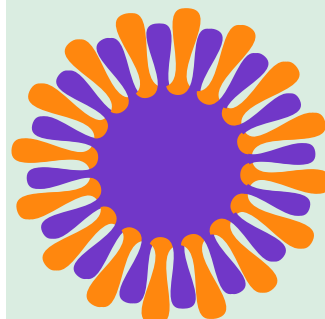


Научно–практическая  
конференция–биеннале

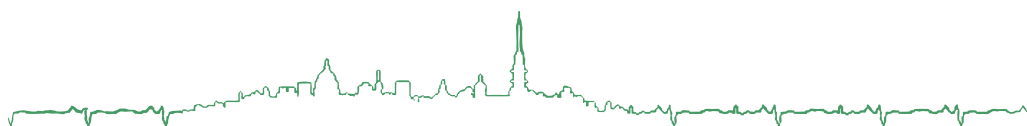
Научно–  
исследовательский  
институт гриппа

Грипп: вирусология,  
эпидемиология,  
профилактика и лечение



**Сборник материалов**

**22–23 октября  
2014**



# СОДЕРЖАНИЕ

Материалы расположены по порядку, аналогичному программе конференции.

Тезисы докладов на конференции 22 октября 2014 года..... 5

Эпидемиологические и вирусологические особенности современных  
вирусов гриппа

---

**Инвариантные паттерны внутренних белков пандемических вирусов гриппа**  
Харченко Е.П. .... 5

---

**Сравнение пандемии гриппа в России 2009/10 года с последующими  
эпидемиями с участием гриппа А(Н1N1)pdm09 (2011–2014 гг.)**  
Карпова Л.С. .... 6

**Антигенный и молекулярно–биологический анализ вирусов гриппа,  
циркулировавших в России в эпидемические сезоны 2012–2014 гг.**  
Еропкин М.Ю., Грудинин М.П., Комиссаров А.Б., Фадеев А.В., Кошелева А.А.,  
Писарева М.М., Бузицкая Ж.В., Даниленко Д.М., Коновалова Н.И., Лобова Т.Г.,  
Еропкина Е.М., Щеканова С.М. .... 8

**Этиология ОРВИ и гриппа у детского населения Новосибирской области в  
2013–2014 гг.**  
Курская О.Г., Соболев И.А., Сивай М.В., Рябиченко Т.И., Шестопапов А.М. .... 9

**Изменчивость поверхностных гликопротеинов штаммов вируса гриппа  
А(Н3N2), изолированных на территории Западной Сибири с 2008 по 2013 гг.**  
Соболев И.А., Курская О.Г. .... 10

**Влияние зарядовых мутаций гемагглютинина на фитнес вируса гриппа**  
Гамбарян А.С., Ломакина Н.Ф., Боравлева Е.Ю., Киселёва И.В., Матросович М.Н. .... 11

**Изменение патогенности вируса гриппа Н1N1/2009, обусловленное мутациями  
в белках полимеразного комплекса**  
Ломакина Н.Ф., Гамбарян А.С., Боравлёва Е.Ю., Исаева О.В., Матросович М.Н. .... 12

**Упаковка генома вирусов гриппа и ограничения в их реассортации**  
Харченко Е.П. .... 13

**Технологии защиты оператора и продукта при производстве лекарственных  
средств**  
Королевский А.И. .... 14

Патогенез, клиника и лечение гриппа и других вирусных инфекций:

---

**Резистентность к противогриппозным препаратам: молекулярно–  
генетические основы, возникновение и распространение**  
Ленева И.А. .... 15

<b>Роль интерферона гамма в иммунном ответе на грипп и ОРВИ</b> Хаитов М.Р. ....	16
<b>Интерферон гамма: молекулярно–биологическая возможность использования препарата «Ингарон» в клинической практике</b> Сологуб Т.В. ....	17
<b>Профилактика острых респираторных инфекций у недоношенных новорожденных</b> Васильева Т.П., Чаша Т.В. ....	18
Тезисы докладов на конференции 23 октября 2014 года.....	19
<hr/> <b>Разработки противогриппозных вакцин и вакцинопрофилактика</b> <hr/>	
<b>Новые технологии в разработке гриппозных вакцин</b> Красильников И.В., Петровский С.В., Мельников С.А. ....	19
<b>Рекомбинантные белки на основе M2e пептида вируса гриппа как основа «универсальных» противогриппозных вакцин</b> Блохина Е.А., Куприянов В.В., Котляров Р.Ю., Марданова Е.С., Lomonosoff G., Равин Н.В. ....	21
<b>Вирус табачной мозаики как вектор для продукции антигенов и антител</b> Иванов П.А., Гасанова Т.В., Петухова Н.В. ....	22
<b>Кандидатная вакцина широкого спектра действия на основе эктодомена M2 белка вирусов гриппа А человека</b> Степанова Л.А., Куприянов В.В., Блохина Е.А., Потапчук М.В., Ковалева А.А., Шалджян А.А., Коротков А.В., Горшков А.Н., Касьяненко М.А., Равин Н.В., Цыбалова Л.М. ....	23
<b>Результаты доклинического исследования безопасности новой вакцины «Унифлю» в свете современных требований к изучению иммунобиологических препаратов</b> Сивак К.В., Саватеева–Любимова Т.Н., Стосман К.И., Рассоха Т.А., Любишин М.М., Макарова О.И., Киселев А.С. ....	24
<b>Разработка генетических вакцин широкого спектра действия против вируса гриппа А на основе рекомбинантных аденовирусных векторов</b> Лысенко А.А. ....	25
<b>Новый подход к профилактике и иммунотерапии туберкулеза: мукозальная вакцина на основе рекомбинантных гриппозных векторов</b> Стукова М.А., Хайруллин Б.М., Шурыгина А.-П.С., Бузицкая Ж.В., Писарева М.М., Ерофеева М.К., Грудинин М.П., Касенов М.М., Нурпейсова А.С., Сарсенбаева Г.Ж., Богданов Н.В., Егоров А.Ю., Сансызбай А.Р., Киселев О.И. ....	27

<b>Эпидемиологическая значимость вакцинопрофилактики гриппа</b> Ерофеева М.К., Никоноров И.Ю., Максакова В.Л., Позднякова М.Г., Коншина О.С., Охапкина Е.А., Войцеховская Е.М., Коровкин С.А., Мельников С.Я. ....	28
<b>Использование медицинских респираторов как эффективный способ профилактики и защиты от вирусов гриппа различной этиологии</b> Анашкина Ю.В. ....	29
<b>Peregrination across Continents Developing Medical and Environmental Biosensors</b> Marks R.S. ....	30
<hr/> <b>Перспективные разработки диагностических и противовирусных препаратов</b> <hr/>	
<b>Перспективы использования биологических микрочипов для диагностики гриппа</b> Клотченко С.А., Васин А.В., Плотникова А.В., Тараскин С.З., Егоров В.В., Киселев О.И. ....	31
<b>Анализ вторичной структуры гена NS вируса гриппа А</b> Васин А.В., Петрова А.В., Плотникова А.В., Егоров В.В., Клотченко С.А., Киселев О.И. ....	32
<b>Противовирусный препарат «Триазавирин» от скрининга до клинической апробации</b> Дева Э.Г., Русинов В.Л., Киселев О.И. ....	33
<b>New Antiviral Drug Triazavirin from Screening to Clinical Trials</b> E.G. Deyeva, V.L. Rusinov, O.I. Kiselev ....	34
<b>Действие антивирусных препаратов и вирусов гриппа на экспрессию генов врождённого иммунитета в клетках крови человека</b> Соколова Т.М., Шувалов А.Н., Полосков В.В., Шаповал И.М., Ершов Ф.И. ....	35
<b>Современные скрининговые технологии в вирусологии и их применение в разработке вакцин и фармпрепаратов</b> Овешников И.Н. ....	36
Прочие тезисы.....	37
<b>Серологический мониторинг циркуляции вирусов гриппа среди населения Алматинской области в 2014 году</b> Таубаева Ш.Ж., Кливлева Н.Г., Шаменова М.Г., Кузнецова Т.В. ....	37
<b>Изоляция вирусов гриппа, циркулировавших в эпидемический сезон 2013–2014 гг. в Центральном Казахстане</b> Байсейіт С.Б., Глебова Т.И., Кливлева Н.Г., Лукманова Г.В. ....	38
<b>Филогенетический анализ генов поверхностных белков вирусов гриппа H1N1, выделенных в г. Атырау в 2012–2013 гг.</b> Глебова Т.И., Кливлева Н.Г., Кузнецова Т.В., Шаменова М.Г. ....	39

Тезисы устных докладов.....40

**Методические основы выделения экзосом из культуральной среды, содержащей вирус гриппа**

Забродская Я.А., Шалджян А.А., Максимова Ю.А., Егорова М.А., Горшков А.Н., Кадырова Р.А., Клотченко С.А., Егоров В.В., Васин А.В. .... 40

**Новые иммуногенетические характеристики современных гриппозных вакцин и их комбинаций с препаратом «рибонуклеат натрия»**

Полосков В.В., Шувалов А.Н., Соколова Т.М, Костинов М.П. .... 41

**Влияние инфицирования вирусом гриппа А на изменение профиля экспрессии мРНК субъединиц NMDA-рецептора в мозге мышей**

Егорова М.А., Плотникова М.А., Клотченко С.А., Зарубаев В.В., Васин А.В..... 43

**Молекулярно–генетические варианты вируса гепатита В**

Елпаева Е.А., Писарева М.М., Грудинин М.П..... 44

**Высокорепродуктивные аттенуированные реассортанты H2N2 на основе донора А/Гонконг/1/68/162/35**

Петров С.В., Потапчук М.В., Репко И.А., Цыбалова Л.М. .... 45

**Диагностика и клиническая характеристика аденовирусной инфекции 4 и 7 типов**

Янина М.А, Комиссаров А.Б, Осидак Л.В., Львов Н.И. .... 46

Тезисы постерных докладов.....49

**Мутации в генах полимеразного комплекса определяют холодоадаптированный фенотип штамма–донора А/Гонконг/1/68/162/35**

Сергеева М.В., Петров С.В., Пулькина А.А., Фадеев А.В., Потапчук М.В., Цыбалова Л.М. .... 49

**Рекомбинантные белки на основе НВс и эктодоменов консервативного белка М2 вируса гриппа А**

Касьяненко М.А., Шалджян А.А., Горшков А.Н., Ковалева А.А., Степанова Л.А. .... 50

Дополнение

---

**Заседание Проблемной комиссии «грипп и гриппоподобные инфекции»**

**О соответствии циркулирующих штаммов составу сезонной вакцины.**

**Новые опасности зоонозного происхождения**

Еропкин М.Ю., Коновалова Н.И., Даниленко Д.М., Лобова Т.Г., Петрова П.А., Корнилова Е.Г., Щеканова С.М..... 51

Перспективные разработки диагностических и противовирусных препаратов

**Каркасные соединения как ингибиторы ранних стадий вирусной репродукции**

Зарубаев В.В., Третьяк Т.С., Салахутдинов Н.Ф. .... 54

## ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ 22 ОКТЯБРЯ 2014 ГОДА

### ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ И ВИРУСОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ СОВРЕМЕННЫХ ВИРУСОВ ГРИППА

#### **ИНВАРИАНТНЫЕ ПАТТЕРНЫ ВНУТРЕННИХ БЕЛКОВ ПАНДЕМИЧЕСКИХ ВИРУСОВ ГРИППА**

Харченко Е.П.

ФГБУ «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова» РАН, Санкт–Петербург, Россия

Эволюционная изменчивость вирусов гриппа типа А (ВГА) находит явное проявление в многообразии их поверхностных белков: гемагглютинина и нейраминидазы. В отличие от гемагглютинина и нейраминидазы, первичная структура внутренних белков (ВБ) консервативна. С возрождением пандемического штамма (ПШ) 1918 г. уже доступны молекулярные характеристики ПШ пяти последних пандемий гриппа, что позволяет сформулировать вопрос: имеют ли ПШ такие особенности характеристик их ВБ, которые выделяют их из не ПШ (например, сезонных штаммов), т.е. возможно ли сегодня безошибочно распознать ПШ среди других штаммов и проследивать возникновение пандемического потенциала у циркулирующих штаммов?

