосредственной близости к национальному парку «Земля леопарда».

Работа выполнена в рамках проекта ДВФУ «Мониторинг природно-очаговых инфекций Дальнего Востока в интересах обеспечения биологической безопасности Российской Федерации» при поддержке Всемирного фонда дикой природы.

### Материал и методы

**Оперативные мероприятия** проводились сотрудниками уполномоченных подразделений департаментов по охране, контролю и регулированию использования объектов животного мира, природных ресурсов и охраны окружающей среды, здравоохранения Приморского края, Государственной ветеринарной инспекции Приморского края, Федеральных служб Россельхознадзора и Роспотребнадзора, Министерства здравоохранения и Министерства внутренних дел Российской Федерации в соответствии с действующими служебными инструкциями.

**Метод флуоресцирующих антител** (МФА) применяли для индикации антигенов RABV в отпечатках фрагментов мозга (аммонова рога, продолговатого мозга, мозжечка, коры больших полушарий) убитого медведя с подозрением на бешенство, а также лабораторных мышей, погибших после интрацеребральной инокуляции биоматериала, потенциально содержащего RABV. В работе использовали лиофилизированные анти-RABV-антитела, меченные флуоресцеинизотиоцианатом (ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ВНИИЗЖ), Россия). МФА осуществляли согласно инструкции производителя и ГОСТу 26075-2013 [12, 13].

**Иммуноферментный анализ** (ИФА) проводили в сэндвич-варианте. Набор препаратов для лабораторной диагностики бешенства животных методом ИФА (ФГБУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности – Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт» (ФЦТРБ – ВНИВИ), Россия) использовали для индикации антигенов RABV согласно инструкции производителя [13, 14].

**Выделение вируса методом биопробы** [4, 13] выполняли на двух моделях: интрацеребрально инокулированных (по 20 мкл/особь) 3- и 21-дневных лабораторных белых мышей. Гибель животных в первые 48 ч после инокуляции считалась неспецифической (посттравматической). RABV идентифицировали с помощью МФА.

**Метод Риду–Менча** [15] с линейно-логарифмической интерполяцией использовали для оценки инфекционного титра изолированного штамма (количества 50% инфекционных доз) на модели 3-дневных мышей. Титрование проводили в диапазоне 10<sup>-n</sup>, n = 5, 6, ..., 10 по 3 гнезда × 6 особей/разведение. За инокулированными животными наблюдали в течение 30 сут.

**Выделение РНК из мозговой ткани** мышей проводили с помощью набора для выделения РНК RNeasy Lipid Tissue Mini Kit («Qiagen», Германия) в соответствии с рекомендациями производителя. РНК элюировали в 100 мкл H<sub>2</sub>O Rnase-free («Qiagen», Германия) и хранили при –70°C.

**Накопление кДНК** осуществляли с помощью реакции обратной транскрипции и последующей полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР). Реакцию ОТ проводили с применением набора Реверта-L (ЦНИИЭ, Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. Полученную кДНК разводили в 5 раз с помощью H<sub>2</sub>O Rnase-free («Qiagen», Германия) и хранили при –70°C. ПЦР проводили с использованием «горячего старта» в реакционной смеси объемом 25 мкл, содержащей 2 мкл кДНК, по 0,4 мМ прямого и обратного праймеров, 2,5 мкл (1,76 мМ) дНТФ (ЦНИИЭ, Россия) и 10 мкл ПЦР-буфера blue-2 (ЦНИИЭ, Россия). Параметры термоциклирования (n = 40): 94°C – 1 мин, 55–65°C – 15 с, 7°C – 60 с; финальная элонгация 5 мин. Реакцию выполняли на приборе МахуGene («Ахуген», США). Результаты амплификации контролировали электрофоретическим методом в 1,5% агарозном геле с добавлением бромистого этидия.

**Секвенирование полноразмерного генома RABV** выполняли с помощью набора праймеров, описанного ранее [16], на автоматическом капиллярном секвенаторе ABI Prism 3500 XL («Applied Biosystems», США).

### Результаты титрования штамма RABV/*Ursus arctos*/Russia/Primorye/PO-01/2014 на модели интрацеребрально инокулированных 3-дневных лабораторных мышей и определения инфекционного титра по Риду–Менчу [15]

Отрицательный десятичный логарифм разведения вирусосодержащей жидкости	Количество животных в эксперименте		Данные, пересчитанные по Риду–Менчу		
	выжили	погибли	выжили	погибли	летальность
5	0	18	0	63	100,0
6	0	18	0	45	100,0
7	4	14	4	27	87,1
8	12	6	16	13	44,8
9	13	5	29	7	19,4
10	16	2	45	2	4,3

Примечание. Серым фоном обозначены разведения, между которыми заключена LD<sub>50</sub>.

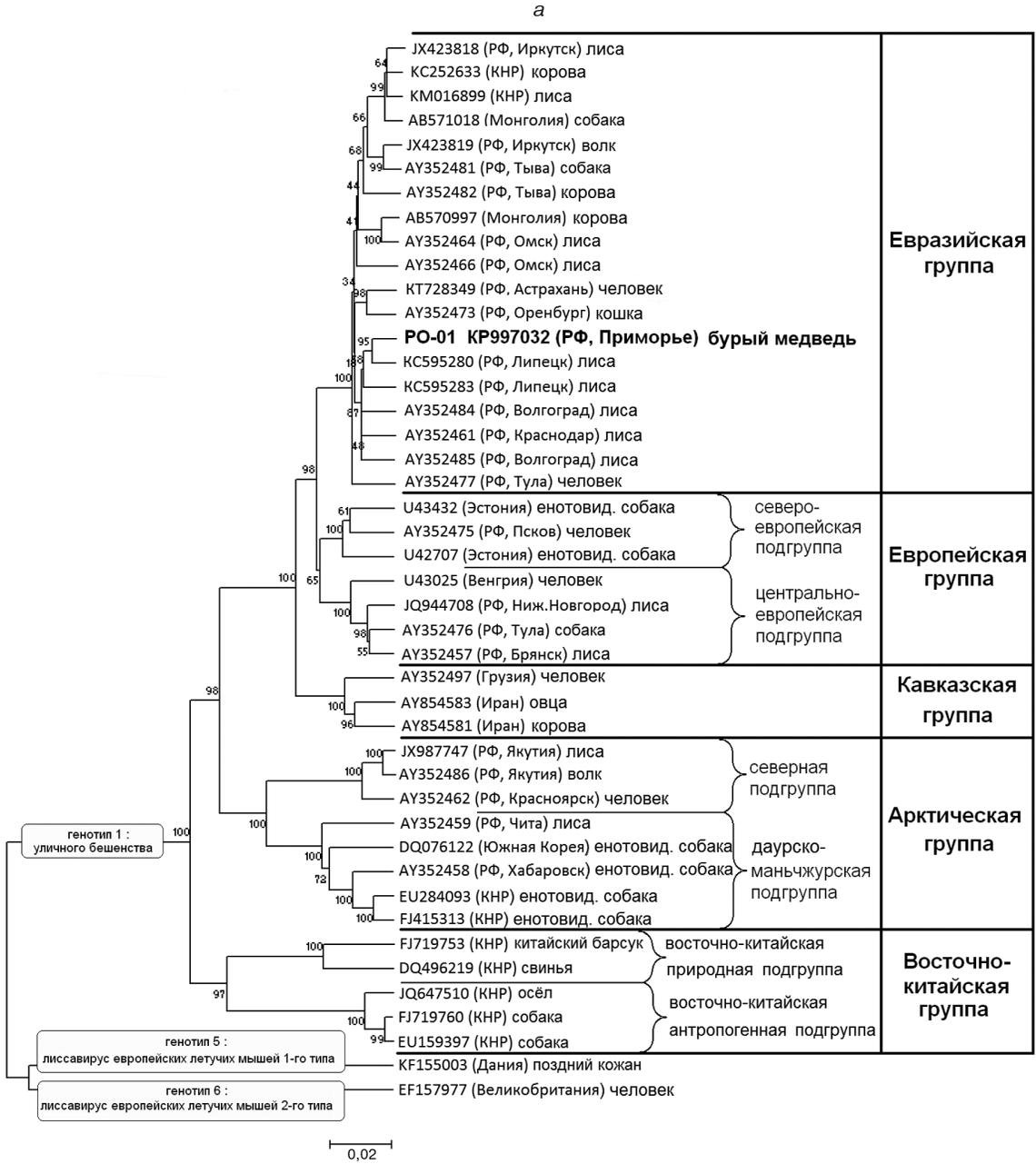
Статистический анализ нуклеотидных последовательностей проводили с использованием программного пакета Mega 6.06 [17]: множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей выполняли с помощью алгоритма ClustalW, кластер-анализ – NJ (neighbor-joining – «ближайшего соседа»), bootstrap-анализ – 1000-кратным повторением.

