

ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России

НАУЧНО–ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ–БИЕННАЛЕ

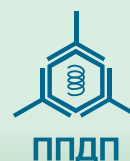
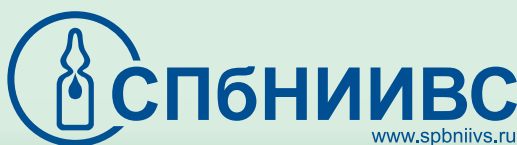
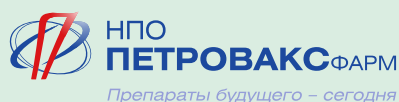


«ГРИПП: ВИРУСОЛОГИЯ, ЭПИДЕМИОЛОГИЯ, ПРОФИЛАКТИКА И ЛЕЧЕНИЕ»

ОТЕЛЬ «ХОЛИДЕЙ ИНН
САНКТ–ПЕТЕРБУРГ – МОСКОВСКИЕ ВОРОТА»

27–28 ОКТЯБРЯ 2016 ГОДА

СБОРНИК МАТЕРИАЛОВ



федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научно–исследовательский институт гриппа»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научно–практическая конференция–биеннале
«Грипп: вирусология, эпидемиология,
профилактика и лечение»

Санкт–Петербург,
27–28 октября 2016 года

Сборник материалов

2016 год

СОДЕРЖАНИЕ

Материалы расположены по порядку, аналогичному программе конференции.

Тезисы докладов 27 октября 2016 года

Пленарное заседание

Консервативные антигены вируса гриппа: назад в будущее.....4
Иванов П.А., Гасанова Т.В.

Итоги доклинических исследования универсальной противогриппозной вакцины «Унифлю»..... 5
Цыбалова Л.М., Степанова Л.А., Потапчук М.В., Куприянов В., Равин Н.В.

Новые высокопатогенные вирусы гриппа птиц — 2016 год.....6
Шестоалов А.М., Шаршов К.А.

Эпидемиология гриппа

Грипп у беременных: результаты госпитального надзора в период 2012–2016 гг.....7
Бурцева Е.И., Трушакова С.В., Кистенева Л.Б., Мукашева Е.А., Краснослободцев К.Г., Гарина Е.О., Мирянова Т.В., Аюкова О.В., Девяткин А.В.

Заболеемость гриппом и ОРВИ и летальность от гриппа в период 2009–2016 гг. в городах Российской Федерации по материалам 2-х Национальных Центров ВОЗ.....9
Карпова Л.С., Бурцева Е.И., Соминина А.А.

Сезонность гриппа в средних широтах и тропиках: депонирование биоаэрозоля в легких как ключ к разгадке..... 11
Ишматов А.Н.

Антигенная картография в изучении эволюции вирусов гриппа.....12
Еропкин М.Ю., Еропкин М.Ю., Даниленко Д.М., Коновалова Н.И., Петрова П.А., Желтухина А.И.

Результаты оценки затрат территориальных фондов ОМС на оказание медицинской помощи больным гриппом и ОРВИ в 59 городах Российской Федерации.....14
Сысоева Т.И.

Генетическая и антигенная эволюция вирусов гриппа

Геном пандемического вируса А/Н1N1-2009: пять лет эволюции.....16
Харченко Е.П.

Детерминация гомологичных фрагментов в структуре белков вирусов гриппа А/ Н1N1 pdm09 2009–2016 гг. выделения и белков системы гемостаза человека.....18
Жилинская И.Н., Фадеев А.В., Прочуханова А.Р., Харченко Е.П.

Аттенуирующие мутации в гемагглютинине вируса гриппа H5N1.....20
Ломакина Н.Ф., Садыкова Г.К., Тимофеева Т.А., Боравлёва Е.Ю., Прилипов А.Г., Гамбарян А.С.

Структурные характеристики вирусоподобных частиц 4M2E-NVCore.....21
Егоров В.В., Цыбалова Л.М., Ягудина Я.А., Шалджян А.А., Горшков А.Н., Степанова Л.А., Ковалева А.А., Куклин А.И., Лебедев Д.В.

Моделирование конформационной подвижности рибонуклеопротеиновых комплексов вируса гриппа А методом молекулярной динамики.....22
Швецов А.В., Егоров В.В., Сергеева М.В., Цыбалова Л.М.

Антигенное разнообразие вирусов гриппа, выделенных от детей в 2013–2016 гг. в г. Санкт-Петербурге.....23
Петрова П.А., Коновалова Н.И., Даниленко Д.М., Щеканова С.М., Васильева А.Д., Желтухина А.И., Лобова Т.Г., Еропкин М.Ю.

Тезисы докладов 28 октября 2016 года

Противогриппозные вакцины: новые достижения

Разработка живых гриппозных вакцин против потенциальных пандемических вирусов гриппа.....	25
<i>Киселева И.В.</i>	
Растения как биофабрики для получения противогриппозных вакцин.....	27
<i>Блохина Е.А., Марданова Е.С., Котляров Р.Ю., Степанова Л.А., Цыбалова Л.М., Равин Н.В.</i>	
Использование апатогенного вируса диких уток в качестве живой оральной ветеринарной вакцины предотвращает циркуляцию вируса и защищает птиц.....	29
<i>Гамбарян А.С., Боравлева Е.Ю., Гордейчук И.В., Луницын А.В.</i>	
Итоги иммунопрофилактики гриппа в эпидемический сезон 2015–2016 годов.....	30
<i>Селькова Е.П., Гренкова Т.А., Полежаева Н.А., Суранова Т.Г.</i>	
Оценка иммуногенных и протективных свойств отечественной инактивированной расщепленной трехвалентной гриппозной вакцины.....	32
<i>Курская О.Г., Шариков К.А., Цжен Мэн, Игнатъев Г.М., Шестопалов А.М.</i>	

Противогриппозные вакцины: технология и контроль

Роль мертиолята в составе вакцин в проблеме меркуриализма.....	34
<i>Саватеева-Любимова Т.Н., Александров А.Г.</i>	
Оптимизация технологии производства инактивированных вакцин против гриппа.....	36
<i>Прошина Е.А., Савина Н.Н.</i>	
Количественная оценка вирусных белков в сложной смеси методом масс-спектрометрии.....	39
<i>Якудина Я.А., Тараскин А.С., Плотникова М.А., Егорова М.А., Шалджян А.А., Егоров В.В.</i>	
Повышение иммуногенности субъединичной гриппозной вакцины с помощью конъюгирования поверхностных антигенов вируса гриппа с окисленным декстраном.....	40
<i>Зайцева Е.С.</i>	
Результаты эпидемиологического исследования эффективности применения вакцины Гриппол плюс. Опыт Республики Беларусь.....	44
<i>Шмельёва Н.П., Шиманович В.П., Грибкова Н.В., Сивец Н.В., Лапо Т.П.</i>	

Клинико-иммунологические аспекты респираторных инфекций

Сравнительные клинико-иммунологические аспекты пандемического гриппа в педиатрии.....	45
<i>Афанасьева О.И., Головачева Е.Г., Афанасьева В.С.</i>	
Роль вируса гриппа А и LPS <i>E. coli</i> в индукции дисфункции клеток эндотелия (на модели перевиваемой линии клеток эндотелия человека ECV-304).....	46
<i>Смирнова С.С., Смирнова Т.Д.</i>	
Респираторно–синцитиальная вирусная инфекция. Роль в структуре респираторной патологии, особенности патогенеза.....	48
<i>Кривицкая В.З., Петрова Е.Р., Соминина А.А.</i>	
Анализ летальных случаев гриппа А(H1N1)pdm09 в эпидемический сезон 2015/2016гг. в Санкт-Петербурге.....	50
<i>Волощук Л.В., Рожкова Е.Г., Го А.А., Тумина Т.Л., Садыхова М.И., Заришнюк П.В., Днепровская Г.Л., Гужов Д.А., Обижаева Е.С.</i>	

ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ 27 ОКТЯБРЯ 2016 ГОДА. ПЛЕНАРНОЕ ЗАСЕДАНИЕ

КОНСЕРВАТИВНЫЕ АНТИГЕНЫ ВИРУСА ГРИППА: НАЗАД В БУДУЩЕЕ

П.А.Иванов, Т.В.Гасанова

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

В нашей лаборатории совместно с НИИ гриппа на основе генома вируса табачной мозаики (ВТМ) была создана и успешно протестирована система презентации М2е-эпитопа (3 варианта) и пептида слияния гемагглютинина (fr, 14 преимущественно гидрофобных аминокислот, GLFGAIAGFIEGGW) вируса гриппа в растениях. Последовательности антигенов клонировали в С-концевую область гена белка оболочки (БО).

Мыши, иммунизированные препаратами ВТМ-М2е, были устойчивы к инфекции 5-ти летальных доз (LD50) не только гомологичного, но и гетерологичного штаммов вируса гриппа. Оценка соотношения антител в полученных сыворотках, специфичных к эпитопу вируса гриппа или к БО ВТМ, показала значительное превышение содержания антител к эпитопу (5:1). Недавняя публикация (Banik et al., 2015) продемонстрировала, что генетически модифицированные частицы ВТМ (реакционноспособный остаток лизина в N-концевой части БО) можно использовать для химической конъюгации с 3-мя иммуногенными белками, обеспечивая защиту против туляремии у мышей (молекулярные массы от 17 до 70 кДа).

По современным представлениям, эффективность «универсальной» противогриппозной вакцины зависит от индукции кросс-реактивных Т-клеток; подобный иммунитет не способен предотвратить инфекцию, но значительно ослабляет ее развитие. Вакцины на основе М2е действуют, прежде всего, по механизму ADCC посредством Fc-рецепторных клеток и CD4+ лимфоцитов (Deng et al., 2015). При этом, в основном, вырабатываются специфические IgG и, в случае мукозальной иммунизации, IgA. Заражение животных, вакцинированных М2е-препаратом, приводило к активной выработке антител против внутренних белков М1 и NP. Дальнейшее развитие идеи гетеросубтипических вакцин предполагает использование консервативных антигенов, дополняющих функции М2е, например стеблевого домена гемагглютинина (субтипы 1 и 2). В последние годы опубликовано достаточное количество данных, подтверждающих защиту широкого спектра у птиц и мышей при экспрессии полноразмерных генов NP, М1 и PB с помощью адено- и поксвирусных векторов. Белок М1 способен формировать стабильные вирусоподобные частицы в клетках насекомых. В случае нейраминидазы наиболее перспективной мишенью представляется протяженный фрагмент белка в районе активного центра, включающий нонапептид ILRTQESEC.

ИТОГИ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ УНИВЕРСАЛЬНОЙ ПРОТИВОГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ «УНИФЛЮ»

Цыбалова Л.М.¹, Степанова Л.А.¹, Потапчук М.В.¹, Куприянов В.², Равин Н. В.²

1 — ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, г. Санкт–Петербург, Россия

2 — Институт биоинженерии ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, г. Москва, Россия

Контроль эпидемий и пандемий гриппа является одной из основных проблем современного здравоохранения. Существенно приблизиться к ее решению можно путем создания вакцин, направленных на широкий круг вирусов гриппа. Целевыми вирусными белками для такого рода вакцин, «универсальных», являются белки, общие по своим аминокислотным последовательностям для всех субтипов вирусов гриппа А и доступные для эффекторов иммунной системы. Белком, соответствующим этим требованиям, является белок М2 и, особенно, его эктодомен — М2е. Его характеризует высокая консервативность — практическая идентичность для вирусов гриппа А человека, кроме АН1N1рdm09, и обильное экспонирование на инфицированных клетках.

Нами была разработана конструкция гибридного белка, представляющего коровый антиген вируса гепатита В с включением в иммунодоминантную петлю четырех копий протеина М2е.

В качестве адъюванта использовали препарат «Деринат». Для изучения специфического действия вакцинного препарата — вакцины «Унифлю» (40 мкг рекомбинантного белка и 500 мкг «Дерината») — мышей иммунизировали в/м три раза с интервалом 2 нед. Через 2 недели после третьей иммунизации мышей инфицировали вирусами гриппа разных субтипов в дозе 5 LD50.

Изучение специфической активности рекомбинантной вакцины «Унифлю» показало, что она обладает высокой иммуногенностью: стимулирует образование М2е специфических IgG антител, выявляемых в сыворотке крови и бронхоальвеолярных лаважах, в том числе высоких уровней анти-М2еIgG подкласса IgG2a. Вакцина усиливает М2е активированную пролиферативную активность лимфоцитов и приводит к формированию М2е-специфического Т-клеточного ответа.

Вакцина «Унифлю» обеспечивала 90–100% защиту от летального заражения вирусами гриппа А человека различных субтипов: А/PR/8/34 (H1N1), А/Japan/305/57 (H2N2), А/Aichi/2/68 (H3N2), а также 80% выживаемость мышей, зараженных летальной дозой вируса гриппа А/California/7/2009 (H1N1)рdm09, гетерологичного по М2е по отношению к другим вирусам гриппа А человека. Вакцина снижала на 1,5–2,5 Lg репродукцию вирусов гриппа А разных субтипов в легких животных. Результаты по доклиническому изучению протективности рекомбинантной гриппозной вакцины «Унифлю» свидетельствуют о широком спектре ее защитного действия в отношении всех субтипов вирусов гриппа А человека.

На животных, включая хорьков, было показано, что вакцина не обладает острой и хронической токсичностью, была безопасна, не оказала иммунотоксического влияния на организм экспериментальных животных, а также не вызвала развития гиперчувствительности.

НОВЫЕ ВЫСОКОПАТОГЕННЫЕ ВИРУСЫ ГРИППА ПТИЦ — 2016 ГОД

Шестопалов А.М.*(shestopalov2@ngs.ru), Шаршов К.А.

ФГБНУ НИИЭКМ, г. Новосибирск, Россия

Появившийся в 1996 году высокопатогенный вирус птичьего гриппа H5N1 в Гуандонге (Китай) в настоящее время превратился в несколько генетических клад. Начиная с 2008 года, клады 2.3.4 HPAIV со 2 и 8 нейраминидазами были выявлены в Китае. Вспышки H5N8 клады 2.3.4.4 HPAIV за пределами Китая была впервые зарегистрирована в Южной Корее в январе 2014. Во время этой вспышки были определены две различных H5N8 группы, Пуан- и Сунчхон-подобные вирусы. Летом 2014 года вирус этого субтипа был выявлен у дикой утки вида свиязь в Саха-Якутии.

2016 год принес новые сюрпризы и находки. На озере Увс-Нуур (Республика Тыва) был собран материал от 59 птиц различных видов. Из собранных образцов было выделено 11 изолятов вируса гриппа, которые в РГА-РТГА были определены как H5, а в дальнейшем по ПЦР и в сиквенсе типированы как вирусы гриппа H5N8. Индекс патогенности на цыплятах был определен как 2,84.