Цель исследования состояла в поиске подходов распознавания по молекулярным характеристикам ПШ вирусов гриппа А. Анализ включал 70 штаммов ВГА, выделенных у человека, свиньи и птиц, в числе которых подтипы H1N1, H2N2, H3N2, H5N1, H7N7, H7N9, H9N2 и H10N9. Источником первичных структур их ВБ служили общедоступные по Интернету базы данных. С помощью компьютерного анализа установлено, что для первичных структур белков M1, M2, NP, PB1, PB2, PA и NS2 (NS1 исключен из анализа из-за эволюционной изменчивости его длины) пяти ПШ обучающей выборки характерно постоянство числа и позиций для определенных аминокислот и инвариантных фрагментов. Выявление инвариантных паттернов аминокислотного состава и матриц инвариантности первичных структур ВБ обучающей выборки ПШ позволило безошибочно идентифицировать все ПШ и соответственно исключить все не ПШ в контрольной выборке, т.е. ПШ по их ВБ образуют особое подмножество, от которого на разных расстояниях «отдалены» не ПШ.

Выполненный нами анализ позволяет предположить, что ПШ 1918, 1957, 1968, 1977 и 2009 гг. обрели свой пандемический потенциал конвергенцией их ВБ к пандемическим инвариантам, т.е. пандемический потенциал ВГА формировался уникальной комбинацией первичных структур ВБ, которая случайно и приближенно воссоздавалась через различные промежутки времени, исчисляемые десятками лет. Если эта комбинация молекулярных инвариантных паттернов ВБ служит фундаментальной основой пандемичности ВГА и воспроизводилась ранее в пандемиях минувших столетий, то прогнозирование будущих пандемий гриппа ВГА не представляется уже нереальным или недостижимым.

## **СРАВНЕНИЕ ПАНДЕМИИ ГРИППА В РОССИИ 2009/10 ГОДА С ПОСЛЕДУЮЩИМИ ЭПИДЕМИЯМИ С УЧАСТИЕМ ГРИППА А(Н1N1)PDM09 (2011–2014 ГГ.)**

Карпова Л.С.

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

В России за 5 лет было 4 эпидемии с участием пандемического гриппа А(Н1N1)pdm09. Пандемию гриппа наблюдали в сезон 2009–2010 гг., II волна была в сезон 2010/11 гг., III — в 2012/13гг. и IV — в 2013/14гг.

Пандемия гриппа А(Н1N1)pdm09 в 2009 году распространялась по территории России с Дальнего Востока в западном направлении. Следующие эпидемии 2011 г. и 2013 г. были смешанной этиологии, при этом пандемический грипп распространялся по территории России с европейской части в восточном направлении. В эпидемию 2014 г., как и в 2009 г., вирус гриппа А(Н1N1)pdm09 распространился с Дальнего Востока на территорию Сибири, а грипп А(Н3N2) — с запада на европейскую часть территории России.

Отмечены различия интенсивности эпидемического процесса в Федеральных округах по заболеваемости и продолжительности эпидемий. Интенсивность эпидемий по округам зависела от географического распространения гриппа, прежде всего пандемического, по территории России и его вклада в заболеваемость, и была выше на стартовых территориях эпидемий.

Первая волна пандемии гриппа А(Н1N1)pdm09 в России началась необычно рано (с 21–27.09.2009 г.). Заболеваемость на пике в последние эпидемии была в 1,5–2 раза ниже, чем в две предыдущие. Общая продолжительность эпидемий по стране составила от 14 до 17 недель.

Наиболее интенсивной была I волна пандемии 2009 года. По сравнению с ней, в эпидемию 2014 г. уменьшились: вовлеченность в эпидемию всех возрастных групп населения городов (с 100% и 89,8% до 47,5% и 22,0% городов); заболеваемость населения в среднем в 2,5 раза (с 8,5% до 4,0%) и во всех возрастных группах, особенно, взрослого населения в возрасте от 15 до 64 лет в 3,3 раза (с 5,0% до 1,5%); продолжительность эпидемии всего населения на 3 недели (с 6,8 до 4,0 недели), особенно среди взрослых на 4 недели (с 6,7 до 2,9 недели); процент госпитализированных с диагнозом «грипп» от всех госпитализированных с гриппом и ОРВИ в 5 раз (с 14,1% до 2,8%); летальность среди всего населения и взрослых в возрасте 15 до 64 лет в 60 раз (с 0,003% до 0,0005%), среди лиц старше 65 лет в 25 раз (с 0,05% до 0,002%) и детей в возрасте до 2 лет в 10 раз (с 0,002% до 0,0002%).

Но увеличились: процент госпитализированных детей дошкольного возраста (с 5,3% до 8,6% и с 1,9% до 3,2%); доля в возрастной структуре умерших лиц старшего возраста с 54 лет, в том числе старше 65 лет в 5 раз (с 2,4% до 12,0%), и детей 0–2 лет — в 5,7 раза (с 1,4% до 8,0%); доля среди умерших лиц с метаболическим синдромом (с 8,1% до 36,0%) и сердечно-сосудистой патологией (с 5,0% до 36,0%).

Сравнение эпидемий с участием пандемического гриппа А(Н1N1) pdm09 с 2009 по 2014 г., показало снижение их интенсивности в динамике: по числу заболевших гриппом и ОРВИ, госпитализированных с гриппом и ОРВИ, и летальных исходов от лабораторно подтвержденного гриппа.

Дополнительная смертность населения Санкт–Петербурга в пандемию гриппа была выше, чем в последующие эпидемии (по 2013г.), от соматических и инфекционных заболеваний в сумме (52 против 29, 9, 4), и отдельных заболеваний (болезней системы кровообращения и органов дыхания). Самая высокая дополнительная смертность от соматических и инфекционных заболеваний была у лиц старше 70 лет (29 против 18, 8, и 4).



Пандемию 2009 г. в России, как и в США, можно отнести к I категории тяжести по шкале оценки тяжести пандемий гриппа CDC (Центр по контролю и предупреждению заболеваний, Атланта), принятой большинством экспертов ВОЗ.

## **АНТИГЕННЫЙ И МОЛЕКУЛЯРНО–БИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВИРУСОВ ГРИППА, ЦИРКУЛИРОВАВШИХ В РОССИИ В ЭПИДЕМИЧЕСКИЕ СЕЗОНЫ 2012–2014 ГГ.**

Еропкин М.Ю., Грудинин М.П., Комиссаров А.Б., Фадеев А.В., Кошелева А.А., Писарева М.М., Бузицкая Ж.В., Даниленко Д.М., Коновалова Н.И., Лобова Т.Г., Еропкина Е.М., Щеканова С.М.

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

В сезоне 2012–2013 гг. нами было выделено, получено из опорных баз и проанализировано 367 штаммов гриппа человека, а в сезоне 2013–2014 гг. — 451 штамм. Распределение штаммов по подтипам в анализируемые сезоны, соответственно, составило: А(Н1N1)pdm09 — 37 и 48,1 %; А(Н3N2) — 25,7 и 44,1 %; В — 37,3 и 7,8 %. Антигенный анализ штаммов А(Н1N1)pdm09 показал, что их антигенные свойства почти не изменились с момента начала циркуляции пандемических вирусов 2009 г. Однако метод 3D антигенной картографии, впервые примененный к российским изолятам, показал тенденцию формирования группы штаммов в 2013–2014 гг., несколько отличающихся по положению на антигенной карте от вирусов предыдущих лет. Секвенирование и последующий филогенетический анализ показали принадлежность всех штаммов 2013–2013 гг. к генетической группе 6, которая в ходе дальнейшей эволюции разделилась на несколько подгрупп. Все проанализированные изоляты 2014 г. принадлежали к подгруппе 6В (референс–штамм — А/Ю.Африка/3626/13). Штаммы А(Н3N2) были подобны эталону А/Техас/50/12 и принадлежали к генетической группе 3С (эталон — А/Самара/73/13). В ходе дальнейшей эволюции штаммы 2014 г. оказались в подгруппе 3С.3, кроме штамма А/С.-Петербург/80/14, принадлежавшего подгруппе 3С.2 (референс–штамм этой подгруппы — А/Аляска/18/14). Трехмерная антигенная картография наглядно демонстрирует постепенный антигенный дрейф вирусов А(Н3N2) за несколько последних лет. Все секвенированные штаммы гриппа А не несли генетических маркеров устойчивости к ингибиторам нейраминидазы, но были устойчивы к адамантанам.

Изоляты гриппа В Ямагатской линии в анализируемые сезоны принадлежали к генетическим группам 2 и 3 с эталонными штаммами В/Брисбен/03/07 и В/Стокгольм/12/11, соответственно, а штаммы 2014 г. — только к подгруппе 3 (референс–штамм — В/Висконсин/01/10). Штаммы В Ямагатской линии реагировали с антисывороткой к вакцинному референс–штамму А/Массачусетс/02/12 с пониженными титрами, в основном — 1/8 гомологичного титра.

Штаммы гриппа В Викторианской линии были по-прежнему подобны эталону В/Брисбен/60/08 и принадлежали к генетической группе 1А. В сезоне 2013–2014 гг. штаммы Викторианской линии были выделены только в Восточной Сибири и на Дальнем Востоке. Построенные нами 3D-антигенные карты за 8–9 лет демонстрируют более медленный антигенный дрейф вирусов гриппа В, по сравнению со штаммами гриппа А.

Количественный анализ активности нейраминидазы в MUNANA–тесте 203-х штаммов гриппа А различных подтипов, лет выделения и хозяев (человек, птицы, свинья) продемонстрировал наивысшую активность этого фермента у вирусов гриппа птиц А(Н5N1), как у высоко–, так и у низкопатогенных. На втором месте по активности нейраминидазы идут архивные штаммы А(Н2N2), в то время как активность современных штаммов А(Н1N1) и А(Н3N2) существенно ниже. В целом, активность N1 оказалась достоверно выше, чем N2. Это подтверждает связь между активностями двух основных поверхностных белков вируса гриппа и свидетельствует о важности функционального баланса HA и NA для эффективной гриппозной инфекции.

## ЭТИОЛОГИЯ ОРВИ И ГРИППА У ДЕТСКОГО НАСЕЛЕНИЯ НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ В 2013–2014 ГГ.

Курская О.Г.<sup>1,2</sup>, Соболев И.А.<sup>1,2</sup>, Сивай М.В.<sup>1,2</sup>, Рябиченко Т.И.<sup>3</sup>, Шестопалов А.М.<sup>1,2</sup>

1–ФГБУ «Научный центр клинической и экспериментальной медицины» СО РАМН, Новосибирск, Россия

2–Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

3–ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет» МЗ РФ, Новосибирск, Россия

Острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ) — самая частая патология, встречающаяся вне зависимости от возраста, места проживания и социального статуса человека. На долю ОРВИ в нашей стране приходится около 93% всей инфекционной патологии. При этом часто возникает необходимость проведения дифференциального диагноза с целью установления точного возбудителя ОРВИ, выбора тактики лечения, этиотропной терапии и предупреждения осложнений. Целью данной работы явилось изучение этиологической структуры острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ), в том числе гриппа, потребовавших стационарного лечения, у детского населения г. Новосибирска. Для этого во время эпидемического сезона производился сбор клинического материала (мазки из носа и зева) у детей, поступивших в стационар с симптомами ОРВИ. Исследование материала на наличие генетического материала вирусов, вызывающих острые респираторные заболевания (респираторно-синцитиальный вирус, риновирус, метапневмовирус, вирус парагриппа, коронавирус, аденовирус, бокавирус), осуществляли методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с помощью коммерческого набора «АмплиСенс ОРВИ-скрин-FL».