**Результаты**

Расследование инцидента позволило установить, что четырехлетний бурый медведь (*Ursus arctos*; 3–4 года; ♂) впервые появился в окрестностях с. Барабаш (Хасанский район Приморского края) вечером 15.11.2014 и в тот же вечер загрыз собаку на окраине села. Вечером 17.11.2014 медведь загрыз еще одну собаку и напал на гражданку N. (69 лет), которая была доставлена в ОРИТ КГБУЗ «Хасанская ЦРБ» (пос. Славянка, Хасанский район Приморского края) с тяжелыми травмами: скальпированной раной волосистой части головы, множе-

ственными укушенно-рваными ранами левой половины грудной клетки с повреждением нижней доли легкого слева, открытым фрагментированным переломом ребер VI–XI слева, разрывом диафрагмы и гемопневмотораксом слева, отрывом селезенки, гемоперитонеумом, травматическим шоком III степени.

Учитывая девиантность поведения медведя – выход из сезонной спячки (хотя летом–осенью 2014 г. имела хорошая кормовая база), неровную походку с частыми лежками, отсутствие страха перед человеком, отсутствие характерных ударов по жертве лапами, нехарактерное разгрызание задранных собак со стороны хребта с разрыванием тела жертвы на части, – сделали предположение о заболевании хищника бешенством. Поэтому с первых часов госпитализации пострадавшей N. вводилась антирабическая вакцина КоКАВ по схеме 0–3–7–14–30–90, антирабический иммуноглобулин не вводился. Пациентка N. была выписана 18.12.2014 в удовлетворительном состоянии.



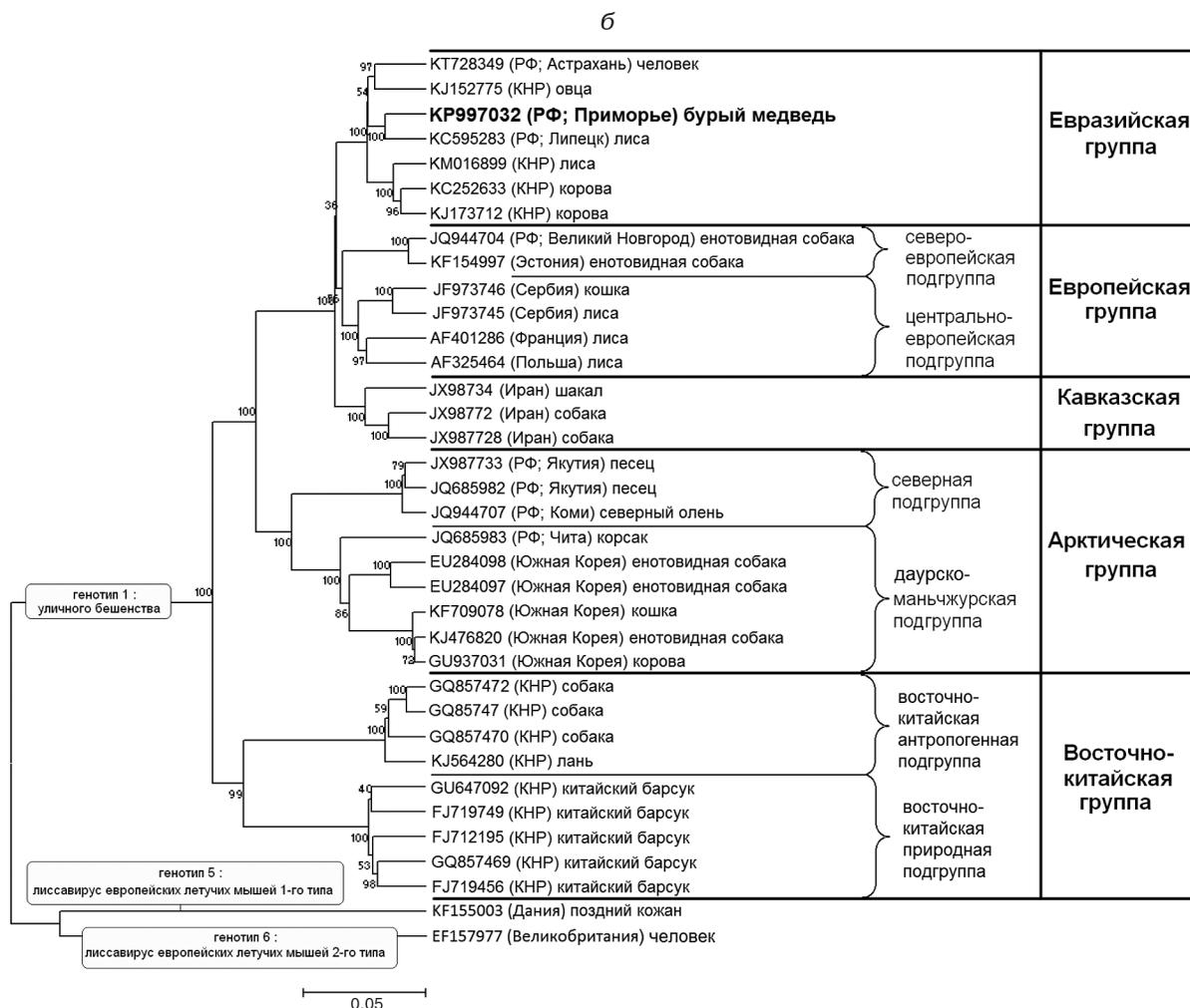


Рис. 2. Кластер-анализ нуклеотидных последовательностей полноразмерных генов N (1353 н. о.) (а) и G (1575 н. о.) (б) штаммов вируса бешенства, встречающихся на территории Северной Евразии. Алгоритм выравнивания – ClustalW; метрика – p-distance; алгоритм восходящей иерархической классификации – NJ («ближайшего соседа»). Штамм PO-01 выделен жирным шрифтом. Указаны идентификаторы GeneBank, место и источник изоляции штамма

Отбор образцов биологического материала медведя проводился 18.11.2014 в Центре диагностики болезней животных на базе Приморской государственной сельскохозяйственной академии, куда была доставлена туша животного после его отстрела. Голова медведя была передана в Приморскую межобластную ветеринарную лабораторию. 08.12.2014 фрагменты мозга медведя были доставлены в лабораторию вирусологических исследований Центра гигиены и эпидемиологии в Приморском крае без нарушения холодной цепи.

Индикация антигенов RABV в тканях мозга медведя была проведена методами ИФА и МФА с положительным результатом.

Изоляцию вируса выполняли на двух биологических моделях: интрацеребрально инокулированных 3- и 21-дневных лабораторных белых мышей. В первом случае инкубационный период составил 11–12 сут при отсутствии неспецифического падежа в первые 48 ч после инокуляции, во втором – 14–15 сут и 3 (30%) соответственно. У инокулированных мышей развивалась классическая картина менингита с парезом сначала задних, а потом и передних конечностей. Штамм получил название RABV/Ursus arctos/Russia/Primorye/PO-01/2014 (далее – PO-01). Оценка LD<sub>50</sub> по данным титрования (см. таблицу) с помощью

линейно-логарифмической интерполяции:  $8 - (50,0 - 44,8) / (87,1 - 44,8) = 7,9$ . Оценка инфекционности штамма:  $7,9 \lg (LD_{50}) / 20 \text{ мкл} = 9,6 \lg (LD_{50}) / \text{мл}$ .

Идентификация штамма и его принадлежность к RABV были подтверждены с использованием ИФА, МФА, ОТ-ПЦР и секвенирования полноразмерного генома (GeneBank KR997032).

### Обсуждение

Анализ полноразмерного генома выделенного штамма PO-01 показал его принадлежность к генотипу 1 RABV (уличного бешенства). Данный штамм является первым полностью секвенированным дальневосточным штаммом RABV и может считаться топотипным.