Филогенетический анализ показал что три выбранных изолята вируса, для которых были определены первичные структуры белка HA, характеризуются наличием протеолитического сайта расщепления HA (PLREKRRKR/G), присущего изолятам высокопатогенного вируса гриппа птиц. Согласно анализу первичных структур геномов, а также филогенетическому анализу, по пяти сегментам (PB1, PB2, PA, NP и M) исследованные штаммы вируса гриппа H5N8 схожи с низко патогенными штаммами вирусов гриппа птиц, которые были изолированы на территории Монголии, Китая и Вьетнама. Исходя из нуклеотидных последовательностей сегментов генома, кодирующих HA, NA и NS все три штамма относятся к высокопатогенным вирусам гриппа птиц (генетическая группа В клады 2.3.4.4). Вирусы гриппа, характеризующиеся схожими первичными структурами HA, NA и NS, изолировались в 2014 г. на востоке Китая.

Таким образом, глобальное распространение вируса гриппа H5 субтипа клады 2.2 в 2005–2006 году и и клады 2.3.4.4 в 2014 году указывает на то что, юг Сибири играет важную роль в поддержании, развитии и распространении высокопатогенных вирусов гриппа. Причем, озеро Увс-Нуур является одним из ключевых мест для этого процесса. На это указывает выявление высокопатогенных вирусов гриппа клады клады 2.3.2 2.2 в 2006 году и клады 2.3.2 в 2009 году у диких птиц обитающих на этом озере.

Поскольку через этот регион проходят несколько важных путей миграции околотовдных и водоплавающих птиц, выявление высокопатогенного вируса гриппа у них здесь имеет важное, если не ключевое значение для распространения новых вариантов гриппа H5N8 субтипа во время следующих миграции.

Благодарности: работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ (Федеральная программа — проект нет. RFMEFI61315X0045).

ЭПИДЕМИОЛОГИЯ ГРИППА

ГРИПП У БЕРЕМЕННЫХ: РЕЗУЛЬТАТЫ ГОСПИТАЛЬНОГО НАДЗОРА В ПЕРИОД 2012–2016 гг.

Бурцева Е.И.¹, Трушакова С.В.¹, Кистенева Л.Б.¹, Мукашева Е.А.¹, Краснослободцев К.Г.¹, Гарина Е.О.¹, Мирянова Т.В.², Аюкова О.В.², Девяткин А.В.²

1 — *Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», г. Москва, Россия*

2 — *ГБУЗ «Инфекционная клиническая больница №1» ДЗ г. Москвы, Россия*

В течение пандемий гриппа 1918/19 и 1957 гг. смертность среди беременных женщин, инфицированных гриппом, превысила 50% — это 10% от всех умерших. В период пандемии 2009г. в РФ умерли 83 беременные женщины (15,8% от общего числа погибших); в 2016 г. — 8 из 663 (1,2%). В период беременности, особенно во втором и третьем триместрах, происходят адаптационные процессы, такие как физиологическая иммуносупрессия, изменения в эндокринной, респираторной и сердечно-сосудистой систем (Louie J., 2010; Киселев О.И., 2011, 2012). В этот период женщина крайне уязвима и восприимчива к респираторным вирусным инфекциям; заболеваемость среди беременных в несколько раз выше по сравнению с небеременными женщинами (Swing W., 2000; Acs N., 2006). Риск развития тяжелых респираторных заболеваний возрастает до 35,6 на 10 000 беременных с сопутствующей патологией против 2 на 10 000 у женщин без патологии. Материнское инфицирование вирусом гриппа является причиной антенатальной гибели плода, развития врождённых патологий, осложнённого течения беременности.

Цель исследования заключалась в оценке бремени вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09, А(Н3N2) и В на тяжесть течения гриппозной инфекции у беременных, госпитализированных с ОРВИ в период 2012–2016 гг. в ГБУЗ «Инфекционная клиническая больница №1» ДЗ г. Москвы. Исследования проводили согласно Протоколу Глобальной Сети Госпитального надзора за гриппом, включающего стандартизацию сбора и анализа данных, в т.ч. проведение лабораторных исследований (GIHSN, <http://gihsn.org/>). Сеть основана на государственно–частном партнерстве и включает госпитали ряда стран, расположенных в разных частях мира, с целью улучшения понимания глобальной эпидемиологии гриппа и оценки эффективности вакцин в группах риска. Дизайн исследования включал отбор женщин на разных сроках беременности, госпитализированных с симптомами ОРВИ в период активности вирусов гриппа в сезонах 2012–2016 гг. (декабрь–май), согласно критериям: общим — лихорадка, головная боль, боль в мышцах и общее недомогание; катаральным — кашель, боль в горле, одышка, появившиеся в первые 7 дней до госпитализации. У всех включенных в исследование были взяты образцы носоглоточных смывов с последующей постановкой ОТ-ПЦР на вирусы гриппа А(Н1N1)pdm09, А(Н3N2), В/Ям и В/Вик.

В период четырех сезонов было опрошено 2554 беременных, 1806 из них были включены в исследование. У 845 (47%) беременных была подтверждена гриппозная инфекция, том числе: грипп А(Н1N1)pdm09 — 44%, А(Н3N2) — 27% и В/Ям — 13% и В/Вик — 10%. Частота диагностирования типа/подтипа вирусов гриппа коррелировала с их активностью в период эпидемических подъемов.

Полученные результаты позволили сделать следующие выводы. Беременность остается одним из факторов риска инфицирования вирусами гриппа независимо от типа/подтипа. Риск развития тяжелого течения гриппозной инфекции возрастает со сроками гестации и требует лечения в условиях стационара. Наличие сопутствующих заболеваний (сердечно-сосудистые, органов мочевыводящей системы, аутоиммунные заболевания) повышают риск развития гриппозной инфекции и осложнений. У беременных с гриппозной инфекцией более часто применяли кесарево сечение. Госпитализация беременных с гриппозной инфекцией позволила снизить частоту летальных исходов, и в период последних четырех эпидемий нами не было выявлено ни одного случая. Раннее назначение противовирусной терапии снижает риск тяжелого течения инфекции и развития осложнений.

ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ ГРИППОМ И ОРВИ И ЛЕТАЛЬНОСТЬ ОТ ГРИППА В ПЕРИОД 2009–2016 гг. В ГОРОДАХ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ПО МАТЕРИАЛАМ 2-х НАЦИОНАЛЬНЫХ ЦЕНТРОВ ВОЗ

Карпова Л.С.¹, Бурцева Е.И.², Соминина А.А.¹

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

2 — ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», г. Москва, Россия

Проведен анализ информации, еженедельно поступающей из 59 городов, сотрудничающих с Национальными центрами по гриппу при ФГБУ НИИ гриппа и ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи. Общая численность наблюдаемого населения — 52 млн. человек. Представлены сравнительные данные заболеваемости гриппом и ОРВИ, госпитализации и смертности в различных возрастных группах детей (0–2, 3–6 и 7–14 лет) и взрослых (15–64 и 65 лет старше) в пандемию 2009 года и эпидемию 2016 года.

Эпидемия 2016 г., в отличие от пандемии с ее необычно ранним началом (28.09.2009–04.10.2009), началась в обычный для гриппа период (11.01.2016–17.01.2016). Синхронный рост заболеваемости отмечен сразу в 8 городах, расположенных в 5 Федеральных округах Европейской части России: Южном, Приволжском, Северо-Западном, Центральном и Уральском, а на следующей неделе — в городах Сибири и Дальнего Востока.

Таким образом, эпидемия 2016 года распространилась с европейской части России на восток, в отличие от пандемии, которая, наоборот, шла с Дальнего Востока на запад.

Пик эпидемии в стране (с 25.01 по 31.01) наступил уже через две недели от начала эпидемии, в то время как в период пандемии 2009 года — через 6 недель. Это свидетельствует о более высоком темпе развития эпидемии последнего сезона, чем пандемии.

Анализ динамики заболеваемости гриппом и ОРВИ в 59 городах РФ в среднем показал, что на пике последней эпидемии заболеваемость была больше, чем во все предшествующие сезонные эпидемии и сопоставима с показателями заболеваемости на пике эпидемий 2009–2010 гг. и 2010–2011 гг. (1,3% и 1,4% и 1,43%). Выявлены возрастные особенности заболеваемости в эпидемию 2016 года, по сравнению с пандемией: заболеваемость на неделе пика была больше у детей 3–6 лет (7,5% и 6,8%) и лиц старше 65 лет (0,3% и 0,2%) и меньше в других возрастных группах.

Эпидемия 2016 г. от пандемии 2009 г. отличалась меньшей продолжительностью в стране (12 и 17 недель) и в городах (4,6 и 6,8 недель); заболеваемостью населения в границах эпидемии в городах (5,4% и 8,5%) и за период эпидемии в стране (9,6% и 14,4%) и летальностью всего населения (в 1,7 раз) и в возрастных группах, кроме лиц старше 65 лет, у которых летальность была больше. А частота госпитализации, особенно, лиц старше 65 лет (в 3,7 раза) и доли умерших среди лиц старше 54 лет и сердечно-сосудистой патологии были больше.

В Санкт–Петербурге эпидемия 2016 г. от других городов отличалась большей продолжительностью, заболеваемостью во всех возрастных группах, процентом госпитализированных с диагнозом «грипп» и летальностью от гриппа (в 3,3 раза), что связано с низким уровнем популяционного иммунитета и меньшей частотой госпитализации, особенно, детей и лиц старше 65 лет.

Ключевые слова: эпидемия, пандемия, заболеваемость, госпитализация и летальность от гриппа и ОРВИ.

СЕЗОННОСТЬ ГРИППА В СРЕДНИХ ШИРОТАХ И ТРОПИКАХ. ДЕПОНИРОВАНИЕ ИНФЕКЦИОННОГО БИОАЭРОЗОЛЯ В ЛЕГКИХ КАК КЛЮЧ К РАЗГАДКЕ

Ишматов А.Н.

Независимый исследователь (к.ф.-м.н.), с. Советское, Алтайский край, Россия

Введение. Зараженный человек при дыхании выделяет инфекционный биоаэрозоль с каплями размером менее 1 мкм (~300нм) [1].

Методы. Проведен анализ литературы и исследований по эпидемиологии ОРВИ и гриппа в различных климатических условиях, процессах передачи, процессах и предикторах начала заболеваний. На основе этого анализа, известных данных по тепло-массопереносу и депонированию частиц в легких, а также на основе численного моделирования получены основные результаты работы.

Результаты. В настоящей работе показано, что такие биоаэрозоли практически не несут опасности в нормальных условиях. Но все в корне меняется, когда человек находится в условиях с прохладным воздухом. В таких условиях при вдохе в легких происходит процесс критического перенасыщения водными парами и на микро- и наночастицах, которые попадают в легкие и содержат вирус или бактерии, начинают конденсироваться водные пары — такие капли вырастают в десятки раз, становятся большими и массивными. Если при дыхании в нормальных условиях такие частицы и капли оседают в легких с вероятностью 3–20%, то дыхание прохладным воздухом ведет к повышению их оседания/депонирования в легких до 97%. Эффект конденсационного роста и максимального депонирования биоаэрозоля в легких наблюдается при условиях свойственных вспышкам сезонных ОРВИ и гриппа как в средних широтах: $T < 15^{\circ}\text{C}$; $RH < 60\%$ (T — температура; RH — относительная влажность); так и в тропиках: $RH > 80\%$, $T = 17\text{--}25^{\circ}\text{C}$ (прим: сезон дождей в тропиках связывают с сезоном ОРВИ и гриппа).

Заключение. Впервые описанный механизм депонирования инфекционного биоаэрозоля в легких может стать ключом к пониманию вековой мистерии вокруг сезонных вспышек респираторных заболеваний. Этот механизм является общим «звеном» для заболеваний как в тропиках, так и в средних широтах — и это крайне важное наблюдение, сделанное впервые. Множество работ и исследований в этой области, множество гипотез и теорий, но нет ни одной единой теории для различных климатических условий.

Список литературы:

1. Lindsley, W.G., et al., 2016. Viable Influenza A Virus in Airborne Particles Expelled during Coughs vs. Exhalations. *Influenza Other Respir Viruses*. 2016 Sep;10(5):404-13.
2. Ishmatov, A.N., 2016. Mist in the Lungs as a Reason of Influenza and Colds Seasonality in Temperate and Tropical Climates. *Options IX for the control of influenza* 24-28 August 2016, Chicago, Illinois, USA, ABSTRACT# P-507.
3. Ishmatov A.N. (2016) Why respiratory viruses or bacteria have the highest probability to be deposited in the respiratory tract in flu seasons. *PeerJ Preprints* 4:e2237v2 // <https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.2237v2>

АНТИГЕННАЯ КАРТОГРАФИЯ В ИЗУЧЕНИИ ЭВОЛЮЦИИ ВИРУСОВ ГРИППА

Еропкин М.Ю., Даниленко Д.М., Коновалова Н.И., Петрова П.А., Желтухина А.И.

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

Антигенная картография — это графический способ представления результатов антигенного анализа с помощью специально разработанной компьютерной программы, основанной на данных математического моделирования. Установлено, что генетические изменения не обязательно связаны с антигенным дрейфом, хотя тесная взаимосвязь между генетической дистанцией и антигенным дрейфом существует. Антигенные карты дают возможность проследить за эволюцией вирусов в течение значительного времени и сравнить очень большой массив данных (сотни и тысячи антигенов), что очень трудно сделать с помощью традиционных таблиц антигенного анализа методом РТГА. Таким образом, антигенная картография дает возможность наглядного представления и лучшего понимания как генетической, так и антигенной эволюции.

Метод антигенной картографии был разработан учеными из Кембриджского университета под руководством проф. Дерека Смита [1]. Соответствующее программное обеспечение находится в свободном доступе на сайте: <http://antigenic-cartography.org>. Данные РТГА заносятся в таблицу Excel, и впоследствии импортируются в программу. Программа основана на так называемом «методе Прокруста»: каждая карта характеризуется т. наз. «фактором стресса», который показывает, насколько положение каждой точки отличается от теоретической модели. Существуют двумерная и трёхмерная версии программы.

Антигены отображаются на карте кружками: референс- (эталонные) антигены — крупными, а тестируемые штаммы (эпидемические изоляты) — мелкими, обычно для наглядности, разными цветами, антисыворотки наносятся в виде квадратов, крупных — для референс-антигенов и мелких — для других штаммов. Расстояние между двумя соседними квадратами соответствует «антигенной дистанции» в РТГА в $\frac{1}{2}$ гомологичного титра.