В ходе исследования были проанализировано 256 мазков из носа и зева от детей разных возрастных групп: 40% образцов было получено от детей первого года жизни и по 30% образцов — от детей раннего возраста (1–3 года) и от детей старше 3 лет. Наличие генетического материала вирусов, вызывающих ОРВИ, было выявлено в 73% случаев, при этом наименьший уровень выявления вирусов наблюдался у детей старше 3 лет. У 16% детей с подтвержденным этиологическим диагнозом отмечалась микст-инфекция, при этом чаще всего выявлялось сочетанное заражение респираторно-синцитиальным вирусом и риновирусом. Наиболее распространенным этиологическим агентом, вызывающим ОРВИ у детей в наблюдаемый период, оказался респираторно-синцитиальный вирус, составив 66% от всех случаев ОРВИ с уточненной этиологией, при этом в 53% случаев он выявлялся в виде моноинфекции и в 13% — в виде микст-инфекции, преимущественно в сочетании с риновирусной инфекцией. Риновирус был выявлен в 15% случаев. Доля гриппа в структуре ОРВИ в наблюдаемый период составила 7%. На долю других респираторных вирусов (аденовирус, вирусы парагриппа 1–3 типов, метапневмовирус, коронавирусы, бокавирус) пришлось 17% случаев с подтвержденной этиологией.

Работа поддержана грантом Правительства Новосибирской области № ОН.14–27.

## **ИЗМЕНЧИВОСТЬ ПОВЕРХНОСТНЫХ ГЛИКОПРОТЕИНОВ ШТАММОВ ВИРУСА ГРИППА А(Н3N2), ИЗОЛИРОВАННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ ЗАПАДНОЙ СИБИРИ С 2008 ПО 2013 ГГ.**

Соболев И.А., Курская О.Г.

ФГБУ «Научный центр клинической и экспериментальной медицины» СО РАМН, Новосибирск, Россия

Грипп представляет собой одну из наиболее значимых проблем, стоящих перед современной системой здравоохранения. Эпидемический характер заболеваемости гриппом обуславливает ряд проблем социального и экономического характера.

Работа направлена на изучение изменчивости сегментов генома вируса гриппа А(Н3N2), кодирующих поверхностные гликопротеины (нейраминидазу и гемагглютинин) штаммов, изолированных на территории Западной Сибири с 2008 по 2013 гг. Клинические образцы собирались от пациентов с симптомами ОРВИ. Сбор образцов осуществлялся с октября 2008 г. по июнь 2013 г. Всего было собрано 2640 образца, из которых на культуре клеток МДСК было выделено 416 изолятов вируса гриппа: 189 (45%) изолятов — вирус гриппа А(Н3N2), 95 (23%) изолятов — вирус гриппа А(Н1N1) и 132 (32%) — вирус гриппа В. Для дальнейшего исследования были выбраны 29 изолятов вируса гриппа А(Н3N2). Для отобранных изолятов была определена первичная структура генов, кодирующих поверхностные гликопротеины вируса, осуществлен анализ последовательностей на нуклеотидном и аминокислотном уровне, и выполнен филогенетический анализ.

Для исследованных штаммов вируса гриппа характерна низкая степень изменчивости первичной структуры гемагглютинина и нейраминидазы в пределах отдельных эпидемических сезонов кроме сезона 2008–2009. Кроме того, некоторые последовательности полностью идентичны на нуклеотидном и аминокислотном уровне. Показано, что в исследованных штаммах вируса гриппа отсутствуют известные на данный момент аминокислотные замены, ассоциированные с развитием резистентности к ингибиторам нейраминидазы.

Согласно филогенетическому анализу и наличию ряда характерных аминокислотных замен, исследованные штаммы относятся к следующим группам:

- Клада Brisbane/10 (штаммы эпидемического сезона 2008–2009)
- Клада Perth/16, генетическая группа 1 (сезон 2010–2011)
- Клада Victoria/208, генетическая группа 3В (штамм A/Novosibirsk/02d/2012, сезон 2011–2012)
- Клада Victoria/208, генетическая группа 3С (сезон 2011–2012, за исключением штамма A/Novosibirsk/02d/2012, а также штаммы сезона 2012–2013)

## ВЛИЯНИЕ ЗАРЯДОВЫХ МУТАЦИЙ ГЕМАГГЛЮТИНИНА НА ФИТНЕС ВИРУСА ГРИППА

Гамбарян А.С.<sup>1</sup>, Ломакина Н.Ф.<sup>1</sup>, Боравлева Е.Ю.<sup>1</sup>, Киселёва И.В.<sup>2</sup>, Матросович М.Н.<sup>3</sup>

1–ФГБУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов» им. М.П. Чумакова РАМН, Москва, Россия

2–ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Россия

3–Institute of Virology, Philipps University, Marburg, Germany

Известно, что вирусы гриппа человека не способны расти в куриных эмбрионах (КЭ) без приобретения мутаций, изменяющих рецепторную специфичность вирусов. Исходные человеческие вирусы H1N1 (как пандемические, так и вирусы, циркулировавшие до 2009 года) в позициях 225 и 226 гемагглютинаина содержат Asp и Gln. Это — ключевое место рецептор-связывающего участка (PCY), ответственного за распознавание типа связи между сиаловой кислотой и последующей галактозой (3`SLN или 6`SLN рецепторы).

При адаптации к эмбрионам, как правило, возникают мутации Asp225/Gly либо Gln226/Arg. Обе мутации сдвигают заряд гемагглютинаина в положительную сторону. На примере пандемических вирусов A/Hamburg/4/2009 и A/California/2009 мы изучали влияние мутаций Asp225/Gly и Gln226/Arg и ряда компенсаторных мутаций на рецепторную специфичность, сродство к клеткам МДСК, урожайность в куриных эмбрионах и на культуре клеток и патогенность для мышей. Показано, что вирус с мутацией Asp225/Gly начинает распознавать 3`SLN, но сохраняет способность связывать 6`SLN, в то время как вирус с мутацией Gln226/Arg начинает распознавать 3`SLN, и полностью теряет способность связывать 6`SLN. Оба вируса приобретают принципиальную способность к росту в куриных эмбрионах, но их урожайность, как в КЭ, так и клетках МДСК очень низка. При росте в культуре клеток образуются мелкие, плотные фокусы, вирионы плохо отрываются от клеток. Это признаки слишком высокого сродства вирионов к клетке, обусловленного, как изменившейся рецепторной специфичностью, так и возросшим положительным зарядом. При пассировании в КЭ либо в клетках МДСК быстро возникают мутации, резко повышающие урожайность в обеих системах. Мы получили пять таких мутантов, и во всех пяти случаях это были замены сдвигающие заряд верхушечной части гемагглютинаина от плюса к минусу (Lys123/Asn, Lys157/Asn, Gly158/Gln, Asn159/Asp и Lys212/Met). Компенсаторные мутации не влияют на рецепторную специфичность вируса, но ослабляют связывание вируса с клеткой, облегчают отрыв вируса от клетки и обеспечивают более эффективное заражение других клеток. Компенсаторные мутации влияют на форму «фокусов» в культуре: они становятся большими и рыхлыми, что говорит о том, что вирионы легко отрываются от хозяйской клетки, уходят в культуральную жидкость и могут заражать другие клетки на большом расстоянии от родительской. В литературе часто встречается утверждение, что замена Asp225/Gly повышает вирулентность пандемических вирусов H1N1. Наш опыт показывает, что вирус с единичной заменой Asp225/Gly абсолютно не патогенен для мышей, и только после приобретения одной из компенсаторных замен приобретает частичную патогенность.

## **ИЗМЕНЕНИЕ ПАТОГЕННОСТИ ВИРУСА ГРИППА H1N1/2009, ОБУСЛОВЛЕННОЕ МУТАЦИЯМИ В БЕЛКАХ ПОЛИМЕРАЗНОГО КОМПЛЕКСА**

Ломакина Н.Ф.<sup>1</sup>, Гамбарян А.С.<sup>1</sup>, Боравлёва Е.Ю.<sup>1</sup>, Исаева О.В.<sup>1</sup>, Матросович М.Н.<sup>2</sup>

1–ФГБУ ИПВЭ им. М.П. Чумакова, Москва, Россия

2–Institute of Virology, Philipps University, Marburg, Germany

Адаптированный к куриным эмбрионам пандемический вирус A/Hamburg/5/2009 (H1N1) с заменой D225G в HA был пассирован через легкие мышей. После 12-го пассажа произошло скачкообразное возрастание вирулентности, совпавшее с одновременным появлением мутаций в функционально значимых сайтах белков полимеразного комплекса PB2 (V686M), PA (F35L) и в NP (Q4K, G16D).

Мутация в PB2 V686M расположена в домене, ответственном за связывание с вирусной полимеразой PB1, белком NP и клеточным белком импортином (Ping et al, 2011). Мутации в NP (Q4K, G16D) находятся в области сигнала ядерной локализации, взаимодействия с импортином и субъединицей PB2. Позиция 16 в NP также входит в сайт каспазного расщепления и является «маркером хозяйской принадлежности», так как у вирусов гриппа птиц и животных в этой позиции, как правило, расположен G, а у вирусов человека — D. Пандемический вирус 2009 года содержит NP свиных вирусов с G16, однако, в ходе циркуляции в людях в отдельных случаях уже обнаруживалась замена G16D. Интересно, что эта же мутация возникла в ходе пассирования через лёгкие мышей. Мутации в NP и PB2, по всей видимости, взаимосвязаны и влияют на регуляцию транспорта вирусного генома в ядро. Консервативная аминокислота F35 расположена в N-концевом домене PA, который выполняет функцию эндонуклеазы при захвате кэп-структуры мРНК хозяйской клетки на первых этапах транскрипции вирусных РНК. Замена F35S (Zhang et al, 2012) приводит к холодадаптированности вируса. С другой стороны, в банке белковых последовательностей замена F35L присутствует только у 105 штаммов, среди которых исключительно вирусы высокопатогенного гриппа птиц H5N1, H9 и H7, и вирусов H1N1 пандемии 2009 г., выделенных из легочной ткани внешне здоровых свиней и погибших людей. Общим фактором, объединяющим столь разные вирусы, может быть только температура репродукции. Нормальная температура тела птиц около 40. В легких свиней, больного человека и мышей она может достигать 39-40. Вероятно, мутация F35L дает преимущества росту вируса в измененном температурном режиме.

Из наших данных следует, что синергичное действие мутаций в белках NP (Q4K, G16D), PB2 (V686M) и PA (F35L) приводит к резкому повышению вирулентности вируса.

## **УПАКОВКА ГЕНОМА ВИРУСОВ ГРИППА И ОГРАНИЧЕНИЯ В ИХ РЕАССОРТАЦИИ**

Харченко Е.П.

ФГБУ «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова» РАН, Санкт–Петербург, Россия

Вирусы последних эпидемий гриппа (1918, 1957, 1968, 1997 и 2009 гг.) являются реассортантами. Очевидно, что для прогнозирования возникновения предпандемических штаммов необходимо знание правил, по которым реализуется реассортация генов вирусов в природе. Раскрытие механизмов реассортации упирается в проблему раскрытия молекулярных механизмов сборки генома при репликации вируса гриппа в клетке. Одна из проблем сборки генома вирионов вирусов гриппа заключается в том, что не понятно, каким образом происходит включение по одной копии каждого из 8 генов в состав вириона. Из доступных данных известно: при синтезе каждая РНК взаимодействовала с другой, и для разных подтипов и штаммов сеть этих взаимодействий отлична друг от друга; 8 РНП пакуются в один супрамолекулярный комплекс, удерживаемый РНК–РНК взаимодействиями; трехмерная организация 8 РНП в вирионе не случайна; РНК в составе РНП упакована таким образом, что на молекулы нуклеопротеинов наматывается двуспиральная РНК из антипараллельных нитей. Поддержание двуспиральности упакованной РНК в РНП предполагает наличие в каждой из геномной РНК вируса гриппа аутокомплементарных последовательностей. С помощью компьютерного анализа всех РНК генома разных штаммов вирусов гриппа А нами выявлено существование в каждой из РНК аутокомплементарных последовательностей. Наличие аутокомплементарных последовательностей в каждом сегменте РНК позволяет объяснить укладку каждой РНК во вторичную структуру с поддержанием двуспиральности.