Отличие PO-01 от вакцинного штамма RV-97 (GeneBank EF542830), на основе которого выпускаются живые аттенуированные вакцины Синраб (ФГБУ «ВНИИЗЖ», Россия) и Оралрабивак (Покровский завод биопрепаратов, Россия), применявшиеся для профилактики бешенства среди диких плотоядных в Приморском крае [18], составляет по N-гену 5,6% для нуклеотидной последовательности (2,7 % для аминокислотной последовательности), P-гену – 9,3% (9,4%), M-гену – 9,2% (7,4%), G-гену – 9,5% (9,5%), L-гену – 7,1% (2,8%). Таким образом, контамина-

ция биоматериала фиксированным штаммом исключается. Вместе с тем вакцины на основе RV-97 могут быть рекомендованы к дальнейшему применению, так как основные иммунодоминантные сайты [19] в белках PO-01 и RV-97 либо совпадают (G: 34–42 аминокислотных остатка (а. о.), 198–200, 231, 330–338, 342–343 а. о.; P: 75–90 а. о.; N: 313–337, 374–383 а. о.), либо отличаются незначительно (P: A197V и I202A в сайте 191–206 а. о.; N: A407T в сайте 404–418 а. о.).

Штаммы RABV, изолированные на территории Северной Евразии, на основании сравнительного анализа гена N (1353 нуклеотидных основания (н.о.)), кодирующего вирусный нуклеопротеин, классифицируются на несколько генетических групп, которые имеют определенную географическую приуроченность [5, 6, 20–23]. PO-01 принадлежит к евразийской генетической группе (рис. 2, а), которая широкой полосой охватывает умеренный пояс Евразии. Представители этой группы встречаются на территориях от Восточной Европы до Забайкальского края. Представленные данные свидетельствуют о том, что евразийская группа распространяется вплоть до восточной окраины материка. К этому же выводу приводит и анализ гена G (1575 н. о.) (рис. 2, б), который кодирует поверхностный гликопротеин, формирующий поверхностные пепломеры, связывающиеся с клеточными рецепторами и опосредующие слияние вирусной и клеточной мембран [1–3]. G-белок является более изменчивым по сравнению с нуклеопротеином, однако иерархия генетических групп и подгрупп для N- и G-генов в целом подобны.

Арктическая генетическая группа первоначально включала штаммы, изолированные в Северо-Восточной Азии. Однако в процессе дальнейшего изучения RABV штаммы арктической группы были обнаружены в Читинской области, Хабаровском крае, КНР и Южной Корее, формируя даурско-маньчжурскую подгруппу (см. рис. 2), которая может встретиться и на территории Приморского края. Здесь также может быть обнаружена и восточно-китайская генетическая подгруппа RABV. Таким образом, на юге Дальнего Востока возможна одновременная циркуляция трех генетических групп RABV, что с учетом присутствия IRKV создает здесь сложный профиль циркуляции лиссавирусов.

В связи с планами расширения заповедной территории на юге Приморского края, включения в нее ряда трансграничных участков России и Китая, создания естественных пограничных проходов для животных, необходим корректный анализ циркуляции лиссавирусов RABV и IRKV. При этом следует иметь в виду не только возможность распространения смертельно опасной инфекции среди самих хищников, но и подрыв их кормовой базы [2, 3, 6, 21–23]. Для популяций малочисленных кошачьих – амурского тигра (*Panthera tigris altaica*) и дальневосточного леопарда (*Panthera pardus amurensis*) – реализация угрозы со стороны инфекционных заболеваний может иметь необратимые последствия. Необходимо интенсифицировать мониторинговые и профилактические мероприятия в отношении лиссавирусов на сопредельных российско-китайских территориях юга Дальнего Востока в популяциях диких, домашних и сельскохозяйственных животных.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**ЛИТЕРАТУРА (пп. 3, 5, 10, 11, 15–18, 20–23  
см. REFERENCES)**

1. Львов Д.К., ред. *Медицинская вирусология*. М.: МИА; 2008.
2. Львов Д.К., ред. *Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных*. М.: МИА; 2013.
4. Белик Е.В., Дудников С.А., Бельчихина А.В., Лядский М.М., Дудорова М.В. *Эпизоотическая ситуация по бешенству на территории Владимирской области (2005–2009)*. Информационно-аналитический обзор. Владимир: ВНИИЗЖ; 2010.

6. Чупин С.А., Чернышова Е.В., Метлин А.Е. Генетическая характеристика полевых изолятов вируса бешенства, выявленных на территории Российской Федерации в период 2008–2011 г. *Вопросы вирусологии*. 2013; 58 (4): 44–9.
7. Хисматуллина Н.А., Гулюкин А.М., Гулюкин М.И., Иванов А.В., Сабирова В.В., Южаков А.Г. и др. Два случая гидрофобии в Республике Татарстан: прижизненная и постмортальная лабораторная диагностика. *Вопросы вирусологии*. 2015; 60 (2): 18–24.
8. Сидорова Д.Г., Сидоров Г.Н., Полещук Е.М., Колычев Н.М. Бешенство в Восточной Сибири в XX – начале XXI веков. *Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения РАН*. 2007; (Приложение 3): 168–72.
9. Ботвинкин А.Д. Смертельные случаи заболевания людей бешенством в Евразии после контактов с рукокрылыми. *Plecotus et al.* 2011; (14): 75–86.
12. Инструкция по применению Антирабического лиофилизированного иммуноглобулина, меченного флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ-иммуноглобулин). Владимир: ФГБУ «ВНИИЗЖ»; 2011.
13. ГОСТ 26075-2013. Методы лабораторной диагностики бешенства. Межгосударственный стандарт. М.: Стандартинформ; 2014.
14. Назаров Н.А., Михайлина Н.М., Рыбаков С.С., Метлин А.Е., Чепуркин А.В., Молодкин А.В. и др. Разработка твердофазного непрямоемкого сандвич-варианта иммуноферментного анализа для диагностики бешенства животных. *Труды Федерального центра охраны здоровья животных*. 2006; 4: 117–24.
19. Метлин А.Е. *Молекулярно-биологические характеристики полевых изолятов и аттенуированных штаммов вируса бешенства*. Дисс. ... канд. вет. наук. Владимир; 2004.

**REFERENCES**

1. L'vov D.K., ed. *Medical Virology [Meditsinskaya virusologiya]*. Moscow: MIA; 2008. (in Russian)
2. L'vov D.K., ed. *Handbook of Virology. Viruses and Viral Infections of Humans and Animals [Rukovodstvo po virusologii. Virusy i virusnye infektsii cheloveka i zhivotnykh]*. Moscow: MIA; 2013. (in Russian)
3. L'vov D.K., Shchelkanov M.Yu., Alkhovsky S.V., Deryabin P.G. *Zoonotic Viruses of Northern Eurasia. Taxonomy and Ecology*. Elsevier Academic Press; 2015.
4. Belik E.V., Dudnikov S.A., Bel'chikhina A.V., Lyadskiy M.M., Dudorova M.V. *Epizootic Situation for Rabies on the Territory of Vladimir region (2005–2009). Information-analytic Review [Epizooticheskaya situatsiya po beshenstvu na territorii Vladimirskiy oblasti (2005–2009). Informatsionno-analiticheskiy obzor]*. Vladimir: VNIIZZh; 2010. (in Russian)
5. Kuzmin I.V., Botvinkin A.D., McElhinney L.M., Smith J.S., Orciari L.A., Hughes G.J. et al. Molecular Epidemiology of terrestrial Rabies in the former Soviet Union. *J. Wildl. Dis.* 2004; 40 (4): 617–31.
6. Chupin S.A., Chernyshova E.V., Metlin A.E. Genetic characterization of the rabies virus field isolates detected in Russian Federation within the period 2008–2011. *Voprosy virusologii*. 2013; 58 (4): 44–9. (in Russian)
7. Khismatullina N.A., Gulyukin A.M., Gulyukin M.I., Ivanov A.V., Sabirova V.V., Yuzhakov A.G. et al. Two cases of hydrophobia in the republic of Tatarstan: in vivo and postmortem laboratory diagnosis. *Voprosy virusologii*. 2015; 60 (2): 18–24. (in Russian)
8. Sidorova D.G., Sidorov G.N., Poleshchuk E.M., Kolychev N.M. Hydrophobia in the East Siberia in XX – the Beginning of XXI Century. *Byulleten' Vostochno-Sibirskogo nauchnogo tsentra Sibirskogo otdeleniya RAMN*. 2007; (Suppl. 3): 168–72. (in Russian)
9. Botvinkin A.D. Fatal human cases of rabies in Eurasia after contacts with bats. *Plecotus et al.* 2011; (14): 75–86. (in Russian)
10. Leonova G.B., Belikov S.I., Kondratov I.G., Krylova N.V., Pavlenko E.V., Romanova E.V. et al. A fatal case of bat lyssavirus infection in Primorye Territory of the Russian Far East. *WHO Rabies Bulletin Europe*. 2009; 33 (4): 5–8.
11. Liu Y., Zhang S., Zhao J., Zhang F., Hu R. Isolation of Irkut Virus from a Murina leucogaster Bat in China. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2013; 7 (3): e2097.
12. Instruction on use of the anti-rabies lyophilized immunoglobulin labeled by fluorescein isothiocyanate (FITC-immunoglobulin). Vladimir: FGBU «ARRIAH»; 2011. (in Russian)
13. ГОСТ 26075-2013. Методы лабораторной диагностики бешенства. Interstate standard. Moscow: Standartinform; 2014. (in Russian)
14. Nazarov N.A., Mikhaylina N.M., Rybakov S.S., Metlin A.E., Chepurkin A.V., Molodkin A.V. et al. Development of indirect sandwich ELISA for the diagnostics of rabies. *Trudy Federal'nogo tsentra okhrany zdorov'ya zhivotnykh*. 2006; 4: 117–24. (in Russian)
15. Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Amer. J. Hyg.* 1938; 27: 493–7.
16. Poleshchuk E.M., Deviatkin A.A., Dedkov V.G., Sidorov G.N., Ochka-sova J.V., Hodjakova I.A. et al. Complete genome sequences of four virulent rabies virus strains isolated from rabid animals in Russia. *Genome Announc.* 2013; 1 (3): e00140–13.
17. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipki A., Kumar S. MEGA6:

- Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 2013; 30 (12): 2725–9.
18. Lubchenko E. Rabies control in eastern Russian Ussuriysk region. *WHO Rabies Bulletin Europe*. 2008; 32 (1): 7–8.
  19. Metlin A.E. *Molecular and Biological Characteristics of Field Isolates and Attenuated Strains of Rabies Virus*: Diss. Vladimir; 2004. (in Russian)
  20. Liu Y., Zhang S., Zhao J., Zhang F., Li N., Lian H. et al. Fox- and raccoon-dog-associated rabies outbreaks in northern China. *Viol. Sin.* 2014; 29 (5): 308–10.
  21. Zhu H., Chen X., Shao X., Ba H., Wang F., Wang H. et al. Characterization of a virulent dog-originated rabies virus affecting more than twenty fallow deer (*Dama dama*) in Inner Mongolia, China. *Infect. Genet. Evol.* 2015; 31: 127–34.
  22. Nadin-Davis S.A., Simani S., Armstrong J., Fayaz A., Wandeler A.I. Molecular and antigenic characterization of rabies viruses from Iran identifies variants with distinct epidemiological origins. *Epidemiol. Infect.* 2003; 131 (1): 777–90.
  23. Pant G.R., Lavenir R., Wong F.Y., Larrous F., Bhatta D.R., Bourhy H. et al. Recent emergence and spread of an Arctic-related phylogenetic lineage of rabies virus in Nepal. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2013; 7 (11): e2560.

Поступила 1.11.15

Принята в печать 19.11.15

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016  
УДК 578.824.11:578.5]:577.21.08

**Зайкова О.Н.<sup>1</sup>, Гребенникова Т.В.<sup>1</sup>, Елаков А.Л.<sup>1</sup>, Кочергин-Никитский К.С.<sup>1</sup>, Алипер Т.И.<sup>1</sup>, Чучалин С.Ф.<sup>2</sup>, Гулюкин А.М.<sup>3</sup>**

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНОМОВ ПОЛЕВЫХ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА БЕШЕНСТВА, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ КИРОВСКОЙ ОБЛАСТИ

<sup>1</sup>Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва; <sup>2</sup>Управление ветеринарии Кировской области, 610046, г. Киров; <sup>3</sup>ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени Я.Р. Коваленко», 109428, г. Москва

Статья посвящена молекулярно-генетическому исследованию геномов полевых изолятов вируса бешенства, циркулирующих среди диких животных на территории Кировской области, с целью проведения филогенетического анализа и определения возможной реверсии вакцинного штамма вируса бешенства, используемого при оральной вакцинации, к вирулентному варианту. Исследованы 24 образца мозга от диких плотоядных, отстреленных после проведения на этой территории оральной иммунизации вакциной Рабивак-О/333, а также приманка с вакциной, предоставленные Кировской ветеринарной службой. Методами флюоресцирующих антител и обратнотранскриптной полимеразной цепной реакции было установлено, что все предоставленные образцы содержат вирус бешенства. Филогенетический анализ фрагментов гена *N* показал генетическую близость кировских полевых изолятов к изолятам, выделенным в Бурятии, анализ фрагментов гена *G* продемонстрировал генетическую близость кировских полевых изолятов к изолятам, выделенным в 2011 г. в Липецке, а также к украинским изолятам 2006 и 2010 гг. В ходе молекулярно-биологического анализа фрагментов генов *N* и *G* полевых изолятов и генома вакцинного вируса бешенства установлено, что в данном случае реверсия вакцинного штамма к вирулентному варианту отсутствует.

**Ключевые слова:** бешенство; оральная иммунизация; секвенирование; молекулярно-генетический анализ; филогенетический анализ геномов вируса бешенства.

**Для цитирования:** Зайкова О.Н., Гребенникова Т.В., Елаков А.Л., Кочергин-Никитский К.С., Алипер Т.И., Чучалин С.Ф., Гулюкин А.М. Молекулярно-генетическая характеристика геномов полевых изолятов вируса бешенства, циркулирующих на территории Кировской области. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61 (4):186-192.

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-4-186-192

**Zaykova O.N.<sup>1</sup>, Grebennikova T.V.<sup>1</sup>, Elakov A.L.<sup>1</sup>, Kochergin-Nikitsky K.S.<sup>1</sup>, Aliper T.I.<sup>1</sup>, Chuchalin S.F.<sup>2</sup>, Gulyukin A.M.<sup>3</sup>**

### MONITORING OF RABIES IN WILD ANIMALS IN THE KIROV REGION AFTER ORAL IMMUNIZATION

<sup>1</sup>D.I. Ivanovsky Institute of Virology «Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation; <sup>2</sup>The Veterinary Department of the Kirov Region, Kirov, 610046, Russian Federation; <sup>3</sup>Kovalenko All-Russian Scientific Research Institute of Experimental Veterinary, Moscow, 109428, Russian Federation

This work presents the results of the molecular genetic research on genomes of field isolates of the rabies virus circulating in the territory of the Kirov region in order to analyze the phylogenetic relationship between the wild isolate genomes and to determine the possible reversion of the vaccine strain of the rabies virus used in the oral vaccine to virulent variant. We studied 24 brain samples from wild carnivores shot after oral immunization of the area with Rabivak–O/333. A bait with the vaccine provided by the Veterinary Service of the Kirov was also studied. All samples were found to be positive for the presence of the rabies virus as established by FAT and RT-PCR techniques. Phylogenetic analysis of *N* genome fragments of the rabies virus showed that the field isolates from the Kirov regions were genetically close to the field isolates from Buryatia 2012. Analysis of *G* genome fragments showed that the Kirov field isolates were close to the isolates from Lipetsk (2011), as well as to the Ukrainian isolates (2006 and 2010). Molecular genetic analysis of the gene fragments *N* and *G* for the field isolates and fragments of the genome of the rabies virus vaccine did not reveal any reversion to the virulent vaccine strain.

**Для корреспонденции:** Гребенникова Татьяна Владимировна, д-р биол. наук, проф., рук. лаб. молекулярной диагностики, Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, E-mail: t\_grebennikova@mail.ru

**Key words:** rabies; oral immunization; sequencing; molecular-genetic research; phylogenetic analysis of the genomes fragments of the rabies virus.

**For citation:** Zaykova O.N., Grebennikova T.V., Elakov A.L., Kochergin-Nikitsky K.S., Aliper T.I., Chuchalin S.F., Gulyukin A.M. Monitoring of rabies in wild animals in the Kirov region after oral immunization. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2016; 61(4):186-192. (In Russ.).

DOI 10.18821/0507-4088-2016-61-4-186-192

**For correspondence:** Tatyana V. Grebennikova, PhD., professor, head of the laboratory of molecular diagnostics D.I. Ivanovsky Institute of Virology «Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation, E-mail: t\_grebennikova@mail.ru

**Information about authors:** Grebennikova T.V., <http://orcid.org/0000-0002-6141-9361>

**Funding.** Support for the research was carried out with the help of the state budget.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 15 January 2016

Accepted 26 January 2016

## Введение

Бешенство – инфекционное заболевание, вызываемое вирусом бешенства *Rabies virus* рода *Lyssavirus* семейства *Rhabdoviridae*. По оценке ВОЗ, бешенство входит в пятерку инфекционных болезней, общих для человека и животных, наносящих наибольший социальный и экономический ущерб. В Российской Федерации обстановка по бешенству остается неблагоприятной. Так, в течение 2014 г. зафиксировано 2096 очагов бешенства, заболело 2315 животных. Наибольшее число неблагоприятных пунктов зарегистрировано в Белгородской (125), Липецкой (119), Саратовской (124) областях и Республике Татарстан (118). В первом квартале 2015 г. зафиксировано 1008 вспышек бешенства, во время которых заболело и пало 1201 животное. Бешенство животных установлено на территориях 58 субъектов РФ [1, 2].