Несмотря на простоту и наглядность, метод иногда дает ошибки, особенно в случае небольших различий в РТГА, связанные с формализацией данных, поэтому полученные карты полезно сопоставлять с традиционным представлением антигенного анализа в РТГА.

Антигенные карты позволяют осмыслить большие массивы трудно сопоставимых данных. На них можно одновременно видеть глобальную картину за десятилетия эволюции вирусов. Так, например, с помощью антигенной картографии прослежена эволюция вирусов гриппа А(Н3N2) с момента их появления в человеческой популяции (1968) до 2003 г. [2]. Установлено, что происходила последовательная смена 11-ти антигенных групп, причем в этом участвовало очень ограниченное число аминокислотных остатков НА — 7-10 остатков, и все они находятся вблизи рецептор-связывающего сайта НА.

Дальнейшим этапом развития антигенной картографии является его сочетание с филогенетическим анализом, которое предложено разработчиками программы Nextflu [3]. При этом методе: 1) различия в титрах РТГА картируются прямо на филогенетическом дереве; 2) доступна

интерактивная модель — можно навести курсор на конкретный штамм и оценить его антигенную дистанцию от других штаммов; 3) модель хорошо предсказывает антигенную дистанцию без экспериментального измерения разницы титров в РТГА.

В НИИ гриппа впервые в России метод антигенной картографии систематически применяется несколько лет для исследования эволюции всех разновидностей гриппа человека, причем в качестве антисывороток используются крысиные поликлональные антисыворотки. При этом построенные карты оказались аналогичны картам, полученным с применением хорьковых постинфекционных сывороток. Доклад иллюстрирует тенденции эволюции вирусов гриппа человека А(Н1N1), А(Н1N1)рdm09, А(Н3N2), Вv и Вуam в течение последних 6–8 лет с применением метода антигенного картирования.

Список литературы:

1. Smith D.J., Lapedes A.S., de Long J.C et al. Mapping the antigenic and genetic evolution of influenza virus // *Science*, 2004, v.305(5682), p.371-376. [PMID: 15218094]
2. B.F.Koel, D.F.Burke, T.M.Bestebroer et al. Substitutions near the receptor binding site determine major antigenic change during influenza virus evolution // *Science*. – 2013 – V. 342. – P. 976-979. DOI: 10.1126/science.1244730; www.sciencemag.org/content/342/6161/976/suppl/DC1
3. R.A.Neher, T.Bedford. *Bioinformatics*, 2015, 1-3. doi: 10.1093/bioinformatics/btv381

РЕЗУЛЬТАТЫ ОЦЕНКИ ЗАТРАТ ТЕРРИТОРИАЛЬНЫХ ФОНДОВ ОМС НА ОКАЗАНИЕ МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩИ БОЛЬНЫМ ГРИППОМ И ОРВИ В 59 ГОРОДАХ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Сысоева Т.И.

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

Произведен расчет прямых экономических потерь (ПЭП) на лечение амбулаторных и стационарных больных гриппом и ОРВИ на основании средней стоимости законченного случая лечения Территориальных фондов Обязательного Медицинского Страхования (ТФ ОМС). Для расчета использовали:

- Данные о количестве заболевших детей и взрослых с диагнозами «грипп» и «ОРВИ», находившихся на стационарном или амбулаторном лечении в каждом из 59 городов – опорных баз ФЦГ с общей численностью населения около 51 млн. человек. Рассчитаны ПЭП за календарный год (с 1 по 53 неделю года) и за эпидемический период (с 40 по 20 недели).
- Средняя стоимость законченных случаев лечения в медицинских организациях (стационарах и поликлиниках) по данным Территориальных программ на сайтах ТФОМС. ТФОМС рассчитывают среднюю стоимость законченного случая лечения, опираясь на базовую ставку финансирования, которую ежегодно определяет Генеральный Фонд ОМС.

Расчет экономических затрат проводили по формуле:

$$P=X1*q1+X2*q2+Y1*q1+Y2*q2, \text{ где}$$

X1 — число госпитализированных больных с гриппом; X2 — число амбулаторных больных с гриппом; Y1 — число госпитализированных больных с ОРВИ; Y2 — число амбулаторных больных с ОРВИ; q1 — региональный норматив затрат на госпитализацию; q2 — региональный норматив затрат на обращение по поводу заболевания в амбулаторных условиях.

Прямые экономические затраты ТФОМС на амбулаторные и стационарные случаи гриппа и ОРВИ по 59 городам РФ в 2014 году составили 21,1 млрд. рублей, в 2015 году - 22,2 млрд. рублей. Увеличение затрат было связано как с ростом заболеваемости гриппом, обусловленным изменением антигенных свойств вирусов гриппа А(Н3N2) и В, так и с повышением нормативов Генерального фонда ОМС. Затраты выборочно за эпидемический период (с 40 недели 2014 по 20 неделю 2015 года) составили 16.7 млрд. рублей (77,1% от годовых затрат). Самые высокие прямые затраты на медицинскую помощь при гриппе и ОРВИ были в Москве и Санкт-Петербурге, что связано с численностью проживающего в них населения. В 2014 году они составляли 2 995,2 и 2 720,3 млн. руб., соответственно, в период эпидемического подъема заболеваемости с 40 недели 2014 по 20 неделю 2015 г. — 2 319.6 и 2 288.9 млн. руб., соответственно, и в 2015 году — 3 012,4 и 3084,3 млн. руб., соответственно.

Соотношение прямых годовых затрат отдельно на лечение больных с клиническим диагнозом «грипп» и «ОРВИ» в 2014 году составило 0,5% и 99,5%, в период эпидемического подъема

(40.2014 – 20.2015) – 1,1% и 98,9% и в 2015 году – 0,8% и 99,2%, соответственно.

При проведении корреляционного анализа была выявлена прямая сильная положительная связь ($p < 0.01$) затрат ТФОМС с заболеваемостью гриппом и ОРВИ ($R = 0.86$) и численностью ($R = 0.7$) населения в городах. Также найдена прямая положительная связь средней силы ($p < 0.05$) между затратами на лечение больных и числом ПЦР-диагностированных случаев гриппа А(H1N1)pdm09 ($R = 0.5$), А(H3N2) ($R = 0.5$) и В ($R = 0.56$) в 2014 году, и вирусов гриппа А(H3N2) ($R = 0.6$) и В ($R = 0.46$) в 2015 году, активно циркулировавших в указанные эпидемические периоды.

Список литературы:

1. A manual for estimating disease burden associated with seasonal influenza. World Health Organization, 2015 [Electronic resource] / http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/178801/1/9789241549301_eng.pdf?ua=1 Date of access: 14.10.2016.
2. Federal Fund of the Obligatory Health Insurance [Electronic resource] / <http://ora.ffoms.ru/portal/page/portal/top/about/territorial> Date of access: 14.10.2016.
3. Методические рекомендации по способам оплаты медицинской помощи за счет средств обязательного медицинского страхования [Электронный ресурс] : Методические рекомендации – Режим доступа : <http://www.ffoms.ru/upload/medialibrary/f6b/f6b2e5bf8e20f4b0369f58efe7a0ea44.pdf> . – Дата обращения: 14.10.2016 г.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ И АНТИГЕННАЯ ЭВОЛЮЦИЯ ВИРУСОВ ГРИППА

ГЕНОМ ПАНДЕМИЧЕСКОГО ВИРУСА А/Н1N1-2009: ПЯТЬ ЛЕТ ЭВОЛЮЦИИ

Харченко Е.П.

ИЭФБ РАН, г. Санкт-Петербург, Россия

Цель исследования заключалась в сравнительном компьютерном анализе первичной структуры геномов и белков более 100 разных штаммов вируса типа А/Н1N1 (в том числе и штаммов, выделенных в Санкт-Петербурге), циркулировавших с 1918 по 2016 г., и выявлении особенностей эволюции пандемического вируса А/Н1N1-2009 за 5 лет. Выявлено, что наибольшим изменениям к 2016 г. у штаммов Н1N1 2009–2010 гг. подверглись (в порядке убывания) гены NS, NA и HA. В Н1 серин чаще других аминокислот подвергался заменам. мРНК Н1 всех штаммов А/Н1N1 (1918–2016 гг.) отличаются отсутствием в их последовательностях триплетов CGA, CGG, CGC и CGT, кодирующих аргинин. В мРНК Н1 штаммов 2015 г. содержатся множество аутокомплементарных последовательностей длиной до 13 нуклеотидов, что свидетельствует о ее возможности формировать вторичную структуру. В Н1 штаммов 2015 г. по отношению к генам Н1 2009 г. выявлены 42 мутации, из которых 25 оказались немymi, а 17 значимыми. 3 мутации были трансверсиями, а 39 – транзициями. Все замещения аминокислот были реализованы за счет первичных мутаций. Исключение некоторых кодонов отмечались и в других генах Н1N1, но не в генах полимеразного комплекса. Отсутствие исключения кодонов в генах полимеразного комплекса, трансляция которых вместе с мРНК остальных белков происходит в одном и том же клеточном компартменте, подводит к предположению о детерминации элиминации триплетов из мРНК Н1 особенностями ее фолдинга и скоростью ее трансляции.

Характерная особенность антигенных сайтов (АС) в HA Н1N1-2009-2016 (Sa, Sb, Ca и Cb) — преобладание полярных и гидрофильных аминокислот, особенно серина и лизина, и отсутствие метионина, триптофана и цистеина. С 2009 по 2016 гг. в АС Н1 произошли 4 замены, и две из них привели к возникновению у некоторых штаммов 2015-2016 гг. потенциального сайта гликозилирования, расположенного в сегменте Sa(176-181). Распределение в АС Н1 консервативных позиций и позиций, часто подверженных мутациям, и эволюция штаммов Н1N1 с 1918 по 2009 гг. позволяют предсказать, что возникновение новых сайтов гликозилирования наиболее вероятно лишь в Sa(170-175) и Sa(176-181). Исходя из эволюции вируса Н1N1 за почти столетнюю историю и опираясь на особенности его эволюции (исключение триплетов CGX, TGX и ATG из последовательности антигенных сайтов гена Н1, особенности аминокислотного состава АС Н1 и распределение в них консервативных позиций, ограничения генетического кода), сегодня имеются возможности для более точного прогнозирования эволюции антигенных сайтов Н1.

Анализ результатов вакцинации в период пандемии гриппа 2009–2010 гг. показал существование возможной связи возникновения нарколепсии у детей и подростков с высоким содержанием в вакцине Pandemrix (GlaxoSmithKline) NP и образованием к нему антител (Ат), перекрестно реагировавших с рецептором гипокретина 2 (Ahmed S.S. et al., 2015). Последний содержит в своей внеклеточной петле мотив YDKEEIRRIWR, присутствующий и в NP. Выполненный нами анализ выявил наличие в NP фрагментов, гомологичных таковым глутаматного и мелатонинового рецепторов и ионных каналов, и подводит к вопросу, являются ли Ат к YDKEEIRRIWR в NP единственными виновниками нарколепсии, ибо невозможно отвергнуть участие глутаматного и мелатонинового рецепторов в бодрствовании и засыпании, и образование Ат к гомологичным к ним фрагментам NP при вакцинации.

ДЕТЕРМИНАЦИЯ ГОМОЛОГИЧНЫХ ФРАГМЕНТОВ В СТРУКТУРЕ БЕЛКОВ ВИРУСОВ ГРИППА А/Н1N1PDM09 2009–2016 ГГ. ВЫДЕЛЕНИЯ И БЕЛКОВ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА ЧЕЛОВЕКА

Жилинская И.Н.¹, Фадеев А.В.¹, Прочуханова А.Р.¹, Харченко Е.П.²

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

2 — ИЭФБ РАН, г. Санкт-Петербург, Россия

Цель исследования: для выяснения причин сохранения вирулентности и геморрагического синдрома в эпидемию гриппа 2016 г. на уровне эпидемии 2010 г. (при отсутствии антигенных различий между возбудителями этих эпидемий) проведен компьютерный сравнительный анализ структуры белков вирусов гриппа А/Н1N1pdm09 2009 и 2016 гг. выделения и белков системы гемостаза человека.

Методы: Для анализа были взяты последовательности фрагментов генома вируса гриппа А/California/07/2009 из международной базы данных GISAID EpiFlu. Определение первичной структуры фрагментов генома вируса гриппа А/Saint-Petersburg/RII04/2016 было проведено в лаборатории молекулярной вирусологии и геномной инженерии ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России с использованием набора реагентов Qiagen RNeasy Mini kit (Qiagen, Германия) на секвенаторе нового поколения Illumina Miseq (Illumina, США). Источником первичных структур белков анализированных вирусов и 41 белка гемостаза человека служили общедоступные в Интернете базы данных соответственно www.ncbi.nlm.nih.gov и www.nextprot.org. Поиск гомологичных последовательностей в структуре вирусных белков и белков гемостаза осуществляли путем сравнения в них фрагментов длиной в 12 аминокислот, принимая родственными те из них, которые проявляли идентичность по ≥ 7 позициям.

Результаты: Результаты поиска гомологичных аминокислотных последовательностей в структуре белков вирусов гриппа и белков гемостаза человека показали, что в структуре всех белков вируса гриппа имеются последовательности, мимикрирующие факторы коагуляции системы свертывания крови, причем, в ряде вирусных белков — PB2, HA и NS1 было выявлено до 2-х и более гомологичных фрагментов. Сравнительный анализ распределения аминокислотных последовательностей, гомологичных аминокислотным последовательностям белков системы гемостаза человека, показал, что в структуре белков вируса гриппа 2016 г. выделения выявлено 10 новых и дополнительных гомологичных фрагментов аминокислотной последовательности при отсутствии двух ранее выявленных в вирусе 2009 г. Следовательно, можно сделать вывод об усилении гомологии с белками гемостаза в структуре вируса гриппа 2016 г., по сравнению с вирусом 2009 г., особенно это касается факторов коагуляции V (в HA и NS1), VIII (в PB2), XI (в NS1), фактора Виллибрандта (в NA).

Заключение: Полученные данные позволяют предположить, что усиление гомологии с белками системы гемостаза человека в структуре вируса 2016 г. выделения по сравнению с вирусом 2009 г. может быть причиной сохранения геморрагического синдрома на достаточно высоком уровне, а также и вирулентности. Кроме того, эпидемия 2016 г. продемонстрировала, что при сходстве антигенных свойств возбудителей, вклад в вирулентность вируса могут вносить мутации в иных, чем в антигенных сайтах, областях вирусных белков.