Поскольку уже на этапе синтеза вирионных РНК происходит их взаимное узнавание, то для реализации таких РНК–РНК взаимодействий необходимо существование комплементарных последовательностей между разными РНК фрагментарного генома вируса гриппа. Выполненный нами компьютерный анализ показал наличие для каждого из подтипов и штаммов своего спектра комплементарных последовательностей, что подтверждает экспериментальные данные о разных моделях упаковки РНК в вирионе у разных подтипов и штаммов. Препятствия для реассортации геномов разных штаммов вирусов гриппа могут быть обусловлены отсутствием комплементарных последовательностей в фрагментах генома. Из–за вырожденности генетического кода даже при идентичности самих белков у двух разных штаммов соответствующие им гены (РНК) могут отличаться на треть оснований и реассортация между ними может и не происходить.

## **ТЕХНОЛОГИИ ЗАЩИТЫ ОПЕРАТОРА И ПРОДУКТА ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ**

Королевский А.И.

ООО «СЗПК», Санкт–Петербург, Россия

Работа представляет собой обзор технологий для защиты оператора и продукта при разработке и производстве лекарственных средств.

Безопасность оператора является основополагающим моментом для создания или реконструкции уже имеющихся помещений. И для обеспечения безопасности и были созданы барьерные технологии.

История создания барьеров начинается с 40–х годов, когда они использовались для исследований в ядерной и космической промышленности. В настоящее время они могут быть использованы в самых различных областях, в том числе и для производства лекарств.

Современные Барьерные Системы бывают разных форм и размеров, от полностью закрытых систем (изоляторов или перчаточных боксов) до открытых систем (Барьеров Ограниченного Доступа (RAB) и помещений с ламинарным потоком). Защита, которую они обеспечивают, зависит от конструкции и технических характеристик, и должна точно соответствовать задаче, то есть обеспечивать необходимый уровень ограничения между операцией и оператором и окружающей средой.

В мире существует тенденция к производству меньшего количества, но более сильнодействующих (и, следовательно, дорогих) лекарственных средств. Соответственно производство работает с меньшими объемами активных компонентов, и в этом случае применение небольших изоляторов более эффективно, чем строительство больших чистых помещений и/или барьеров.

Изоляторы занимают гораздо меньше места и идеальны для небольших производственных помещений.

### **Список литературы:**

1. Правила надлежащего производства лекарственных средств медицинского применения и ветеринарного применения (GMP) таможенного союза (правила организации производства и контроля качества лекарственных средств)



## ПАТОГЕНЕЗ, КЛИНИКА И ЛЕЧЕНИЕ ГРИППА И ДРУГИХ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

### РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К ПРОТИВОГРИППОЗНЫМ ПРЕПАРАТАМ: МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ, ВОЗНИКНОВЕНИЕ И РАСПРОСТРАНЕНИЕ

Ленева И.А.

ФГБУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» РАМН, Москва, Россия

Среди противогриппозных препаратов базовыми являются химиопрепараты этиотропного действия, направленные на определенную вирусспецифическую мишень в его цикле. К первому поколению относятся препараты адамантанового ряда с блокаторами М2-белка — амантадин и римантадин. К препаратам второго поколения относятся ингибиторы вирусного фермента нейраминидазы — используемый в виде капсул озельтамивир и в форме дискхалера занамивир. В России широкое распространение получил оригинальный отечественный препарат «Арбидол» (умифеновир), эффективный в отношении вирусов гриппа А и В, а также ряда возбудителей ОРВИ. Мишенью «Арбидола» в цикле вирусной репродукции является поверхностный белок вируса гриппа гемагглютинин (НА). Важным фактором, определяющим использование этиотропного препарата, является резистентность. К настоящему моменту мутанты, резистентные к «Арбидолу», получены только в экспериментах в культуре клеток. Молекулярно-генетический анализ выявил, что резистентность к «Арбидолу» обусловлена мутациями в НА2 в положениях 27, 42, 51, 87 и 117. В настоящее время при мониторинге чувствительности эпидемических штаммов к препаратам штаммов, резистентных к «Арбидолу», не выявлено. В клиническом исследовании, проведенном среди 39 пациентов, инфицированных вирусом гриппа А и В, нами не было выявлено формирования резистентности на фоне 5 дневного курса приема препарата. Изучение действия «Арбидола» на репродукцию различных штаммов вируса гриппа А показало, что он подавляет вирусную репродукцию ремантадинрезистентных штаммов вируса гриппа А, а также эталонных, как чувствительных, так и соответствующим им озельтамивиррезистентных штаммов, один из которых — пандемический вирус гриппа А/Калифорния/07/09, второй — вирус гриппа В. Один из возможных путей предотвращения возникновения резистентности — использование комбинации препаратов. Проведенное нами исследование у мышей, инфицированных вирусом гриппа, показало, что если лечение «Арбидолом» и озельтамивиром по отдельности в низких дозах было неэффективно, то комбинированное лечение обоими препаратами в таких же дозах защищало от смерти от 50 до 80% мышей.

## **РОЛЬ ИНТЕРФЕРОНА ГАММА В ИММУННОМ ОТВЕТЕ НА ГРИПП И ОРВИ**

Хаитов М.Р.

ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Россия

Грипп и другие острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ) по распространенности и контагиозности занимают ведущее место среди инфекционных болезней человека. В России на грипп и гриппоподобные острые респираторные заболевания приходится более 90% инфекционной заболеваемости. Основной вклад в структуру ОРВИ вносят вирусы гриппа, парагриппа, респираторно-синцитиальный вирус, коронавирусы, аденовирусы, риновирусы и некоторые энтеровирусы. Вирус гриппа опасен осложнениями, которые часто возникают после заражения, и является причиной высокой смертности у пациентов с ослабленным иммунитетом. Основой противовирусного иммунитета организма является система интерферонов. Интерфероны первого и третьего типа обладают в основном противовирусными свойствами, в то время как интерферон гамма, относящийся к интерферонам второго типа, обладает и противовирусными, и иммуномодулирующими свойствами. Интерферон гамма активизирует центральные клетки иммунной системы, запуская тем самым основные процессы врожденного и приобретенного иммунитета для эффективной защиты организма от респираторных вирусов. Вирус гриппа и некоторые ОРВИ обладают способностью блокировать интерфероновый ответ, что значительно ослабляет иммунный ответ организма и способствует прогрессии вирусной инфекции и поражению как верхних, так и нижних отделов дыхательных путей. Таким образом, адекватный интерфероновый ответ необходим для обеспечения защиты организма от гриппа и ОРВИ. Принимая во внимание мощную противовирусную и иммуномодулирующую активность интерферона гамма, патогенетически обусловленным является применение препаратов рекомбинантного интерферона гамма для профилактики и терапии гриппа и ОРВИ в эпидемический сезон.

## **ИНТЕРФЕРОН ГАММА: МОЛЕКУЛЯРНО–БИОЛОГИЧЕСКАЯ ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРЕПАРАТА «ИНГАРОН» В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ**

Сологуб Т.В.

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

В организме человека существует около 20 видов интерферонов. Для удобства изучения интерфероны разделили на 3 группы по их молекулярному действию, и в зависимости от того, на какие рецепторы воздействует и какие механизмы запускает данный интерферон: интерферон альфа (ИНФ- $\alpha$ ), интерферон бетта (ИНФ- $\beta$ ), интерферон гамма (ИНФ- $\gamma$ ). Все интерфероны обладают противовирусным, иммуномодулирующим, противоопухолевым и антипролиферативным эффектами. Помимо общих свойств, интерфероны обладают рядом отличий. ИНФ- $\alpha$  и ИНФ- $\beta$  больше похожи друг на друга. Их гены локализованы в 9 хромосоме. Индуцирующим сигналом для продукции ИНФ- $\alpha$  и ИНФ- $\beta$  являются вирусы. Эти интерфероны обладают выраженным противовирусным и противоопухолевым действием, в гораздо меньшей степени проявляют иммуномодулирующие свойства. Основными клетками продуцентами для ИНФ- $\alpha$  являются макрофаги, для ИНФ- $\beta$  — клетки эпителия, фибробласты.

ИНФ- $\gamma$ , наряду с интерлейкином-2 (ИЛ-2) и фактором некроза опухоли альфа (ФНО- $\alpha$ ), обладает выраженным иммуномодулирующим действием, является индуктором клеточного звена иммунитета и относится к основным провоспалительным цитокинам. Противовирусные и противоопухолевые свойства у ИНФ- $\gamma$  выражены слабее, чем у ИНФ- $\alpha$  и ИНФ- $\beta$ . ИНФ- $\gamma$  обладает наиболее выраженными иммуномодулирующими свойствами. Являясь продуктом Т-лимфоцитов-хелперов I типа, он вместе с другими провоспалительными цитокинами активирует макрофаги, цитотоксические Т-лимфоциты, натуральные киллеры, подавляет активность В-лимфоцитов, активизирует простагландиную и кортикостероидную системы. Все эти факторы усиливают фагоцитарные и цитотоксические реакции в зоне очага воспаления и способствуют эффективной элиминации инфекционного агента. В настоящее время как в России, так и за рубежом выпускаются коммерческие препараты ИНФ- $\gamma$ : в России ИНФ- $\gamma$  известен под названием «Ингарон», в США имеет торговое название Actimmune, а в Великобритании — Immukin. В России препарат «Ингарон» зарегистрирован для лечения ряда инфекционных заболеваний, в частности, он хорошо зарекомендовал себя в качестве третьего препарата при лечении больных хроническим вирусным гепатитом С. Использование «Ингарона» позволило повысить эффективность противовирусной терапии и снизить частоту развития нежелательных явлений [1]. Ибрагим Йола изучал возможность использования препарата «Ингарон» для лечения больных ВИЧ-инфекцией в сочетании с туберкулезом легких и ХГС. Исследования показали, что на ранней стадии ВИЧ/СПИД-инфекции при сочетании ее с ХГС и/или туберкулезом легких целесообразным является использование ИНФ- $\alpha$  и ИНФ- $\gamma$ , которые способствуют стабилизации инфекционного процесса, уменьшают скорость его прогрессирования и повышают иммунологические показатели. В заключении следует отметить, что ИНФ- $\gamma$  является уникальным препаратом с антивирусной, противоопухолевой и иммуномодулирующей активностью. Благодаря последнему его качеству ИНФ- $\gamma$  был причислен к цитокинам — регуляторам иммунных реакций. Изучение этого интересного цитокина может открыть широкие перспективы для лечения больных не только с лимфопролиферативными заболеваниями, но и больных с онкологической и инфекционной патологией.

## ПРОФИЛАКТИКА ОСТРЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ ИНФЕКЦИЙ У НЕДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ

Васильева Т.П.<sup>1</sup>, Чаша Т.В.<sup>2</sup>

1—Научно–исследовательский центр ЗАО «Фирн М», Москва, Россия

2—ФГБУ «Ивановский научно–исследовательский институт материнства и детства им. В.Н. Городкова» Минздрава России, Иваново, Россия

**Актуальность.** К группе риска на формирование частой острой респираторной заболеваемости относятся недоношенные дети, в том числе рожденные с очень низкой и экстремально низкой массой тела [1].

**Материалы и методы.** Обследованы 218 недоношенных детей в возрасте 1–7 недель, бывших в контакте не менее 2 часов с больной ОРВИ мамой или детьми, в условиях отделения патологии новорожденных и недоношенных детей областного перинатального центра. Из них 104 ребенка родились с массой тела более 1500 граммов: 1 группа (n=52) — применялся препарат «Гриппферон®», капли назальные» (закапывали по 1 капле в каждый носовой ход 2 раза в день в течение 5–7 дней); 2 группа (n=52) — капли не применялись. 114 детей, рожденных с массой менее 1500 граммов, разделены: 3 группа (n=57) — с применением препарата «Гриппферон®, капли назальные» (закапывали по 1 капле в каждый носовой ход 2 раза в день в течение 5–7 дней); 4 группа (n=57) — без применения препарата. Группы сравнения были сопоставимы по гестационному возрасту, массе тела при рождении, факторам риска и заболеваемости. Статистическая обработка проведена с применением компьютерных программ.