Вирус бешенства вызывает специфический энцефалит (воспаление головного мозга) и является единственным из царства *Vira*, поражающим всех теплокровных животных, в том числе человека, с летальностью 100%. Вирионы имеют пулевидную форму, их длина составляет в среднем 180 нм, диаметр – 75 нм. Вирион состоит из несегментированного генома, представленного одной молекулой спиралеобразно скрученной негативной РНК, и 5 структурных белков: нуклеопротеина (N), фосфопротеина (P), матричного белка (M), гликопротеина (G) и РНК-зависимой РНК-полимеразы или большого белка (L – large protein). Геномная РНК неинфекционна [3, 4].

Вирус передается главным образом со слюной при укусе больным животным. Основными переносчиками бешенства являются дикие плотоядные. Диагностика бешенства, как правило, проводится посмертно. Прижизненное и посмертное подтверждение диагноза бешенства может осуществляться путем применения различных диагностических методов, направленных на выявление целого вируса, вирусных антигенов или нуклеиновых кислот в инфицированных тканях (мозге, коже, моче или слюне) [3, 4].

Предупреждение распространения бешенства включает контроль численности основных носителей вируса в природе и бездомных домашних животных, а также их иммунизацию с целью создания зоны, свободной от вируса [5, 6].

Программа оральной вакцинации должна длиться минимум 5 лет. Приманки с вакциной распределяют 2 раза в год, весной и осенью, из расчета 20 приманок на 1 км<sup>2</sup>, используя вертолеты или небольшие самолеты с приборами GPS-навигации. Затем проводят контрольный отстрел животных. Методом флюоресцирующих антител (МФА) исследуют пробы мозга животных на наличие вируса бешенства. Напряженность иммунитета оценивают с использованием иммуноферментного анализа, реакции нейтрализации и других методов, рекомендованных ВОЗ.

Ранее в странах Европы и Канаде были выявлены случаи бешенства диких плотоядных, ассоциированного с ревертировавшим вакцинным штаммом. В 2012 г. в нашей стране

появилась оральная вакцина Рабивак-О/333 из авирулентного штамма ERA-G333 [7–9].

Для контроля антирабических мероприятий и профилактики бешенства необходимо исследовать случаи этого заболевания на неблагоприятных по нему территориях и на территориях, где проводилась оральная иммунизация, исследовать первичную структуру геномов полевых изолятов вируса бешенства [10]. Данная работа посвящена молекулярно-генетическим исследованиям полевых изолятов, циркулирующих в Кировской области. Работа велась в двух направлениях и включала:

1) филогенетический анализ полевых изолятов, а именно сравнение первичной структуры фрагментов геномов полевых изолятов вируса бешенства и изолятов, выделенных в других областях, с референсными штаммами вируса бешенства, представленными в Национальном центре биотехнологической информации (NCBI);

2) молекулярно-генетическое исследование полевых изолятов в Кировской области, полученных после оральной вакцинации, с целью проследить появление маркерных мутаций, связанных с реверсией вакцинного штамма к вирулентному.

## Материал и методы

Для исследования Кировской ветеринарной службой были предоставлены 24 образца мозга диких животных (23 от лисиц и 1 от енотовидной собаки) и приманка с вакциной Рабивак-О/333. Из ткани мозга этих животных готовили мазки на предметных стеклах и исследовали с помощью МФА с использованием антирабического моноклонального ФИТЦ-иммуноглобулина фирмы «Fujirebio» (США) и набора антирабического флюоресцирующего иммуноглобулина (Все-российский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности, Щелковский район) согласно ГОСТу 26075-2013. Окрашенные препараты просматривали микроскопированием.

**Выделение РНК.** РНК выделяли из 200 мкл 10% суспензии мозга с применением коммерческого препарата TRI® Reagent («Sigma Aldrich») по методике производителя и ресуспендировали в 30–50 мкл деионизированной воды при 55°C, периодически перемешивая пробы пипетированием. РНК (5 мкл) использовали для обратной транскрипции и получения кДНК.

**Проведение обратнотранскриптной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР).** Обратную транскрипцию и получение кДНК с использованием M-MLV reverse transcriptase («Fermentas») проводили согласно инструкции производителя с использованием 5 мкл РНК. Реакционная смесь для ПЦР содержала 16 mM Tris HCl; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 1% Triton x100; по 10 pM каждого праймера; 2,5 mM dNTPs; 2 ед. Taq-полимеразы. В нее вносили 5 мкл кДНК. Нуклеотидные последовательности праймеров для ПЦР и секвенирования участка гена *N* были взяты из работы Heaton и соавт. (1997).

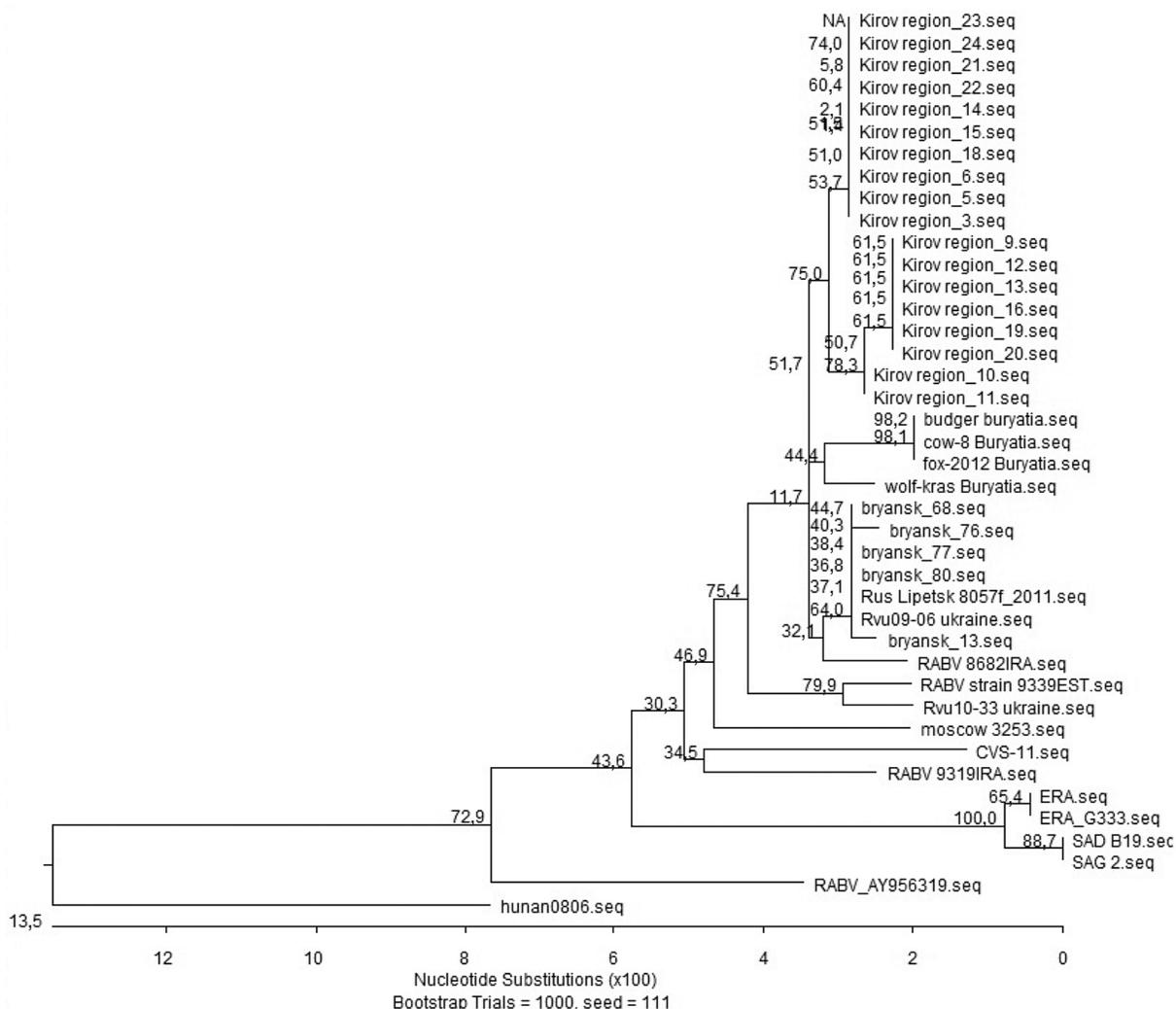


Рис. 1. Филогенетическая дендрограмма, полученная при сравнении фрагментов гена *N* исследуемых изолятов, вакцинного штамма ERA G333 и других вакцинных штаммов и полевых изолятов, представленных в NCBI.

