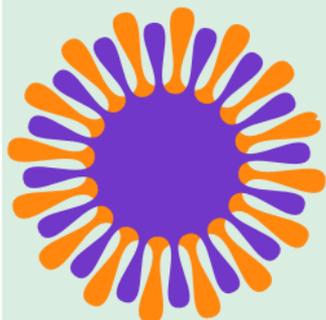


Научно-  
исследовательский  
институт гриппа

45 лет

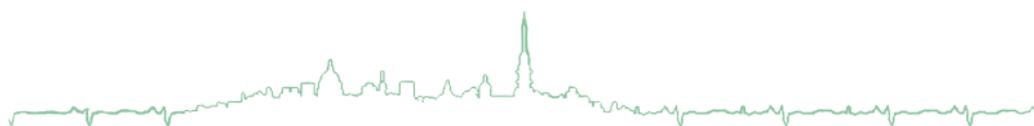
## Юбилейная научно-практическая конференция



Грипп: эпидемиология,  
вирусология, профилактика  
и лечение

24–25 октября  
2012 г.

## Сборник материалов



## СОДЕРЖАНИЕ

Можно ли победить грипп? (Ершов Ф.И.).....	4
<b>I. МОЛЕКУЛЯРНО–БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВИРУСОВ ГРИППА</b>	
Вариации антигенной структуры гемагглютинина вируса гриппа А и проблема пандемий (Каверин Н.В.).....	5
Генетическое разнообразие и молекулярная эволюция вирусов гриппа в России в 2006–2012 годах (Комиссаров А.Б., Писарева М.М., Стукова М.А. и др.) .....	6
Компьютерный анализ структур РНК вируса гриппа: новые гипотезы для старых проблем (Чурсов А., Фришман Д., Шнейдер А.).....	8
Возможности технологии биологических микрочипов для диагностики и молекулярно–генетической характеристики вирусов гриппа (Васин А.В.) .....	9
Филогенетический анализ генов поверхностных и внутренних белков вирусов гриппа А подтипов H3N6 и H3N8, выделенных от диких птиц в Республике Казахстан (Жуматов К.Х., Кыдырманов А.И., Карамендин К.О. и др.) .....	10
Эколого–вирусологические и генетические исследования вирусов гриппа диких птиц в Казахстане (2002–2010 гг.) (Кыдырманов А., Саятов М., Карамендин К. и др.).....	11
<b>II. ОСОБЕННОСТИ ЭТИОЛОГИИ И ЭПИДЕМИОЛОГИИ ГРИППА В ПОСЛЕДНЕЕ ДЕСЯТИЛЕНИЕ</b>	
Основные итоги и перспективы дальнейшего совершенствования деятельности НЦГ ВОЗ в сети глобального надзора и контроля за гриппом (GISRS) (Соминина А.А., Еропкин М.Ю., Грудинин М.П. и др.) .....	12
Эволюция вирусов гриппа в России в течение последней пандемии и в пост–пандемический период (Еропкин М.Ю., Коновалова Н.И., Даниленко Д.М. и др.).....	13
Социркуляция вирусов гриппа и ОРВИ в период эпидемий и пандемии (Бурцева Е.И.).....	15
<b>III. ПЕРСПЕКТИВНЫЕ РАЗРАБОТКИ ПРОТИВОВИРУСНЫХ ПРЕПАРАТОВ</b>	

Триазавирин — препарат нового поколения для лечения вирусных инфекций  
(Киселев О.И., Деева Э.Г., Мельникова Т.И. и др.)..... 16

Полимераза вируса гриппа как мишень для противовирусных  
химиопрепаратов (Зарубаев В.В.)..... 17

#### **IV. ПАТОГЕНЕЗ И КЛИНИКА ГРИППОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ**

Механизм развития желудочно–кишечного синдрома при гриппе  
(Дондурей Е.А.)..... 18

Аденовирусная инфекция у детей (Янина М.А., Осидак Л.В., Милькинт К.К. и  
др.)..... 19

Оценка эффективности включения Беталейкина в терапию гриппа,  
осложненного пневмонией (Волощук Л.В., Мушкатина А.Л., Головачева Е.Г. и  
др.)..... 26

Результаты изучения эффективности цитокинсодержащей терапии при ОРВИ  
(Волощук Л.В., Головачева Е.Г., Мушкатина А.Л. и др.)..... 28

Клиника и современная этиопатогенетическая терапия кори у детей  
(Тимченко В.Н., Павлова Е.Б., Федючек О.О.)..... 35

#### **V. РАЗРАБОТКИ СОВРЕМЕННЫХ ПРОТИВОГРИППОЗНЫХ ВАКЦИН**

Разработка рекомбинантных противогриппозных вакцин нового поколения на  
основе М2 белка (Блохина Е.А., Куприянов В.В., Котляров Р.Ю. и др.)..... 36

Получение кандидатных универсальных противогриппозных вакцин на основе  
химерных частиц вируса табачной мозаики (Иванов П.А., Гасанова Т.В.,  
Петухова Н.В.) ..... 37

Влияние стабильности вируса гриппа на качество вакцин (Романова Ю.Р.) ..... 38

Конструирование и сравнительные испытания экспериментальных вакцин  
против гриппа H5N1 (Гамбарян А.С., Ломакина Н.Ф., Боравлева Е.Ю. и др.)  
Designing and parallel testing of anti-H5N1 influenza experimental vaccines  
(Gambaryan A.S., Lomakina N.F., Boravleva E.Y. et al.)..... 39

Реассортация эпидемических и вакцинных штаммов вируса гриппа  
в эксперименте (Киселева И.В., Федорова Е.А., Дубровина И.А. и др.)..... 41

Материалы сборника подготовлены к изданию сотрудниками Научно–организационного отдела «НИИ гриппа». Все права принадлежат авторам.

## **МОЖНО ЛИ ПОБЕДИТЬ ГРИПП?**

Академик РАМН Ершов Ф. И.

ФГБУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, Москва, Россия

За 80 лет, прошедших со времени открытия вирусов гриппа, детально изучены особенности их репродукции, закономерности изменчивости, патогенез гриппозной инфекции, реакции естественного и адаптивного иммунитета. Здравоохранением разработана и ежегодно осуществляется система мероприятий по борьбе с гриппом, включающая экспресс–диагностику, профилактические прививки, раннюю терапию сезонных подъемов заболеваемости, экстренную профилактику, помощь на дому, госпитализацию по клиническим показаниям и т.д. Фармакотерапия гриппа весьма разнообразна и включает этиотропные препараты, иммуномодуляторы, патогенетическую и симптоматическую терапию. Постоянно продолжается создание новых эффективных антигриппозных препаратов.

Почему же грипп до сих пор продолжает оставаться плохо контролируемой инфекцией?

Существует ряд причин, объясняющих этот парадокс. К ним относятся: ubicquitarность распространения и высокая контагиозность возбудителя, высокий уровень изменчивости его свойств, быстро развивающаяся резистентность к антигриппозным препаратам, нерациональная фармакотерапия. Помимо приведенных выше причин, в основе плохой контролируемости гриппа лежит практическая невозможность охвата всего населения страны комплексом названных мероприятий. Например, применение вакцин или современных препаратов этиотропного действия явно недостаточно и охватывает лишь 5–10% населения. Лишь выборочные контингенты (в основном «группы риска») получают адекватную медицинскую помощь, что же касается всех остальных, то их уделом остается самолечение.

Парадоксальность ситуации, сложившейся к настоящему времени, заключается в явном противоречии достижений науки, разработавшей эффективные способы индикации, предупреждения и лечения гриппа, с практическими результатами борьбы с этой инфекцией.

Иными словами, наукой созданы теоретические предпосылки для победы над гриппом, однако, учитывая все сказанное выше, в обозримом будущем такая победа не представляется реальной.

## I. МОЛЕКУЛЯРНО–БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВИРУСОВ ГРИППА

### ВАРИАЦИИ АНТИГЕННОЙ СТРУКТУРЫ ГЕМАГГЛЮТИНИНА ВИРУСА ГРИППА А И ПРОБЛЕМА ПАНДЕМИЙ

Академик РАМН Каверин Н. В.

ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского» Минздрава РФ, Москва, Россия

Вирусы гриппа А отличаются огромным разнообразием и широким кругом хозяев. Наиболее вариабельны поверхностные белки вируса — гемагглютинин и нейраминидаза. Гемагглютинин является мишенью для нейтрализующих антител, играющих основную роль в защите от вирусной инфекции. К настоящему времени известно 17 антигенных подтипов гемагглютинина. В 1981 году группа Джона Скейла опубликовала трехмерную модель гемагглютинина и осуществила антигенное картирование гемагглютинина Н3, при котором были выявлены позиции аминокислотных остатков, распознаваемых нейтрализующими антителами.

В 2001 году был проведен кристаллографический анализ структуры гемагглютининов подтипов Н5 и Н9, что создало основу для картирования антигенных сайтов этих подтипов. Антигенное картирование было проведено в лаборатории физиологии вирусов ФГБУ НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского. Для подтипа Н5 в качестве вирусов дикого типа были использованы штаммы A/Mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2) и A/Vietnam/1203/04 (H5N1) [1, 2]. Были также определены [3] аминокислотные позиции, распознаваемые моноклональными антителами к штамму A/Duck/Novosibirsk/56/2005 (H5N1), принадлежащему к вирусам H5N1 цинхайской ветви, широко распространившимся в Западной Сибири, в Европе, на Ближнем Востоке, в Африке. Проведенная работа позволила раскрыть не только локализацию, но и детальную структуру двух наиболее важных антигенных сайтов — латеральной петли и дистальной поверхности глобулы. Ранее, до наших работ, такой уровень детализации выявления антигенных зон в трехмерной структуре молекулы гемагглютинина был достигнут только для гемагглютинина Н3.

Антигенное картирование гемагглютинина подтипа Н9 выявило, что аминокислотные остатки в антигенных сайтах сгруппированы совершенно иначе, чем у других подтипов гемагглютинина [4]. Столь резкие отличия гемагглютинина подтипа Н9 от подтипа Н3 и всех остальных, картированных к настоящему времени, коррелируют с особенностями трехмерной структуры гемагглютинина Н9, который, в отличие от других подтипов, не имеет латеральной петли.

Физическая структура и локализация антигенных сайтов выявлены лишь для немногих подтипов гемагглютинина. Для суждения о потенциале разных подтипов в качестве гемагглютининов будущих пандемических вирусов необходима интенсификация исследований в этом направлении.

## Литература

1. Kaverin NV, Rudneva IA, Ilyushina NA, Varich NL, Lipatov AS, Smirnov YA, Govorkova EA, Gitelman AK, Lvov DK, Webster RG. 2002. Structure of antigenic sites on the hemagglutinin molecule of H5 avian influenza virus and the phenotypic variation of escape mutants. *Journal of General Virology* 83, 2497-2505.
2. Kaverin NV, Rudneva IA, Govorkova EA, Timofeeva TA, Shilov AA, Kochergin-Nikitsky KS, Krylov PS, Webster RG. 2007. Epitope mapping of the hemagglutinin molecule of a highly pathogenic H5N1 influenza virus by using monoclonal antibodies. *Journal of Virology* 81, 12911-12917.
3. Rudneva IA, Kushch AA, Masalova OV, Timofeeva TA, Klimova RR, Shilov AA, Ignatieva AV, Krylov PS, Kaverin NV. 2010. Antigenic epitopes in the hemagglutinin of Qinghai-type influenza H5N1 virus. *Viral Immunology* 23, 181-187.
4. Kaverin NV, Rudneva IA, Ilyushina NA, Lipatov AS, Krauss S., Webster RG. 2004. Structural differences among hemagglutinins of influenza A virus subtypes are reflected in their antigenic architecture: analysis of H9 escape mutants. *Journal of Virology* 78, 240-249.

## ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭВОЛЮЦИЯ ВИРУСОВ ГРИППА В РОССИИ В 2006–2012 ГОДАХ

Комиссаров А.Б., Писарева М.М., Стукова М.А., Бузицкая Ж.В., Паянкова А.А., Фадеев А.В., Елпаева Е.А., Задонская А.В., Грудинин М.П.  
ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, С.-Петербург, Россия

Грипп является примером заболевания, вызываемого вирусом, постоянная эволюция которого приводит к ежегодным эпидемиям. В основе эволюции вирусов гриппа лежит накопление мутаций, приводящих к антигенному дрейфу и возникновению новых вариантов вируса, что обеспечивает гетерогенность вирусной популяции и лежит в основе формирования различных генетических линий. Особенности генетической структуры позволяют вирусу гриппа эволюционировать путем реассортации геномных сегментов различных штаммов. Появление в 2009 году нового пандемического штамма А/Н1N1pdm подтвердило потенциал эволюционных возможностей вируса гриппа.

Нами проведен молекулярно–генетический анализ более 280 штаммов вируса гриппа А подтипов Н1N1 и Н3N2 и вируса гриппа В, циркулировавших на территории России в 2006–2012 гг. Вирусы гриппа А подтипа Н1N1 в 2006–2009 годах относились к трем кладам: 1, 2с и 2в. В 2007–2009 годах преимущественно циркулировали вирусы гриппа А подтипа Н1N1 клады 2в и 2с. Большая часть штаммов клады 2в, выделенных в европейской части России (более 91% в 2007–2009 гг. и более 82% в 2008–2009 гг.), несла мутацию устойчивости к озельтамивиру, тогда как вирусы клады 2с — устойчивости к ремантадину.

Вирусы гриппа А/Н1N1pdm2009, циркулировавшие на территории России, были подобны вакцинному штамму А/Калифорния/07/2009, и, как и большинство штаммов,

циркулировавших в различных странах, относились к кладе 7. Штаммы, выделенные в 2009 году, были генетически однородны, тогда как штаммы, выделенные в 2010–2011 гг. были генетически гетерогенны и относились к 6-ти генетическим группам. В 2011–2012 гг. вирусы гриппа А/Н1N1pdm2009 в эпидемическом процессе практически не участвовали, небольшое количество охарактеризованных нами вирусов относилось к генетической группе А/Санкт-Петербург/27/2011–подобных.

Филогенетический анализ вирусов гриппа А подтипа Н3N2 показал, что эволюция данных вирусов была связана с антигенным дрейфом. В 2006–2007 гг. продолжали циркулировать вирусы, подобные А/Висконсин/67/2005, а также выделялись вирусы подобные А/Брисбен/10/2007. Штаммы вируса гриппа А подтипа Н3N2, подобные А/Брисбен/10/2007, продолжавшие циркулировать в 2007–2009 гг., являлись эволюционным продолжением вирусов, циркулировавших 2006–2007 гг. В 2009–2010 гг. вирусы гриппа А подтипа Н3N2 в эпидемическом процессе на территории России не участвовали, а в 2010–2011 гг. выделялись в единичных случаях, но отличались гетерогенностью и относились к 2-м кладам (А/Виктория/208/2009, А/Перт/16/2009) и 4-м генетическим группам (А/Перт/10/2010, А/Айова/19/2010, А/Стокгольм/18/2011 и А/Виктория/210/2009). Штаммы вируса гриппа А подтипа Н3N2 2011–2012 гг. относились к кладе А/Виктория/208/2009 к генетической группе А/Стокгольм/18/2011, образовывали две группы с характерными заменами в антигенных сайтах А, В2 и С. Штаммы вируса гриппа А подтипа Н3N2 2006–2012 гг. были чувствительны к озельтамивиру, но устойчивы к ремантадину.