**Результаты и их обсуждение.** Установлено, что частота развития острых респираторных вирусных инфекций у недоношенных новорожденных, контактировавших с больными ОРВИ, в группе 1 была достоверно ниже, чем в группе 2 ( $p < 0,001$ ), и в группе 3, чем в группе 4 ( $p < 0,001$ ). В группе 1 также достоверно реже, чем в группе 2, отмечалась средняя продолжительность заболевания ( $p < 0,05$ ) и реже — возникновение осложнений ( $p < 0,02$ ). В группе 3 достоверно чаще отмечались дети, не имевшие заболевания острой респираторной вирусной инфекцией, чем в группе 4 ( $p < 0,001$ ), а возникшие заболевания протекали с достоверно менее выраженным проявлением симптомов.

Таким образом, доказанная профилактическая эффективность препарата «Гриппферон®, капли назальные» в развитии ОРВИ на первой неделе жизни у недоношенных, родившихся с очень низкой и экстремально низкой массой тела, контактировавших с больными ОРВИ, позволяет рекомендовать его для использования у данного контингента детей.

### Список литературы:

1. Филькина О.М., Долотова Н.Н., Андренюк О.Г. Заболеваемость недоношенных детей, родившихся с очень низкой и экстремально низкой массой тела, к концу первого года жизни//Вестник Ивановской медицинской академии: — 2010, — №3, — С.49–53

## ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ 23 ОКТЯБРЯ 2014 ГОДА

### РАЗРАБОТКИ ПРОТИВОГРИППОЗНЫХ ВАКЦИН И ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКА

#### НОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В РАЗРАБОТКЕ ГРИППОЗНЫХ ВАКЦИН

Красильников И.В., Петровский С.В., Мельников С.А.

ФГУП «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов» ФМБА России

Высокая смертность от «птичьего» гриппа (2005–2007 гг.), а также пандемия свиного гриппа (2009–2011 гг.) привели к пересмотру научным сообществом отношения к гриппозной инфекции и опасности, связанной с ее распространением. Начались интенсивные исследования по созданию новых препаратов для специфической профилактики.

К этому времени было создано несколько платформ для получения препаратов гриппозных вакцин в виде вирусоподобных частиц (ВПЧ). Прежде всего, были задействованы платформы, позволяющие получать рекомбинантные белки вирусов гриппа, которые в результате самосборки образовывали вирусоподобные частицы уже в процессе биологического синтеза.

Одна из таких платформ была предложена компанией Protein Sciences, США. Эта платформа связана с бакуловирусной системой экспрессии генов, в частности генов сезонного и пандемического вируса гриппа. Бакуловирусная система позволяет экспрессировать несплайсированные гены, а особенности структуры капсидной оболочки бакуловирусов позволяют упаковывать в нее очень большие гены. Основным преимуществом платформы, по данным её разработчиков, является универсальность для производства рекомбинантного белка, что делает возможным производство широкого спектра профилактических и терапевтических вакцин для человека и животных. Примером такого препарата является гриппозная вакцина Flublok. Новая технология позволяет быстро и в больших количествах нарабатывать рекомбинантный белок гемагглютинина, нейраминидазы и мембранного белка М, что особенно важно в случае возникновения пандемии. В настоящее время гриппозные вакцины, произведенные на базе системы бакуловируса, прошли сертификацию в FDA и одобрены к производству в США.

Оригинальная платформа была разработана компанией MEDICFGO, Канада, на базе растений табачного ряда. Антигены вируса гриппа интегрировались в геном агробактерии, которая использовалась для заражения листьев растения.

Особенности процессов синтеза гриппозных антигенов в листьях способствовали сборке и «отпочковыванию» вируса от мембран клеток листьев растения и выхода в межклеточное пространство, а оригинальная схема выделения ВПЧ из сока листьев растения позволила получать вакцинные препараты в виде ВПЧ, которые характеризовались высокой иммуногенностью. Из 1 кг сока листьев удалось выделить около 1,5 г гемагглютинина. Данная платформа также применяется в настоящее время для производства предпандемических и сезонных вакцин против гриппа.

Компания Lentigen (США) разработала платформу на основе лентивирусов, которая позволяет интегрировать гены белков вируса гриппа в геном клеток животных и человека. Данная платформа позволила получить гриппозную вакцину в виде ВПЧ против штамма гриппа H1N1 в течение трех месяцев с момента сиквенса генома этого штамма. Данная

платформа позволяет непрерывно синтезировать вирус гриппа клетками, который ежедневно накапливается в культуральной среде, с последующей очисткой и формулированием.

В Санкт–Петербургском институте вакцин и сывороток ФМБА России разработана ВПЧ вакцина на базе куриных эмбрионов, которая показала высокую иммуногенность в доклинических исследованиях и, в настоящее время выходит на этап клинических испытаний.

## РЕКОМБИНАНТНЫЕ БЕЛКИ НА ОСНОВЕ M2E ПЕПТИДА ВИРУСА ГРИППА КАК ОСНОВА «УНИВЕРСАЛЬНЫХ» ПРОТИВОГРИППОЗНЫХ ВАКЦИН

Блохина Е.А.<sup>1</sup>, Куприянов В.В.<sup>1</sup>, Котляров Р.Ю.<sup>1</sup>, Марданова Е.С.<sup>1</sup>, Lomonosoff G.<sup>2</sup>, Равин Н.В.<sup>1</sup>

1—Центр «Биоинженерия» РАН, Москва, Россия

2—John Innes Centre, Norwich, UK

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 M2 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 адъювантом, и вирусоподобные частицы (ВПЧ), образуемые ядерным антигеном вируса гепатита В (НВс). В докладе представлены результаты работ по созданию кандидатных противогриппозных вакцин на основе внеклеточного домена M2 белка (M2e) вируса гриппа, присоединенного к этим носителям.

Получены рекомбинантные белки, в которых к флагеллину присоединены две копии M2e, имеющего «консенсусную» последовательность штаммов вируса гриппа А человека и две копии M2e вируса гриппа птиц А/Kurgan/5/05. Разработаны методы получения этих белков в клетках *Escherichia coli* и в растениях *Nicotiana benthamiana* с использованием самореплицирующихся вирусных векторов. В экспериментах на животных, проведенных в ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава РФ, показано, что интраназальная иммунизация мышей вакцинным белком обеспечивает защиту от заражения как различными штаммами вируса гриппа А человека, так и вирусом гриппа птиц. Сконструированы рекомбинантные НВс частицы, содержащие 1, 2 или 4 копии M2e пептида в составе иммунодоминантной петли, экспонированной на поверхности ВПЧ. Установлено, что иммуногенность и протективное действие препаратов пропорционально числу копий M2e. Иммунизация мышей M2eНВс частицами, в которых с состав НВс включено 4 копии M2e, обеспечивает полную защиту иммунизированных животных от летальной гриппозной инфекции.

*Работа поддержана грантом РФФИ 13-04-92621, Программой Президиума РАН «Фундаментальные основы технология наноструктур и наноматериалов» и стипендией Президента РФ для молодых ученых и аспирантов (Р.Ю. Котляров).*

## **ВИРУС ТАБАЧНОЙ МОЗАИКИ КАК ВЕКТОР ДЛЯ ПРОДУКЦИИ АНТИГЕНОВ И АНТИТЕЛ**

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

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

Вирус табачной мозаики (ВТМ) является одним из наиболее подходящих кандидатов для экспрессии в растениях как иммуногенных эпитопов, экспонированных на поверхности химерных частиц, так и различных полноразмерных белков, транслируемых с дополнительных субгеномных РНК, в том числе поверхностных антигенов, а также тяжелых и легких цепей антител. Следует упомянуть успешную экспрессию эпитопов малярии и вируса ящура, гемагглютининов Н1 и Н5 вируса гриппа, а также получение антител против вирусов иммунодефицита человека и Эбола.

Ранее в нашей лаборатории совместно с НИИ гриппа, была создана и протестирована система презентации М2е-эпитопа вируса гриппа в растениях на основе генома ВТМ, в качестве носителя антигена использовали белок оболочки (БО).

Содержание субъединиц БО с эпитопом в химерных частицах достигало 90%, уровень накопления рекомбинантного БО составлял 4 г на 1 кг сырой массы. Выделенные препараты использовали для вакцинации линейных мышей BALB/c. Мыши, иммунизированные препаратами ВТМ-М2е, были полностью устойчивы к инфекции 5-ти летальных доз (LD50) гомологичного вируса гриппа А/PR/8/34 (H1N1). Защита от гетерологичного вируса А/California/04/2009 (H1N1) (6 аминокислотных замен из 23-х по сравнению с исходной последовательностью М2е) достигала уровня 70%. Оценка соотношения антител в полученных сыворотках, специфичных к эпитопу вируса гриппа или к БО ВТМ, показала значительное превышение содержания антител к эпитопу (5:1).

На основе последовательности другого консервативного антигена вируса гриппа — fusion-пептида гемагглютинина (fp, 14 преимущественно гидрофобных аминокислот, GLFGAIAGFIEGGW) был создан вектор ВТМ-fp, способный к репликации и системному транспорту по сосудистой системе растений *Nicotiana benthamiana*. Анализ тотальной РНК из зараженных растений методом обратной транскрипции и ПЦР подтвердил генетическую стабильность ВТМ-fp. С помощью электронной микроскопии было показано, что вирионы ВТМ, несущие на своей поверхности fusion-пептид, не отличались по морфологии от ВТМ дикого типа, что говорит об отсутствии существенных проблем при сборке химерных частиц. Таким образом, вектор ВТМ-fp является первым примером успешной экспрессии протяженного гидрофобного пептида в растениях.



## КАНДИДАТНАЯ ВАКЦИНА ШИРОКОГО СПЕКТРА ДЕЙСТВИЯ НА ОСНОВЕ ЭКТОДОМЕНА M2 БЕЛКА ВИРУСОВ ГРИППА А ЧЕЛОВЕКА

Степанова Л.А.<sup>1</sup>, Куприянов В.В.<sup>2</sup>, Блохина Е.А.<sup>2</sup>, Потапчук М.В.<sup>1</sup>, Ковалева А.А.<sup>1</sup>, Шалджян А.А.<sup>1</sup>, Коротков А.В.<sup>1</sup>, Горшков А.Н.<sup>1</sup>, Касьяненко М.А.<sup>1</sup>, Равин Н.В.<sup>2</sup>, Цыбалова Л.М.<sup>1</sup>

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

2—Центр «Биоинженерия» РАН, Москва, Россия

Недавний опыт с H1N1pdm показывает высокий приоритет разработки вакцин нового типа с широким спектром действия для преодоления ограниченной эффективности штамм-специфичных вакцин на основе HA. Концепция разработки вакцин широкого спектра действия заключается в использовании высококонсервативных антигенных детерминант и усиления их иммуногенности для индукции протективного иммунитета. Такие вакцины могут быть получены в стандартных организмах–продуцентах, например, бактериях или дрожжах, что снимает зависимость производства от куриных эмбрионов и решает проблемы безопасности, общие для вакцин, основанных на цельном патогене.

Сконструирован оригинальный рекомбинантный белок 4M2ehNVc с вставкой 4-х копий консенсусной последовательности M2e вирусов гриппа А человека в иммунодоминантную петлю корового антигена вируса гепатита В для разработки гриппозной вакцины широкого спектра действия. На линейных мышах показана высокая иммуногенность рекомбинантного белка 4M2ehNVc. Иммунизация приводила к формированию специфического гуморального и клеточного ответа (формированию CD4 и CD8 клеток памяти), длительной циркуляции анти-M2e антител в крови (по крайней мере в течение 5 месяцев у мышей). Анти-M2e антитела к линейным эпитопам M2e, образующиеся после иммунизации мышей рекомбинантными белками, способны распознавать «нативный» M2e на поверхности клеток, инфицированных вирусами гриппа. Показана выраженная протективность рекомбинантных белков: 90–100% выживаемость при заражении летальной дозой вируса, усиление вирусного клиренса, широта защитного эффекта (эффективная защита от различных субтипов вирусов гриппа А человека: H1N1, H2N2, H3N2). На основе рекомбинантного белка 4M2ehNVc разработана гриппозная рекомбинантная вакцина широкого спектра действия против вирусов гриппа А человека — «Унифлю». Выбрана лекарственная форма и состав вакцины «Унифлю», разработан лабораторный регламент получения вакцины «Унифлю». Проведена оценка стабильности рекомбинантного белка и вакцины «Унифлю» в течение срока годности. Завершены доклинические исследования безопасности вакцины «Унифлю», проводятся доклинические исследования иммунотоксичности и специфической активности.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ДОКЛИНИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ НОВОЙ ВАКЦИНЫ «УНИФЛЮ» В СВЕТЕ СОВРЕМЕННЫХ ТРЕБОВАНИЙ К ИЗУЧЕНИЮ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ**

Сивак К.В., Саватеева–Любимова Т.Н., Стосман К.И., Рассоха Т.А., Любишин М.М., Макарова О.И., Киселев А.С.