**Очистка ПЦР-фрагментов.** Образцы очищали из агарозного геля с помощью набора Silica Bead DNA Gel Extraction Kit («Fermentas») согласно инструкции производителя и секвенировали. Реакцию проводили на амплификаторе Mastercycler Gradient («Eppendorf») с применением Big Dye® Terminator v. 3.1 Ready Reaction Kit («Applied Biosystems»), затем продукты амплификации переосаждали для последующего секвенирования с использованием автоматического секвенатора Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer. Для выравнивания нуклеотидных последовательностей применяли пакет программ DNASTAR v. 3.12 («Lasergene Inc.», США) и Bio Edit 7.0.1.

### Результаты

Первым этапом было проведение исследований с применением МФА. Результаты показали, что все образцы содержат вирус бешенства. Результаты применения МФА были подтверждены в ОТ-ПЦР. ПЦР-продукты секвенировали и получили первичную структуру фрагментов генов *N* и *G* вируса бешенства.

Полученные последовательности фрагментов генов *N* и *G* полевых изолятов и образца вакцины сравнивали между собой, с последовательностями изолятов из других регионов и

с референсными штаммами, представленными в базе данных GeneBank NCBI. В результате были получены филогенетические дендрограммы (рис. 1, 2).

При анализе филогенетической дендрограммы, полученной на основании фрагментов гена *N* (см. рис. 1), установлено, что полевые изоляты, циркулирующие на территории Кировской области, образуют 1 группу, состоящую из 2 близких кластеров.

Анализ фрагментов гена *G* показал, что кировские изоляты образуют 2 отдельные группы, разделенные изолятом, выделенным в 2011 г. в Липецке, а также украинскими изолятами 2006 и 2010 гг. (см. рис. 2). Брянские изоляты по данному участку генома не были исследованы.

Следующим этапом исследования был молекулярно-генетический анализ полевых изолятов из Кировской области, полученных после оральной вакцинации, с целью проследить появление маркерных мутаций, связанных с реверсией вакцинного штамма к вирулентному.

Исследуемый участок гена *N* составил 270 нуклеотидов, кодирующих 90 аминокислот (аминокислотные остатки – а. о.). При сравнении последовательностей фрагмента гена *N* полевых изолятов и штамма ERA G333 было выявлено 5 аминокислотных отличий на сравнительно коротком участке.

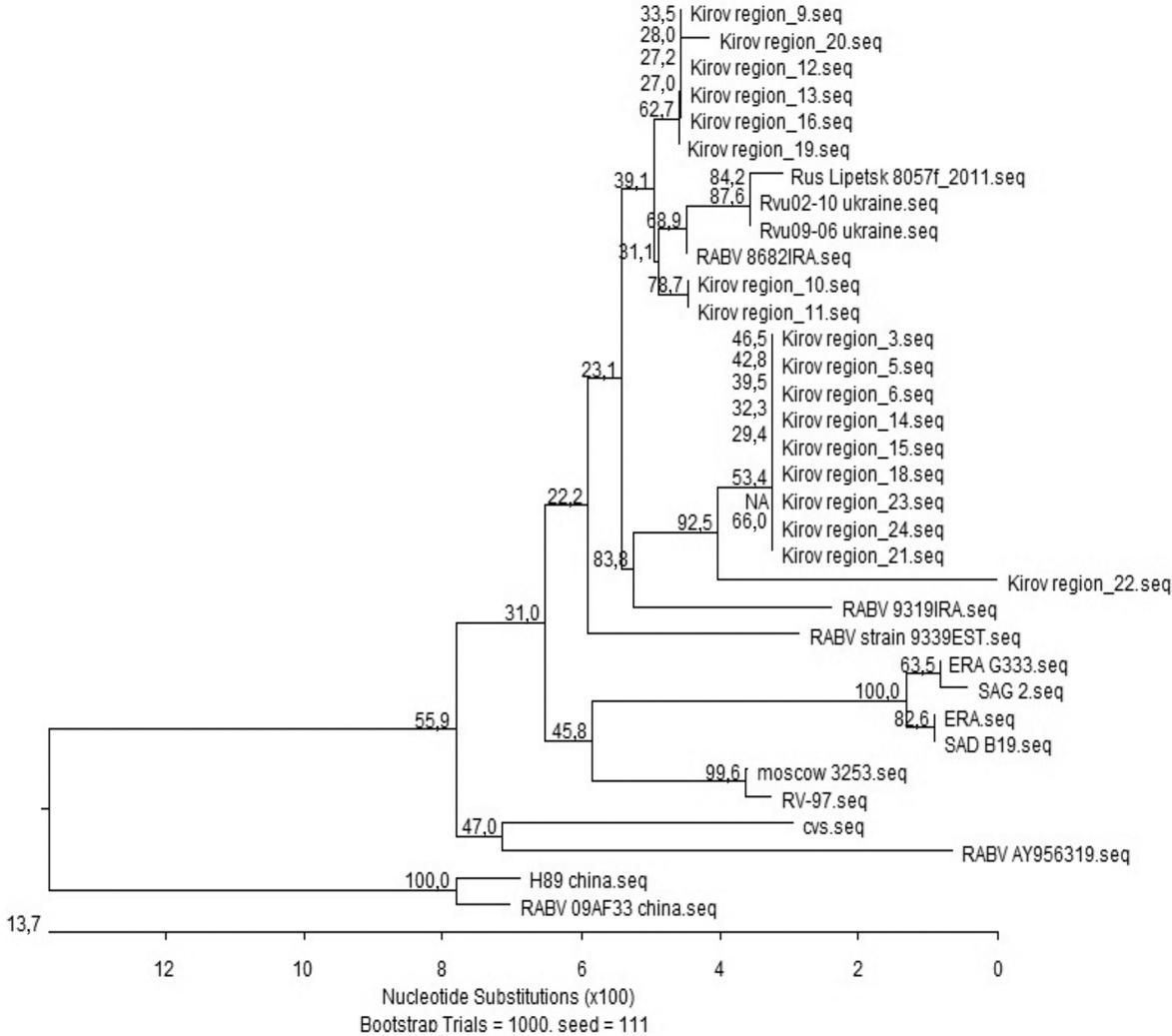


Рис. 2. Филогенетическая дендрограма, полученная при сравнении фрагментов гена G исследуемых изолятов, вакцинного штамма ERA G333 и других вакцинных штаммов и полевых изолятов, представленных в NCBI.

Исследуемый участок гена G составил 235 нуклеотидов, кодирующих 78 аминокислот. При сравнении последовательностей фрагмента гена G полевых изолятов и штамма ERA G333 в большинстве образцов было выявлено 4 аминокислотных отличия, в пробах № 10 и 11 – по 2 идентичных замены.

По аминокислотному составу фрагмента гена N кировские изоляты абсолютно идентичны изоляту RABV 8682IRA, что подтверждает результаты филогенетического анализа (рис. 3).

Существует достаточно близкое сходство по аминокислотному составу фрагмента белка N с изолятами из Бурятии и Брянска. Аминокислотная последовательность фрагмента белка G на заданном участке исследуемых изолятов близка и к RABV AY956319, и к RABV 8682IRA. Проба № 22 имеет 3 аминокислотных отличия от остальных образцов и указанных выше изолятов (рис. 4). Исследование аминокислотной последовательности кировских изолятов подтверждает их филогенетическую близость к изолятам из Липецка и Украины.

**Обсуждение**

Проведено исследование образцов мозга животных, отстреленных на территории Кировской области после прове-

дения там антирабических мероприятий. С помощью МФА и ОТ-ПЦР было установлено, что во всех образцах присутствует вирус бешенства. Главной задачей нашей работы было определить появление маркерных мутаций, связанных с реверсией вакцинного штамма ERA G333 к вирулентному. В результате секвенирования ПЦР-продуктов была получена первичная структура фрагментов генов N и G вируса бешенства полевых изолятов и вакцинного штамма, проведен анализ последовательностей нуклеотидов и аминокислот в сравнении с референсными штаммами и изолятами, выделенными на других территориях.