Вирусы гриппа В принимали участие в эпидемическом процессе в 2006–2012 гг., при этом, как правило, отмечалась циркуляция штаммов, относящихся либо к Викторианской, либо Ямагатской линиям. В 2006–2007 гг. выделялись штаммы Викторианской линии, подобные В/Малазия/2506/2004. В 2007–2008 гг. — штаммы Ямагатской линии, подобные В/Флорида/4/2006 (98%), а также В/Брисбен/4/2006. В эпидемическом сезоне 2008–2009 гг. в циркуляцию вошли вирусы Викторианской линии, антигенно подобные В/Брисбен/60/2008, которые продолжали циркулировать в 2009–2012 гг. Эпидемический сезон 2011–2012 гг. отличался одновременной циркуляцией штаммов двух генетических линий. При этом 20% штаммов, выделенных в Сибири и на Дальнем Востоке, относились к Ямагатской линии и были подобны В/Висконсин/01/2010.

Таким образом, за изученный период произошли существенные изменения в генетической структуре циркулировавших на территории РФ вирусов гриппа А и В. Проведенный анализ позволил выявить основные направления эволюции вирусов гриппа.

## КОМПЬЮТЕРНЫЙ АНАЛИЗ СТРУКТУР РНК ВИРУСА ГРИППА: НОВЫЕ ГИПОТЕЗЫ ДЛЯ СТАРЫХ ПРОБЛЕМ

Чурсов А.<sup>1</sup> (a.chursov@wzw.tum.de), Фришман Д.<sup>1,2</sup> (d.frishman@wzw.tum.de), Шнейдер А.<sup>3</sup> (ashneider@curelab.com)

1 – Технический Университет Мюнхена, Мюнхен, Германия

2 – Институт Биоинформатики и Системной Биологии, Нойхерберг, Германия

3 – CureLab Inc., Нидхем, США

Вторичные структуры РНК играют важные роли в различных биологических процессах. К сожалению, в данный момент не существует инструментов, способных предсказать точную структуру РНК. В частности это связано с тем, что одна и та же последовательность РНК может сворачиваться в совершенно разные структуры, представляя таким образом целый ансамбль вторичных структур. В то же время, существуют математические модели, которые вместо предсказания одной оптимальной структуры предсказывают вероятность нахождения каждого из нуклеотидов находится в спаренном состоянии. Одну из таких моделей мы использовали для изучения структур мРНК вируса гриппа<sup>1</sup>.

Мы предложили гипотезу: небольшое изменение в температуре (32–39°C) может приводить к изменениям в РНК структурах вируса гриппа, и эти изменения структур могут быть различными для мРНК диких штаммов гриппа и соответствующих холодоадаптированных температурно–чувствительных мутантов<sup>2,3</sup>. Мы идентифицировали такие области, в которых различия во вторичных структурах РНК при двух различных температурах наиболее вероятны. Оказалось, что такие области не идентичны для диких штаммов и холодоадаптированных температурно–чувствительных мутантов. Различные реакции мРНК структур на изменение температуры были идентифицированы в генах NS2, PA, PB2 и NP. Различия в изменениях структур, вызванных изменениями температуры, между дикими штаммами вируса гриппа и соответствующими холодоадаптированными температурно–чувствительными мутантами могут быть еще не изученным молекулярным механизмом, являющимся причиной этого феномена.

Следующий вопрос, интересовавший нас, заключался в следующем: существует ли взаимосвязь между мутациями, происходящими в вирусе гриппа, и структурами РНК? Для решения этой задачи нам прежде всего требовалось ввести понятия структуризованности и мутабельности позиций. Формализовав эти понятия, мы построили профили их распределения вдоль последовательностей, которые показали, что несмотря на равномерность распределения наиболее мутабельных позиций вдоль последовательности, существуют очень консервативные области структуры. В свою очередь, это может говорить о том, что в мРНК вируса гриппа могут находиться области вторичной структуры, содержащие ранее неизвестные функционально важные элементы, сохранение которых имеет большое значение для вируса гриппа.

1. Hofacker, I.L., Fontana, W., Stadler, P.F., Bonhoeffer, L.S., Tacker, M. and Schuster, P. (1994) Fast Folding and Comparison of Rna Secondary Structures. *Monatsh Chem*, **125**, 167-188.

2. Cox NJ, Kitame F, Kendal AP, Maassab HF, Naeve C. Identification of sequence changes in the cold-adapted, live attenuated influenza vaccine strain, A/Ann Arbor/6/60 (H2N2). *Virology* 1988; 167:554-67.
3. Klimov AI, Cox NJ, Yotov WV, Rocha E, Alexandrova GI, Kendal AP. Sequence changes in the live attenuated, cold-adapted variants of influenza A/Leningrad/134/57 (H2N2) virus. *Virology* 1992; 186:795-7.

## **ВОЗМОЖНОСТИ ТЕХНОЛОГИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ МИКРОЧИПОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И МОЛЕКУЛЯРНО–ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ХАРАКТЕРИСТИКИ ВИРУСОВ ГРИППА**

Васин А.В.

ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Геном вирусов гриппа типа А (ВГА) состоит из 8 сегментов однонитевой (–)-РНК, кодирующих не менее 12 белков. Несмотря на значительные успехи в понимании структуры и функций вирусных РНК и белков, а также их взаимодействия с различными клеточными факторами, многие стадии репликативного цикла ВГА остаются невыясненными. Для построения многопараметрической модели взаимодействия между вирусом и клетками организма–хозяина применяют современные высокопроизводительные методы функциональной геномики и протеомики, которые позволяют проводить множественный одновременный анализ взаимодействий на уровне белков и нуклеиновых кислот (мРНК, микроРНК, вРНК). Одним из таких методов является технология микрочипов, внедрение которой в лабораторную практику «НИИ гриппа» было инициировано в 2006 году. В настоящее время метод олигонуклеотидных и белковых микрочипов применяют для диагностики и выявления ВГА, а также для профилирования экспрессии клеточных мРНК, микроРНК и белков в ответ на инфицирование ВГА, введение лекарственных препаратов, вакцин и т.п. В частности, выполняются научно–исследовательские работы по оценке транскриптома клеток, инфицированных ВГА разной степени патогенности, а также работы по анализу влияния противовирусного препарата «Триазавирин» на клеточные сигнальные пути. Кроме задач, связанных с профилированием полногеномной экспрессии, ведутся разработки диагностических и узкоспециализированных микрочипов. В частности, разработан олигонуклеотидный микрочип, позволяющий проводить определение и субтипирование всех возможных подтипов ВГА. Создана система оценки иммунного ответа организма при «цитокиновом шторме», вызываемом патогенными штаммами ВГА. Она состоит из олигонуклеотидного и иммунологического (в формате ELISA) микрочипов для определения, соответственно, мРНК и белков IL1B, IL2, IL4, IL6, IL10, IL12B, IL18, IFNG, TNF. В настоящее время метод биологических микрочипов, предложенный немногим более 20 лет назад, получил заслуженное признание и рутинно используется многими молекулярно–биологическими лабораториями по всему миру. В том числе и с использованием данного метода для ВГА показано существование более 5000 потенциальных и экспериментально

подтвержденных взаимодействий между более чем 200 клеточными и 10 вирусными факторами. Такие данные абсолютно необходимы для понимания процессов протекания ВГА инфекции и разработки эффективных средств борьбы с гриппом.

## **ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГЕНОВ ПОВЕРХНОСТНЫХ И ВНУТРЕННИХ БЕЛКОВ ВИРУСОВ ГРИППА А ПОДТИПОВ Н3N6 И Н3N8, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ДИКИХ ПТИЦ В РЕСПУБЛИКЕ КАЗАХСТАН**

Жуматов К.Х., Кыдырманов А.И., Карамендин К.О., Саятов М.Х., Ишмухаметова Н.Г, Асанова С.Е., Даулбаева К.Д.

Республиканское государственное предприятие «Институт микробиологии и вирусологии Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан»

Представлены результаты секвенирования фрагментов М, NP, NS и HA генов казахстанских изолятов вирусов гриппа A/garganey/Korgalzhyn/865/04 (H3N6), A/graylag goose/Korgalzhyn/1867/06 (H3N6), A/teal/Korgalzhyn/1797/06 (H3N8), A/teal/South Kazakhstan/8048/08 (H3N8). Выравнивание секвенированных последовательностей, филогенетический анализ и построение древ проведены с помощью компьютерных программ BioEdit и MEGA версии 4 методом «присоединения соседей» на основе 1000 повторов с использованием последовательностей из GeneBank [1].

Филогенетический анализ HA, NP, М и NS генов казахстанских изолятов вируса гриппа с подтипом HA H3 указывает на гетерогенность их популяции. Так, установлено, что по гену HA изолят A/garganey/Korgalzhyn/865/04 (H3N6) сходен с вирусом A/mallard/Netherlands/05/2001 (H3N6) и входит в кластер европейских штаммов. В отличие от него, изолят A/teal/Korgalzhyn/1797/06 (H3N8) проявил высокую степень родства со штаммом A/aquatic bird/Korea/CN-1/2004 (H3N6), и по этому гену включен в кластер азиатских вирусов внутри евразийской линии. По NP гену вирус A/teal/Korgalzhyn/1797/06 (H3N8) отнесен к отдельному кластеру, в отличие от изолятов A/garganey/Korgalzhyn/865/04 (H3N6), A/graylag goose/Korgalzhyn/1867/06 (H3N6), выделенных вместе с ним в одной местности и в одно и то же время.

Выявлена высокая степень филогенетического родства изолятов из Центрального Казахстана по М гену и их отличие от вируса A/teal/South Kazakhstan/8048/08.

По последовательности нуклеотидов NS гена изоляты A/teal/Korgalzhyn/1797/06, A/teal/South Kazakhstan/8048/08 значительно отличались от A/common tern/Korgalzhyn/847/04 и A/graylag goose/Korgalzhyn/1867/06, и были отнесены к генетическим аллелям А и В, соответственно.

1. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. MEGA4. Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 //Mol. Biol. Evol. - 2007. -Vol.24. –P. 1596-1599.

## **ЭКОЛОГО–ВИРУСОЛОГИЧЕСКИЕ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ВИРУСОВ ГРИППА ДИКИХ ПТИЦ В КАЗАХСТАНЕ (2002–2010 ГГ.)**

Кыдырманов А., Саятов М., Карамендин К., Жуматов К., Асанова С., К. Даулбаева, Ишмухаметова Н., Касымбеков Е.

Институт микробиологии и вирусологии КН МОН РК, Алматы, Казахстан

Изучение экологии и эволюции вирусов гриппа А в условиях Казахстана представляет особый интерес, так как Республика занимает уникальное географическое положение в центре Евразии, и через ее огромную территорию проходят транспалеарктические миграционные пути диких птиц.

При вирусологическом исследовании 5430 биопроб от 159 видов диких птиц, собранных в различных регионах Казахстана в период с 2002 по 2010 гг., выделено 119 изолятов вируса гриппа А от 15 видов утиных, восьми — чайковых, двух — поганковых и по одному у пастушковых и врановых. От них изолированы вирусы гриппа А с семью подтипами HA и пятью – NA в восьми различных комбинациях (H1N2, H3N6/N8, H4N6, H5N1/N3, H11N2, H13N6, H16N3). Определены нуклеотидные последовательности HA, NP, M и NS генов казахстанских изолятов вируса гриппа А. Вирусы H1N2, выделенные от различных видов диких птиц, были идентичными по HA гену, но различались по M гену, который принадлежал к разным эволюционным линиям. При филогенетическом анализе изоляты H3N6 2004 г. проявляли близкое родство с европейскими штаммами, тогда как изоляты H3N8 2006 г. по этому гену находились в кластере азиатских вирусов евразийской линии. Казахстанские изоляты H4N6 являются возможными природными реассортантами H4N8 и H4N6–подобных вирусов, изолированных в Южной Африке и Китае в 2004–2005 гг. Показано, что по нуклеотидным последовательностям гена HA изоляты H5N1 и H5N2 занимают отдельную ветвь с вирусами из Китая, Монголии, Японии, Приморья и образуют кластер азиатских штаммов, который ответвляется от гомогенных в филогенетическом отношении европейских штаммов 2005-2008 гг. Изоляты H5N3 от гусей идентичны с западноевропейскими штаммами вируса гриппа H5. По гену HA казахстанский изолят А/серебристая чайка/Атырау/2186/07 (H11N2) относится к североамериканской линии. Изоляты вируса гриппа подтипа H13 образуют группу вирусов, филогенетически восходящих к прототипному варианту A/gull/Maryland/704/1977. Вирус гриппа А/серебристая чайка/Атырау/2216/07 (H16N3) входит в группу скандинавских штаммов, образующих эволюционную линию H16 В, не связанную с изолятами 1970–1980-х из каспийского региона. Полученные данные указывают на то, что территория Республики Казахстан активно вовлечена в процесс мировой циркуляции и реассортации генов вирусов гриппа.

## **II. ОСОБЕННОСТИ ЭТИОЛОГИИ И ЭПИДЕМИОЛОГИИ ГРИППА В ПОСЛЕДНЕЕ ДЕСЯТИЛЕТИЕ**

### **ОСНОВНЫЕ ИТОГИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕГО СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ НЦГ ВОЗ В СЕТИ ГЛОБАЛЬНОГО НАДЗОРА И КОНТРОЛЯ ЗА ГРИППОМ (GISRS)**

Соминина А.А., Еропкин М.Ю., Грудинин М.П., Карпова Л.С., Зарубаев В.В., Смородинцева Е.А. Писарева М.М., Комиссаров А.Б., Коновалова Н.И., Даниленко Д.М., Столяров К.А.  
ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Развитие надзора за гриппом в России на базе Национального центра по гриппу ВОЗ (НЦГ), созданного первым директором и организатором ФГБУ НИИ гриппа Минздрава РФ, выдающимся российским ученым академиком Анатолием Александровичем Смородинцевым, завершилось созданием современной, весьма сложной и многокомпонентной системы. Эта система включает еженедельную регистрацию данных по заболеваемости, госпитализации и смертности от гриппа и ОРВИ в разных возрастных группах населения, с использованием для анализа ситуации расчетных базовых линий для страны и отдельных Федеральных округов, а также еженедельных эпидемических порогов для каждого из 49 наблюдаемых городов и страны в целом. За прошедший период специалистами НЦГ была осуществлена расшифровка природы трех пандемий гриппа — А(Н3N2) в 1968 году, А(Н1N1) в 1977 году, А(Н1N1)pdm09 в 2009 году.