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

На основании современных рекомендаций фармакологического комитета России доклинические исследования иммунобиологических лекарственных препаратов проводят с применением научных методов оценок в соответствии с правилами надлежащей лабораторной практики в целях получения доказательств безопасности и эффективности разрабатываемых отечественных вакцин и препаратов. Объектом исследования являлась вакцина гриппозная рекомбинантная лиофилизированная для внутримышечного введения «Унифлю». Целью работы являлось доклиническое изучение безопасности вакцины. В задачи исследования входило изучение острой, субхронической токсичности, местно–раздражающего действия и фармакологической безопасности. В остром эксперименте на мышах и крысах внутримышечное и внутривенное однократное введение вакцины «Унифлю» в дозе 2000 мкг/кг животным, не вызвало летальности, достоверных признаков развития патологии, изменения интегральных показателей и патоморфологической картины внутренних органов опытных животных по отношению к контрольным. Двукратная иммунизация вакциной в дозах 1 ТД (40 мкг целевого белка) и 5 ТД (200 мкг целевого белка) с интервалом в 14 дней крысам и кроликам, самцам и самкам, не обусловила летальности, не вызвала патологических проявлений в состоянии и поведении животных, изменения интегральных показателей жизнедеятельности, нарушения системы терморегуляции, патоморфологических изменений. Половых различий не наблюдалось. Оценка местно–раздражающего действия показала, что внутримышечное введение изучаемой вакцины крысам обоего пола в остром эксперименте не сопровождалось значимыми воспалительными изменениями или некрозом в мышце по сравнению с плацебо (адыювант, буфер). Макроскопических изменений внутренних, эндокринных органов и головного мозга отмечено не было. Изучение фармакологической безопасности вакцины «Унифлю» при двукратной иммунизации крыс и кроликов обоего пола, показало отсутствие токсического воздействия в отношении органов и систем, функции которых остро критичны для жизни и функции которых могут быть временно нарушены без причинения необратимого вреда. На основании проведенных исследований можно заключить, что вакцина «Унифлю» обладает большой терапевтической широтой и может быть рекомендована для проведения клинических исследований.

### **Список литературы:**

1. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (Иммунобиологические лекарственные препараты). Часть вторая. — М.: Гриф и К, 2012. — 536 с.
2. Токсикология лекарственных средств. Издание второе дополненное /Т.А. Гуськова/ — М.: МДВ, 2008. — 196 с.

## РАЗРАБОТКА ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВАКЦИН ШИРОКОГО СПЕКТРА ДЕЙСТВИЯ ПРОТИВ ВИРУСА ГРИППА А НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ АДЕНОВИРУСНЫХ ВЕКТОРОВ

Лысенко А.А.

ФГБУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия

Аденовирусы (Adenoviridae) представляют собой ДНК вирусы, лишенные внешней липопротеиновой оболочки и являются перспективными для получения вакцинных векторов. Геном аденовируса прост для манипуляций, сам вирус способен накапливаться в высоком титре, вызывает индукцию как клеточного, так и гуморального иммунного ответа, способен инфицировать как делящиеся, так и не делящиеся клетки. Мы использовали аденовирусные векторы для разработки и изучения кандидатных вакцин против вируса гриппа А. В качестве антигена нами были выбраны несколько консервативных белков вируса гриппа — ионный канал М2 и нуклеопротеин NP. Антитела и Т-клеточный ответ, формирующиеся против консервативных белков вируса гриппа А, способны подавлять инфекцию различных неродственных штаммов гриппа А, и являются необходимым условием для создания вакцин широкого спектра действия против вируса гриппа А.

М2 — ионный канал вируса гриппа, и для взаимодействия с антителами хозяина доступна лишь небольшая часть этого белка. Поэтому мы выбрали эктодомен белка (24 аминокислоты) М2е вируса гриппа птиц и сделали консенсусную последовательность между разными штаммами гриппа птиц. В генетическую конструкцию были включены слитые четыре консенсусные последовательности белка М2е. Для повышения иммуногенности белка 4хМ2е на С-конец был добавлен лиганд Толл-подобного рецептора 5 флагеллин *Salmonella enterica*. Конечная генетическая конструкция М4-F1 содержала лидерный пептид для экспрессии во внешнюю среду, 4 слитых эктодомена М2 и последовательность флагеллина. Эта конструкция была вставлена в геном аденовируса и получен препарат рекомбинантного аденовируса в большом титре. *In vitro* была доказана функциональная активность флагеллина белка и наличие М2 эктодомена в составе слитого белка М4-F1. Мыши были двукратно интраназально иммунизированы препаратом рекомбинантных аденовирусов. Через три недели мышей заразили вирусами гриппа птиц H5N2, H2N3 в дозе 50 LD50 и человека H1N1 в дозе 10LD50. В результате показано, что мыши, интраназально иммунизированные рекомбинантным аденовирусом Ad5-M4-F1 были на 100 и 80% защищены от 50LD50 вирусов гриппа птиц H5N2 и H2N3, соответственно.

Еще одним консервативным белком является нуклеопротеин NP. Этот белок является одним из внутренних антигенов вируса и индуцирует выработку специфических цитотоксических Т-лимфоцитов. Поэтому во второй конструкции мы сделали слитую конструкцию из модифицированной последовательности белков М2 и NP. При помощи методов биоинформатики были подобраны оптимальные аминокислотные последовательности антигенов М2 и NP, наиболее гомологичные для различных штаммов вируса гриппа А, выделенных у человека. Экспрессия генов М2 и NP в составе полученного рекомбинантного аденовируса Ad5-M2NP была подтверждена на культуре клеток A549 методами иммуноблоттинга и иммуногистохимии. Была показана способность полученных препаратов рекомбинантных аденовирусов индуцировать формирование как гуморального так и клеточного иммунного ответа к антигенам М2 и NP вируса гриппа А при однократной интраназальной иммунизации. Была продемонстрирована способность препарата Ad5-M2NP защищать лабораторных животных от летальной дозы (10LD50) вируса гриппа А различных подтипов (H1N1, H5N2, H3N2, H2N3 и H9N2), при однократной интраназальной иммунизации. В результате показано, что мыши, однократно интраназально иммунизированные рекомбинантным аденовирусом Ad5-M2NP были на 100% защищены от

10ЛД50 вирусов гриппа H2N3, H5N2 и H9N2, и на 90% от 10ЛД50 вирусов гриппа H2N3 и H3N2.

Таким образом, полученные нами данные экспериментов по изучению индукции защитного иммунитета рекомбинантными аденовирусами Ad5M4-F1, Ad5-M2NP и свидетельствуют о том, что генетические векторы, несущие разработанные нами антигенные последовательности, способны индуцировать формирование иммунного ответа широкого спектра действия в отношении различных подтипов вируса гриппа А.

## **НОВЫЙ ПОДХОД К ПРОФИЛАКТИКЕ И ИММУНОТЕРАПИИ ТУБЕРКУЛЕЗА: МУКОЗАЛЬНАЯ ВАКЦИНА НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ГРИППОЗНЫХ ВЕКТОРОВ**

Стукова М.А.<sup>1</sup>, Хайруллин Б.М.<sup>2</sup>, Шурыгина А.-П.С.<sup>1</sup>, Бузицкая Ж.В.<sup>1</sup>, Писарева М.М.<sup>1</sup>,  
Ерофеева М.К.<sup>1</sup>, Грудинин М.П.<sup>1</sup>, Касенов М.М.<sup>2</sup>, Нурпейсова А.С.<sup>2</sup>, Сарсенбаева Г.Ж.<sup>2</sup>,  
Богданов Н.В.<sup>2</sup>, Егоров А.Ю.<sup>1</sup>, Сансызбай А.Р.<sup>2</sup>, Киселев О.И.<sup>1</sup>

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

2—НИИ проблем биологической безопасности Министерства образования и науки Республики Казахстан

В рамках клинических исследований 1 фазы с участием 72 здоровых БЦЖ–вакцинированных добровольцев в возрасте 18–50 лет проведена оценка безопасности и иммуногенной активности двух мукозальных вакцин, предназначенных для специфической профилактики (TB/FLU-04L, штамм FLU/ESAT-6\_Ag85A) и иммунотерапии (TB/FLU-01L, штамм FLU/ESAT-6) туберкулеза. Вакцины были получены на основе аттенуированных гриппозных штаммов, экспрессирующих микобактериальные белки ESAT-6 и Ag85A.

**Результаты.** Обе вакцины характеризовались хорошей переносимостью и были безопасны при двукратном интраназальном (TB/FLU-04L) и интраназальном/сублингвальном (TB/FLU-01L) введении. Все нежелательные явления имели легкую степень выраженности. РНК вируса гриппа А идентифицировали в образцах мазков привитых в течение первых двух-трех дней после вакцинации, что подтверждает репликативно–дефектный фенотип вакцинных штаммов и их аттенуацию. Оба препарата обладали высоким иммуногенным потенциалом, проявляющимся развитием CD4+ и CD8+ Т-клеточного ответа; большинство Т-клеток имели CD45RA- фенотип клеток памяти. Среди добровольцев, получивших вакцину TB/FLU-01L, отмечено значительное повышение уровня внутриклеточной секреции IFN-γ и TNF-α как CD4+, так и CD8+ Т-лимфоцитами относительно исходного уровня. В группе интраназального введения вакцины общее количество «ответчиков» составило 78%, при сублингвальном введении — 72%. Среди добровольцев, получивших вакцину TB/FLU-04L интраназально, у 50% наблюдали значительное повышение уровня внутриклеточной секреции IFN-γ как CD4+, так и CD8+ Т-лимфоцитами. Антительного ответа на сам вектор обнаружено не было в обоих исследованиях. Отмечено локальное повышение уровней цитокинов в ответ на интраназальное введение вакцины TB/FLU-04L, что свидетельствует об активации факторов врожденного иммунитета.

**Заключение.** Полученные данные свидетельствуют о перспективности дальнейшей разработки векторных вакцин в качестве средства специфической профилактики и иммунотерапии туберкулеза. Очевидным преимуществом препаратов на основе аттенуированного вируса гриппа, является мукозальный путь введения, что обеспечивает неинвазивную и адресную доставку микобактериальных антигенов.

## ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКИ ГРИППА

Ерофеева М.К.<sup>1</sup>, Никоноров И.Ю.<sup>1</sup>, Максакова В.Л.<sup>1</sup>, Позднякова М.Г.<sup>1</sup>, Коншина О.С.<sup>1</sup>, Охапкина Е.А.<sup>1</sup>, Войцеховская Е.М.<sup>1</sup>, Коровкин С.А.<sup>2</sup>, Мельников С.Я.<sup>2</sup>

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

2—ФГБУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» РАМН, Москва, Россия

Вакцинопрофилактика гриппа позволяет на 70–90% снизить заболеваемость гриппом среди здоровых привитых взрослых, на 60–90% среди привитых детей, на 50% госпитализацию и смертность среди пожилых. В России применяется 7 зарубежных (все инактивированные) и 5 отечественных вакцин, из них одна живая, две инактивированные семейства «Гриппол», а так же две новые российские инактивированные гриппозные вакцины «Ультрикс» и «Совигрипп». Ежегодно в рамках Национального проекта «Здоровье» в России прививают около 34 млн. человек и около 4 млн. — вакцинами, закупленными из других источников (26–27% от всего населения). Охват прививками против гриппа детей в организованных детских коллективах примерно 60%. Включение в 2006 г. вакцинации против гриппа в Национальный календарь профилактических прививок способствовало снижению заболеваемости гриппом.