Как известно, ген N, кодирующий нуклеопротеин, является более консервативным для всех представителей рода *Lyssavirus*, чем ген G, кодирующий белок оболочки гликопротеин [2]. Для некоторых образцов были получены фрагменты генов размером около 100 нуклеотидных пар (н. п.), что объясняется крайне малым количеством вируса в материале. Данные образцы впоследствии были исключены при построении филогенетической дендрогаммы, поскольку нуклеотидная последовательность коротких участков не имела существенных отличий от таковой у фрагментов других образцов.

В ходе исследования было установлено, что практически все кировские изоляты генетически близки к изолятам, цир-

ORIGINAL RESEARCH

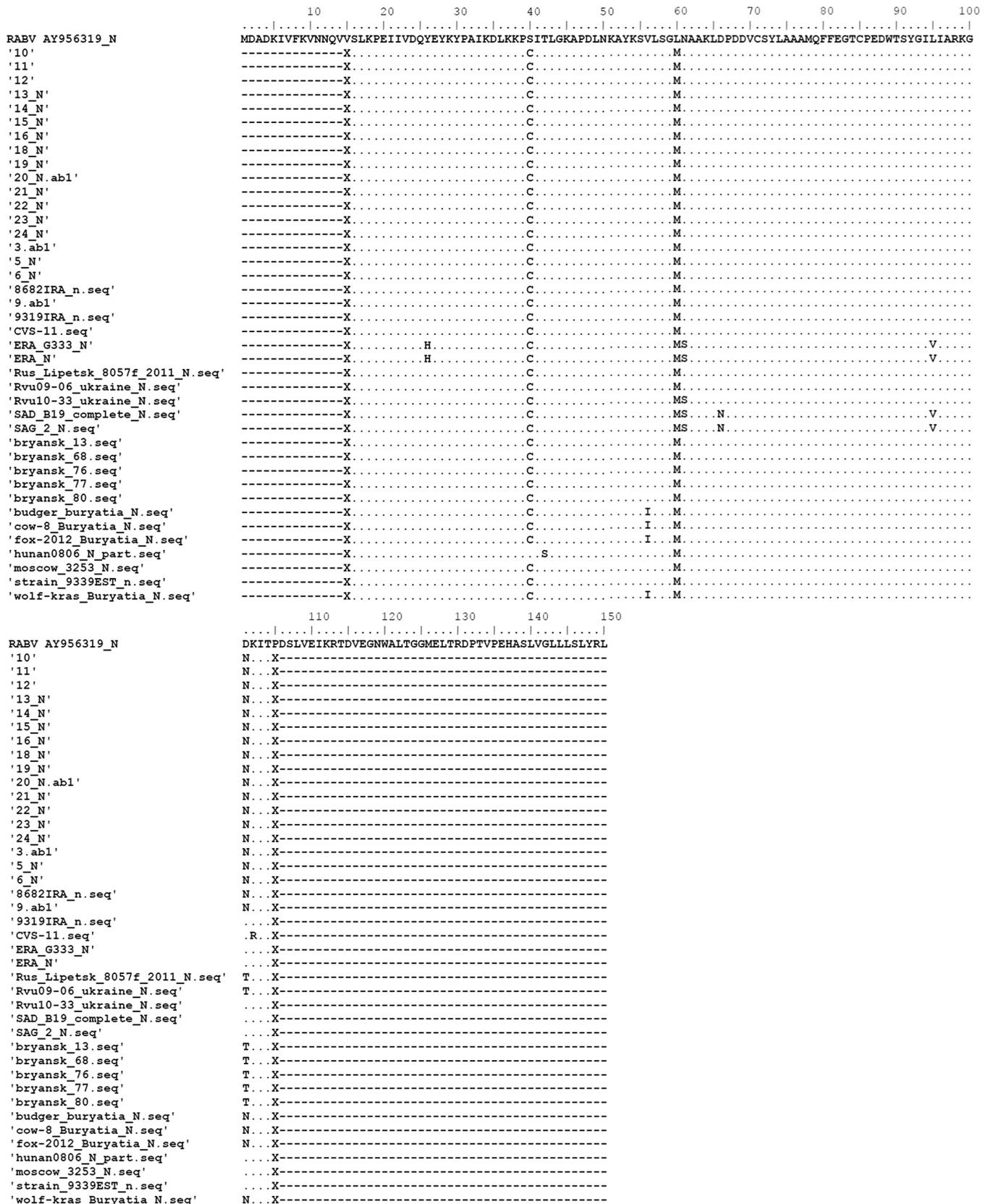


Рис. 3. Сравнение аминокислотных последовательностей фрагмента белка N изолятов из Кировской области с последовательностями референсных штаммов и полевых изолятов, представленных в NCBI.

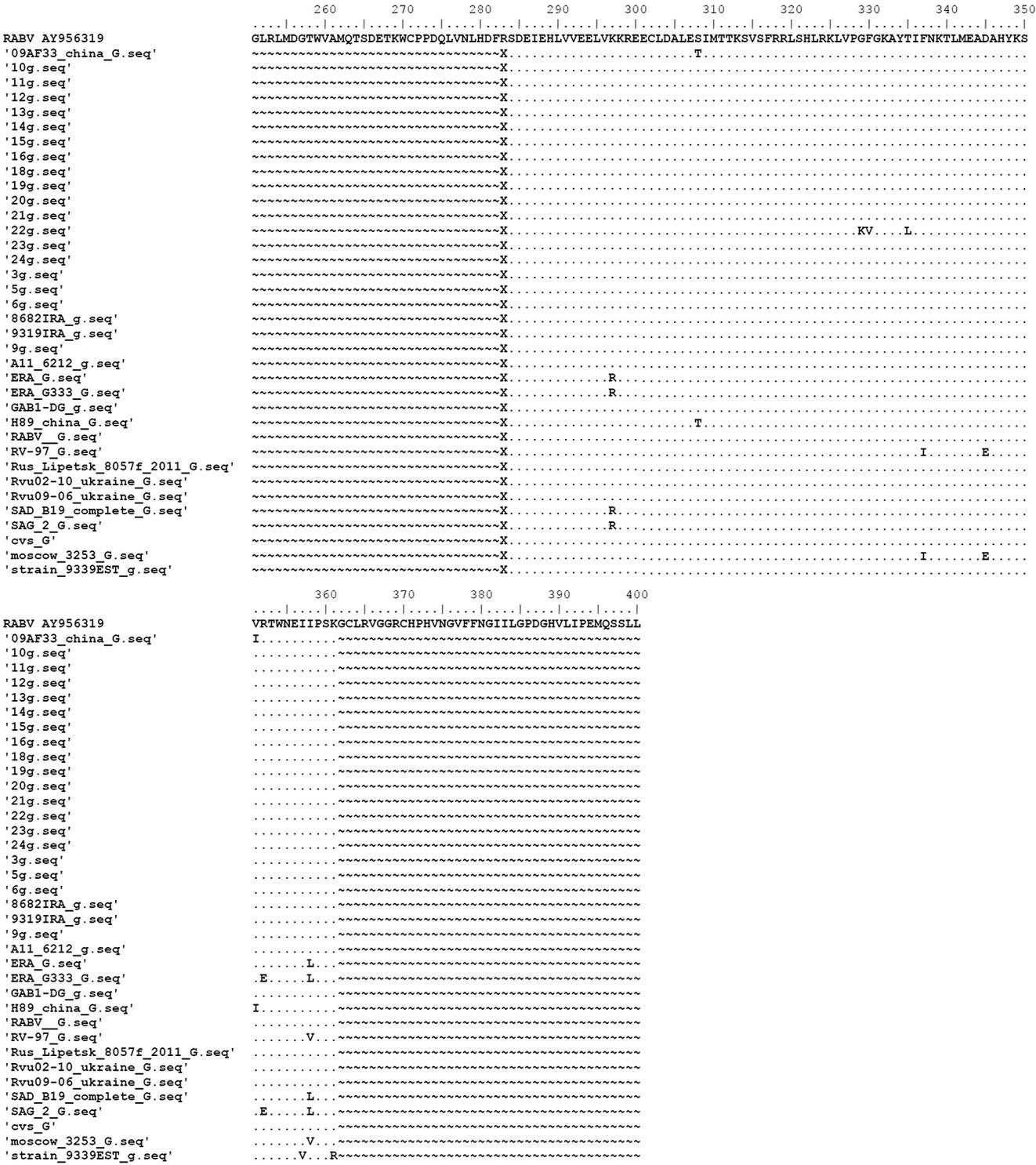


Рис. 4. Сравнение аминокислотных последовательностей фрагмента белка G изолятов из Кировской области с последовательностями референсных штаммов и полевых изолятов, представленных в NCBI.