В последние годы система традиционного надзора дополнена компонентами сигнального клинико–лабораторного надзора, дающего ценную информацию по тяжелым острым респираторным инфекциям (ТОРИ), их связи с этиологией заболевания, с проведением своевременной противовирусной терапии, а также возрастом, полом, сопутствующими заболеваниями и другими факторами. Введение в практику деятельности Опорных баз ПЦР–диагностики (в дополнение к иммунодиагностическим методам), контроль состояния популяционного иммунитета, проведение в НЦГ углубленного антигенного, генетического и филогенетического анализа российских изолятов (в сравнении с циркулирующими в мире вирусами гриппа) внесло существенный вклад в понимание эволюции вирусов гриппа и особенностей эпидемического процесса на современном этапе. Существенное внимание при этом было уделено вопросам стандартизации исследований в соответствии с международными требованиями, с подготовкой проектов приказов Минздрава РФ и Роспотребнадзора, Планов подготовки РФ к очередной пандемии и изданием серии методических рекомендаций. Организация и проведение семинаров и конференций способствовали повышению квалификационного уровня специалистов Опорных баз НЦГ и стран СНГ по эпидемиологии, вирусологии и молекулярной диагностике. НЦГ осуществлялся непрерывный обмен информацией с ВОЗ (через систему FluNet) и ЕвроВОЗ (EuroFlu), а также новыми вирусами гриппа с Сотрудничающими центрами ВОЗ в Атланте и Лондоне с обеспечением российских предприятий, производящих вакцины,

новыми штаммами и стандартами. По итогам работ в 2011 и 2012 гг. Европейским бюро ВОЗ подтверждено соответствие НЦГ всем требованиям, отмечен значительный вклад Центра в деятельность Global Influenza Surveillance and Response System.

Дальнейшее совершенствование системы надзора и контроля за гриппом предполагает расширение и укрепление сети, повышение оперативности ввода информации через интернет, компьютеризации процесса обработки лабораторных и эпидемиологических данных, автоматического построения карт и графиков, отражающих показатели заболеваемости, госпитализации, смертности от гриппа и их интеграцию с данными лабораторного мониторинга. Необходимо повысить эффективность изоляции вирусов гриппа в Опорных базах, проводить антигенное картирование изолятов и определять вероятные направления дальнейшей эволюции возбудителя с использованием данных генетического анализа. Необходимо повысить уровень готовности Центра к распознаванию наиболее вероятных возбудителей предстоящих пандемий (H2, H3v, H5, H7 & H9) за счет конструирования соответствующих диагностических препаратов и создания групп быстрого реагирования для расследования вспышек ОРВИ, вызванных не идентифицируемыми агентами. Планируется определение ущерба от гриппа и ОРВИ для экономики страны, эффективности противогриппозных мероприятий, в первую очередь, вакцинации от гриппа. Укрепление связей с лечебно-профилактическими службами, повышение их информированности по вопросам применения наиболее эффективных из имеющихся противовирусных препаратов, уточнение групп риска, подлежащих первоочередной вакцинации, должны стать существенным дополнением к существующей деятельности НЦГ ВОЗ в РФ.

## **ЭВОЛЮЦИЯ ВИРУСОВ ГРИППА В РОССИИ В ТЕЧЕНИЕ ПОСЛЕДНЕЙ ПАНДЕМИИ И В ПОСТ-ПАНДЕМИЧЕСКИЙ ПЕРИОД**

Еропкин М.Ю., Коновалова Н.И., Даниленко Д.М., Лобова Т.Г., Прокопец А.В., Гудкова Т.М., Григорьева В.А., Бильданова Е.Р., Щеканова С.М.  
ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Структура популяции вирусов гриппа в России по результатам выделения вирусов в НИИ гриппа и его Опорных Базах и антигенного анализа изолятов в РТГА в целом совпадает с данными, полученными при других видах диагностики гриппа (ПЦР, ИФ), хотя имеются небольшие количественные отличия от последних. В течение нескольких пред-пандемических сезонов в России одновременно циркулировали три подтипа гриппа — А(Н1N1), А(Н3N2) и В, причем наблюдалась повышенная вариабельность вирусов А(Н1N1), что можно было рассматривать как возможный индикатор пред-пандемического периода. В первую волну пандемии (октябрь 2009 – январь 2010), пандемический вирус А(Н1N1)pdm09 полностью доминировал (92,1% изолятов), из циркуляции исчезли эпидемический вирус Н1N1 и Н3N2, и лишь в конце сезона стал выделяться вирус гриппа В. В следующий сезон

2010–2011 гг. пандемический грипп составил уже лишь 53% изолятов при существенном участии гриппа В Викторианской линии (44,8% изолятов) и незначительном вкладе штаммов H3N2 (2,3% изолятов). Наконец, в последний эпидсезон пандемический грипп практически исчез из циркуляции (были выделены лишь два штамма в Екатеринбурге), в то время как доля вирусов H3N2 составила 80,6% изолятов, а вируса В — 18,7% (из них около 80% — вирусы Викторианской линии и 20% — Ямагатской).

Антигенный анализ пандемических штаммов A(H1N1)pdm09 показал, что они не претерпели сколь-нибудь значительного антигенного дрейфа в течение двух пандемических сезонов, несмотря на появление определенной генетической вариабельности. Интересной особенностью значительной части пандемических штаммов было появление у них способности взаимодействовать с высокими титрами с прогретой нормальной лошадиной сывороткой, что не характерно как для более ранних штаммов «свиного» происхождения, так и для эталонного штамма ВОЗ А/Калифорния/07/09 (H1N1)pdm09. Аналогичную способность взаимодействия с термостабильными ингибиторами лошадиной сыворотки приобрело в последние три сезона большинство вирусов гриппа В.

Вирусы A(H3N2) постепенно дрейфовали от предшествующего эталонного штамма А/Перт/16/09, и изоляты последнего эпидсезона взаимодействовали с антисыворотками к эталонным штаммам А/Виктория/208/09, А/Виктория/210/09 и А/С.-Петербург/10/12 до 1/1–1/4 гомологичного титра в РТГА. Интересной особенностью Российских изолятов было достаточно слабое взаимодействие с эмбриональным вариантом выбранного в качестве вакцинного штамма на 2012–2013 гг. эталона А/Виктория/361/361/11, что было также подтверждено Европейским референс-центром по гриппу ВОЗ в Лондоне. При этом, по данным генетического анализа большинство Российских изолятов последнего эпидсезона подобны данному эталону.

Вирусы гриппа В Викторианской линии по-прежнему хорошо взаимодействовали с антисывороткой к референс-штамму В/Брисбен/60/08, а вирусы Ямагатской линии были подобны антигенным эталонам В/Бангладеш/3333/07 и В/Висконсин/1/10.

В докладе приводятся результаты обработки данных РТГА методом антигенной картографии, которая была впервые применена к вирусам, изолированным на территории Российской Федерации в течение нескольких сезонов. Нами также впервые были использованы для целей антигенной картографии крысиные поликлональные антисыворотки.

## СОЦИРКУЛЯЦИЯ ВИРУСОВ ГРИППА И ОРВИ В ПЕРИОД ЭПИДЕМИЙ И ПАНДЕМИИ

Бурцева Е.И.

ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздравсоцразвития России,  
Национальный центр по гриппу, сотрудничающий с ВОЗ, г. Москва

Острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ) продолжают «играть лидирующую роль» в структуре инфекционных заболеваний человека. По данным Минздравсоцразвития России, в периоды последних эпидемий число зарегистрированных случаев достигало 27–28 млн., в тоже время, в период 2009 г. число переболевших превысило 33 млн. человек, что стало следствием появления и активного распространения пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09. Воздушно–капельный путь передачи возбудителей ОРВИ определяет главные черты эпидемического процесса и, прежде всего, сходные клинические проявления инфекционного процесса, сезонность, большую восприимчивость детей и подростков. Группа ОРВИ объединяет более 200 возбудителей РНК– и ДНК–содержащих вирусов, относящихся к разным семействам и родам. Среди них «классические» возбудители — вирусы гриппа (А, В и С), РС-вирус (А и В), парагрипп (1, 2, 3, 4А, 4В), аденовирусы (>51 серотипа), риновирусы (>100 типов), коронавирусы (229Е, ОС43); новые и возвращающиеся варианты «классических» — коронавирусы (ТОРС, NL63, NKU1, London1\_novel CoV), риновирус (тип С), аденовирус (тип 14); новые возбудители — метапневмовирус, бокавирус, мимивирус, полиомавирусы, Мелака вирус, а также A(H1N1)pdm09. Эволюция вирусов гриппа была различной, при этом более активно она проходила в популяции штамма вируса гриппа A(H3N2), что повлияло на рекомендации экспертов ВОЗ в выборе эталонов. Активное распространение пандемического вируса гриппа несколько изменило характер эпидемического процесса, но, в тоже время, в активной циркуляции остались «классические» вирусы респираторного тракта, за исключением сезонного штамма вируса гриппа A(H1N1), циркуляцию которого не регистрируют с осени 2009 г. Периоды пиковой активности вирусов гриппа существенно не повлияли на активность возбудителей других ОРВИ, случаи которых диагностируют в течение всего года с небольшими подъемами в осеннее и весеннее время года. Отмечена социркуляция штаммов вирусов гриппа В, принадлежавших к разным эволюционным линиям, что определяет актуальность конструирования 4–валентных гриппозных вакцин. Учитывая различную результативность детекции вирусов гриппа и некоторых возбудителей ОРВИ, существует необходимость в стандартизации результатов диагностики гриппа и ОРВИ с помощью МФА и ОТ–ПЦР.

### III. ПЕРСПЕКТИВНЫЕ РАЗРАБОТКИ ПРОТИВОВИРУСНЫХ ПРЕПАРАТОВ

#### ТРИАЗАВИРИН — ПРЕПАРАТ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Киселев О.И., Деева Э.Г., Мельникова Т.И., Русинов В.Л.\*

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

\*Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина, г. Екатеринбург

Создание новых лекарственных средств, эффективных в отношении вирусных инфекций, является одной из актуальных задач современной медицины. Скрининг, проведенный среди соединений азоло-азинов, структурных аналогов пуринов, позволил выявить ряд перспективных соединений с выраженной противовирусной активностью, в ряду которых особое место занимает Триазавирин. Как показали доклинические исследования в системах *in vitro* и *in vivo*, он обладает высокой противовирусной активностью в отношении широкого спектра вирусов — вирусов гриппа, в том числе «птичьего» и «свиного» происхождения, вирусов клещевого энцефалита и ряда респираторных вирусов. Результаты доклинических исследований показали, что препарат Триазавирин проявляет высокую противовирусную активность, обладает уникальным механизмом действия, не вызывает резистентности, эффективен на всех стадиях гриппозной инфекции, характеризуется оптимальным фармакокинетическим профилем и относится к V классу практически не токсичных соединений.

Исследование механизмов действия производных азоло-азинов показало, что этот класс соединений обладает плейотропным фармакологическим эффектом с преимущественным действием на Глутатион-зависимый редокс-сигнальный путь и процессы фолдинга вирусных белков, контролируемые протеин дисульфид-изомеразой. На основании данных по корреляции структура - функциональная активность сформулирована новая фармакологическая платформа создания противовирусных препаратов широкого спектра действия.

Проведенное в НИИ гриппа клиническое исследование II фазы по протоколу «Перспективное простое слепое сравнительное плацебо-контролируемое клиническое исследование по изучению эффективности и безопасности препарата Триазавирин, капсулы 250 мг у пациентов с диагнозом грипп» установило эффективность препарата Триазавирин в этиотропной терапии гриппа, вызванного вирусами типов А и В. В исследование было включено 114 пациентов с лабораторно подтвержденным диагнозом грипп.

При анализе влияния препарата Триазавирин на длительность основных симптомов заболевания установлено сокращение продолжительности лихорадочного периода, интоксикационного и катарального синдромов, а также острого периода заболевания. Так, сроки нормализации температуры и лихорадочный период (температура тела  $\geq 37,7^{\circ}\text{C}$ ) в группах лечения сокращались более чем в 2 раза по сравнению с группой Плацебо. Установлено, что применение препарата Триазавирин существенно сокращает

продолжительность использования средств симптоматической терапии и частоту развития осложнений.

Вирусы гриппа до начала терапии были выделены у 80 пациентов (70,2%), в том числе, вирусы гриппа типа В — у 12 человек (15%), вирусы гриппа А(H1N1)pdm — у 68 пациентов (85%). В исследовании показано, что уровень повторного выделения вирусов гриппа типа А и В на 5-е сутки от начала терапии существенно ниже по сравнению с группой Плацебо. Так, уровень повторного выделения вирусов гриппа типа А и В в группе пациентов, получавших Триазавирин по схеме 1 капсула 3 раза в день составил 8% и 0%, соответственно, что указывает на преимущества Триазавирин по сравнению с Тамифлю. В опубликованных сообщениях по клиническим исследованиям ингибиторов нейраминидазы указывается, что изоляция вируса на 4–6 дни от начала терапии Тамифлю была значительно выше для гриппа В (по разным источникам 33,3% и 51,6%), чем для гриппа А (12,8% и 15,9%).

Таким образом, полученные данные позволяют рассматривать Триазавирин как универсальный препарат для лечения гриппа, обладающий отчетливыми преимуществами по сравнению с ингибиторами нейраминидазы, эффективность которых напрямую зависит от изменений в структуре нейраминидазы вирусов гриппа типов А и В. Низкая токсичность Триазавирин, его фармацевтические и фармакологические характеристики позволяют рассчитывать на разработку инъекционной формы препарата, что станет несомненным успехом в лечении тяжелых форм гриппозной инфекции.

## **ПОЛИМЕРАЗА ВИРУСА ГРИППА КАК МИШЕНЬ ДЛЯ ПРОТИВОВИРУСНЫХ ХИМИОПРЕПАРАТОВ**

Зарубаев В.В.

ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Несмотря на наличие в жизненном цикле вируса гриппа многих специфических компонентов и этапов, не имеющих клеточных аналогов, в качестве мишеней для лекарств используются лишь два — белок М2 и вирусная нейраминидаза. В то же время наиболее критичные и специфические процессы развиваются в ядре зараженной клетки с участием ключевого вирусного компонента — полимеразного комплекса. Эта структура состоит из трех субъединиц — РА, РВ1 и РВ2 и обеспечивает транскрипцию вирусного генома с образованием мРНК для последующего синтеза белков, а затем — репликацию генома, продукты которой входят в состав вирионов потомства.