Эффективность вакцинопрофилактики гриппа напрямую зависит от соответствия вакцинных и актуальных эпидемических штаммов. В случае неполного штаммового совпадения профилактический эффект возможен при применении расщепленных вакцин, имеющих в своем составе внутренние и внешние белки вирусов гриппа. В России вакцины расщепленного типа до недавнего времени были представлены только зарубежными препаратами. Разработанная в 2005 г. гриппозная инактивированная расщепленная вакцина «Ультрикс» прошла все испытания в соответствии с российскими и международными требованиями. Клинические исследования вакцины «Ультрикс» в 2007–2012 гг. среди здоровых добровольцев 18–60 лет и старше, детей и подростков 6–18 лет показали хорошую переносимость и безопасность препарата, отсутствие аллергизирующего действия. Показатели иммуногенной активности вакцины соответствовали отечественным и международным требованиям для инактивированных гриппозных вакцин и составили: уровень сероконверсий к вирусу гриппа А(Н1N1) — до 94,0%, к А(Н3N2) — до 90, %, к В — до 90,0%; фактор сероконверсий — до 21,9, 12,6, 7,5, а уровень серопротекций — до 95,0%, 90,0% и 78,0% соответственно. Доказано сохранение специфического иммунитета через 6 месяцев после вакцинации у привитых взрослых. Применение новой эффективной и безопасной вакцины расширило список отечественных препаратов, соответствующих требованиям ВОЗ, для специфической профилактики гриппа, что исключает этические проблемы, связанные с их распределением в период пандемий. Отсутствие дефицита препаратов специфической профилактики гриппа делает возможным охватить более 75% населения, входящего в группы риска.

## **ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕДИЦИНСКИХ РЕСПИРАТОРОВ КАК ЭФФЕКТИВНЫЙ СПОСОБ ПРОФИЛАКТИКИ И ЗАЩИТЫ ОТ ВИРУСОВ ГРИППА РАЗЛИЧНОЙ ЭТИОЛОГИИ**

Анашкина Ю.В.

ЗАО «Севзаппромэнерго», Санкт–Петербург, Россия

В настоящее время во многих медицинских учреждениях применяются маски хирургические различных вариантов (двух-, трех-, четырехслойные и др.). Маски, изготовленные надежными производителями, обеспечивают фильтрующую эффективность 95–99%, но из–за отсутствие плотного прилегания по периметру маски позволяет аэрозолям свободно проникать в дыхательные пути пользователя. Таким образом, обеспечивая защиту пациента, маска не может рассматриваться как надежное средство защиты органов дыхания медицинского персонала.

Требуемые параметры защитной эффективности могут обеспечить только респираторы, которые имеют плотное прилегание по полосе фильтрации. На сегодняшний день требования к такой продукции на территории РФ определяются ТР/ТС 019/2011 (FFP1 допускается проникание аэрозолей 22%, FFP2 — 8%, FFP3 — 2%), в то время как для защиты от инфицированных аэрозолей необходима защита как минимум 2-го класса.

Оптимальная конструкция респиратора должна обеспечивать: 1. герметичность по полосе обтюрации; 2. универсальный размер (подходить для людей разных возрастных категорий и типом лиц); 3. предельную простоту в применении.

В респираторах конструкции «АЛИНА®» удалось совместить все указанные выше требования. С учетом накопленного опыта сотрудничества с организациями здравоохранения, компания «Севзаппромэнерго» запустила в серийное производство новые, специализированные модели респираторов серии «АЛИНА®» для медицины (РУ № ФСР 2010/08771 от 30.08.10). Респираторы прошли многочисленные испытания и получили высокую оценку специалистов НИИ Гриппа, Центрального НИИ эпидемиологии, НИИ гигиены им. Эрисмана, Нижегородского НИИ гигиены и профпатологии.

Рекомендуемые сферы применения:

1. Респираторы Алина-106, Алина-116 (FFP1D) рекомендованы для повседневного применения персоналом и посетителями лечебных заведений.
2. Респираторы Алина-206, Алина-216 (FFP2D) предназначены для использования для защиты от вирусов гриппа различной этиологии.
3. Респираторы Алина-316 (FFP3D) предназначены для использования при возможном контакте с наиболее опасными возбудителями заболеваний

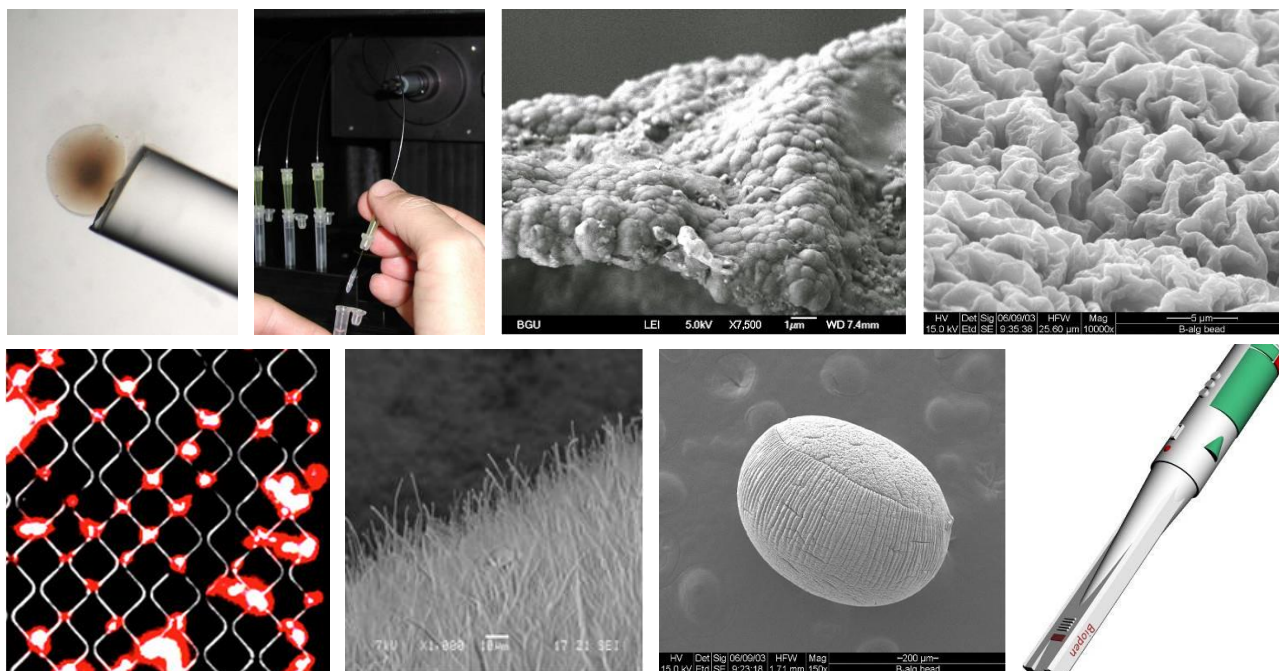
Респираторы отличает высокая эффективность, высокое качество и в 2–3 раза более низкая, по сравнению с аналогичной импортной продукцией, стоимость.

## PERIGRINATION ACROSS CONTINENTS DEVELOPING MEDICAL AND ENVIRONMENTAL BIOSENSORS

Robert S. Marks<sup>1,2,3</sup>

1–Department of Biotechnology Engineering, Ben Gurion University of the Negev, Israel  
2–School of Materials Science & Engineering, Nanyang Technological University, Singapore  
3–NTU-HUJ-BGU CREATE Programme, Singapore 138602

We describe here the development of various technologies developed in our laboratory over the years, which are mostly multi-disciplinary in scope (chemistry, molecular biology, physics, data mining and chemical engineering). Most have been validated using real-life samples from various continents. The biosensors are divided into two categories, one based on affinity bioreceptors and the other on live cells. The main transducers discussed are optical while other systems will be mentioned. Some of the devices are meant for point-of-care, on-site or flow-through sensing. Examples given are those established in our lab such as chemiluminescence-based fiber-optic immunosensors to viral pathogens (Ebola, Dengue, Hepatitis C, West Nile virus, Rift Valley fever) – the BioPen concept; biochip immunosensors based on electrogenerated films deposited on ITO chip surfaces; magnetic liquid fiber guide immunosensors; diagnostic phagocytic chemiluminescent imprints to identify clinical ailments or other techniques still in development such as the detection of negative stranded RNA viruses (CCHF, influenza) using reverse genetics cell sensors or use of nanostructures for enhanced immunosensors or metal enhanced bioluminescence. We have several techs in the pipeline including lateral flow immunoassay modified with an electrochemical device to produce a quantitative assay, or stilbene-aptamer complexes etc...





## ПЕРСПЕКТИВНЫЕ РАЗРАБОТКИ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ И ПРОТИВОВИРУСНЫХ ПРЕПАРАТОВ

### ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ МИКРОЧИПОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ГРИППА

Клотченко С.А.<sup>1</sup>, Васин А.В.<sup>1</sup>, Плотникова А.В.<sup>1</sup>, Тараскин С.З., Егоров В.В.<sup>1</sup>, Киселев О.И.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>–ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, Санкт–Петербург, Россия

Технология биологических микрочипов, появившаяся в 1990-х годах, в настоящее время повсеместно используется для анализа изменения экспрессии генов, выявления полиморфизмов, генотипирования. Помимо научно–исследовательских приложений биочипы имеют огромный потенциал в области высокопроизводительной молекулярной диагностики. Применительно к молекулярной диагностике гриппа высокопроизводительная технология биочипов позволяет в рамках одного эксперимента проводить типирование и субтипирование всех известных вирусов гриппа, определять генетические особенности вирусного генома (сайты лекарственной устойчивости, патогенности и т.п.), а также генетические и иммунологические характеристики противовирусного ответа организма–хозяина. В ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России были разработаны лабораторные образцы биочипов для диагностики гриппа. В частности, создан диагностический олигонуклеотидный микрочип («IAVchip») для субтипирования вирусов гриппа А человека и животных. Предложен универсальный метод флуоресцентного мечения геномных сегментов всех известных подтипов вирусов гриппа А, состав буфера гибридизации, а также программное обеспечение для обработки получаемых результатов. Анализ 48 штаммов вирусов гриппа А человека и животных, принадлежащих к 18 разным подтипам, позволил однозначно типировать все штаммы и субтипировать 45 штаммов. Помимо олигонуклеотидного микрочипа проводится работа по созданию белкового биочипа, позволяющего проводить типирование и в некоторых случаях субтипирование вирусов гриппа А человека. Кроме того, разработан иммунологический биочип для количественной оценки белкового профиля экспрессии цитокинов IL2, IL4, IL8, IL10, IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$  человека, характеризующих клеточный противовирусный иммунный ответ. На клеточной модели гриппозной инфекции показана высокая специфичность метода, широкий диапазон измеряемых концентраций (от 5 до 3800 пг/мл) и высокая производительность. Представленные методы на основе микрочипов могут быть в дальнейшем использованы как для научных, так и для клинических исследований. На основании проведенных работ обсуждаются преимущества и недостатки метода биочипов для диагностики гриппа, а также перспективы их практического применения.

## АНАЛИЗ ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЫ ГЕНА NS ВИРУСА ГРИППА А

Васин А.В., Петрова А.В., Плотникова А.В., Егоров В.В., Клотченко С.А., Киселев О.И.