кулировавшим в Бурятии в 2012 г. В 2014 г. были проведены исследования полевых изолятов, циркулирующих в Брянской области, где также проводилась оральная вакцинация [10]. Полевые изоляты из Брянской области образуют отдельную группу, генетически близкую к изолятам, выделенным в 2011 г. в Липецке, а также к украинскому изоляту 2009 г.

Ранее исследовали российские изоляты в сравнении с изолятами, циркулирующими в близлежащих европейских странах, и результаты подтверждают распределение изолятов по географическому принципу [11, 12]. Кроме того, представляется интересной идентичность аминокислотной последовательности на заданном участке кировских изолятов и изолята RABV 8682IRA, выделенного в Иране [13].

Ранее также проводились исследования вакцинных штаммов. Так, А. Метлин и соавт. [14] исследовали российский вакцинный штамм RV-97. Результаты исследования показали, что данный штамм образует отдельную филогенетическую ветвь на дендрограмме, имеет уникальные замены и не ревертирует к полевым изолятам.

В случае исследования нуклеотидной последовательности фрагментов генов *N* и *G* кировских изолятов соответствующие последовательности генов вакцинного штамма ERAG333 генетически достаточно далеко отстоят от таковых у полевых изолятов вируса бешенства (см. рис. 1 и 2).

При сравнении со штаммом ERAG333, выделенным из вакцины, выявлены замены в последовательностях аминокислот фрагментов генов *N* и *G*. Согласно данным предыдущих исследований, скорость мутирования составляет  $1,4 \cdot 10^{-4}$  замены на сайт в год [15]. Это может означать, что штамм, выделенный из вакцины, не является родоначальником вирусов, выделенных из исследуемых образцов.

Накопление вирусных мутаций в геномах полевых изолятов, особенно на территориях проведения оральной вакцинации, может изменить структуру данных геномов. Несомненно, необходимо регулярно проводить молекулярно-генетические исследования как полевых изолятов, так и используемых живых вакцин. Исследование, выполненное нами в Кировской области, показало, что в данном случае реверсия вакцинного штамма отсутствует, так как выявлены существенные геномные различия между исследуемыми образцами и штаммом ERAG333, используемым в вакцине.

**Финансирование.** Поддержка исследования осуществлялась с помощью государственного бюджета.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ЛИТЕРАТУРА (пп. 8, 9, 12–14 см. REFERENCES)

1. Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору. Available at: [www.fsvps.ru](http://www.fsvps.ru).
2. Всемирная организация здравоохранения. Available at: <http://www.who.int/ru>.
3. Львов Д.К., ред. *Руководство по вирусологии: Вирусы и вирусные инфекции человека и животных*. М.: ООО «Издательство «Медицинское информационное агентство»; 2013.
4. Васильев Д.А., Луговцев В. Ю., ред. *Вирусы вызывающие болезни обиче для многих видов сельскохозяйственных животных. Курс лекций по вирусологии. Часть вторая*. Ульяновск; 2004.
5. Сливко И.А., Сафонов Г.А., Хрипунов Е.М., Гогин А.Е., Жестерев В.И., Баньковский Д.О. Возможные причины неудачи оральной антирабической иммунизации диких плотоядных животных в Российской Федерации. *Ветеринария*. 2013; (10): 27–31.
6. Шабейкин А.А., Гулюкин А.М., Цареградский П.Ю., Паршикова А.В., Южаков А.Г., Зайкова О.Н. Анализ текущей эпизоотической ситуации по бешенству на территории Российской федерации. *Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные*. 2015; (4): 5–8.
7. Баньковский Д.О. *Иммунобиологические свойства штамма ERAG 333 вируса бешенства для изготовления оральной антирабической вакцины: Дисс. ... канд. вет. наук*. Щелково; 2010.
8. Елаков А.Л., Зайкова О.Н., Кочергин-Никитский К.С., Гребенникова Т.В., Алипер Т.И. Мониторинг бешенства у диких животных в Брянской области. *Ветеринария*. 2015; (1): 11–4.
9. Метлин А.Е. *Молекулярно-биологические характеристики полевых изолятов и аттенуированных штаммов вируса бешенства: Дисс. ... канд. вет. наук*. Владимир; 2004.
10. Чупин С.А., Чернышова Е.В., Метлин А.Е. Генетическая характеристика полевых изолятов вируса бешенства, выявленных на территории Российской Федерации в период 2008–2011 гг. *Вопросы вирусологии*. 2013; (4): 44–9.
11. The Federal Service for Veterinary and Phytosanitary Surveillance. Available at: [www.fsvps.ru](http://www.fsvps.ru). (in Russian)
12. World Health Organization. Available at: <http://www.who.int/ru>. (in Russian)
13. L'vov D.K., ed. *Guidelines for Virology: Viruses and Viral Infections of Humans and Animals [Руководство по вирусологии: Вирусы и вирусные инфекции человека и животных]*. Moscow: ООО «Izdatel'stvo «Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo»; 2013. (in Russian)
14. Vasil'ev D.A., Lugovtsev V.Yu., eds. *The Virus Causes Disease Common to Many Species of Animals. Course of Lectures on Virology. Part II [Virussy vyzyvayushchie bolezni obshchie dlya mnogikh vidov sel'skokhozyaystvennykh zhivotnykh. Kurs lektsiy po virusologii. Chast' vtoraya]*. Ul'yanovsk; 2004. (in Russian)
15. Slivko I.A., Safonov G.A., Khripunov E.M., Gogin A.E., Zhesteriev V.I., Ban'kovskiy D.O. Possible reasons for the failure of oral rabies immunization of wild carnivores in the Russian Federation. *Veterinariya*. 2013; (10): 27–31. (in Russian)
16. Shabaykin A.A., Gulyukin A.M., Tsaregradskiy P.Yu., Parshikova A.V., Yuzhakov A.G., Zaykova O.N. Analysis of the current epizootic situation of rabies in the territory of the Russian Federation. *Rossiyskiy veterinarnyy zhurnal. Sel'skokhozyaystvennyye zhivotnyye*. 2015; (4): 5–8. (in Russian)
17. Ban'kovskiy D.O. *Immunobiological Properties ERAG 333 Strain of Rabies Virus for the Manufacture of an Oral Rabies Vaccine: Diss.* Shchelkovo; 2010. (in Russian)
18. Fehlnher-Gardiner C., Nardine-Davis S., Armstrong J., Muldoon F., Bachmann P., Wandeler A. Era vaccine-derived cases of rabies in wildlife and domestic animals in Ontario, Canada, 1989–2004. *J. Wildl. Dis.* 2008; 44 (1): 71–85.
19. Müller T., Bätza H.J., Beckert A., Bunzenthall C., Cox J.H., Freuling C.M. et al. Analysis of vaccine-virus-associated rabies cases in red foxes (*Vulpes vulpes*) after oral rabies vaccination campaigns in Germany and Austria. *Arch. Virol.* 2009; 154 (7): 1081–91.
20. Elakov A.L., Zaykova O.N., Kochergin-Nikitskiy K.S., Grebennikova T.V., Aliper T.I. Monitoring of rabies Wild animals in the Bryansk region. *Veterinariya*. 2015; (1): 11–4. (in Russian)
21. Metlin A.E. *Molecular Biological Characteristics of Field Isolates and Attenuated Strains of Rabies Virus: Diss.* Vladimir; 2004. (in Russian)
22. Metlin A.E., Rybakov S., Gruzdev K., Neuvonen E., Huovilainen A. Genetic heterogeneity of Russian, Estonian and Finnish field rabies viruses. *Arch. Virol.* 2007; 152 (9): 1645–54.
23. Pant G.R., Lavenir R., Wong F.Y., Certoma A., Larrous F., Bhatta D.R. et al. Recent emergence and spread of an arctic-related phylogenetic lineage of rabies virus in Nepal. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2013; 7 (11): e2560.
24. Metlin A., Paulin L., Suomalainen S., Neuvonen E., Rybakov S., Mikhailishin V. et al. Characterization of Russian rabies virus vaccine strain RV-97. *Virus Res.* 2008; 132 (1–2): 242–7.
25. Chupin S.A., Chernyshova E.V., Metlin A.E. Genetic characterization of field isolates of rabies virus identified in the territory of the Russian Federation in 2008–2011. *Voprosy virusologii*. 2013; (4): 44–9. (in Russian)

Поступила 15.01.16

Принята в печать 26.01.16