В зависимости от конформации полимеразный комплекс проявляет различные ферментативные активности. Среди них выделяют связывание кэп-структуры клеточных мРНК, эндонуклеазную активность при отщеплении праймера от клеточных мРНК и собственно полимеразную активность — синтез комплементарной копии РНК.

Благодаря быстрому развитию методов молекулярного моделирования на сегодняшний день существуют селективные ингибиторы каждой из перечисленных

активностей. Так, разработанные низкомолекулярные соединения избирательно угнетают сборку полимеразного комплекса из субъединиц, блокируя взаимодействие PA-PB1, конкурируют с кэп–связывающим центром комплекса (RO 0794238), многие соединения синтетического (производные дикетобутановой кислоты, N–гидроксимид, BPR3P0128) и природного происхождения (маршантины, эпигаллокатехины, Флутимид) способны ингибировать эндонуклеазную активность полимеразы, препятствуя ранним стадиям вирусной транскрипции. Многочисленные аналоги нуклеозидов (Рибавирин, Т-705 и др.) являются ингибиторами непосредственно полимеразной активности комплекса, угнетая процессы транскрипции и репликации вирусоспецифических РНК. Кроме того, разработаны соединения (АЗ, Бреквинар, Рибавирин), эффективно блокирующие полимеразную активность и вирусную репродукцию в целом, но направленные не на вирусные белки, а на клеточные ферменты, подавление которых истощает пул клеточных нуклеотидов, лишая тем самым полимеразный комплекс субстрата. Такие соединения как проявляют высокую активность, так и обладают широким спектром противовирусного действия, включая как РНК–, так и ДНК–геномные вирусы.

В клинической практике в качестве противогриппозных средств используются в настоящее время только Рибавирин и Т-705 (Фавипиравир, находится в III стадии клинических испытаний). Однако важность полимеразного комплекса для репродукции вируса гриппа и высокая эффективность ее ингибиторов говорят о перспективности подобных соединений в качестве средств химиотерапии гриппозной инфекции.

#### **IV. ПАТОГЕНЕЗ И КЛИНИКА ГРИППОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ**

##### **МЕХАНИЗМ РАЗВИТИЯ ЖЕЛУДОЧНО–КИШЕЧНОГО СИНДРОМА ПРИ ГРИППЕ**

Дондурей Е.А.

ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Несмотря на общепринятое отрицание возможной взаимосвязи между гриппом и желудочно-кишечными (ЖК) симптомами, регулярно появляются как отечественные, так и зарубежные публикации, описывающие те или иные проявления ЖК синдрома при гриппе, вызванном разными штаммами. Их число возросло с выходом на эпидемическую арену сначала птичьего (H5N1), а затем и пандемического (H1N1pand) гриппа, для которых ЖК синдром стал расцениваться как характерный, наряду с синдромом интоксикации и катаральным. И все же до сих пор данные о частоте ЖК симптомов даже при пандемическом гриппе крайне противоречивы. Кроме того, существенными недостатками даже имеющихся публикаций являются либо небольшое число наблюдений, либо отсутствие полноценного

исследования пациентов для исключения возможной сопутствующей вирусной или бактериальной инфекции, а, нередко, авторы ограничиваются только описанием симптоматики без оценки возможных причин развития ЖК дисфункции.

В то же время, на основании накопленных вирусологических и морфологических исследований показана возможность прямой связи между вирусом гриппа и клиническими проявлениями поражения ЖК тракта у людей. В частности, наличие у вирусов гриппа способности в определенных условиях изменять рецепторный профиль и, следовательно, возможность взаимодействовать с энтероцитами, имеющими на поверхности рецепторы с «птичьим» фенотипом. Кроме того, обнаруженная высокая способность кишечных клеток САСО–2 поддерживать вирусную репродукцию позволила предположить возможную восприимчивость нормальных энтероцитов человека для вируса гриппа, которые могут вовлекаться в патогенез заболевания, сопровождаясь ЖК симптомами. Также, на основании экспериментальных данных высказано предположение об участии в рецепции вируса гриппа на клетках–мишенях не только терминальных остатков сиаловой кислоты в клеточном рецепторе, но и всего трансмембранного рецепторного комплекса с его клеточно–специфическим окружением.

Таким образом, несмотря на возрастающее число исследований, посвященных проблеме ЖК симптомов при гриппе, появление ряда неоспоримых доказательств возможности репродукции некоторых вирусов гриппа в эпителии ЖКТ, безусловно, остается много противоречий, и ставить точку в этом вопросе пока рано.

## **АДЕНОВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ У ДЕТЕЙ**

Янина М.А., Осидак Л.В., Милькинт К.К., Суховецкая В.Ф., Дондурей Е.А.  
ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

### **Введение**

В структуре острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ) у детей аденовирусная инфекция занимает немаловажное место после гриппа, наравне с респираторно–синцитиальной инфекцией и парагриппом [1]. Эти заболевания распространены повсеместно, регистрируются в течение всего года с сезонным подъемом в зимне–весенний период. Наблюдаются спорадические случаи и локальные вспышки в закрытых детских и взрослых коллективах, в том числе в виде нозокомиальных инфекций в стационарах. Поражаются как верхние, так и нижние дыхательные пути (фарингиты, трахеиты, ларинготрахеиты, бронхиты, бронхиолиты, нередко с развитием пневмонии).

В настоящее время выделяют более 90 типов аденовирусов, в том числе 50 серотипов, включенных в 7 подгрупп (А,В1,В2,С,Д,Е,Ф), имеющих общий комплементсвязывающий антиген, но различающихся по ряду признаков (антигенных, молекулярно–биологических, тропизму к различным тканям и т.д.), способных вызывать

заболевания у человека (HADV). Для вируса характерна эпителиотропность и токсичность, способность поражать эпителий кишечного и респираторного тракта, конъюнктивы, а также лимфоидную ткань.

Известно, что капсид аденовируса имеет икосаэдрическую форму и состоит из 252 капсомеров, 240 из которых — гексоны образуют 20 треугольных граней, а 12 пентонов располагаются в вершинах икосаэдра и снабжены фибриллами. Пентон (В-антиген) обладает эндонуклеазной активностью и обуславливает токсическое действие аденовирусов. Фибрилла состоит из трех одинаковых гликозилированных полипептидов и нековалентно связана с пентоном. Серологическая классификация аденовирусов базируется на иммунологической специфичности антител против антигенов гексонов, пентона и фибрилл. Гексоны также содержат родо- и группоспецифическую антигенную детерминанту. [2]

Предполагают, что определенным серотипам аденовирусов, принадлежащим к разным группам, свойственно поражение тех или иных органов и тканей, в зависимости от чего развиваются соответствующие проявления заболевания. Так, поражения респираторного тракта вызываются преимущественно представителями подгрупп В, С и Е, тканей глаза — представителями подгруппы D, а желудочно-кишечного тракта — А и F.

В основном, все аденовирусы вызывают манифестные формы заболеваний, имеющие спорадический или вспышечный характер, однако известно, что серотипы 1, 2, 5 и 6 являются также причиной длительной бессимптомной персистенции в миндалинах, аденоидах и кишечном тракте ребенка.

Возбудители подгруппы С (1, 2, 5 и 6 серотипы) и 4 серотип подгруппы Е вызывают поражения верхних и нижних дыхательных путей у детей, причем у детей раннего возраста при инфицировании серотипами 2 и 5 часто развиваются пневмонии. Вирусы подгруппы В1 (серотипы 3, 7 и 21), в основном, вызывают заболевания нижних дыхательных путей. Большинство респираторных инфекций, вызванных аденовирусами, протекает в среднетяжелой форме и не отличается от других ОРВИ. Однако, специфические серотипы, такие, как 3, 7 и 14, связывают со случаями летальных исходов.[3] Заболевание протекает тяжело у новорожденных и детей с сопутствующей патологией, нередко с развитием пневмонии и даже сепсиса. Аденовирусная пневмония у детей раннего возраста протекает с хроническим поражением легких, ведущим к лёгочному фиброзу и внутрипросветному фиброзу, сужающему просвет дыхательных путей.[4]

Серотипы 8, 19 и 37, как правило, являются основной причиной острых конъюнктивитов, протекающих в виде вариантов: острый фолликулярный конъюнктивит в сочетании с респираторным синдромом или без него, эпидемический кератоконъюнктивит и фарингоконъюнктивальная лихорадка.

Острый фолликулярный конъюнктивит, называемые в зарубежной литературе “pinkeye”, проявляется зудом, жжением, слезоточивостью, инъекцией сосудов склер, и имеет тенденцию спонтанно проходить через несколько дней. [4]. При эпидемическом кератоконъюнктивите, кроме вышеперечисленных симптомов, у ребенка наблюдаются отек и покраснение век, слизистое отделяемое из глаз, слипание век между собой, а также светобоязнь. Синдром фарингоконъюнктивальной лихорадки представлен подъемом температуры тела, болью в горле и конъюнктивитом. Также могут иметь место ринит и

шейный аденит. Процесс может начинаться с одного глаза с появления зернистого образования на пальпебральной конъюнктиве и последующим вовлечением второго глаза. Вспышки фарингоконъюнктивальной лихорадки с риском заражения до 60% возникают после посещения зараженных водоемов и бассейнов с ненадлежащим хлорированием воды.

Представители подгруппы F являются одними из возбудителей тяжелых гастроэнтеритов у детей раннего возраста. Они вызывают длительно протекающую диарею, приводящую к обезвоживанию ребенка и снижению его массы тела. По данным Joanne M. Langley, MD, 2005, аденовирусы являются этиологическим фактором 5–15% гастроэнтеритов у детей раннего возраста, требующих стационарного лечения, 94% из которых были в возрасте до 4-х лет. [4]

Заболевание характеризуется умеренно выраженной интоксикацией, невысокой температурой, сохраняющейся в течение нескольких дней (до 2-х недель), которая при этом иногда носит волнообразный характер. Диспепсические проявления в виде рвоты и диареи выражены умеренно и сохраняются около 3-х дней. Больные значительно чаще, чем при других вирусных гастроэнтеритах, отмечают боль в животе, которая бывает обусловлена увеличением мезентериальных лимфоузлов. Зачастую желудочно-кишечные (ЖКТ) проявления развиваются на фоне уже имевшегося до этого поражения респираторного тракта или фарингоконъюнктивальной лихорадки.

11-й серотип аденовируса вызывает острый геморрагический цистит [3]. Заболевание проявляется такими симптомами как гематурия, дизурия и полиурия. Гематурия нарастает в течение 3-х дней, выявляясь при микроскопическом исследовании еще несколько дней, затем спонтанно купируется. Геморрагический цистит, тубулоинтерстициальный нефрит и выделение аденовируса с мочой часто отмечались у детей после пересадки почки и костного мозга. [4]

У детей с иммуносупрессией (трансплантация органов и костного мозга, ВИЧ-инфекция) аденовирусная инфекция зачастую протекает с осложнениями и в тяжелой форме. Однако, процент развития диссеминированного процесса, вызванного аденовирусами, у детей с иммуносупрессией незначительно выше, чем у иммунокомпетентных детей. Диссеминированную аденовирусную инфекцию у иммунокомпетентных детей вызывают серотипы 3, 5 и 7, а серотипы 1 и 2 — у детей с иммуносупрессией. У всех пациентов до этого отмечалось выделение вируса из респираторного или кишечного трактов. [5]

## **Материалы и методы**

Удельный вес участия аденовирусов в этиологии различных форм течения ОРВИ был установлен у 6494 детей различных возрастных групп, госпитализированных в ДГБ Святой Ольги (базовая для ФГБУ НИИ гриппа МЗСР РФ).

Этиологию заболевания устанавливали в материалах со слизистой носовых ходов и задней стенки глотки, обработанных по стандартной методике: аспираты и смывы из носовых ходов с помощью определения антигенов в эпителиальных клетках слизистой носа,

с использованием стандартных, в том числе и моноклональных, препаратов флюоресцирующих антител против известных возбудителей, производимых в лаборатории биотехнологии диагностических препаратов ФГБУ НИИ гриппа МЗ РФ, прямого твердофазного иммуноферментного анализа (П–ТФ–ИФА), основанного на выявлении вирусных антигенов в смывах (и/или аспиратах) из носоглотки, с помощью антител, меченных каким–либо ферментом (чаще всего пероксидазой), ПЦР в режиме реального времени — для количественной оценки содержания ДНК вируса в клиническом образце, а также серологически (РСК, РН с типоспецифическими сыворотками).

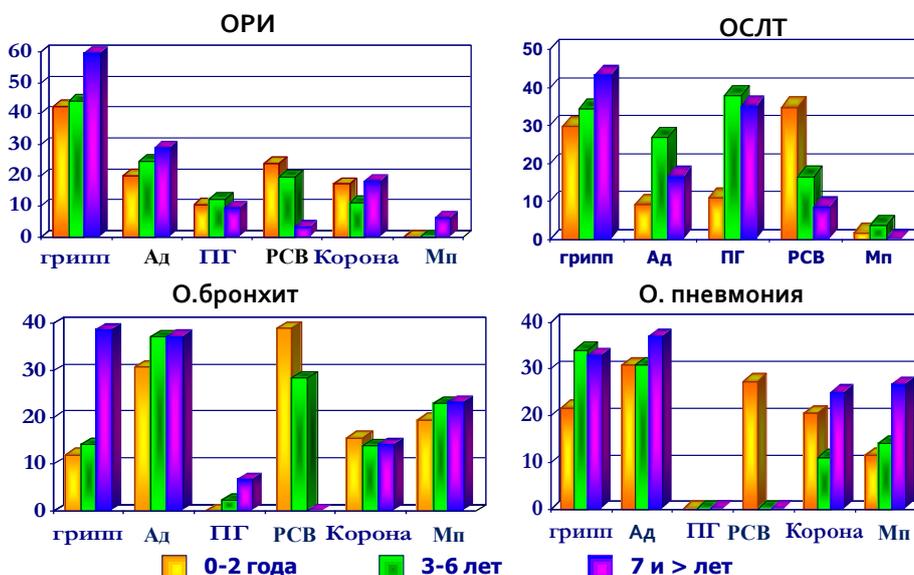
## Результаты и их обсуждение

По нашим данным, несмотря на то, что при всех нозологических формах заболеваний вирус гриппа встречался чаще других, аденовирусная инфекция занимает в этиологии ОРВИ также немаловажное место (Рис. 1).

При неосложненных формах (острый ринофарингит) поражение аденовирусом занимает третье место во всех возрастных группах. В этиологии ОРВИ, протекающих с явлениями острого стенозирующего ларинготрахеита (ОСЛТ), доминировали вирусы парагриппа, как изолированные, так и в ассоциации с аденовирусной инфекцией (до 10–27% случаев). Значительно чаще аденовирус обнаруживался при развитии острого бронхита (около 40% у детей 3–7 лет, и до 30% у детей раннего возраста) и пневмонии (30% у детей в возрасте до 6 лет, и до 40% у детей школьного возраста).