АТТЕНУИРУЮЩИЕ МУТАЦИИ В ГЕМАГГЛЮТИНИНЕ ВИРУСА ГРИППА H5N1

Ломакина Н.Ф.^{1,2}, Садыкова Г.К.², Тимофеева Т.А.², Боравлёва Е.Ю.¹, Прилипов А.Г.², Гамбарян А.С.¹

1 — ФГБНУ «ИПВЭ им. М.П. Чумакова», г. Москва, Россия

2 — ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», г. Москва, Россия

Высоковирулентный вирус гриппа А/курица/Курган/3/2005 (H5N1) был аттенуирован для куриных эмбрионов, цыплят и мышей методом обратной селекции, направленной на повышение устойчивости к протеазному расщеплению и кислым значениям pH. В аттенуированном варианте А/курица/Курган/3654ат/2005 (Ку-ат), сохранившем полиосновный сайт протеолиза гемагглютинина (HA), произошло 10 аминокислотных замен относительно исходного вируса, расположенных в функционально важных участках вирусных белков PB1, PB2, NP, HA, NS1.

Настоящая работа посвящена выяснению влияния на аттенуацию трех мутаций в HA: Asp61Asn в HA1; Val48Ile и Lys131Glu в HA2.

Методом обратной генетики аналогичные замены в соответствующих позициях были внесены в HA рекомбинантного вируса А/Vietnam/1203/04-PR8/CDC-RG (VN-PR) (H5N1), любезно предоставленного доктором Вебстером. Полученный мутант VN3х-PR8, как и VN-PR, лишен полиосновного сайта в HA и имеет 3 упомянутые выше замены.

В тесте гемолиза эритроцитов при разных значениях pH штамм Ку-ат индуцировал гемолиз при значениях pH на $0,40 \pm 0,05$ единиц ниже, чем исходный вирус А/курица/Курган/3/2005. Похожее различие ($0,55 \pm 0,05$) наблюдалось и в паре VN3х-PR8 и VN-PR. Эти данные свидетельствуют о том, что мутации Asp61Asn в HA1-субъединице; Val48Ile и Lys131Glu в HA2-субъединице снижают pH конформационного перехода молекулы HA до значений 5,25-5,30, что характерно для слабовирулентных природных вирусов.

Патогенность вирусов оценивали на мышах породы BALB/c весом 7–9 г при интраназальном заражении в дозе от 10¹ до 10⁵ ЭИД₅₀/мышь по выживаемости и изменению веса. Исходный вирус VN-PR8 оказался столь же патогенен для мышей, как и высоковирулентный вирус А/курица/Курган/3/2005. Три замены, внесенные в HA, снизили вирулентность: выживаемость мышей от мутантного вируса VN3х-PR8 составила от 50 до 70% в зависимости от дозы инфицирования, в то время как VN-PR8 вызывал 100%-ую гибель при тех же дозах заражения.

На трехмерной молекуле гемагглютинина аминокислоты в позициях 61 в HA1; 48 и 131 в HA2 располагаются в узловых участках молекулы, где контактируют отдаленные отрезки одной цепи, либо разные цепи и субъединицы. По всей видимости, мутации в местах контакта меняют подвижность молекулы и влияют на параметры конформационного изменения HA, необходимого на первых этапах размножения вируса.

В итоге, методом обратной генетики показано, что аминокислоты 61Asn в HA1; 48Ile и 131Glu в HA2 снижают значение pH перехода гемагглютинина подтипа H5 с 5,7-5,8 до 5,25-5,30 и значительно понижают вирулентность вируса H5N1 для мышей.

СТРУКТУРНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ВИРУСОПОДОБНЫХ ЧАСТИЦ 4M2E-НВС

Егоров В.В.^{1,4}, Цыбалова Л.М.¹, Ягудина Я.А.¹, Шалджян А.А.¹, Горшков А.Н.¹, Степанова Л.А.¹, Ковалева А.А.¹, Куклин А.И.^{2,3}, Лебедев Д.В.⁴

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

2 — Объединенный институт ядерных исследований, г. Дубна, Россия

3 — Московский физико-технический институт, г. Долгопрудный, Россия

4 — ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова» НИЦ «Курчатовский институт», г. Гатчина, Россия

Вирусоподобные частицы (ВПЧ) широко используются при создании вакцин. Наиболее часто используются вакцины на основе ВПЧ НВс антигена вируса гепатита В. НВс-ВПЧ представляют собой комплекс из способных к самосборке в сферические частицы мономеров НВс, в так называемую «антигенную петлю» которых методами генной инженерии проведена вставка целевого антигена. Диаметр НВс-ВПЧ составляет 34 нм, и состоит она из 90 или 240 мономеров молекулярной массы 21 кДа.

Для использования НВс-ВПЧ в вакцинах необходимо, чтобы

1. Вставка в «антигенную петлю» локализовалась снаружи ВПЧ
2. ВПЧ не проявляли склонности к олигомеризации
3. ВПЧ не проявляли склонности к агрегации

Используемые при изучении ВПЧ методы просвечивающей электронной и атомно-силовой микроскопии не обладают достаточным разрешением для определения положения и конформации вставки в «антигенную петлю». Для определения положения и пространственной структуры вставки необходимо использование дополнительных методов исследования.

В настоящей работе изучаются НВс-ВПЧ со вставками антигена М2Е из вируса гриппа. Вставки четырёх tandemно расположенных последовательностей из М2Е проведены в «антигенную петлю» НВс-ВПЧ методами генной инженерии. Проведена экспрессия, выделение и очистка рекомбинантного белка. Последовательность и положение вставки подтверждено масс-спектрометрически. Частицы охарактеризованы с помощью электронной микроскопии и динамического светорассеяния. Проведены пилотные эксперименты по малоугловому нейтронному рассеянию на суспензии полученных частиц, ведётся обработка результатов.

МОДЕЛИРОВАНИЕ КОНФОРМАЦИОННОЙ ПОДВИЖНОСТИ РИБОНУКЛЕОПРОТЕИНОВЫХ КОМПЛЕКСОВ ВИРУСА ГРИППА А МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ

Швецов А.В.^{1,2}, Егоров В.В.^{1,3}, Сергеева М.В.³, Цыбалова Л.М.³

1 — Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», г. Гатчина, Россия

2 — Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, г. Санкт-Петербург, Россия

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

Для однокитевых РНК-вирусов нуклеопротеин (NP) является основным компонентом рибонуклеопротеиновых комплексов (vRNP), которые отвечают за вирусную транскрипцию и репликацию. Белок NP вируса гриппа А состоит из двух спиральных доменов головы и тела, образующих банано-подобную конфигурацию. С помощью метода молекулярной динамики мы оценивали различия в конформационной подвижности полных филаментов, а так же нонамерных колец белка NP вируса гриппа А/Гонконг/1/68 (H3N2) и его холодоадаптированного варианта с мутацией E292G. Мы обнаружили, что мутация E292G в белке NP может привести к изменению в четвертичной структуре RNP комплексов в зависимости от температуры (299K или 312K). Наблюдаемые нами изменения могут пролить свет на механизмы холодовой адаптации вируса гриппа А. Объяснение механизма влияния мутации E292G в белке NP может внести свой вклад в развитие методов генной инженерии холодоадаптированных мутантов вируса гриппа А.

Работа была выполнена при поддержке гранта РФФИ 14-24-01103-офи-м.

ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСОВ ГРИППА ВЫДЕЛЕННЫХ В ЭПИДЕМИЧЕСКИЕ СЕЗОНЫ 2013–2016 гг. В САНКТ–ПЕТЕРБУРГЕ СРЕДИ ДЕТЕЙ

Петрова П.А., Коновалова Н.И., Даниленко Д.М., Щеканова С.М., Васильева А.Д., Желтухина А.И., Лобова Т.Г., Еропкин М.Ю.

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

Несмотря на успехи вакцино– и химиопрофилактики, грипп в настоящее время остается распространенной и неконтролируемой инфекцией. У лиц, относящихся к группам риска (люди после 65 лет, беременные женщины, дети от 0 до 6 лет, лица с хроническими заболеваниями), грипп часто сопровождается большим количеством осложнений — пневмонией, поражением нервной системы, почек, сердечно сосудистой системы и т.д. Дети до 18 лет ежегодно вовлекаются в эпидемический процесс, связанный с вирусами гриппа и другими ОРВИ.

Выраженный высокий уровень изменчивости вирусов гриппа затрудняет создание эффективных лечебных, профилактических и диагностических средств. Для предотвращения летальных и тяжелых случаев гриппозной инфекции необходима разработка эффективных химиопрепаратов, а также вакцины, компоненты которой должны соответствовать штаммам, циркулирующих в человеческой популяции. Непрерывная изменчивость современных вирусов гриппа определяет необходимость ежегодного обновления штаммового состава гриппозных вакцин.

Для анализа уровня эволюционной изменчивости современных вирусов гриппа производили выделение штаммов из назофарингиальных мазков, полученных от госпитализированных детей от 0 до 18 лет, на клеточной культуре MDCK (CDC, Atlanta, USA), 10 дневных развивающихся куриных эмбрионах, поставляемых ООО «Племрепродуктор» (пос. Синявино, Ленинградская область, Россия). Далее проводили идентификацию вирусов и их антигенный анализ в реакции торможения гемагглютинации с панелью диагностических антисывороток, предоставляемых ВОЗ для идентификации вирусов гриппа человека и панелью крысиных поликлональных антисывороток, полученных к широкому спектру современных референс-вирусов гриппа человека А и В.

Вирусы гриппа А(Н3N2). В исследуемые эпидемические сезоны 2013–2016 гг. наблюдалась одновременная циркуляция вирусов гриппа А(Н3N2), А(Н1N1)pdm09 и вирусов гриппа В. В 2013–2014 гг. вирусы гриппа А(Н3N2) доминировали и составляли 80,5% от всех выделенных штаммов. В 2014–2015 гг. они составили 30%, а в 2015–2016 гг. вирусов данного подтипа из материалов от детей выделено не было.

При анализе антигенных взаимодействий изолятов 2013–2014 гг. с антисывороткой, полученной к вирусу-кандидату в вакцинные штаммы А/Виктория/361/11, было показано, что большинство выделенных вирусов взаимодействовали с данной сывороткой на 1/4–1/8 гомологичного титра. Низкий уровень взаимодействия с сывороткой к вирусу, введенному в состав вакцин, показывает наличие изменений в молекуле НА у циркулирующих штаммов.

В эпидемический сезон 2014–2015 гг. был зафиксирован антигенный дрейф вирусов А(Н3N2), выявлена гетерогенность популяции: зарегистрированы вирусы, подобные А/Санкт-Петербург/80/14

(генетическая группа 3с.2а) и вирусы, подобные А/Швейцария/9715293/13 (генетическая группа 3с.3а). В то же время, в составе вакцины находился штамм, подобный А/Техас/50/12. Вследствие этого очевидно, что вакцинный компонент по вирусам данного подтипа, установленный на эпидемический сезон 2014–2015 гг., не соответствовал этиологической структуре возбудителя.

Вирусы гриппа А(Н1N1)pdm09. Циркуляция вирусов гриппа данного подтипа была отмечена во всех трех эпидемических сезонах 2013–2016 гг. Удельный вес данного возбудителя в разные сезоны колебался и составил 11,7%, 7% и 80,5% соответственно. Детальный анализ антигенных взаимодействий исследуемых штаммов показал, что вирусы гриппа подтипа А(Н1N1)pdm09 данных эпидемических сезонов были антигенно схожи с эталонным и вакцинным штаммом А/Калифорния/7/09. Таким образом, исходя из данных антигенного анализа, можно утверждать, что компонент противогриппозной вакцины А/Калифорния/07/09 во всех трех сезонах был актуальным.

Вирусы гриппа типа В. В 2013–2014 гг. и 2014–2015 гг. была отмечена активная циркуляция вирусов гриппа В Ямагатской разновидности. Удельный вес данного типа составил 7,8% и 63% соответственно. В последний эпидемический сезон был выделен только 1 штамм данной линии. Антигенный анализ вирусов гриппа В Ямагатской линии 2013–2015 гг. показал их гомогенность, все они были подобны эталонному вирусу В/Пхукет/3073/13. Вирус, выделенный в эпидемическом сезоне 2015–2016 гг., был антигенно схож с вирусами Ямагатской линии 2012–2013 гг.

В 2015–2016 гг. была отмечена активная циркуляция вирусов гриппа В Викторианской разновидности. Они составили 18,3% от всех изолятов. Вирусы гриппа В Викторианской линии реагировали с антисывороткой к эталонному штамму В/Брисбен/60/08 до 1–1/2 гомологичного титра, что показывает их антигенную однородность. Стоит особо отметить, что в прошедшем эпидемическом сезоне в составе трёхвалентных противогриппозных вакцин, применяемых в России и в мире, в качестве компонента гриппа В был включен вирус Ямагатской линии, подобный В/Пхукет/3073/13, при этом в циркуляции ведущая роль принадлежала вирусам Викторианской линии, что позволяет говорить о выраженном несоответствии циркулирующих штаммов гриппа В и состава противогриппозной вакцины.

Подводя итог, хочется подчеркнуть, что антигенный анализ позволяет подробно и четко охарактеризовать свойства и эволюционную изменчивость вирусов гриппа. Эти данные помогают наглядно оценить антигенное соответствие циркулирующих в популяции штаммов с вирусами-кандидатами, включенными в состав противогриппозных вакцин на эпидемический сезон. Так, вирусы гриппа подтипа А(Н3N2) и типа В последних двух эпидемических сезонов показали несоответствие выбранного вакцинного компонента и циркулирующих штаммов. В связи с этим было отмечено большее распространение вирусов данного подтипа среди населения, в том числе среди детских возрастных групп. Эти данные свидетельствуют о необходимости проведения более детального и масштабного антигенного анализа вирусов гриппа человека для того, чтобы повысить качество отбора штаммов–кандидатов для противогриппозных вакцин. В то же время, проблема несоответствия компонентов вакцины по гриппу В может быть решена внедрением в практику тетравалентных вакцин, которые с успехом применяются уже несколько лет в ряде зарубежных стран.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ И АНТИГЕННАЯ ЭВОЛЮЦИЯ ВИРУСОВ ГРИППА

РАЗРАБОТКА ЖИВЫХ ГРИППОЗНЫХ ВАКЦИН ПРОТИВ ПОТЕНЦИАЛЬНО ПАНДЕМИЧЕСКИХ ВИРУСОВ ГРИППА

Киселева И.В.

ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», г. Санкт-Петербург, Россия

Вакцинные штаммы для живой гриппозной вакцины (ЖГВ) готовятся в соответствии с ежегодными рекомендациями Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ). Кроме того, ЖГВ включена в Глобальный план ВОЗ по гриппозным вакцинам, а также в Программу ВОЗ по подготовке к пандемии. Эта Программа предполагает создание международных и государственных коллекций потенциально пандемических вакцинных штаммов с целью скорейшего начала производства вакцин и иммунизации населения при наступлении пандемической ситуации. ВОЗ отмечает целый ряд преимуществ ЖГВ в предпандемический период. В частности, в отличие от инактивированных гриппозных вакцин, живые вакцины вводятся интраназально, имитируя естественную инфекцию, способны индуцировать более широкий спектр иммунного ответа и защищать привитых против дрейфовых вариантов вируса гриппа. По данным ВОЗ, современные производственные мощности не могут обеспечить потребностей в гриппозных вакцинах даже для групп риска, но эта проблема может быть решена с помощью ЖГВ, что существенно в экстренной пандемической ситуации. В соответствии с Программой ВОЗ, сотрудниками отдела вирусологии ФГБНУ «ИЭМ» подготовлены штаммы ЖГВ против целого ряда пандемических и потенциально пандемических штаммов вируса гриппа серотипов H1N1pdm, H5N1, H7N3, H7N9, H2N2.

Аттенуированный фенотип потенциально пандемических ЖГВ был подтвержден молекулярно-генетическими и вирусологическими методами и в экспериментах на лабораторных животных. Результаты доклинических исследований на хорьках показали безвредность, иммуногенность и защитную эффективность этих ЖГВ. Вакцинация хорьков потенциально пандемическими ЖГВ индуцировала высокие титры гомологичных и гетерологичных антител и защищала их против заражения гомологичным и гетерологичным вирусами. Пандемические вакцины, прошедшие стадию доклинических исследований, по согласованию с Минздравом РФ были испытаны в клинике ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа» Минздрава РФ. Параметрами оценки являлись безвредность вакцин, приживляемость вакцинного вируса, генетическая и фенотипическая стабильность изолятов, трансмиссивность вакцин и их иммуногенность. Оценка иммуногенности проводилась с использованием ряда различных иммунологических тестов, включая определение антительного и клеточного иммунного ответа. Вакцины показали себя безопасными, низкоректогенными, сохраняли высокую генотипическую и

фенотипическую стабильность после репликации в ВДП волонтеров и не передавались от вакцинированных невакцинированным лицам. Вакцины стимулировали образование антигемагглютинирующих, нейтрализующих и секреторных антител, а также продукцию клеточных факторов (CD4+, CD8+). Суммарный иммунный ответ на введение ЖГВ, оцениваемый по всем иммунологическим тестам, выявлялся у 86–97% привитых лиц.

Обеспечение населения России собственной живой гриппозной вакциной против потенциально опасных вирусов гриппа имеет стратегическое значение. В случае возникновения пандемии из подготовленной коллекции потенциально пандемических ЖГВ можно оперативно выбрать соответствующий штамм для передачи в производство.

Исследования проводились при финансовой поддержке Program for Appropriate Technology in Health (PATH) и Всемирной организации здравоохранения.

РАСТЕНИЯ КАК БИОФАБРИКИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОТИВОГРИППОЗНЫХ ВАКЦИН

Блохина Е.А.¹, Марданова Е.С.¹, Котляров Р.Ю.¹, Степанова Л.А.², Цыбалова Л.М.², Равин Н.В.¹

1 — ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, г. Москва, Россия

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

Использование растений в качестве «биофабрик» для получения рекомбинантных белков медицинского назначения является конкурентоспособной альтернативой традиционным технологиям, основанным на использовании бактерий, дрожжей или клеток животных. В последние годы были разработаны методы быстрой и высокоэффективной транзientной экспрессии белков в нетрансгенных растениях, основанные на использовании рекомбинантных фитовирусных векторов. Задачей работы являлось создание системы экспрессии в растениях кандидатной противогриппозной вакцины широкого спектра действия.

Традиционные противогриппозные вакцины создаются на основе поверхностных белков вируса гриппа – нейраминидазы и гемагглютинина, высокая изменчивость которых требует создания новых вакцин для вновь появляющихся штаммов. Консервативный М2 белок вируса гриппа является одним из кандидатов для создания «универсальной» вакцины. Однако, для создания эффективной вакцины этот белок должен быть присоединен к высокоиммуногенному носителю. В качестве таких носителей мы используем флагеллин бактерии *Salmonella typhimurium*, являющийся лигандом TLR5 рецепторов и эффективным мукозальным адьювантом, и вирусоподобные частицы (ВПЧ), образуемые ядерным антигеном вируса гепатита В (НВс).

На основе генома вируса Х картофеля был создан фитовирусный вектор, обеспечивающий экспрессию целевых белков в листьях растений *Nicotiana benthamiana*. Разработана система экспрессии в растениях кандидатной противогриппозной вакцины на основе внеклеточного домена М2 белка (М2е) вируса гриппа, присоединенного к флагеллину. Синтез этого белка в листьях растений составлял 30% общего растворимого белка, т.е. около 1 мг/г ткани листа. Рекомбинантный белок проявлял высокую иммуногенность при интраназальном введении и защищал иммунизированных мышей от летальной инфекции различными штаммами вируса гриппа.

В рамках второго направления работ созданы фитовирусные векторы для экспрессии в растениях НВс антигена с присоединенным к нему М2е пептидом на N-конце. Уровень экспрессии этого белка, М2еНВс, составлял около 2% общего растворимого белка. Кроме того, целевой белок образовывал вирусоподобные частицы *in vivo*, что было подтверждено результатами электронной микроскопии. В иммунологических исследованиях очищенный препарат ВПЧ индуцировал высокий уровень антител и защищал мышей от летальной дозы заражения вирусом гриппа.

Развитием этого направления исследований является создание НВс частиц, представляющих на своей поверхности наряду с М2е и консервативные участки основного иммуногена вируса гриппа – гемагглютинина. Созданы искусственные гены, кодирующие гибридные НВс белки, содержащие фрагменты гемагглютинина и М2е, включенные на N-конец и в район иммунодоминантной петли НВс-антигена, соответственно. Поскольку, фрагмент гемагглютинина содержал участок из нескольких

подряд гидрофобных аминокислот, что является критичным для сборки ВПЧ, между последовательностью гемагглютинина и НВс антигена были введены линкеры, обеспечивающие лучший фолдинг гибридных белков. Экспрессированные в бактериальных клетках *E. coli* рекомбинантные белки были очищены в денатурирующих условиях с последующим освобождением от денатурирующего агента. С помощью атомно силовой микроскопии показано формирование ВПЧ размером от 15 до 30 нм. В дальнейшем планируется экспрессия этих белков в растениях с помощью вирусных векторов.

Работа выполнена с использованием Экспериментальной установки искусственного климата, поддержана программой фундаментальных исследований Президиума РАН «Наноструктуры: физика, химия, биология, основы технологий» и грантом РФФИ 16-34-00976.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АПАТОГЕННОГО ВИРУСА ДИКИХ УТОК В КАЧЕСТВЕ ЖИВОЙ ОРАЛЬНОЙ ВАКЦИНЫ ПРЕДОТВРАЩАЕТ ЦИРКУЛЯЦИЮ ВЫСОКОПАТОГЕННОГО ВИРУСА H5N1 И ЗАЩИЩАЕТ ПТИЦ

Гамбарян А.С.¹, Боравлева Е.Ю.¹, Гордейчук И.В.¹, Луницын А.В.²

1 — ФГБНУ «ИПВЭ им. М.П. Чумакова», г. Москва, Россия

2 — ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии, г. Покров, Владимирская обл., Россия

Исследовали возможность использования апатогенного вируса гриппа дикой утки A/duck/Moscow/4182/2010 (d/4182) в качестве живой вакцины, препятствующей циркуляции высоко патогенных вирусов H5N1 между утками и курами. При заражении уток высокопатогенным вирусом A/chicken/Kurgan/3/2005 (H5N1), они не болеют, но выделяют с фекалиями инфекционный вирус. Мы продемонстрировали, что цыплята, посаженные к таким уткам, заражаются, выделяют вирус в окружающую среду и гибнут. Если же утки были предварительно орально инфицированы вирусом d/4182, то при последующем заражении вирусом H5N1 они не выделяют вирус в окружающую среду. Подсаженные цыплята не заболевают, не выделяют вирус с фекалиями и не дают иммунного ответа на H5N1 вирус. Вирус d/4182 вызывает у уток хороший иммунный ответ при добавлении низких доз вируса в поилки, очевидно вследствие того, что утки являются природным хозяином данного вируса. Оральная иммунизация кур также защищает их от последующего заражения высокопатогенным вирусом H5N1. Таким образом, вирус A/duck/Moscow/4182/2010 способен защищать домашнюю птицу и подавлять циркуляцию высокопатогенных вирусов H5N1 после однократной оральной иммунизации, и может рассматриваться как дешёвый и удобный в использовании кандидат в вакцинный штамм.

ИТОГИ ИММУНОПРОФИЛАКТИКИ ГРИППА В ЭПИДЕМИЧЕСКИЙ СЕЗОН 2015–2016 ГОДОВ

Селькова Е.П.¹, Гренкова Т.А.¹, Полежаева Н.А.¹, Суранова Т.Г.²

1 — ФГБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, г. Москва, Россия

2 — Всероссийская Служба Медицины Катастроф (ВСМК)

Анализ заболеваемости гриппом населения Российской Федерации за последние 20 лет (с 1996 по 2015 годы) показал, что иммунопрофилактика гриппа приводит к существенному сокращению заболеваемости, профилактике осложнений и снижению смертности среди населения. Заболеваемость снизилась в 152 раза (с 5 173,8% в 1997 г. до 34,01% в 2015 г.). При этом количество ежегодно иммунизированного населения увеличилось в 9 раз (с 4,97 млн. в 1996 году до 44,92 млн. в 2015 году). За период с 2006 по 2015 годы охват иммунизацией населения возрос с 22 млн. доз до 40 млн. доз. В эпидсезон 2015–2016 гг. были иммунизированы против гриппа более 44,92 млн. человек, что составило 31,3% населения страны, в том числе 13,3 млн. детей до 17 лет. Это — максимальный охват прививками за все годы иммунизации. За счет средств Федерального бюджета в рамках НК были иммунизированы 39,2 млн. человек (87,3% от числа всех привитых). Охват иммунизацией групп риска в РФ составил: дети от 6 мес. до 6 лет — 32%; дети от 7 до 17 лет — 58,2%; медицинские работники — 45,3%; лица старше 60 лет — 34,4%.

По официальным статистическим данным за эпидемический сезон 2015/2016 годов в целом по стране ОРВИ перенесли 12 573 469 чел., гриппом переболело 3,2 млн. чел. По оперативным данным заболеваемость всей группой ОРВИ не привитого совокупного населения страны в 7,8 раз, гриппом — в 14,4 раза выше, чем в группе привитых против гриппа в рамках НК.

В эпидсезон 2015–2016 гг. в стране заболело гриппом 1 169 вакцинированных против гриппа человек, что составило 2,7% от числа всех заболевших с лабораторно подтвержденным диагнозом (0,0026% от числа привитых).

Всего в эпидсезон 2015/2016 зарегистрировано 671 летальных исходов в 68 регионах с лабораторным подтверждением. В материалах от погибших выделены вирус гриппа А (H1N1)2009 — 657 случаев, вирус гриппа А (H3N2) — 6 случаев, вирус гриппа В — 1 случай.

В прошедший эпидсезон летальным исходом закончились 0,8–1,0% заболеваний гриппом, что превысило среднемноголетние уровни на 11–36%. Среди школьников на протяжении последних лет отмечается высокий охват иммунопрофилактикой гриппа (в 2015 году — 58,2%), что способствовало снижению числа летальных исходов — 3 случая. Среди взрослого населения лабораторно подтвержденных летальных исходов 95,9% приходится именно на взрослое население. В период эпидемического подъема заболеваемости в сезон 2015/2016 годов от гриппа и его осложнений погибло 8 женщин на разных сроках беременности, все погибшие женщины не были вакцинированы против гриппа.

Среди общего числа летальных исходов (671) в эпидсезон 2015–2016 гг. зарегистрировано 6 смертей у привитых. Основной причиной смерти во всех случаях являлось тяжелое течение вирусной

и вирусно-бактериальной пневмонии, вызванной вирусом гриппа А(Н1N1)2009. Тяжелому течению способствовала сопутствующая патология, основными из которых являлись эндокринные (диабет, ожирение) и сердечно-сосудистые заболевания, новообразования и хронические заболевания желудочно-кишечного тракта. В 4 из 6 случаев имело место позднее обращение заболевших за медицинской помощью (на 3–4 день от появления первых клинических симптомов) и недооценка тяжести состояния пациентов. Только в двух случаях при обращении за медицинской помощью были выставлены диагнозы грипп и пневмония, в четырех случаях диагностировано ОРВИ, в связи с чем госпитализация проведена только на 3–4 день от обращения при резком ухудшении состояния пациентов. Смерть во всех случаях наступила в первые 10 дней от начала заболевания.

В эпидсезон 2015–2016 гг. вакцинация населения против гриппа в рамках Национального календаря профилактических прививок (НК) проводилась вакцинами отечественного производства «Гриппол», «Гриппол плюс», «Совигрипп» и «Ультрикс».

Список литературы:

1. Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Фролова Н.В., Михеев В.Н., Рыжиков А.Б./ О предварительных итогах эпидемического сезона 2015–2016 гг. по гриппу и острым респираторным вирусным инфекциям в Российской Федерации/ *Consilium Vedicum*. 2016. | vol. 18 | №. 3:стр. 8-11
2. «Об итогах эпидсезона по гриппу и ОРВИ 2015–2016» (письмо Роспотребнадзора №01/778316-27 от 20.06.2016 г.)
3. Селькова Е.П., Гренкова Т.А., Гудова Н.В., Оганесян А.С., Полежаева Н.А. / Эпидемиологическая значимость вакцинопрофилактики гриппа. Отечественная противогриппозная вакцина последнего поколения // *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*, 2014, №4-стр.43-51

ОЦЕНКА ИММУНОГЕННЫХ И ПРОТЕКТИВНЫХ СВОЙСТВ ОТЕЧЕСТВЕННОЙ ИНАКТИВИРОВАННОЙ РАСЩЕПЛЕННОЙ ТРЕХВАЛЕНТНОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ

Курская О.Г.¹, Шаршов К.А.¹, Цжен Мэн¹, Игнатъев Г.М.², Шестопапов А.М.¹

1 — ФГБНУ НИИЭКМ, г. Новосибирск, Россия

2 — ФГУП СПбНИИВС ФМБА России, г. Санкт-Петербург, Россия

Вакцинация считается наиболее оптимальным методом профилактики гриппа, сочетая в себе высокую специфичность, профилактическую эффективность и экономичность. Гриппозные вакцины способны защитить от заболевания 70 – 90% взрослого населения, если антигены, содержащиеся в ней, совпадают с циркулирующими вирусными антигенами. Кроме того, эффективность вакцинопрофилактики зависит от степени иммунного ответа на вакцинацию и профилактической эффективности вакцины.