**Рисунок 1. Удельный вес респираторных возбудителей в этиологии ОРВИ.**

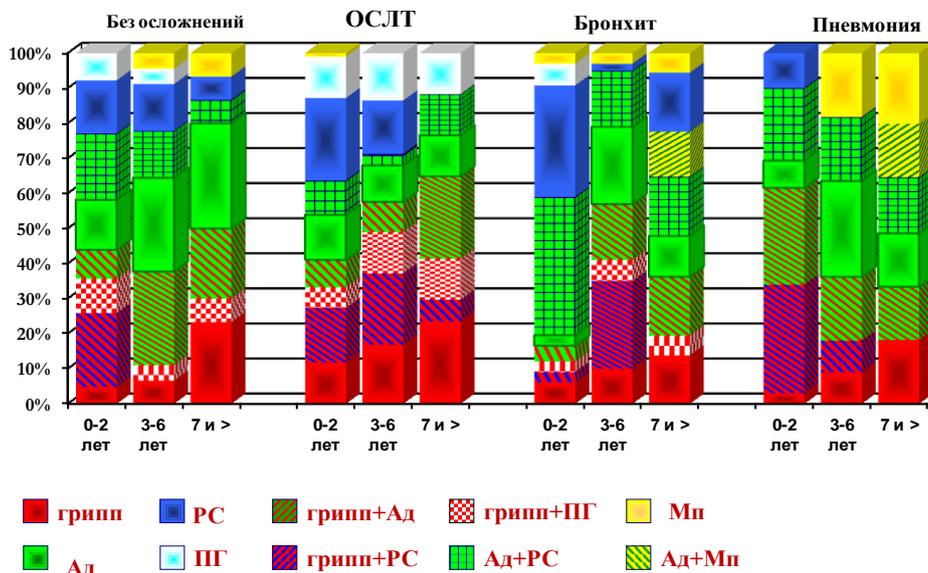
### Удельный вес респираторных возбудителей в этиологии ОРВИ



Следует отметить, что значительно больший процент аденовирусной инфекции, как моно-, так и в ассоциации с другими возбудителями (особенно с вирусом гриппа), встречался у пациентов с затяжными формами заболеваний (Рис. 2).

**Рисунок 2. Этиологическая структура затяжных форм.**

### Этиологическая структура затяжных форм



Ассоциация этих возбудителей, вызывающая затяжное течение заболевания без осложнений, была максимально выражена у детей 3–6 лет и составила от 10 до 80%. Затяжное течение ОРВИ, осложненной ОСЛТ, аденовирусом как моно-, так и в ассоциации с гриппом и РС-вирусом, вызывал в 30–90%, преимущественно у детей школьного возраста. В структуре же затяжного течения ОРВИ с бронхитом основная роль принадлежит ассоциации аденовирусной и РС-инфекции, занимающей до 65% у детей до 2-х лет. Также аденовирус (как моно-, так и в сочетании с РС-вирусом и вирусом гриппа) являлся наиболее частым фактором, вызывающим затяжное течение пневмонии, особенно у детей младшего возраста (от 30 до 90% у детей до 2-х лет и от 15 до 80% у детей 3–6 лет).

Тяжелые формы заболеваний, как с развитием осложнений, так и без них, наиболее часто были обусловлены как вирусом гриппа (18,7%), так и, в не меньшей степени, аденовирусом (18,4%) (таблица 1). В целом, участие аденовируса в ассоциации с другими возбудителями ОРИ почти всегда сопровождается усугублением выраженности и продолжительности основных симптомов заболевания. Основными клиническими критериями тяжелых форм течения инфекции при отсутствии бронхолегочных поражений и осложнений со стороны ЛОР-органов при аденовирусной инфекции являлись гипертермия, явления конъюнктивита (в 21,6% случаев), многократная рвота и появление симптомов поражения кишечного тракта на фоне выраженных катаральных симптомов с экссудативным

компонентом в респираторном тракте, в то время как при гриппе преобладали гипертермия и проявления геморрагического синдрома на фоне скудных катаральных симптомов в носоглотке типа ринофарингита.

**Таблица 1. Наличие тяжелых форм и выраженность симптомов интоксикации при различных ОРВИ.**

Этиология	Число детей	Постепенное начало, %	Тяжелая форма, %	Симптомы интоксикации (%)		
				Лихорадка $\geq 39^{\circ}\text{C}$	Конъюнктивит	рвота
Адено (моно)	317	25,0	18,4	22,5	21,6	23,0
Адено+РС	109	24,0	15,8	23,0	13,6	28,0
Адено+МП	51	15,7*	17,7	31,4***	17,6	17,6
Адено+Грипп	272	17,8***	19,8	30,0***	12,5	21,6
Грипп (моно)	316	6,3	18,7	40,3	0	17,2

\* —  $p < 0,05$  по отношению к соответствующей первой моноинфекции; \*\* —  $p < 0,05$  по отношению ко второй моноинфекции.

При отсутствии осложнений у детей всех возрастных групп доминирующим возбудителем, являющимся причинным фактором затяжного инфекционного процесса, был аденовирус, как моно-, так и в сочетании с вирусами гриппа и РСВ. При всех вариантах аденовирусной инфекции интоксикация и катаральный синдром были максимальными, особенно при ее сочетании с РСВ и вирусом гриппа. Также данная ассоциация обуславливала значительно более продолжительный острый период заболевания (таблица 2).

**Таблица 2. Продолжительность клинических симптомов при ОРВИ у детей.**

Этиология	Число детей	Продолжительность в днях ( $M \pm m$ )			
		Лихорадки	Интоксикации	Катаральных симптомов	Острого периода заболевания
Адено (моно)	317	6,2 $\pm$ 0,36	4,6 $\pm$ 0,31	7,5 $\pm$ 0,91	7,9 $\pm$ 0,9
Адено + РС	109	5,0 $\pm$ 0,61	4,5 $\pm$ 0,61	11,5 $\pm$ 0,72	12,8 $\pm$ 0,8
Адено+МП	51	5,3 $\pm$ 0,34	4,4 $\pm$ 0,37	9,4 $\pm$ 0,49	10,1 $\pm$ 0,6
Адено+Грипп	272	5,9 $\pm$ 0,35	4,9 $\pm$ 0,43	10,3 $\pm$ 0,43	12,6 $\pm$ 0,3
Грипп (моно)	316	3,4 $\pm$ 0,16	3,2 $\pm$ 0,32	4,6 $\pm$ 0,21	5,8 $\pm$ 0,2

Для аденовирусной инфекции характерно преимущественно постепенное начало с последующим максимальным развитием у большинства пациентов симптомов интоксикации и респираторного синдрома в период разгара, и умеренно выраженными симптомами дисфункции ЖКТ, а также наибольшей продолжительностью острого периода заболевания. (Таблица 3). С практически одинаковой частотой наблюдается одновременное или последовательное сочетание симптоматики. Самым продолжительным при аденовирусной инфекции являются симптомы выраженной интоксикации (адинамия). ЖК синдром при аденовирусной инфекции включает в себя, как правило, повторную рвоту, разжижение стула, сопровождающееся болями в животе. Стул у большинства пациентов необильный, водянистый до 6–7 раз в сутки с примесями слизи и непереваренных пищевых включений. Наибольшая продолжительность острого периода при аденовирусной инфекции, в отличие от сравниваемых ( $p < 0,05$ ), была связана как с респираторным синдромом, так и с поздней нормализацией стула.

Наличие различных вариантов течения инфекции, вероятнее всего, связано с разными серо/генотипами возбудителя.

**Таблица 3. Сравнительная характеристика клинического течения сочетанного поражения респираторного и желудочно–кишечного трактов различной вирусной этиологии.**

Признак	Аденовирусная (n=42)		Ротавирусная (n=34)		Коронавирусная (n=22)		Грипп (n=16)	
	Частота (%)	Длительность (M± m)	Частота (%)	Длительность (M± m)	Частота (%)	Длительность (M± m)	Частота (%)	Длительность (M± m)
Лихорадка	92,9	6,1±0,2	91,2	3,6±0,3	77,3	5,2±0,4	100	3,6±0,5
Адинамия	78,6	3,3±0,3	91,2	2,3±0,3	68,2	2,2±0,4	87,5	2,0±0,4
Ринит	97,6	6,3±0,1	61,8	3,3±0,3	100	5,4±0,3	75	4,1±0,4
Кашель	95,2	6,7±0,1	67,6	3,1±0,4	100	5,6±0,3	81,3	4,6±0,5
Рвота	61,9	1,7±0,2	82,4	2,2±0,1	50	1,5±0,5	37,5	1,3±0,6
Разжижение стула	92,9	8,1±0,1	88,2	6,1±0,3	100	4,8±0,3	43,8	2,5±0,4

*n* = количество детей в группе.

## Заключение

Таким образом, учитывая значимый вес аденовируса как возбудителя ОРИ со склонностью к осложнениям (развитию бронхитов и пневмоний) и затяжному течению у детей всех возрастных групп, а также его способность поражать и другие органы и системы, вызывая разнообразные клинические проявления, представляется интересным проведение исследования с возможностью генотипирования аденовируса в материалах, взятых от больных. При использовании данных GenBank нами было проведено выравнивание и анализ нуклеотидных последовательностей генома различных серотипов аденовируса. Его гексон содержит гипервариабельные участки, к одному из них заказаны праймеры для постановки ПЦР, с целью установления генотипа аденовируса в материалах, полученных от пациентов.

Анализ полученных данных поможет достоверно определить, какие генотипы преимущественно циркулируют в нашем регионе, и какая клиническая картина и осложнения развиваются при инфицировании различными генотипами детей разных возрастных групп, а также, возможно, разработать новую концепцию лечения аденовирусной патологии, вызванной различными генотипами у детей.

#### **Литература:**

1. Острые респираторные инфекции у детей и подростков: практическое руководство для врачей// Л.В. Осидак и др. – СПб.: ИнформМед, 2010.-26с.
2. Медицинская вирусология: Руководство/Под ред. Д.К. Львова. – М.:ООО «Медицинское информационное агентство», 2008. -656 с.: ил.
3. Pond, Kathy. Water recreation and disease. Plausibility of Associated Infections: Acute Effects, Sequelae and Mortality / K. Pond// World Health Organization (WHO). - 2005. - P. 192-199.
4. Joanne M. Langley, MD, MSc\*. Adenoviruses.// PediatricsinReview. -2005. - V.26, №.7. –P.244 -249.
5. Flor M. Munoz, Pedro A. Piedra, and Gail J. Demmler.Disseminated Adenovirus Disease in Immunocompromised and Immunocompetent Children.// Clinical Infectious Diseases (CID). – 1998. – V. 27. -№ 5. –P.1194 -1201.

#### **ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ВКЛЮЧЕНИЯ БЕТАЛЕЙКИНА В ТЕРАПИЮ ГРИППА, ОСЛОЖНЕННОГО ПНЕВМОНИЕЙ**

Волощук Л.В.<sup>1</sup>, Мушкатина А.Л.<sup>1</sup>, Головачева Е.Г., Заришнюк П.В.<sup>1</sup>, Тумина Т.Л.<sup>1</sup>,  
Галкина С.Н.<sup>1</sup>, Днепровская Г.Л.<sup>2</sup>, Павлова А.Г.<sup>2</sup>

1 — ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

2 — Клиническая Инфекционная Больница им. С.П. Боткина, Россия

**Цель исследования:** изучение влияния на клиническую картину содержания цитокинов в сыворотке крови больных гриппом как неосложненной формы, так и осложненного пневмонией, а также изучение эффективности Беталейкина в комплексной терапии гриппа, осложненного пневмонией.

**Задачи исследования:** определение концентрации цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-1Ra, antiIFN- $\alpha$ ), IFN- $\alpha$  и IFN- $\gamma$  в сыворотке крови у пациентов с различными формами гриппа и изучение их клинико–патогенетического значения. Изучение корреляционных связей между показателями концентрации цитокинов в сыворотке крови пациентов и клиническими характеристиками гриппа. Изучение эффективности Беталейкина в

комплексной терапии гриппа осложненного пневмонией и разработка критериев включения.

Цитокиновый статус при гриппе был изучен у 123 человек, из них с неосложненным гриппом — 61 пациент; с формой, осложненной пневмонией — 62 пациента. Эффективность Беталейкина оценивалась у 196 человек с диагнозом «грипп, осложненный пневмонией»: 102 пациента (основная группа) дополнительно к стандартному лечению получали Беталейкин и 94 пациента (группа сравнения) — стандартную терапию. Беталейкин является точной копией цитокина IL-1 $\beta$  человека, препарат произведен в ФГУП «Гос. НИИ особо чистых биопрепаратов» ФМБА.

В результате проведенной работы установлено, что прогностически неблагоприятными признаками гриппа является увеличение концентрации TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-10 с резким падением IFN- $\gamma$ .

Продолжительность интоксикационного синдрома при гриппе напрямую зависит от концентрации TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-1Ra, IL-10 в разгаре заболевания. Высокое содержание в остром периоде заболевания IL-1 $\beta$  способствует сокращению продолжительности интоксикационного синдрома.

Продолжительность катарального синдрома при гриппе имела прямую корреляционную связь с концентрацией IL-1Ra и обратную с IL-1 $\beta$ .

Высокие показатели TNF- $\alpha$ , IL-8 и IL-1 $\beta$  в сыворотке крови в разгаре заболевания увеличивают продолжительность рентгенологических изменений в легких.

При проведении исследования установлено, что средняя продолжительность кашля, аускультативных изменений в легких статистически значимо короче у лиц, получавших Беталейкин. Рентгенологические изменения в легких у лиц, получавших Беталейкин, статистически значимо менее продолжительные, чем у пациентов сравнимой группы (14,7 $\pm$ 0,5 дней против 19,5 $\pm$ 0,7 дня).

По нашим данным, применение препарата Беталейкин способствует статистически значимому снижению концентрации в сыворотке крови цитокинов IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1Ra, antiIFN- $\alpha$ , IL-10 и повышению содержания IFN- $\gamma$  и IFN- $\alpha$ .

Препарат оказался эффективным у пациентов любого возраста, но его включение в терапию наиболее активно способствует полному разрешению пневмонии у пациентов старше 50 лет, независимо от характера и объема инфильтрации.

Наиболее быстро полное разрешение пневмонии на фоне Беталейкина наблюдалось у пациентов с начальной концентрацией в сыворотке крови IL-1 $\beta$   $\leq$ 80–120 пг/мл и концентрацией IL-1Ra 500–1000 пг/мл.

С целью торможения пирогенного действия Беталейкина группе больных (20 человек) было использовано одновременное с препаратом внутривенно капельное введение Цитофлавина, что приводило к укорочению, либо предупреждению вышеописанной реакции.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗУЧЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЦИТОКИНСОДЕРЖАЩЕЙ ТЕРАПИИ ПРИ ОРВИ

Волощук Л.В., Головачева Е.Г., Мушкатина А.Л., Го А., Заришнюк П.В., Осидак Л.В., Рожкова Е.Г., Павлова А.Г., Днепровская Г.Л., Галкина С.Н., Герасимов А.А.

ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

### Введение

Несмотря на успехи в области современной вакцинопрофилактики и химиотерапии, острые респираторные инфекции (ОРИ) и, особенно, грипп, по-прежнему остаются самыми массовыми заболеваниями.

Осложнения при гриппе и гриппоподобных заболеваниях (ГПЗ), особенно в период эпидемии, регистрируются в 20–30% случаев. Основными причинами, приводящим к их развитию, считают нарушения иммунной защиты организма. Наиболее частое осложнение этих заболеваний – пневмония, присоединение которой всегда утяжеляет течение процесса [5].

Цитокиноterapia — новое направление в иммунокорректирующей терапии, использующее как возможности компенсации эндогенного цитокина, так и антицитокиновую терапию. Наиболее широкое применение в практической медицине для лечения различных вирусных заболеваний, в том числе гриппа, герпеса, гепатитов и др., получили препараты интерферонового ряда [2]. Новый отечественный препарат Интерфераль — рекомбинантный ИФН- $\alpha 2b$ , выпускаемый в форме аэрозоля для местного применения, не имеет аналогов в нашей стране и за рубежом.

IL-1 $\beta$  — один из ключевых медиаторов защитных реакций организма, существенный компонент цитокиновой регуляции, который играет важную роль в опосредованном иммунном ответе, участвуя в остром и хроническом воспалении [4]. Для IL-1 $\beta$  характерно также плеiotропное воздействие на различные клетки иммунной системы, т.е. он служит индуктором запуска цитокинового каскада [1]. Препарат Беталейкин является лекарственной формой рекомбинантного IL-1 $\beta$  человека, который полностью соответствует природному (эндогенному) цитокину человека [3].

### Материалы и методы

Выполнение исследований осуществлялось в отделении РВИ у взрослых ФГБУ «НИИ гриппа» Минздравсоцразвития России, базирующегося на 23-м отделении клинической инфекционной больницы им. С.П. Боткина.

У 256 человек было проведено изучение лечебной эффективности цитокин-содержащих препаратов с иммуномодулирующей и противовирусной активностью производства ФГУП «Гос. НИИ Особо Чистых Биопрепаратов» Федерального медико-биологического агентства.

Интерфераль — интерферон  $\alpha 2b$  человеческий рекомбинантный, использовался в терапии неосложненных форм заболевания (60 человек). Интерфераль-аэрозоль вводился в

каждый носовой ход пациентов в течение 1 секунды 7 раз в день (через каждые 2 часа) в первые два дня, затем 3 раза в день в течение 5 дней. Беталейкин (действующее вещество интерлейкин-1 $\beta$ ), идентичный человеческому интерлейкину-1 $\beta$ , включался в терапию пациентов с пневмонией (196 человек). Беталейкин–лиофилизат для приготовления раствора для подкожного или внутривенного введения, помещенный в ампулы. В настоящем исследовании апробировано подкожное введение препарата в дозе по 0,5 мкг 1 раз в сутки в течение 4–5 дней.

Для оценки эффективности препарата Интерфераль было сформировано 2 группы наблюдения — основная и группа сравнения. Основная группа (30 человек с неосложненным течением ГПЗ) получали Интерфераль. Группа сравнения (30 человек с неосложненным течением ГПЗ) получала симптоматическую терапию, назначаемую и пациентам основной группы.

При оценке эффективности Беталейкина было также сформировано 2 группы наблюдения — основная и группа сравнения. Основная группа (102 человека с пневмонией) получали Беталейкин парентерально в составе комплексной терапии, включавшей в себя и антибактериальную терапию; группа сравнения (94 человека с пневмонией) получала только терапию, необходимую для лечения пневмонии. Этиологию заболевания устанавливали с использованием вирусологических и бактериологических (общепринятых) методов исследования. Состояние иммунологической реактивности пациентов оценивали по динамике показателей цитокинов (IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , antiIFN- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-1Ra, IL-10, а также иммуноглобулина IgE, циркулирующих в сыворотке крови, и sIgA в носовых смывах, определяемых «сэндвич»–методом твердофазного ИФА.

Анализ полученных результатов выполняли с применением статистического пакета SPSS 17.0RU for Windows. Значимыми считали различия при  $p \leq 0,05$ .

## **Результаты и обсуждение**

### **Результаты изучения лечебной эффективности препарата Интерфераль у больных неосложненным гриппом и гриппоподобными заболеваниями.**

Изучение лечебной эффективности и переносимости Интерфералья было проведено у 60 больных гриппом и другими ГПЗ, вошедших в состав двух групп наблюдения (I — основная и II — сравнения), сформированных методом случайной выборки. В целом, по доминирующим признакам (полу, возрасту, срокам развития болезни, нозологическому диагнозу, формам тяжести и клиническим проявлениям) сравниваемые группы больных, включенных в исследование, были репрезентативны. В основную группу были включены 30 больных в возрасте от 18 до 52 (в среднем  $25,9 \pm 9,4$  лет) с гриппом или ГПЗ, из них: мужчин — 18, женщин — 12. Больные данной группы получали Интерфераль в аэрозоле интраназально по указанной схеме на фоне симптоматической терапии. В группу сравнения, получавших только симптоматическую терапию, также вошли 30 пациентов в возрасте от 18 до 64 лет (в среднем  $29,9 \pm 14,3$  лет), среди которых мужчин и женщин было по 15 человек.

Начало заболевания у всех пациентов было острым. Характер лихорадочной реакции в диапазоне 38,0–38,9°C в сравниваемых группах был примерно одинаковым. У всех больных отмечались признаки катарального воспаления в носоглотке. Проведенные наблюдения показали, что использование в комплексной терапии взрослых при гриппе и ГПЗ Интерферала способствует более быстрой ликвидации всех симптомов инфекционного процесса. На фоне введения препарата у пациентов наблюдалась статистически значимая более быстрая, чем в группе сравнения, ликвидация всех проявлений интоксикации и катаральных симптомов и сокращение продолжительности острого периода заболевания.

Было осуществлено изучение влияния Интерферала на цитокиновый статус пациентов по динамике концентрации цитокинов (ИЛ-1 $\beta$ , РАИЛ, ИЛ-6, ИЛ-8, ИФН- $\alpha$  и - $\gamma$ ), циркулирующих в сыворотке крови и носовых смывах (табл.3). Показано, что исходное повышение концентрации ИЛ-1 $\beta$  в обеих группах через неделю статистически значимо не менялось и достоверно снижалось к 15 дню исследования. При этом снижение концентрации данного показателя в основной группе было умеренным, а в сравниваемой группе существенно более значимым. Содержание РАИЛ в сыворотках крови больных основной группы было также исходно более высоким, чем у пациентов группы сравнения, статистически значимо снижаясь к концу исследования, в отличие от пациентов группы сравнения, у которых этот показатель значимо повышался, соответствуя динамике изменений ИЛ-1 $\beta$ . Динамика содержания ИЛ-1 $\beta$  и РАИЛ в носовых смывах была подобна таковой в сыворотке крови. Основная группа характеризовалась более высоким, чем в сравниваемой группе, исходным содержанием ИЛ-1 $\beta$ , которое достоверно снижалось к 15 дню терапии. У больных сравниваемой группы, напротив, отмечено статистически значимое увеличение содержания этого цитокина в носовых смывах к концу исследования.

**Таблица 3. Содержание цитокинов у больных гриппом и ГПЗ на фоне Интерферала.**

Показатель (пг/мл)	Группа	Содержание цитокинов (M $\pm$ m)						
		Д 0		Д 7		Д15		
		Me	МКР	Me	МКР	Me	МКР	
в сыворотке крови	ИЛ-1 $\beta$	A	338	192-429	312	173-561	204 *#	14-485
		B	261	80-577	245	65-409	119 #	9-170
	РАИЛ	A	1125*	580-2298	764	343 -2819	733*#	275-2262
		B	532	160 - 1366	333	0- 1031	926#	324 - 3089
	ИЛ-6	A	0	0 - 23	0	0 -76	0	0 -172
		B	0	0 - 18	0	0 - 0	0	0 - 0
	ИЛ-8	A	0	0 - 26	28 *#	0-64	0	0 - 27
		B	0	0 - 50	0	0 - 0	0	0 - 66
	ИФН- $\alpha$	A	0	0 - 34	0	0 - 75	0	0 - 15
		B	0	0 - 27	0	0 - 28	0	0 - 5
	ИФН- $\gamma$	A	0	0 - 84	0	0 - 35	0	0 - 43
		B	0	0 - 195	0	0 - 0	0	0 - 64

Показатель (пг/мл)	Группа	Содержание цитокинов (M±m)						
		Д 0		Д 7		Д15		
		Me	МКР	Me	МКР	Me	МКР	
В НОСОВЫХ СМЫВАХ	ИЛ-1β	А	70 *	0 -129	81	27 - 199	41	0 - 142
		В	0	0 - 70	44	12- 62	56 #	0 – 144
	РАИЛ	А	2617	1176-4447	3272#	2020-5988	3229*	1620-4113
		В	3323	1824-4006	3076	1561-4079	2985	1594-3829
	ИЛ-8	А	408 *	252-1017	303 *	172-635	152 *#	38-440
		В	174	110 - 348	56#	12-239	38 #	11-128
	ИЛ-6	А	0	0 - 41	9 *	0 - 90	0 #	0 - 19
		В	0	0 - 132	0	0 - 12#	0 #	0 - 0
	ИФН-α	А	0	0 - 11	0 *#	0 - 144	0	0 - 0
		В	0	0 - 6	0	0 - 4	0	0 - 0
	ИФН-γ	А	0	0 - 24	0	0 - 8	0	0 - 23
		В	0	0 - 32	0	0 - 34	0	0 - 0

Д 0,7,15 — день обследования; Группы А — Основная, В — сравнения; Me — медиана, МКР — межквартильный размах; \*отличия показателя статистически значимы по отношению к группе сравнения; # — к исходному уровню, N — как в табл. 3.2.1

Вместе с тем, содержание РАИЛ в смывах пациентов сравниваемой группы практически не изменялось, а у пациентов основной группы — достоверно увеличивалось к 7 дню терапии, оставаясь статистически значимо выше показателей сравниваемой группы к 15 дню. Повышенное содержание ИЛ-1β в сыворотке крови у больных при терапии Интерфералем сохранялось более длительно на фоне меньших концентраций РАИЛ. Менее выраженная, но все же статистически значимая сходная по отношению к исходным данным динамика ИЛ-8 имела место к периоду ранней реконвалесценции и в сыворотке крови пациентов основной группы, в отличие от группы сравнения. Анализ динамики содержания ИЛ-6 в носовых смывах, в отличие от его содержания в крови, выявил статистически значимое, в отличие от группы сравнения, повышение к 7 дню. Содержание ИФН-α и ИФН-γ в сыворотке крови больных обеих групп при поступлении не имело каких-либо различий между группами, снижаясь к периоду ранней реконвалесценции. Некоторое повышение показателя ИФН-α в носовых смывах, наблюдалось на 7 день терапии у лиц, получавших Интерфераль.

### **Результаты изучения лечебной эффективности Беталейкина (рекомбинантного ИЛ-1β) у больных осложненными пневмонией формами гриппа.**

Изучение лечебной эффективности и переносимости Беталейкина в составе комплексной терапии, проведено у 196 больных гриппом и другими ОРВИ, осложненных пневмонией, вошедших в состав двух групп наблюдения (основная — 102 человека, и группа

сравнения — 94 человека), сформированных методом рандомизации. Пациенты основной группы получали Беталейкин подкожно в дозе 0,5 мкг 1 раз в сутки в течение 4 дней, группы сравнения — только адекватную базисную терапию (в том числе и антибактериальную), как и пациенты основной группы. По доминирующим признакам (полу, возрасту, срокам развития болезни, нозологическому диагнозу, формам тяжести и клиническим проявлениям заболевания, а также характеру сопутствующей патологии) наблюдаемые группы пациентов были сопоставимы. Примерно у половины больных были обнаружены как вирусные, так и бактериальные возбудители. Из вирусных возбудителей доминировали вирусы гриппа А(Н3N2) и А(Н1N1)pdm2009 в виде моноинфекции, на втором месте по частоте выявлялись вирус гриппа В и вирус гриппа А(Н1N1) более ранних лет. Сочетание вирусов гриппа между собой, либо с другими вирусами имело место в небольшом проценте случаев. Из бактериальных возбудителей во всех группах наблюдения чаще всего встречались *Str. pneumoniae* и *Str. viridians* как моноинфекция, так и их сочетание с другими возбудителями (*S. albicans*, *Str. progenies*, *Staph. aureus*, Гр (-) флора из семейства *Enterobacteriaceae*), а также в единичных случаях респираторный микоплазмоз, орнитоз и легионеллез. Клинические симптомы заболевания в большей степени определялись объемом поражения легких.

Анализ продолжительности основных симптомов заболевания в зависимости от вида получаемой терапии позволил установить статистически значимое сокращение их продолжительности у лиц, получавших Беталейкин, по сравнению с пациентами группы сравнения. Полное разрешение инфильтрации к моменту выписки наблюдалось статистически значимо чаще у больных, получавших Беталейкин (75,6% в отличие от 50% случаев в группе сравнения). Отрицательной рентгенографической динамики в основной группе не было, в отличие от 7,6% случаев в группе сравнения. При рентгенографическом контроле после выписки полное разрешение пневмонии регистрировалось в 100% случаев в обеих группах, но средняя продолжительность рентгенологических изменений в легких была статистически значимо короче у лиц получавших Беталейкин ( $14,7 \pm 0,5$  дней против  $19,5 \pm 0,7$  дня у пациентов сравниваемой группы). Вместе с тем, введение Беталейкина практически не оказывало какого-либо существенного влияния на продолжительность интоксикации, которая практически была такой же, как и у больных в группе сравнения ( $6,9 \pm 0,4$  дней и  $7,3 \pm 0,4$  дней). Также практически одинаковой у пациентов обеих групп была и продолжительность лихорадки, что, возможно, было связано с действием самого цитокина, обладающего кратковременным гриппоподобным эффектом. У 62 больных в крови больных определена динамика содержания концентрации основных про- и противовоспалительных цитокинов (до введения, на 2, 5 день и на 10 сутки после начала лечения). Если до введения препарата средние значения цитокинов у пациентов обеих групп не имели статистически значимых различий между собой, то после начала лечения показатели их содержания стали различными. Так, через сутки после введения препарата повышенная в 90,3% случаев концентрация ФНО- $\alpha$  у больных основной группы статистически значимо снизилась в отличие от группы сравнения. В период ранней реконвалесценции у получавших Беталейкин показатель ФНО- $\alpha$  достиг нормальных значений в 41,9% (таб. 8). Концентрация РАИЛ регистрировалась выше нормы в 100% случаев у пациентов обеих групп в течение всего периода наблюдения, свидетельствуя о неадекватном торможении иммунных реакций при

гриппе, причины чего были описаны ранее. Однако в период ранней реконвалесценции величина данного показателя в основной группе вновь повысилась, достигнув статистически значимо более высоких показателей, чем в группе сравнения, характеризуя своевременное и адекватное торможение воспалительных реакций, обусловленных высоким уровнем ИЛ-1 $\beta$ . Несколько иная динамика наблюдалась в отношении показателя ИЛ-6, концентрация которого на следующий день после введения препарата начала снижаться, а к моменту выписки достигла нормальных значений в 64,5% среди наблюдаемых пациентов.