Целью данной работы явилась оценка иммуногенных и профилактических свойств отечественной инактивированной расщепленной трехвалентной гриппозной вакцины на животной модели (мыши линии BALB/c).

В качестве вакцины сравнения использовали инактивированную сплит-вакцину «Ваксигрипп». Животным контрольной группы вводили 0,85% раствор хлорида натрия.

Для оценки иммуногенности вакцин определяли титры специфических антигемагглютинирующих антител (в реакции торможения гемагглютинации) и нейтрализующих антител (в реакции микронейтрализации) в сыворотке крови иммунизированных животных после двукратного введения вакцин. Оценивали уровень сероконверсии (процент серопозитивных животных) и средние геометрические титры (GMT) антител для каждой группы животных к трем штаммам вируса гриппа, входящим в состав вакцин. Показано, что двукратная иммунизация введение исследуемой вакцины вызывала сероконверсию одновременно к трем антигенам при определении двумя методами (РТГА и РМН) у 80% животных экспериментальной группы и у 90% животных в группе сравнения. При этом не было достоверных отличий средних геометрических титров антител к вакцинным штаммам у животных обеих групп.

Для оценки протективных свойств исследуемой вакцины осуществляли инфицирование животных на 21-е сутки после второй иммунизации летальной дозой штамма вируса гриппа A(H1N1)pdm09, адаптированного к организму мышей. Оценивали наличие клинических признаков инфекции, уровень летальности и изменение средней массы тела животных в течение 14 суток после инфицирования. В контрольной группе уровень летальности составил 100%. В экспериментальной группе и группе сравнения гибель животных отсутствовала. Кроме того, у животных данных групп не наблюдались клинические признаки инфекции и значимое изменение массы тела в течение всего периода наблюдения.

Как известно, эффективность вакцинопрофилактики гриппа напрямую зависит от соответствия вакцинных и актуальных эпидемических штаммов. Мы оценивали уровень специфических антител к вакцинному и актуальному эпидемическому штаммам вируса гриппа субтипа А(Н1N1)рdm09, доминировавшего во время сезона 2015–2016 гг., в сыворотках крови людей, вакцинированных исследуемой вакциной осенью 2015 г. Доля сывороток крови, имевших защитный титр антител к вакцинному штамму, составила 79%, а к сезонному штамму – 85%. При этом средний геометрический титр антител к эпидемическому штамму был достоверно выше титра антител к вакцинному штамму.

Таким образом, показана высокая иммуногенная активность и профилактическая эффективность инактивированной расщепленной трехвалентной гриппозной вакцины отечественного производства.

ПРОТИВОГРИППОЗНЫЕ ВАКЦИНЫ: ТЕХНОЛОГИЯ И КОНТРОЛЬ

РОЛЬ МЕРТИОЛЯТА В СОСТАВЕ ВАКЦИН В ПРОБЛЕМЕ МЕРКУРИАЛИЗМА

Саватеева–Любимова Т.Н., Александров А.Г.

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

В настоящий момент времени загрязнение окружающей среды по всему миру становится одной из ведущих проблем охраны здоровья, одной из которых является ртутная контаминация. Сегодня внимание токсикологов и экологов приковано, в большей степени, не к острым отравлениям данным токсическим металлом, а к проблеме меркуриализма или, даже, микромеркуриализма. Особое внимание, в этом ключе, привлечено к носительству ртути у беременных женщин и детей. Так, при изучении динамики содержания ртути в цельной крови у женщин в зависимости от срока беременности были получены данные, свидетельствующие о заметном возрастании ее уровня в III триместре [1,2]. Содержание ртути в пуповинной крови новорожденных, при этом, был в 1,3 раза выше, чем ее уровень в крови у матерей. Данные, полученные в эксперименте, показали, что у кормящих крыс и крыс, лишенных потомства, и подвергавшихся в течение беременности хроническому воздействию токсиканта в сублетальных концентрациях, уровень ртути в почках и крови был достоверно ниже в первом случае [3]. Последнее подтверждает имеющиеся в литературе сведения о наличии ртути в грудном молоке и дополнительном поступлении ее в организм новорожденного при материнском кормлении. Экспериментальные данные описывают и дозозависимые нарушения в формировании поверхностного рефлекса и отклонения от нормы ряда показателей структуры поведенческого паттерна у крысят в тесте «открытое поле», рожденных от матерей, с ртутной контаминацией.

Совокупность сведений о возможном носительстве ртути у новорожденных и связанных с этим отклонений в развитии, ставит вопрос о дополнительном поступлении ртути в виде консерванта (мертиолят), входящего в состав различных вакцин. Согласно календарю плановых прививок, в результате применения вакцин, содержащих мертиолят, разовое поступление ртути составляет от 12,5 мкг до 37,5 мкг/кг массы тела ребенка, а суммарное поступление ртути за 6 месяцев составляет свыше 112,5 мкг/кг. Кроме этого, есть еще и рекомендуемые прививки против гемофильной палочки на 3-й, 4-й и 5-й месяцы жизни ребенка. Это составляет дополнительные 75 мкг ртути на кг массы тела. Много это или мало? Дискуссия на эту тему имеет широкий общественный резонанс и часто ведет к необоснованному, в ряде случаев, отказу родителей от необходимой вакцинации.

Наиболее простым выходом из ситуации, связанной с вакцинацией, является отказ от применения этилртути в качестве консерванта в составе вакцин. Однако, вопрос с ртутной контаминацией женщин детородного возраста и детей остается важной проблемой и требует как

своевременной ее диагностики, так и разработки мероприятий по снижению уровня ртутного носительства не только за счет экологических административных ресурсов, но и за счет новых методов детоксикации, что требует дальнейших экспериментальных и клинических исследований.

Список литературы:

1. Малов А.М. и соавт. Содержание ртути в крови женщин с различными сроками беременности. Токсикологический вестник, 2001, № 5, С. 5-11
2. Гайдуков С.Н. и соавт. Изменение во время беременности уровня ртути в крови у женщин, входящих в группу риска по ее содержанию в начальные периоды беременности. Вестник Новгородского государственного университета, 2015, Том 85, № 2, С. 124 — 126
3. Favero A.M. et al. Lactating and nonlactating rats differ to renal toxicity induced by mercuric chloride: the preventive effect of zinc chloride. Cell Biochem Funct, 2014, Vol. 32, P. 420–428

ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА ИНАКТИВИРОВАННЫХ ВАКЦИН ПРОТИВ ГРИППА

Прошина Е.А., Савина Н.Н.

ФГУП СПбНИИВС ФМБА России, г. Санкт-Петербург, Россия

Технологический процесс производства гриппозных вакцин требует постоянной оптимизации технологии с целью повышения качества конечного продукта, а также повышения эффективности самой технологии (увеличение выхода доз вакцины на 1 единицу потраченного сырья).

В качестве основного направления оптимизации было выбрано изменение технологии инактивации вирусной активности, а также способ очистки вирусодержащей аллантоисной жидкости (ВАЖ). Согласно нашим исследованиям основной причиной, затрудняющей очистку ВАЖ и инактивацию вирусной активности, является процесс агрегации вирионов между собой и между дебрисными структурами. В результате агрегации ограничивается доступ инактивирующего агента к вирионам. Кроме того, агрегированные структуры вирионов в процессе очистки (на стадии микрофльтрации) задерживаются фильтрами и, таким образом, повышают технологические потери. Для решения обеих вышеуказанных проблем нами был разработан новый технологический подход, принцип которого состоит в том, что ВАЖ сразу после сбора из куриных эмбрионов (КЭ) обрабатывают веществами, которые подавляют процесс агрегации. Дезагрегированная таким образом ВАЖ далее подвергается обработке высокоэффективным дезинфектантом (β -пропиолактон), после чего инактивированная ВАЖ проходит технологические стадии микрофльтрации и ультрафилтрационного концентрирования. В результате внесенных изменений нам удалось добиться полного снятия инфекционной активности в обработанной ВАЖ, а также получить высокоочищенный вирионный концентрат с низкой степенью агрегации. Такой концентрат далее подвергается двукратной очистке методом ультрацентрифугирования в градиентах плотности сахарозы. В рамках эксперимента было произведено две серии очищенного вирусного концентрата (ОВК), один из которых (ОВК №1) был произведен по классической технологии, а второй (ОВК №2) — с использованием внесенных в технологию изменений (модернизированная технология). Полученный препарат ОВК №2 имеет очень высокую степень очистки (содержание овальбумина к гемагглютиниру (ГА) по методу одиночной радиальной иммунодиффузии (ОРИД), отношение белок к ГА по ОРИД). Данные представлены в таблице 1.

Таблица 1. Сравнение экспериментальных серий ОВК

Наименование	Количество ГА по ОРИД (мкг) на 1 КЭ	Количество овальбумина (мкг) на 1 г ГА по ОРИД	Отношение общего белка (г) к ГА по ОРИД (г)
Экспериментальная серия ОВК №1 (классическая технология)	42,3	160,4	3,21
Экспериментальная серия ОВК №2 (модернизированная технология)	35,5	83,4	2,42

Из данных следует, что в ОВК №1 удельное содержание овальбумина на 1 грамм ГА по ОРИД почти в два раза выше, чем полученный по модернизированной технологии ОВК №2. Следует отметить, что на этой стадии эффективность модернизированной технологии (количество ГА по ОРИД к 1 КЭ) меньше, чем при классической технологии (35,5 против 42,3). Однако, при выделении моновакцин из двух вышеуказанных ОВК (по регламенту на препарат «Гриппол») эффективность технологии изменилась в обратную сторону (22,71 против 28,29). Данные представлены в таблице 2.

Таблица 2. Сравнение характеристик моновакцин

Наименование	Отношение ГА по ОРИД (мкг) к КЭ (штг)	Отношение овальбумина (нг) к ГА по ОРИД (мкг)	Отношение белка (г) к ГА по ОРИД (г)	% выхода ГА по ОРИД в моновакцинах от ГА по ОРИД в ОВК
Экспериментальная моновакцина серии №1	22,71	15,2	2,49	49,00%
Экспериментальная моновакцина серии №2	28,29	1,8	1,68	80,00%

Данный феномен изменения эффективности (отношение ГА по ОРИД к КЭ) объясняется тем, что, по-видимому, ОВК №2, полученный по модернизированной технологии содержит в своем составе вирионные частицы, которые менее агрегированы, чем в препарате, полученном по классической технологии (ОВК №1). После процесса разрушения вирусных частиц детергентом происходит удаление недоразрушенных вирионов методом ультрацентрифугирования. Те поверхностные антигены, которые перешли в растворимое состояние под действием детергента, отбираются и из них производят моновакцину. Те же вирусные частицы, которые не были разрушены детергентом, уходят в осадок вместе с тем ГА, который в них содержится. В ОВК №2 повышенной очистки, где агрегация вирусных частиц минимальна, эффективность выделения растворимых антигенов (гемагглютинина и найраминидазы) максимальна и составляет 80%, тогда как в случае недостаточной очистки (ОВК №1) эффективность выделения растворимых антигенов сравнительно низка (49%), что в свою очередь обуславливает низкую эффективность технологии в целом (данные представлены в таблице 2).

Кроме того моновакцина серии №2, полученная по модернизированной технологии по всем параметрам гораздо чище моновакцины серии №1, полученной по классической технологии. В частности уменьшилось отношение общего белка к ГА по ОРИД (1,68 против 2,49), а так же существенно уменьшилось содержание овальбумина (1,8 против 15,2).

Таким образом, проведенная оптимизация позволила реально увеличить количество ГА, полученного с 1 КЭ (эффективность технологии), а так же существенно улучшить параметры очистки (отношение белка к ГА по ОРИД, содержание овальбумина) полученной моновакцины серии №2.

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА ВИРУСНЫХ БЕЛКОВ В СЛОЖНОЙ СМЕСИ МЕТОДОМ МАСС–СПЕКТРОМЕТРИИ

Ягудина Я.А., Тараскин А.С., Плотникова М.А., Егорова М.А., Шалджян А.А., Егоров В.В.

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

Методы, с помощью которых возможно идентифицировать целевой белок и оценить его количество, без предварительного выделения и применения специфических антител, актуальны во многих областях биологии и медицины. В частности, для оценки эффективности векторных вакцин важным параметром является определение количества целевого антигена в исследуемой ткани. Цель данного исследования – разработать методику определения концентрации белков, в том числе вирусных, в сложной белковой смеси с применением метода масс-спектрометрии. На сегодняшний день существует технология (Mirgorodskaya O.A. et al., 2004) получения пептидов, модифицированных изотопом кислорода ^{18}O , для определения концентрации их немеченых аналогов методом MALDI масс-спектрометрии. В данной работе указанную методику применили для определения концентрации белка NS1 в лизированной клеточной культуре A549, заражённой вирусом гриппа A/Chicken/Kurgan/5/05/NSwt (H5N1).

На первом этапе для отработки методики определили концентрацию рекомбинантного белка NS1(1-124). На основании MALDI масс-спектрометрии в структуре этого белка выбрали и получили изотопно–меченый аналог пептида VADQELGDAPFLDR для дальнейшего использования в качестве изотопно–меченого стандарта при определении концентрации белка NS1. Данный пептид модифицировали изотопом кислорода ^{18}O и определили концентрацию рекомбинантного белка NS1(1-124) в растворе. На втором этапе провели электрофоретическое разделение белков в полиакриламидном геле (ЭФ в ПААГ) с образцами рекомбинантного белка NS1(1-124) в различных концентрациях, вырезали окрашенные Кумасси зоны, содержащие белок, провели трипсинолиз белков в геле и определили концентрацию рекомбинантного белка по изотопно-меченому пептиду VADQELGDAPFLDR. Таким образом, показали, что методика применима для определения концентрации белка в растворе и в ПААГ. На третьем этапе также провели ЭФ в ПААГ с образцами лизированных клеток A549, зараженных ВГА, в которых предварительно показали содержание белка NS1 методом вестерн–блоттинга. Окрашенные Кумасси зоны, соответствующие по электрофоретической подвижности белку NS1, вырезали, провели трипсинолиз белков в геле и определили в них концентрацию полноразмерного белка NS1.