**Таблица 8. Концентрация цитокинов в крови у больных на фоне введения Беталейкина.**

Показатели (пг/мл)		сроки определения (сутки)			
		1	2	3	4
ФНО- $\alpha$ (N<50пг/мл)	I	87 $\pm$ 6,9	74,9 $\pm$ 5,5*#	74,1 $\pm$ 7,2*#	65,6 $\pm$ 7,4***#
	II	88,5 $\pm$ 4,8	93,2 $\pm$ 4,9	91,1 $\pm$ 4,1	90,8 $\pm$ 4,2
ИЛ-1 $\beta$ (N<50пг/мл)	I	97,9 $\pm$ 8,4	115,4 $\pm$ 9,7#*	104,6 $\pm$ 10,1	88,2 $\pm$ 7,7#
	II	111,8 $\pm$ 7,8	94,8 $\pm$ 6,3#	87,8 $\pm$ 5,3#	77,3 $\pm$ 4,0#
РАИЛ (N<200пг/мл)	I	987,1 $\pm$ 111,6	644,6 $\pm$ 90,3*#	758,5 $\pm$ 70,1#	1183 $\pm$ 67,8***#
	II	827,2 $\pm$ 62,8	894,8 $\pm$ 53,2	881,5 $\pm$ 41,7	890,4 $\pm$ 36,1
ИЛ-6 (N<50пг/мл)	I	80,4 $\pm$ 6,8	70,3 $\pm$ 6,9*#	55,3 $\pm$ 4,9***#	47,3 $\pm$ 4,5*#
	II	78,6 $\pm$ 5,9	90,9 $\pm$ 5,1#	79,1 $\pm$ 4,6	62 $\pm$ 3,6
ИФН- $\alpha$ (N<50пг/мл)	I	25,2 $\pm$ 2,2	37,9 $\pm$ 2,9***#	38,3 $\pm$ 2,5***#	31,8 $\pm$ 1,4***#
	II	26,5 $\pm$ 3,0	25,7 $\pm$ 2,1	24,0 $\pm$ 1,8	20,7 $\pm$ 1,5#
АнтиИФН- $\alpha$ (N<200пг/мл)	I	25,2 $\pm$ 2,2	37,9 $\pm$ 2,9***#	38,3 $\pm$ 2,5***#	31,8 $\pm$ 1,4***#
	II	26,5 $\pm$ 3,0	25,7 $\pm$ 2,1	24,0 $\pm$ 1,8	20,7 $\pm$ 1,5#
ИФН- $\gamma$ (N<50пг/мл)	I	530,8 $\pm$ 51,5	475,6 $\pm$ 35,3#	484,8 $\pm$ 22,2***#	634,8 $\pm$ 48,5#
	II	539,5 $\pm$ 41,4	475,1 $\pm$ 39,0	649,9 $\pm$ 29,0#	622,2 $\pm$ 31,9
ИЛ-10 (N<50пг/мл)	I	93,5 $\pm$ 6,2	88,4 $\pm$ 10,6*	81,6 $\pm$ 7,1***#	80,4 $\pm$ 6,1***#
	II	94,3 $\pm$ 5,1	101,4 $\pm$ 5,2	101,4 $\pm$ 3,8	98,1 $\pm$ 4,0
ИЛ-8 (N<50пг/мл)	I	145,6 $\pm$ 13,1	139,7 $\pm$ 8,2*	121,7 $\pm$ 7,4#*	92,1 $\pm$ 4,2***#
	II	138,5 $\pm$ 8,5	142,8 $\pm$ 7,8	128,4 $\pm$ 6,1	121,1 $\pm$ 5,7#

1 — при поступлении, 2 — через 24 часа, 3 — через 5 дней, 4 — через 10–12 дней от начала лечения; \* — различия показателей статистически значимы по отношению к группе сравнения, # — по отношению к исходным данным; \* ( $p>0,05$ ), \*\* ( $p>0,01$ ), # ( $p>0,01$ ); I — основная группа ( $n=31$ ), II — группа сравнения ( $n=31$ )

Снижение показателя ИЛ-8 на фоне введения Беталейкина было более медленным, но все же к моменту выписки его концентрация в крови пациентов основной группы оказалась статистически значимо более низкой, чем в группе сравнения. Анализируя интерфероновый статус пациентов, необходимо отметить, что введение Беталейкина оказывало умеренное влияние на содержание как ИФН- $\alpha$ , так и ИФН- $\gamma$ . Концентрация

противовоспалительного цитокина ИЛ-10 в сыворотке крови статистически значимо снижалась по отношению к исходному уровню и сохранялась таковой до конца наблюдения, в отличие от группы сравнения, у пациентов которой имело место повышение содержания данного цитокина. Установлено влияние Беталейкина на содержание секреторного sIgA в носовых секретах. Несмотря на то, что у большинства больных его показатель был в пределах нормы, среднее значение его статистически значимо повышалось у пациентов основной группы с  $1,4 \pm 0,2$  до  $1,7 \pm 0,1$  пг/мл, в то время как в группе сравнения снизились с  $1,2 \pm 0,1$  до  $1,1 \pm 0,08$  пг/мл.

## Выводы

1. Включение в терапию пациентов с гриппом и ГПЗ нового отечественного препарата Интерфераль (аэрозоль) способствует статистически значимому сокращению продолжительности основных симптомов заболевания и, соответственно, более быстрому выздоровлению (в среднем на 1,5 дня). Результаты клинико–лабораторных наблюдений показали его безвредность и хорошую переносимость.
2. Назначение Беталейкина в виде подкожных инъекций способствует достоверному сокращению продолжительности катарального синдрома и физикальных изменений в легких. Средняя продолжительность рентгенологических изменений в легких у лиц, получавших Беталейкин, была статистически значимо короче, чем у пациентов сравнимой группы ( $14,7 \pm 0,5$  дней против  $19,5 \pm 0,7$  дня).
3. Применение препарата Беталейкин приводит к достоверному снижению концентрации в сыворотке крови ИЛ-8, ФНО- $\alpha$ , ИЛ-6, РАИЛ, антиИНФ- $\alpha$ , ИЛ-10 и повышению содержания ИНФ- $\gamma$  и ИНФ- $\alpha$ .

## Список литературы

1. Васильева Г.И., Иванова И.А., Тюкавкина С.Ю. Цитокины - общая система гомеостатической регуляции клеточных функций //Медицинская иммунология - 2010. - Т.12, № 4. - С. 305-310.
2. Деева, Э.Г. Антивирусные препараты для лечения гриппа. В книге: Грипп птиц: происхождение инфекционных биокатастроф, 2005.- С.131- 162.(35)
3. Калинина Н.М., Кетлинский С.А., Оковитый С.В., Шуленин С.Н. // Заболевания иммунной системы. Диагностика и фармакотерапия М.: Эксимо.- 2008.-496с.
4. Симбирцев, А.С. Цитокины: классификация и биологические функции //Цитокины и воспаление. 2004.-№- 3(2) - С.16-21.
5. Ramshaw, I. A. , Ramsay A. J., Karupiah G.et al. Cytokines and immunity to viral infections//Immunol.Rev. - 1998. - Vol. 159. - № 1. - P. 69-77.

## КЛИНИКА И СОВРЕМЕННАЯ ЭТИОПАТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ КОРИ У ДЕТЕЙ

Тимченко В.Н., Павлова Е.Б., Федючек О.О.

Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия

Корь представляет серьезную угрозу здоровью и жизни детского и взрослого населения, она опасна развитием тяжелых форм болезни, осложнений, остается одной из основных причин смерти среди детей раннего возраста во всем мире, несмотря на широкую активную иммунизацию. Проведено клиническое наблюдение за 44 больными корью детьми в возрасте от 5 мес. до 14 лет, госпитализированными в специализированный стационар. Обследование всех детей включало сбор анамнеза, ежедневный врачебный осмотр на протяжении всего периода стационарного лечения с оценкой выраженности клинической симптоматики. Показано, что в современных условиях корь у детей регистрируется в основном в возрастной группе от 5 мес. до 3 лет (81,8%) преимущественно у непривитых (95,5%), протекает типично, как правило, в среднетяжелой форме (95,4%). Частота осложнений кори составила 27,3%. Среди специфических осложнений преобладали стенозирующий ларинготрахеит и обструктивный бронхит.

Медикаментозное лечение больных корью проводили с использованием препаратов рекомбинатных интерферонов, симптоматической терапии лихорадки, ринита, кашля. В большинстве случаев (84,1%) в качестве средства этиотропной терапии использовали Виферон (детям до 7 лет — Виферон 150000 МЕ, старше 7 лет — Виферон 500000 МЕ) по 1 свече *per rectum* 2 раза в сутки курсом 5 дней. Виферон–мазь, Виферон–гель применяли для смазывания слизистой оболочки полости носа и ротоглотки. Терапия Вифероном привела к сокращению выраженности и длительности основных симптомов кори по сравнению с больными, у которых препараты ИФН не использовали. Для снижения температуры тела у 81,8% детей назначали ибупрофен (Нурофен для детей в суппозиториях — детям от 3 мес. до 2 лет, в суспензии — от 3 мес. до 12 лет, Нурофен в таблетках — 6 лет и старше) в разовой дозе 5–10 мг/кг до 3–4 раз в сутки). Нурофен для детей оказался эффективен как в катаральный период, так и в период высыпания кори. Необходимость в антибактериальной терапии возникла у 29 больных (65,9%). У всех детей констатировано выздоровление.

## V. РАЗРАБОТКИ СОВРЕМЕННЫХ ПРОТИВОГРИППОЗНЫХ ВАКЦИН

### РАЗРАБОТКА РЕКОМБИНАНТНЫХ ПРОТИВОГРИППОЗНЫХ ВАКЦИН НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ НА ОСНОВЕ M2 БЕЛКА

Блохина Е.А., Куприянов В.В., Котляров Р.Ю., Марданова Е.С., Равин Н.В.  
Центр "Биоинженерия" РАН, Москва, Россия

Традиционные противогриппозные вакцины создаются на основе поверхностных белков вируса гриппа — нейраминидазы и гемагглютанина, высокая изменчивость которых требует создания новых вакцин для вновь появляющихся штаммов. Консервативный M2 белок вируса гриппа является одним из кандидатов для создания «универсальной» вакцины. Однако, для создания эффективной вакцины этот белок должен быть присоединен к высокоиммуногенной наночастице — носителю. В качестве такого носителя мы используем вирусоподобные частицы (ВПЧ), образуемые ядерным антигеном вируса гепатита В (НВс). В докладе представлены результаты работ по созданию кандидатных противогриппозных вакцин на основе НВс частиц, несущих внеклеточный домен M2 белка (M2e). Присоединение M2e пептида к НВс частице может быть достигнуто либо на «генетическом» уровне в форме гибридного белка, способного к самосборке в ВПЧ, либо в результате сборки комплекса, включающего немодифицированные НВс частицы и M2e пептид, *in vitro*. Разработаны методы получения рекомбинантных M2eНВс частиц в бактериальной и растительной системах экспрессии. В экспериментах на мышах, проведенных НИИ гриппа Минздравсоцразвития, показано, что ряд разработанных препаратов обеспечивает полную защиту иммунизированных животных от летальной гриппозной инфекции. В результате этих экспериментов установлено, что для создания вакцины, эффективной против различных штаммов гриппа человека и животных необходимо включение в состав вакцины нескольких соответствующих M2e пептидов, разработаны способы получения таких препаратов.

#### Литература

1. Равин Н.В., Котляров Р.Ю., Марданова Е.С., Куприянов В.В., А.И. Мигунов, Л.А. Степанова, Л.М. Цыбалова, Киселев О.И., Скрыбин К.Г. (2012) Продукция в растениях рекомбинантной противогриппозной вакцины на основе вирусоподобных НВс-частиц, несущих внеклеточный домен M2 белка. *Биохимия*, т.77, №1, с. 43-52.
2. Blokhina E.A., Kuprianov V.V., Stepanova L.A., Tsybalova L.M., Kiselev O.I., Ravin N.V., Skryabin K.G. (2012) A molecular assembly system for presentation of antigens on the surface of Hbc virus-like particles. *Virology*, inpress (publishedonline 10 Oct 2012).

## ПОЛУЧЕНИЕ КАНДИДАТНЫХ УНИВЕРСАЛЬНЫХ ПРОТИВОГРИППОЗНЫХ ВАКЦИН НА ОСНОВЕ ХИМЕРНЫХ ЧАСТИЦ ВИРУСА ТАБАЧНОЙ МОЗАИКИ

Иванов П.А., Гасанова Т.В., Петухова Н.В.

МГУ им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет, кафедра вирусологии, Москва, Россия

Грипп А является одним из самых распространенных вирусных заболеваний человека и животных. Большинство коммерческих вакцин содержит HA (гемагглютинин) и NA (нейраминидаза). Эти гликопротеины являются высокоиммуногенными, но, одновременно, и высоко вариабельными, поэтому в последнее время интенсивно изучаются возможности получения универсальных противогриппозных вакцин широкого спектра действия, содержащих консервативные вирусные антигены. Перспективным кандидатом для создания подобной вакцины является N-концевая часть матричного белка M2, которая располагается на поверхности вириона. Последовательность данного эпитопа, получившего название M2e, состоит из 24-х аминокислотных остатков и остается практически неизменной с 1933 г.

Создана система экспрессии M2e-эпитопа вируса гриппа в растениях на основе генома вируса табачной мозаики (VTM), в качестве носителя антигена использовали белок оболочки (БО) VTM. Иммуногенные свойства эпитопа, представленного во множестве копий (до 2000 на 1 химерную частицу), значительно усиливаются.