Таким образом, в результате исследования разработали и применили методику определения концентрации белков при помощи изотопно–меченого стандарта пептида методом MALDI масс-спектрометрии в сложной белковой смеси.

ПОВЫШЕНИЕ ИММУНОГЕННОСТИ СУБЪЕДИНИЧНОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ С ПОМОЩЬЮ КОНЪЮГИРОВАНИЯ ПОВЕРХНОСТНЫХ АНТИГЕНОВ ВИРУСА ГРИППА С ОКИСЛЕННЫМ ДЕКСТРАНОМ

Е.С. Зайцева

ФГУП СПбНИИВС ФМБА России, г. Санкт-Петербург, Россия

В рамках научно исследовательской работы проведена химическая модификация антигенов вируса гриппа B/Florida/04/2006 и A/California/07/2009. Химическую модификацию антигенов (Ag) осуществляли методом, основанным на образовании ковалентной связи между свободными аминогруппами L- лизина и альдегидными группами окисленного декстрана (полиглюкина), описанного в работах Б.В. Москвичева, Т.М. Таратиной, Г.П. Ивановой [1, 2] на примере белков с ферментативной активностью.

В работе использовали концентраты субъединиц (КСЕ) вируса гриппа B/Florida/04/2006 и A/California/07/2009, выделенного при производстве инактивированной субъединичной вакцины против вируса гриппа в ФГУП СПбНИИВС ФМБА России.

Основываясь на результатах предыдущих работ по химической модификации белковых структур [1, 2] использовали декстран в форме 6% раствора полиглюкина для инфузий, окисленный периодатом натрия до степени окисления $\gamma_o=20\pm 4$ %. Химическую модификацию антигенов вируса гриппа проводили в различных молярных соотношениях основных реагентов (Ag:Д) в реакционном растворе, которое составило 1:5 1:10; 1:20; 1:40; 1:100. Определение белка проводили в соответствии с методикой, изложенной в ОФС 42-0053-07, используя метод Лоури (метод А без предварительного осаждения белка) [3]. Количественное содержание полисахаридной составляющей в модифицированных антигенах проводили в соответствии с методикой, изложенной в статье Roe J.H. [4]. Полученные образцы визуализировали в ПААГ (Рис.) 1.

На примере антигенов вируса гриппа A/California/07/2009 показано перераспределение белковых глобул из зоны с молекулярными массами 57-86 кДа, соответствующие молекулярным массам антигенов вируса гриппа гемагглютинину и нейраминидазе, в случае не модифицированного антигена вируса гриппа (Рис.1 дорожка I) в зону с молекулярными массами более 250 кДа (Рис.1 дорожки II и III) в случае химической модификации антигенов вируса гриппа окисленными декстранами.

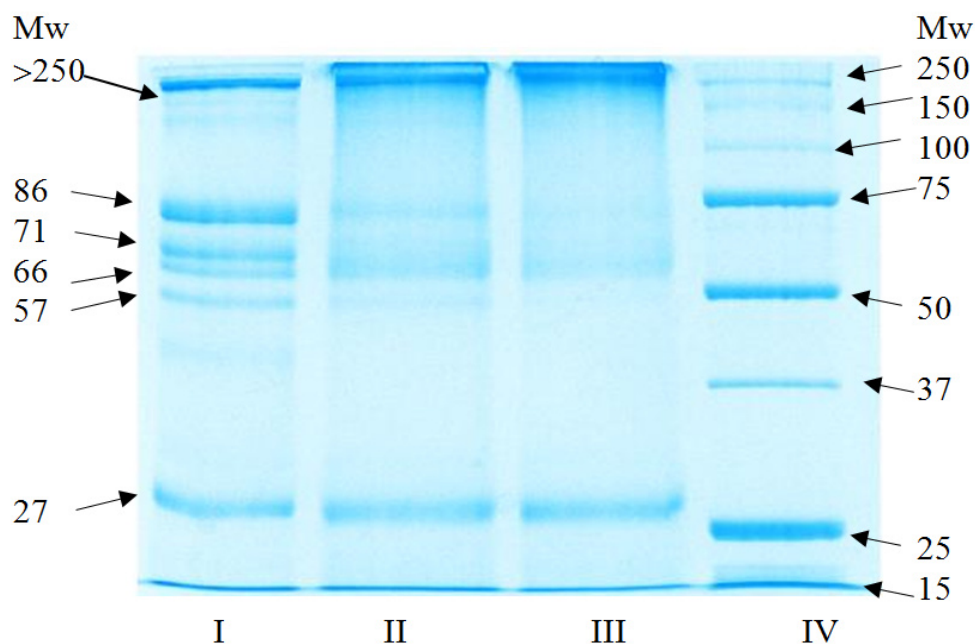


Рис. 1. Визуализация антигенов вируса гриппа А в ПААГ 12%. Окрашивание Кумасси R-250; дорожка I – КСЕ вируса гриппа А/California/07/2009; дорожка II – КСЕ вируса гриппа А/California/07/2009, конъюгированный с полиглютужином в соотношении 1:5; дорожка III – КСЕ вируса гриппа А/California/07/2009, конъюгированный с полиглютужином в соотношении 1:10; дорожка IV – Белковый маркер молекулярного веса.

Такое перераспределение белков по молекулярным массам в модифицированных образцах подтверждает предположение об образовании ковалентной связи между глобулами антигенов и модифицирующего агента — полиглюкина. Полученные данные позволяют предположить, что в результате химической модификации антигенов вируса гриппа образуются высокомолекулярные антигенные структуры, связанные с глобулами полиглюкина.

Иммуногенность модифицированных антигенов вируса гриппа (Агмод), проверяли на беспородных белых мышах весом 10–12 г. Иммунизацию белых беспородных мышей (n=15) КСЕ, модифицированным полиглюкином в различных соотношениях, проводили двукратно с интервалом в 1 неделю, забор крови проводили на 21 сутки после первой иммунизации. Титр специфических антител в полученных от животных сыворотках изучали в реакции торможения гемагглютинации. Результаты представлены на рисунке 2.

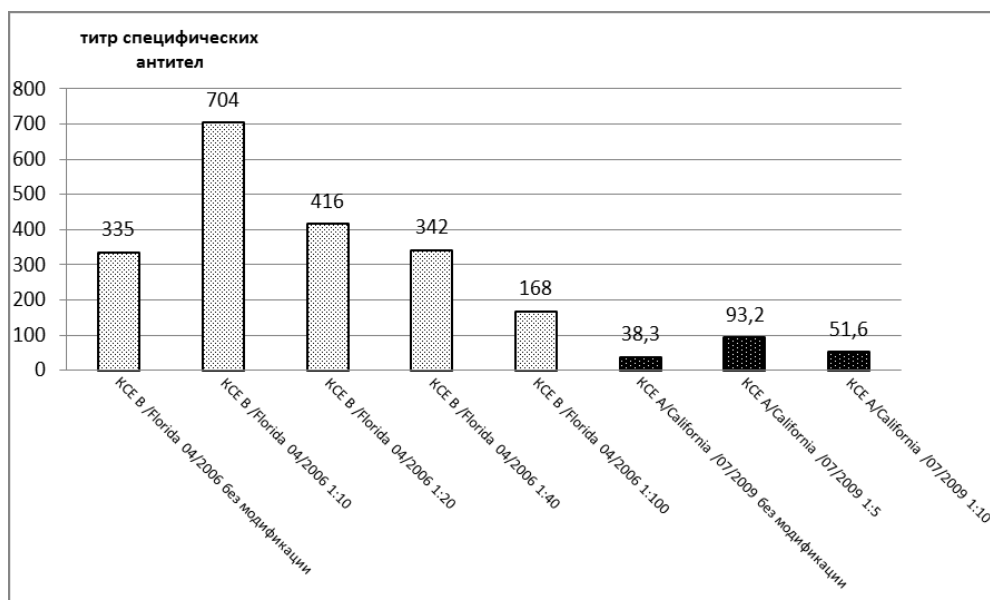


Рис. 2. Оценка титров специфических антител в сыворотках крови мышей, полученных в результате иммунизации антигенами вируса гриппа А и В, конъюгированными с окисленным декстраном, в сравнении с исходными образцами без модификации на 21 сутки после иммунизации. Под титром специфических антител (ось ординат) подразумевали кратность последнего разведения сыворотки крови мыши при котором наблюдалось торможение гемагглютинации (ось абсцисс).

Показано, что при иммунизации модифицированными полиглюкином образцами антигенов вируса гриппа, происходит выработка специфических антител к гемагглютнину. Величина титра специфических антител в сыворотке крови животных зависит от доли полисахарида, введенного в новую молекулярную конструкцию. Установлено, что оптимальным является соотношение основных компонентов (Ag:Д) в реакционной смеси от 1:5 до 1:10, при этом наблюдался наибольший достоверно значимый титр специфических антител в сыворотке иммунизированных животных. Вероятно, «сшивка» антигенов вируса гриппа с полисахаридом приводит к увеличению устойчивости антигена вируса гриппа и, следовательно, к увеличению времени циркуляции его в кровяном русле. Кроме того, полиглюкин, являясь «тимуснезависимым» антигеном, сам непосредственно стимулирует В-лимфоциты [5, 6].

Список литературы:

1. Москвичев Б.В. Многоцелевая модификация гидрофильными полимерами биологически активных веществ как средство создания новых препаратов и технологических процессов в медицинской промышленности: дис. д-ра хим. наук, Л., 1986. – С. 143 – 156, 166 – 169.
2. Таратина Т.М. Синтез и свойства полимерных производных стрептокиназы: дис. ... канд. хим. наук, Л., 1985. – С. 84 – 92, 148 – 155.
3. Государственная фармакопея Российской Федерации издание XII часть 1. – М.: Научный центр экспертизы средств медицинского применения, 2008 г. – С. 105-106.

4. Roe, J.H. The determination of dextran in blood and urine with anthrone reagent / J.H. Roe // J. Biol. Chem. – 1954. – Vol. 208, № 2. – P. 889 – 896.
5. United States Patent 6,287,568 // Methods relating to immunogenic dextran-protein conjugates / W. Denong, E. Bernard, K. Elvin. The Trustees of Columbia University in the City of New York Appl.No.: 09/149,997; Filed: 09,1998.
6. Шкурупий В.А. Цитофизиология и адресная терапия. М., 2007. С 109 – 150.

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ВАКЦИНЫ ГРИППОЛ ПЛЮС. ОПЫТ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

Шмелёва Н.П., Шиманович В.П., Грибкова Н.В., Сивец Н.В., Лапо Т.П.

ГУ «РНПЦ эпидемиологии и микробиологии» Министерства здравоохранения, г. Минск, Республика Беларусь

Ведущая роль в профилактике заболеваемости гриппом принадлежит вакцинопрофилактике. В эпидемическом сезоне 2015–2016 гг. для массовой иммунизации населения в Республике Беларусь была использована вакцина гриппозная тривалентная инактивированная полимер–субъединичная «Гриппол® плюс», производства ООО «НПО Петровакс Фарм», Российская Федерация. В связи с этим определенным интерес представляло изучение безопасности, иммуногенности и эпидемиологической эффективности вакцины «Гриппол® плюс» при массовой вакцинации организованных коллективов Республики Беларусь.

Вакцинация проведена в рамках ежегодной кампании вакцинопрофилактики гриппа. Наблюдаемый контингент был представлен детьми от 6 до 17 лет и взрослыми обоих полов от 18 лет и старше. В исследовании приняли участие 12282 человека. Средний показатель охвата иммунизацией совокупного контингента составил 46,7%.

В ходе наблюдения за привитыми (100 человек) выявлена хорошая переносимость вакцины. Местные поствакцинальные реакции были выявлены в одном случае — в виде гиперемии 0,5 мм, в остальных — в виде легкой болезненности, локализованной в месте инъекции, без признаков воспаления, не требовали проведения лечебных мероприятий и спонтанно купировались в течение 1–3 дней. Слабая температурная реакция на введение вакцины (37,1°C) зарегистрирована только у одного участника. Других системных реакций, а также средних и тяжелых вакцинальных реакций на введение вакцины зарегистрировано не было.

Изучение иммуногенной активности вакцины (группа наблюдения 100 человек) показало, что вакцина по всем трем штаммам соответствует всем критериям оценки иммуногенности, предъявляемым к инактивированным гриппозным вакцинам Комитетом по патентованным лекарственным препаратам (СРМР).

Анализ заболеваемости гриппом и ОРВИ в течение 6 месяцев после иммунизации показал, что вакцина способствовала снижению респираторной заболеваемости среди привитых по сравнению с контрольной группой в 3,4–5,3 раза для детской и взрослой категории населения, участвующего в проекте, соответственно.

Этиологическая расшифровка случаев заболеваний методом ПЦР в режиме реального времени также свидетельствует о высокой профилактической активности вакцины. Исследовано 865 клинических образцов, забранных выборочно у вакцинированных и не вакцинированных лиц в первые 5 дней от начала заболевания. Образцы исследованы методом ПЦР с целью выявления генетического материала вирусов гриппа А и В с дифференциацией субтиппа вируса гриппа А (Н1 и Н3), вирусов парагриппа 1–4 типов, адено-, бока-, метапневмо-, рино- и респираторно-синтициальных вирусов. Индекс профилактической эффективности «Гриппол® плюс» при лабораторно подтвержденной заболеваемости гриппом составил 4,5–6.

КЛИНИКО–ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ РЕСПИРАТОРНЫХ ИНФЕКЦИЙ

СРАВНИТЕЛЬНЫЕ КЛИНИКО–ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ТЯЖЕЛЫХ СИНДРОМОВ ПРИ ГРИППЕ В ПЕДИАТРИИ

Афанасьева О.И., Головачева Е.Г., Афанасьева В.С.

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

Появление в популяции реассортантных штаммов вирусов гриппа, резистентных к известным противовирусным препаратам и провоцирующих нарушение адекватного иммунного ответа, нередко обуславливает развитие тяжелых синдромов (крупа и бронхообструкции) и полиорганных поражений, что создаёт реальную угрозу повышения летальности от гриппа.

Цель. Сопоставить динамику показателей цитокинового профиля с расчетом прогностических коэффициентов, предопределяющих развитие тяжелых синдромов на фоне гриппа.

В эпидемические сезоны 2013–2016 гг., обследовано 784 пациента с верифицированным гриппом. Из них: с синдромом крупа — 203 человека (25,9%), с синдромом бронхообструкции — 581 человек (74,1%). Содержание в сыворотке крови IL-1 β , IL-4, IL-10 и IFN- γ определяли методом ИФА с использованием коммерческих тест–систем производства eBioscience (США–Австрия) в динамике заболевания с расчетом коэффициентов соотношения IL-4/IFN- γ и IL-8/IFN- γ .