Вирусные векторы VTM-M2e содержали различные варианты консенсусной последовательности M2e человека. Опыты по агроинfiltrации с помощью почвенной бактерии *Agrobacterium tumefaciens* показали, что рекомбинантные вирусы способны к дальнему транспорту по сосудистой системе растений *Nicotiana glauca*. Обратная транскрипция с последующей полимеразной цепной реакцией (ПЦР) доказала генетическую стабильность векторов VTM-M2e. Повторное заражение растений подтвердило этот вывод.

Из верхних листьев были выделены препараты химерных вирусов, содержание субъединиц белка оболочки с эпитопом достигало 90%, уровень накопления рекомбинантного БО VTM-M2e составлял 4 г на 1 кг сырой массы. Химерные вирионы не отличаются по морфологии от VTM дикого типа и представляют собой жесткие палочковидные частицы. Иммуноэлектронная микроскопия продемонстрировала, что M2e-эпитоп в составе химерных частиц экспонирован на поверхности вириона.

Полученные препараты использовали для иммунизации линейных мышей BALB/c. Показана выраженная иммуногенность химерных частиц. Важная особенность исследованных препаратов — потеря веса экспериментальных мышей при иммунизации практически не отличалась от контрольной группы. Мыши, иммунизированные препаратами VTM-M2e, были полностью устойчивы к инфекции 5 летальных доз (LD<sub>50</sub>) вируса гриппа A/PR/8/34 (H1N1), при этом число выживших мышей в контрольной группе не превышало 20%. У вакцинированных мышей наблюдалось значительно менее выраженное снижение веса и более мягкие клинические проявления заболевания. Защита от гетерологичного (3 аминокислотные замены в последовательности M2e) вируса A/California/04/2009 (H1N1) была частичной, при этом максимальный уровень достигал 75% (7-кратное превышение над контрольной группой).

Оценка соотношения антител, специфичных к эпитопу вируса гриппа или к носителю данного антигена (белок оболочки ВТМ), в полученных сыворотках показала значительное превышение содержания антител к эпитопу. Таким образом, в растениях получена кандидатная противогриппозная вакцина нового поколения, обладающая выраженным защитным действием при инфекции гомологичными и гетерологичными штаммами вируса гриппа А человека. Возможность универсального действия данной вакцины против вируса гриппа других серотипов, а также против птичьего гриппа, будет исследоваться в дальнейшей работе.

## **ВЛИЯНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ ВИРУСА ГРИППА НА КАЧЕСТВО ВАКЦИН**

Романова Ю.Р.

ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Мы показали, что при адаптации вирусов гриппа человека к росту в тканевых культурах (MDCK и Vero) и куриных эмбрионах возникают мутации в гемагглютинине (НА), приводящие к повышению рН его активации и снижению стабильности к кислым значениям рН среды и повышенной температуре. Стабильность молекулы НА, определяемая первичной структурой гена, оказывает прямое действие на инфекционность и иммуногенность вакцинных штаммов для живой противогриппозной вакцины. Вакцинные кандидаты, содержащие НА, идентичный по сиквенсу первичным изолятам, и характеризующиеся стабильным фенотипом, были более иммуногенными для хорьков при i.n. иммунизации, чем вирусы, содержащие мутантный НА.

Большинство производимых в мире в настоящее время противогриппозных препаратов — инактивированные вакцины, культивируемые на куриных эмбрионах. Выделяемые от больных гриппом вирусы часто не обладают параметрами роста в куриных эмбрионах, удовлетворяющими требованиям производителей вакцин. Например, вирусы серотипа H3N2 иногда совсем не растут в куриных эмбрионах. Поэтому, для производства вирусосодержащей массы часто используют адаптированные мутантные вирусы. Мы показали, что адаптация к росту в куриных эмбрионах также сопровождается появлением мутаций, снижающих стабильность НА. Для инактивированных вакцин потеря стабильности НА приводила к снижению содержания основного вирусного антигена НА в концентрированных очищенных инактивированных препаратах вируса. Предотвратить появление адаптационных мутаций в НА и сохранить стабильный фенотип вирусов, характерный для первичных изолятов, было возможно при использовании селективного давления при культивировании вирусов в клетках Vero в виде пониженного рН среды (рН 6,5).

Вирусы гриппа человека более устойчивы к кислому рН среды, чем высокопатогенные вирусы гриппа птиц серотипа H5N1. Введение мутации 58 K→I во вторую субъединицу НА вируса гриппа A/Vietnam/1203/04 (H5N1) методом индуцированного мутагенеза приводило

к снижению рН конформационного изменения НА вируса до уровня, известного для вирусов гриппа человека. Вирус с пониженным рН активации характеризовался повышенной стабильностью к кислой среде и повышенной температуре. Вакцинный кандидат, содержащий НА повышенной стабильности, характеризовался более высокой инфекционностью в клетках респираторного тракта млекопитающих и иммуногенностью при интраназальном введении.

## **КОНСТРУИРОВАНИЕ И СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ИСПЫТАНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ВАКЦИН ПРОТИВ ГРИППА H5N1**

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

1 — ФГБУ Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН, г. Москва, Россия

2 — Институт экспериментальной медицины РАМН, г. Санкт-Петербург, Россия.

3 — ФГУ ВНИИЗЖ, г. Владимир, Россия.

Целью нашей работы было создание не требующей покупки лицензии ветеринарной противогриппозной H5 вакцины, и сравнение живых и инактивированных вакцин. Сравнивались как коммерческие вакцины, так и сконструированные в лаборатории молекулярной биологии вирусов гриппа Института полиомиелита и вирусных энцефалитов РАМН экспериментальные вакцинные штаммы. Используя оригинальный метод «обратной селекции», который заключался в культивировании исходного вируса в условиях, имитирующих жизненный цикл вирусов диких уток, из высоковирулентного вируса H5N1 A/Chicken/Kurgan/3/2005 был получен вариант, аттенуированный для мышей и

## **DESIGNING AND PARALLEL TESTING OF ANTI-H5N1 INFLUENZA EXPERIMENTAL VACCINES**

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

1 — M.P.Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis, RAMS, Moscow, Russia

2 — Research Institute of Experimental Medicine, RAMS, St.-Petersburg, Russia

3 — Federal Center for Animal Health, Vladimir, 600901 Russia

The goal of this work was designing of the unlicensed anti-H5N1 influenza poultry vaccine, and parallel testing of inactivated (split and whole virion) and live vaccines. Inactivated vaccines as well as designed in M.P. Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis experimental strains were compared. The highly pathogenic A/chicken/Kurgan/3/2005, (Ku/05) H5N1 influenza virus was attenuated using the method of “reverse selection” in an environment simulating the life cycle of wild duck influenza viruses. The hemagglutinin from this strain (Ku-at) has amino acid substitutions of Asp54/Asn and Lys222/Thr in HA1 and Val48/Ile and Lys131/Thrin HA2 while maintaining the polybasic HA cleavage site. Five experimental live vaccines were tested; two of them had the hemagglutinin of the A/Vietnam/1203/04 strain lacking

кур (Ku-at). Гемагглютинин Ku-at содержит 4 аттенуирующие мутации: Asp54/Asn Lys222/Thr в HA1 и Val48/Ile и Lys131/Thr в HA2, при сохранении полиосновного сайта и нарезания. Методом реассортации из этого вируса, а так же из вакцинного штамма VNH5N1-PR8/CDC-RG (VN-PR8) были получены экспериментальные вакцинные штаммы с внутренними генами от холодаадаптированного донора аттенуации либо от непатогенного птичьего вируса. Для сравнения использовали также апатогенный H5N2 вирус A/Duck/Moscow/4182/2010 (dk4182), выделенный из фекалий утки на московском пруду.

В опытах на мышах было показано, что все испытанные живые экспериментальные вакцины, как и инактивированная цельновирионная, после однократной вакцинации вызывают высокий прирост антител, и хорошо защищают от последующего заражения высокопатогенным H5N1 вирусом. Инактивированная субъединичная вакцина намного менее эффективна.

Индекс патогенности на курах всех экспериментальных штаммов упал до нуля, по сравнению со значением 2,89 для исходного вируса A/Chicken/Kurgan/3/2005. Сравнивались разные схемы вакцинации цыплят. Наилучшие результаты были получены при аэрозольной вакцинации однодневных цыплят штаммом dk4182. Этот вирус апатогенен и обеспечивает полную защиту от последующего заражения высокой дозой вируса A/Chicken/Kurgan/3/2005.

**Ключевые слова:** вирус гриппа А, H5N1, ветеринарная вакцина

the polybasic HA cleavage site and two had hemagglutinin from Ku-at. The rest genes of these experimental strains were from the H2N2 cold adapted master strain A/Leningrad/134/17/57 (VN-Len and Ku-Len) or from the apathogenic H6N2 virus A/Gull/Moscow/3100/2006 (VN-Gull and Ku-Gull). The fifth was apathogenic H5N2 virus A/Duck/Moscow/4182/2010(dk4182), isolated from the mallard feces in the Moscow pond.

A single immunization of mice with all experimental live vaccine as well as inactivated whole virion H5N1 vaccine elicited a high level of serum antibodies and provided complete protection against challenge with the lethal virus A/Chicken/Kurgan/3/05 (H5N1). Split vaccine was much less effective. Pathogenicity indexes of Ku-at and the rest tested strains for chicken were zero, while index of parent H5N1 virus A/chicken/Kurgan/3/2005 was 2.98. Intramuscular, intranasal and aerosol route of vaccination were compared. The best result was obtained via aerosol vaccination of chicken by the dk4182 strain. This virus was totally apathogenic for one-day old chicken and provided complete protection against highly pathogenic H5N1 virus.

**Keywords:** influenza virus A, H5N1, poultry vaccine.

## РЕАССОРТАЦИЯ ЭПИДЕМИЧЕСКИХ И ВАКЦИННЫХ ШТАММОВ ВИРУСА ГРИППА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Киселева И.В., Федорова Е.А., Дубровина И.А., Баженова Е.А., Иванова Е.В., Ларионова Н.В.,  
Руденко Л.Г.

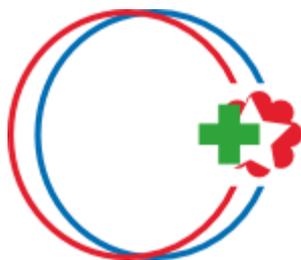
ФГБУ «НИИЭМ» СЗО РАМН, Санкт–Петербург, Россия

Реассортация вирусов гриппа в природе — широко распространенное явление, играющее ключевую роль в появлении новых штаммов, в том числе пандемических. При смешанной инфекции происходит обмен сегментами генома разных вирусов, в результате чего появляется вирус с новой комбинацией свойств, непредсказуемо взаимодействующий с популяцией хозяина. По мнению Всемирной организации здравоохранения, использование противогриппозных вакцин является наиболее эффективным путем защиты восприимчивой популяции как от сезонно возникающих эпидемий, так и глобальных пандемий гриппа. Кроме того, массовая вакцинация имеет целью ограничить безудержное распространение нового возбудителя в природе и снизить риски новых событий реассортации. Широкое применение живых гриппозных вакцин (ЖГВ), особенно в пандемический по гриппу период, ставит закономерный вопрос о возможной трансмиссивности ЖГВ и реассортации вакцинных штаммов с циркулирующими уличными вирусами гриппа. Чтобы развеять эти опасения, в настоящей работе были изучены свойства реассортантов, полученных при скрещивании «диких» и вакцинных штаммов вируса гриппа в экспериментах *in vivo*.

Нами были изучены свойства реассортантов, полученных при скрещивании «диких» и вакцинных штаммов вируса гриппа в экспериментах *in vivo*. Проанализированы последствия принудительного заражения животных (морских свинок) двумя и тремя штаммами вируса гриппа, одним из которых был холодоадаптированный вакцинный штамм. Показано, что реассортация «диких» вирусов гриппа с холодоадаптированными вакцинными штаммами ЖГВ возможна не в любых условиях, и может не происходить даже под давлением селектирующих факторов. В ситуации, когда заражение животных одновременно 2–3 вирусами гриппа приводило к формированию реассортантов, ни один из них по биологическим свойствам не проявлял большей вирулентности, чем соответствующие «дикие» родители. Установлен факт отсутствия контагиозности холодоадаптированных штаммов, что открывает новые перспективы применения живой гриппозной аттенуированной вакцины как в эпидемический по гриппу период, так и в пандемической ситуации.

Таким образом, доказана необоснованность опасений, связанных с возможностью формирования на основе вакцинных штаммов ЖГВ мутантных вирусов с высоким уровнем патогенности.

Группа компаний «Санта» — 20 лет на  
российском рынке!



Представительство европейских  
брендов:

**Кармолис®** [www.carmolis.ru](http://www.carmolis.ru)  
(Др.А.иЛ.Шмидгалл/Австрия и  
Иромедика/Швейцария)

Защита от простуды и гриппа!

*Препараты эфирных масел  
лекарственных растений.*

**БЛОК®** [www.blocbloc.ru](http://www.blocbloc.ru)  
(Др.А.иЛ.Шмидгалл/Австрия)

Вкусная энергия! Заблокируй усталость!

*Аскорбинка с фруктовыми соками.*

**Ультра-Адсорб®** [www.ultra-adsorb.ru](http://www.ultra-adsorb.ru)  
(Лаинко/Испания)

Всегда комфортное пищеварение!

*Активированный уголь в капсулах.*



МБНПК [«ЦИТОМЕД»](#) — одна из первых отечественных фармацевтических компаний–производителей. На фармацевтическом рынке с 1989 года. ЗАО «Цитомед» в числе первых начал поддержку научных разработок в области отечественной биохимии и фармакологии, организацию производства оригинальных российских препаратов.

За 20 лет честного и безупречного труда были разработаны и внедрены во врачебную практику:

**«Тимоген» спрей и в ампулах** — иммуномодулятор для лечения иммунодефицитных состояний

**«Простатилен» лиофилизат и свечи** — препарат для лечения заболеваний предстательной железы

**«Эпиталамин»** — препарат для нормализации гормонального баланса

**«Цитовир»** для взрослых и детей — препарат для профилактики и лечения гриппа и ОРЗ

**«Тимоген» крем** — препарат для лечения атопического дерматита.

Производство ЗАО МБ НПК «Цитомед» — это современный комплекс, располагающийся в Санкт-Петербурге почти на 1 200 кв. метров с цехами по производству мазей, кремов, суппозиториев, таблеток.

Лекарственные препараты производятся на современном высокотехнологичном оборудовании из качественного сырья на основе современных технологий. ЗАО «Цитомед» сотрудничает со специалистами НИИ экспериментальной медицины РАМН, Военно–медицинской академии им. С.М.Кирова, Санкт-Петербургского Государственного медицинского университета имени И.П. Павлова, Санкт-Петербургской медицинской академии последипломного образования.