Результаты. При гриппе с синдромом крупа у детей в начале заболевания содержание IL-1 β и IL-4 составляло более 100 и 50 пг/мл соответственно. Снижение этих показателей в 2–3 раза на 2 сутки коррелировало со снижением температурной реакции и купированием стеноза гортани, тогда как при ОРВИ не гриппозной этиологии стенозирующий ларинготрахеит сохранялся до 4–5 суток без динамики содержания этих цитокинов. Следует отметить, что продолжительность ложного крупа на фоне пандемического гриппа была кратковременна, не более 1,5 суток, но в 14,1% случаев на 5–6 день в периоде реконвалесценции наблюдался рецидив стеноза гортани, то есть возврат синдрома без повторного заражения за счет оставшихся в организме возбудителей. Бронхообструктивный синдром при гриппе формировался при увеличении содержания IL-4 и IL-8 на фоне незначительного повышения IL-1 β (до 50 пг/мл), что сопровождалось температурной реакцией не более 38,0 $^{\circ}$ C и свидетельствовало о недостаточности иммунной защиты. У пациентов с низким содержанием IFN- γ (<30 пг/мл), высоким содержанием IL-8 в начале заболевания без существенной динамики к периоду реконвалесценции и при коэффициентах соотношения IL-4/IFN- γ и IL-8/IFN- γ больше 3 возможно прогнозирование вирусиндуцированной бронхообструкции.

Заключение. Таким образом, по динамике цитокиновых реакций при гриппозной инфекции у детей возможно не только предопределить развитие тяжелых синдромов, но и оценить адекватность терапии.

РОЛЬ ВИРУСА ГРИППА А И LPS E. COLI В ИНДУКЦИИ ДИСФУНКЦИИ КЛЕТОК ЭНДОТЕЛИЯ (НА МОДЕЛИ ПЕРЕВИВАЕМОЙ ЛИНИИ КЛЕТОК ЭНДОТЕЛИЯ ЧЕЛОВЕКА ECV-304)

Смирнова С.С.^{1,2} Смирнова Т.Д.¹

1 — ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, г. Санкт–Петербург, Россия

2 — Санкт–Петербургский политехнический университет Петра Великого, г. Санкт–Петербург, Россия

Клетки эндотелия играют значительную роль в патогенезе гриппозной инфекции у человека, являясь наиболее важным источником цитокинов в легких и регулируя проницаемость альвеолярно-капиллярного барьера. Вирус гриппа, как и вторичная бактериальная инфекция, может вызывать дисфункцию эндотелия. В литературе достаточно широко представлены работы по изучению сокультивирования вируса гриппа А с различными бактериальными представителями, но мы не встретили работ по изучению взаимоотношений вируса гриппа и бактериального липополисахарида (LPS). Кроме того, изучение репродукции вируса гриппа *in vitro* в основном проводится при заражении клеток высокими дозами вируса и, как правило, в ранние сроки, что может моделировать острую вирусную инфекцию. Но практически нет данных о том, какие изменения происходят в клетках при заражении очень низкими дозами вируса гриппа А, а также при более продолжительном культивировании, что может моделировать хроническую вирусную инфекцию и связанные с ней отдаленные осложнения. Эти неизученные аспекты и вошли в задачи данного исследования.

В результате исследования было показано, что заражение клеток эндотелия низкими дозами вируса гриппа А стимулирует пролиферацию и апоптоз клеток, причем пролиферация клеток поддерживается на стабильно высоком уровне в течение длительного времени. Пролиферация клеток, зараженных высокими дозами вируса, ингибирована в первые сутки после заражения, но при последующем культивировании также происходит усиление пролиферации и апоптоза клеток эндотелия. Впервые нами изучено совместное воздействие на клетки эндотелия вируса гриппа А при разных дозах заражения и LPS E. coli при низкой концентрации (100 нг/мл). Проведено изучение физиологического состояния клеток эндотелия на протяжении длительного культивирования (от 5-суток до 6–8 пассажей) как при раздельном, так и при совместном воздействии вируса гриппа и LPS. Обнаружено, что LPS также стимулирует пролиферацию и апоптоз клеток эндотелия, но на 5–6 пассажах отмечено значительное снижение пролиферации. Показана смена экспрессии генов факторов роста, цитокинов и других клеточных факторов в зависимости от длительности культивирования и развития процесса повышения клеточной проницаемости при воздействии вируса гриппа и/или LPS. При изучении процесса миграции клеток в тесте на застывание раны впервые показано, что в течение 4–8 часов наблюдаются те же закономерности воздействия вирусов при разных инфицирующих дозах и LPS, что и при определении пролиферации. Вирус в низкой дозе и LPS по отдельности усиливают миграцию клеток, вирус в высокой дозе – подавляет, при совместном воздействии вируса и LPS преимущественно наблюдалось восстановление миграции клеток до уровня миграции клеток в контроле. По совокупности исследованных параметров физиологического состояния (пролиферация, апоптоз, экспрессия генов цитокинов и других клеточных факторов,

миграция) клеток эндотелия установлено, что и вирус гриппа, и LPS по отдельности вызывают дисфункцию клеток эндотелия, а эффект от одновременного воздействия на клетки вируса гриппа А и LPS преимущественно усредняется, либо усиливается. На основании полученных данных разработана клеточная модель, позволяющая наблюдать переход от острой вирусной инфекции (первые сутки после заражения клеток высокой инфицирующей дозой) к хронической (последующие сутки и пассажи после заражения клеток низкой инфицирующей дозой) и исследовать возможные отдаленные последствия гриппозной инфекции.

РЕСПИРАТОРНО–СИНЦИТИАЛЬНАЯ ВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ. РОЛЬ В СТРУКТУРЕ РЕСПИРАТОРНОЙ ПАТОЛОГИИ, ОСОБЕННОСТИ ПАТОГЕНЕЗА

Кривицкая В.З.¹, Петрова Е.Р.¹, Соминина А.А.¹

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

Респираторно–синцициальный вирус (РСВ) распространен повсеместно и играет важную роль в структуре инфекционной патологии дыхательного тракта, особенно у детей первых лет жизни. Согласно данным Национального Центра по гриппу ВОЗ при НИИ гриппа, полученным по результатам ПЦР-диагностики, проведенной более чем в 50 городах РФ, в эпидсезон 2015/2016 гг. рост заболеваемости РСВ-инфекцией (РСВИ) в России предшествовал гриппу. Пик РСВИ наблюдали в декабре, гриппа — в январе/феврале. Для гриппа картина была практически идентичной для всех возрастных групп детей. Для РСВ показана возрастная зависимость. У детей до 2 лет РСВИ выявляли с наибольшей частотой (до 28% в декабре) и диагностировали в 11–18% вплоть до мая, когда грипп наблюдали лишь в единичных случаях. У детей 3–6 лет было показано 2 небольших пика — в декабре (14–15%) и апреле (9–11%). Среди детей 7–14 лет РСВ с невысокой частотой (0–7%) определяли в течение всего периода наблюдения.

РСВ является одной из основных причин госпитализации детей первых 2 лет жизни, а также фактором риска тяжелого течения ОРЗ у взрослых пациентов с хронической бронхолегочной патологией. Обследование госпитализированных пациентов с ОРЗ показало, что среди детей в возрасте до 3 лет острый стенозирующий ларинготрахеит (ОСЛ) и острый обструктивный бронхит (ООб) обусловлен РСВИ в 52% и 66% случаев, соответственно. У детей старшего возраста РСВИ диагностировали в 28% случаев при ОСЛ и 46% при ООб. Обострение бронхиальной астмы было ассоциировано с РСВИ у 43% детей старше 3 лет (средний возраст 7, 2 г.) и 50% взрослых пациентов.

РСВ — мощный иммуномодулятор. При неосложненном течении РСВИ развивается Th1-тип иммунного ответа, который обеспечивает быстрое выздоровление. Однако для РСВ в значительной большей мере, чем для других распространенных вирусов ОРЗ человека, включая риновирусы, вирусы гриппа, парагриппа, аденовирусы, свойственна индукция Th2-опосредованного адаптивного противовирусного иммунного ответа, который связан с развитием иммунопатологических проявлений. Одной из составляющих Th2-типа иммунного ответа является синтез IgE, который обуславливает развитие гиперреактивности и обструкции дыхательных путей. Проведенная работа показала, что некоторые формы осложненного течения РСВИ можно рассматривать как результат вирус–индуцированной IgE–опосредованной аллергии. Так, в группе детей в возрасте до 2 лет с РСВИ, осложненной ООб, был показан повышенный уровень РСВ–специфических IgE в крови. У детей более старшего возраста высокий уровень анти–РСВ IgE наблюдали при РСВИ, протекающей в виде ОСЛ или ООб. При неосложненном течении инфекции среднегрупповой уровень данных антител (АТ) не был повышен.

Известно, что анти–РСВ адаптивный иммунный ответ не обеспечивает полную противовирусную защиту, что является одной из причин частых реинфекций. Постановка реакции нейтрализации с оценкой результатов микрокультуральным ИФА при использовании вирусспецифических моноклональных АТ выявила сниженную активностью РСВ–нейтрализующих АТ при осложненном течении РСВИ (ООб у детей и острая пневмония у взрослых), по сравнению с неосложненным заболеванием. Т.о., повышенный уровень вирусспецифических IgE и сниженная активность анти–РСВ нейтрализующих АТ может быть причиной осложненного течения РСВИ у детей и взрослых.

АНАЛИЗ ЛЕТАЛЬНЫХ СЛУЧАЕВ ТЯЖЕЛОЙ ФОРМЫ ГРИППА А(Н1N1)PDM 2009 ЗА ПЕРИОД ЭПИДЕМИИ 2015/2016 гг. В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ

Волощук Л.В., Рожкова Е.Г., Го А.А., Тумина Т.Л., Садыхова М.И., Заришнюк П.В., Днепровская Г.Л., Гужов Д.А., Обижаева Е.С.

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

Актуальность. Результаты международных исследований продемонстрировали, что смертность от гриппа и других респираторных инфекций носит пролонгированный (до трех–четырёх месяцев) характер: острая токсическая смерть (первые три – пять дней болезни), смерть, вызванная осложнениями (две – четыре недели) и отсроченная смерть, связанная с декомпенсацией хронических заболеваний. Неблагоприятные исходы чаще всего наблюдаются у лиц с сопутствующими хроническими заболеваниями [1,2,3].

Цель. Провести клинико–лабораторный анализ случаев летальных исходов тяжелой формы гриппа А(Н1N1)pdm 2009 за эпидемию 2015/2016 гг. в стационарах Санкт–Петербурга.

Материалы и методы. Ретроспективно изучено 105 историй болезни пациентов с летальным исходом гриппа А(Н1N1)pdm2009 за эпидемию 2015/2016 гг. в стационарах Санкт–Петербурга. Анализ полученных результатов выполняли с применением статистического пакета SPSS 17.0RU for Windows.

Результаты. Пациенты госпитализировались с 1–го по 21–й день болезни, медиана составила 5,0(3,0;7,0). При поступлении в стационар состояние большинства пациентов расценивалось как тяжелое и крайне тяжелое, обусловленное выраженной интоксикацией и прогрессирующей дыхательной недостаточностью. Установлено, что достоверно чаще умирали мужчины 66,7% (70), против 33,3% (35) женщин. Наибольшее число умерших было в возрастной группе старше 60 лет 44,8% (47/105), на втором месте по частоте пациенты в возрасте от 41 до 60 лет — 40,0% (42/105), в возрастной группе от 21 до 40 лет — 15,2% (16/105) пациентов. В анамнезе только у 2 пациентов не были отмечены сопутствующие хронические заболевания. Сочетанная патология — 48,6% (51/105), ожирение — 44,8% (47/105) пациентов, сахарный диабет — 28,5% (30/105) пациентов. Подтвержденных данных о вакцинации против гриппа ни у кого не было. Зарегистрировано значимое повышение КФК и ЛДГ уже при первичном биохимическом анализе крови, а также снижение ПТИ и общего белка. Наблюдался выраженный геморрагический синдром. Так при жизни кровохарканье зафиксировано в 19,1% (20) случаев, микрогематурия — в 82,6% (71) случаев. У большей части пациентов смерть наступала после 5 дня болезни (88,6%), медиана составила 10,0 (8,0; 16,6) день болезни, у 12 (11,4%) пациентов — до 5 дня болезни (включительно), медиана составила 4,0 (4,0; 5,0) день болезни. Достоверных различий между сопутствующей патологией у больных, умерших до 5 дня, и от осложнений (в течение 2–4 недель) не выявлено. Патологоанатомически в большинстве случаев выявлялись двусторонняя субтотальная вирусно–бактериальная пневмония, причем, в 70,5% с геморрагический компонентом, отек головного мозга у трети умерших, тяжелая токсическая паренхиматозная дистрофия миокарда, печени, почек (белковая или белково–жировая) у 43 пациентов (41%).

Выводы.

1. Среди пациентов, умерших от гриппа А/Н1N1pdm/2009 достоверно преобладали мужчины.
2. Сопутствующая патология определялась у 98% (103) пациентов.
3. При анализе летальных случаев до 5 дня болезни и смерти, вызванной осложнениями, установлено, что достоверных отличий в характере и частоте сопутствующей патологии не выявлено.
4. Повышенное содержание в крови ферментов КФК, ЛДГ и снижение ПТИ можно расценивать как маркеры тяжелого гриппа.
5. Отсутствие вакцинации и позднее назначения этиотропных препаратов значительно ухудшают прогноз заболевания.

Список литературы:

1. Гладков С.А., Григорьева И.В., Дедов В.А., Эсауленко Е.В., Цинзерлинг В.А. клинико-морфологические сопоставления в случаях летальных исходов при гриппе в 2009–2011 гг. Журнал инфектологии. 2011;3(4):55-61
2. Еженедельный бюллетень по информированному мониторингу проявлений гриппа Н1N1 и других генотипов вируса с пандемическим потенциалом за период 09.05.2010–16.06.2010/ Референс–лаборатория ВОЗ по диагностике гриппа Н5 ФГУН ГНЦВБ. Выпуск 7
3. Кожокару В.И., Лобзин Ю.В., Кожокару Д.И. Интенсивная терапия тяжёлых осложнений гриппа. Журнал инфектологии. 2012;4(1):58-64.

Сборник материалов подготовил
сотрудник Научно–организационного отдела
ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России
Автономов Е.Д.

© ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России

Санкт–Петербург

2016 год

www.influenza.spb.ru