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

Вторичная структура РНК играет важную роль в жизненном цикле вируса гриппа А (ВГА). В гене NS было обнаружено существование, по меньшей мере, двух стабильных структур типа «шпилька» в областях 82–148 н. и 497–564 н. В работе провели компьютерный анализ распределения вышеописанных вторичных структур среди ВГА человека и других организмов. Вторичные структуры в последовательностях (+)-РНК 8–геномного сегмента ВГА были предсказаны с использованием программы RNAfold. Структуры типа «шпилька» классифицировали в соответствие с параметрами: стебель > 16 п.н., петля > 6 н., число ветвей — 0,  $\Delta G < -19$  kcal/mol; «шпилька»–подобные структуры классифицировали в соответствие с параметрами: стебель > 14 п.н., число ветвей < 2, ветвь < 5 пн. Выравнивание последовательностей провели в программе MAFFT, филогенетический анализ выполнили с использованием алгоритма RAxML. В результате проведенного анализа обнаружили, что паттерн вторичных структур в гене NS отличался для ВГА разных организмов. Стабильные структуры типа «шпилька» обнаружили для большинства штаммов ВГА птиц, собак и других видов. Для ВГА лошадей «шпильку» предсказали преимущественно для области 82–148 н. В случае ВГА свиней и человека «шпильку» предсказали у ~50% штаммов в области 497–564 н. и ~20% штаммов в области 82–148 н. Далее провели филогенетический анализ гена NS ВГА человека и свиньи с целью изучения распределения вторичных структур в соответствие с происхождением гена NS. «Шпильки» предсказали в обеих областях гена NS в случае большинства штаммов ВГА человека и свиньи птичьего происхождения (H5, H7, H9 и др.), ВГА H1N1 и H1N1pdm человека. При этом для вирусов H1N1pdm в области 82–148 предсказали преимущественно «шпилька»–подобную структуру. «Шпильки» не предсказывались для вирусов H3N2 человека, а для вирусов H2N2 человека — только для области 82–148 н. Для вирусов H1N1pdm «шпильку» предсказали для обеих областей, однако для области 82–148 н. структура являлась преимущественно «шпилька»–подобной. Для ВГА свиней «шпильки» предсказывались только для половины штаммов, при этом для области 82–148 н. предсказывалась в основном «шпилька»–подобная структура. Также показали, что существует временной паттерн распределения структур типа «шпилька» в генах NS ВГА человека и свиньи, ведущих происхождение от предкового вируса A/Brevig Mission/1/1918, имеющего птичье происхождение. Таким образом, в работе показали, что паттерн вторичных структур гена NS среди ВГА отличается в зависимости от их филогенетического происхождения.

## ПРОТИВОВИРУСНЫЙ ПРЕПАРАТ «ТРИАЗАВИРИН» ОТ СКРИНИНГА ДО КЛИНИЧЕСКОЙ АПРОБАЦИИ

Деева Э.Г.<sup>1</sup>, Русинов В.Л.<sup>2</sup>, Киселев О.И.<sup>1</sup>

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

2–Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН, Екатеринбург, Россия

Создание новых лекарственных средств, эффективных в отношении вирусных инфекций, является одной из актуальных задач современной медицины. Скрининг, проведенный среди соединений азоло-азинов, позволил выявить ряд перспективных соединений, в ряду которых особое место занимает «Триазавирин».

Представлены результаты доклинического и клинического изучения I, II фаз нового отечественного противовирусного препарата «Триазавирин». Результаты изучения фармакокинетики и безопасности препарата «Триазавирин» показали, что максимальная концентрация «Триазавирин» в плазме крови достигается в среднем через 1–1,5 часа, кривая убывания концентраций двухфазна, период полувыведения в первой фазе составляет 0,5–1,4 часа. Использование «Триазавирин» в этиотропной терапии гриппа способствует сокращению продолжительности основных симптомов заболевания (интоксикации, лихорадки, катаральных симптомов), снижению частоты развития осложнений и объема симптоматической терапии. На фоне приема «Триазавирин» снижается уровень повторного выделения вирусов гриппа.

**Ключевые слова:** триазавирин, грипп, доклинические исследования, специфическая активность, токсичность, клинические исследования, эффективность, фармакокинетика, безопасность.

## NEW ANTIVIRAL DRUG TRIAZAVIRIN FROM SCREENING TO CLINICAL TRIALS

E.G. Deyeva<sup>1</sup>, V.L. Rusinov<sup>2</sup>, O.I. Kiselev<sup>1</sup>

1–Research Institute of Influenza, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Saint–Petersburg, Russia

2–Postovsky Institute of Organic Synthesis of Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia

The development of new antiviral drugs is one of the topical problems of medicine. Screening conducted among compounds azolo-azines revealed a number of promising compounds, among which a special place is occupied by Triazavirin.

The results of pre-clinical and clinical trials I, II phases for a new anti-influenza drug Triazavirin are presented. Pharmacokinetic studies have revealed that maximal concentration of Triazavirin in plasma is achieved in a relatively short time (1–1,5 h, and it is maintained in adequate concentrations. Elimination curve is biphasic,  $T_{1/2}$  in the 1st phase equals 0,5–1,4 h. Treatment of patients with oral Triazavirin proved to reduce significantly the duration of main clinical symptoms of influenza (intoxication, fever, respiratory symptoms), thus decreasing a number of incidents of influenza-related complications, and avoiding use of symptomatic drugs. The re-isolation rate of the influenza viruses was significantly lower for the patients administrating Triazavirin.

**Key words:** triazavirin, influenza, preclinical trials, clinical trials, specific activity, toxicity, pharmacokinetics, safety, efficacy.

## ДЕЙСТВИЕ АНТИВИРУСНЫХ ПРЕПАРАТОВ И ВИРУСОВ ГРИППА НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ ВРОЖДЁННОГО ИММУНИТЕТА В КЛЕТКАХ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Соколова Т.М.<sup>1,2</sup>, Шувалов А.Н.<sup>1</sup>, Полосков В.В.<sup>1</sup>, Шаповал И.М.<sup>1</sup>, Ершов Ф.И.<sup>1</sup>

1— ФГБУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия

2—«НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского», Москва, Россия

Рецепторы врождённого иммунитета TLRs и RLRs, узнающие молекулярные структуры вирусов и бактерий, включают сигнальные процессы активации генов интерферонов (ИФН) и воспалительных цитокинов.

По нашим данным в клетках человеческой крови активность этих генов значительно различается по уровням (от 10 до 1000 раз) и индивидуально варьирует: B2M ген высокоактивный, гены TLR4, TLR8, MDA5 и факторов транскрипции NFκB, IRF3, IRF7, IPS - среднеактивные и гены TLR3, TLR7, TLR9, RIG1 и p53 имеют низкую активность.

Известные противовирусные препараты (АВП) рекомбинантных ИФН типа 1 («Реаферон», «Генфаксон»), «Ингавирин», индукторы ИФН «Ридостин» и «Циклоферон», исследованные нами, стимулируют экспрессию TLR- и RLR-генов в дозовой зависимости, тем самым повышая иммунитет клеток крови к патогенам. Наши данные с АВП и вирусами гриппа А демонстрируют ассоциацию «узнающих» типов рецепторов с индукцией их генов в клетках человека. Стимулирующий эффект «сильнее» в клетках доноров с низкими уровнями экспрессии.

Препарат Ридостин (смесь dsРНК и osРНК киллерных штаммов дрожжей) индуцирует гены рецепторов TLR3 и MDA5 и фактор транскрипции NFκB, подобно синтетическому комплексу поли(ИЦ). Наличие в составе osРНК дополняет спектр индуцируемых генов рецепторами TLR7 и TLR8.

Препарат Циклоферон (N-метилглюкаминная соль акридоноуксусной кислоты) — в большей степени стимулятор гена TLR9 (сенсор CpG ДНК) и в меньшей — гена TLR3 (сенсор dsРНК), а также генов IRF7, ИФН-бета и ИФН-гамма. Циклоферон, взаимодействуя с нуклеиновыми кислотами, изменяет их структуру и это приводит к «узнаванию» иммунными рецепторами и индукции синтеза ИФН с участием фактора транскрипции IRF7.

Препарат «Ингавирин» (Дикарбамин и Витаглутам) впервые изучен нами как регулятор генов рецепторов врождённого иммунитета и системы ИФН. «Ингавирин» избирательно стимулирует гены TLR7 и RIG1 и этим похож на зарубежный имидазолсодержащий препарат Imiquimod. Дополнительно «Ингавирин» повышает уровень экспрессии генов факторов транскрипции NFκB, p53 и IRF3, генов ИФН (гамма и альфа) и ИФН-зависимых белков Mx1 и OAS1. Поэтому есть все основания считать, что эффективность противовирусного действия «Ингавирин», «Ридостин» и «Циклоферон» при гриппе связана с активацией сигнальных механизмов иммунного ответа, приводящих к активации системы ИФН. Сравнительный анализ АВП как индукторов ИФН-альфа, ИЛ1бета и ИЛ10 клетками крови человека показывает преимущества «Ридостина».

Эффекты АВП на реакции генов врождённого иммунитета сопоставлены с действием патогенных вирусов гриппа А H1N1(Moscow 2009)pdm и H5N1(Vietnam, 2004). Наши исследования подтверждают, что узнавание вирусов гриппа и его компонентов, осуществляется группой рецепторов врождённого иммунитета (TLR4, TLR7/8, RIG1). Активация этих сигнальных рецепторных путей в иммунокомпетентных клетках является важной составляющей степени распространения инфекции и проникновения вирусов в чувствительные клетки дыхательных путей. В своей работе мы показали, что птичий вирус H5N1 и его «эскейп» мутант в первые часы контакта с лимфоцитами человека «сильно» активируют транскрипцию генов иммунных рецепторов и синтез ФНО-альфа. В динамике инфекции (48–72ч) наблюдается подавление их активности. Антигенные различия

мутантного вируса существенно не изменяют его индуцирующих свойств. В лимфоцитах человека не происходит размножения инфекционного вируса H5N1, но наблюдается сохранение вирионной РНК на протяжении 72 ч. Это подтверждает мнение о возможности использования активированных лимфоцитов в качестве депо для доставки вирусов гриппа в чувствительные клетки. Вирусодержащие лимфоциты секретируют высокие уровни гамма-ИФН, что обуславливает резистентность этих клеток к вирусам гриппа. Вирус гриппа А H1N1<sub>pdm</sub> подавлял активность генов RIG1 и TLR7. Альфа2-ИФН в дозе 104 МЕ/мл снижал содержание вирусных РНК в клетках и устранял ингибирующее действие вируса на ген TLR7. Действие вируса гриппа H1N1 на гены иммунных рецепторов и секрецию цитокинов ИЛ1-бета и ФНО-альфа намного слабее, чем вируса H5N1. Опыт изучения действия АВП и вирусов гриппа А на иммунные реакции в клетках человеческой крови показывает выраженную индивидуальную чувствительность, которую необходимо учитывать при применении АВП.

**Список публикаций:**

1. Соколова Т.М., Шувалов А.Н., Телков М.В., Колодяжная Л.В., Ершов Ф.И. Препарат «Ридостин» индуцирует транскрипцию широкого спектра генов системы интерферона в клетках человека. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, — 2013. Т.156, №8. С. 179–182.
2. Соколова Т.М., Шувалов А.Н., Шаповал И.М., Соколова З.А., Ершов Ф.И. Активация генов сигнальных путей иммунитета: различная индивидуальная чувствительность клеток крови человека к препаратам интерферонов и индукторов. ИФН. Медицинская иммунология, — 2014. №5–6. (в печати)

## СОВРЕМЕННЫЕ СКРИНИНГОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ВИРУСОЛОГИИ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В РАЗРАБОТКЕ ВАКЦИН И ФАРМПРЕПАРАТОВ

Овешников И.Н.

ООО «Олимпас Москва»

**Цели:** Объяснить принципы современного скрининга и то, как они могут быть использованы в вирусологии для решения вирусологических задач и при поиске новых вакцин и препаратов в фармакологии.

Рассказать о разнице между «закрытыми» скрининговыми станциями и открытыми модульными системами. Модульность и разнообразие функций открытой системы как преимущество при исследованиях редких явлений и механизмов процессов внутри клеток.

Предоставить краткий обзор прикладных задач и проблем, которые были успешно решены с использованием скрининга.

Кратко рассказать об особенностях скрининговой системы scan<sup>R</sup> компании Олимпас.

**Методы:** Эпифлюоресцентная микроскопия, скрининг, высокотехнологичный имиджинг на основе камеры, высокопроизводительная обработка данных с возможностью выбора критериев сортировки массивов для локализации популяций значений с заданными параметрами.

**Результаты:** Современной вирусологии и фармацевтике необходим мощный инструмент для количественного анализа событий, происходящих во многих клетках, а также для поиска событий, происходящих с малой вероятностью. Многие из процессов (например клеточный цикл) нуждаются в мониторинге всей популяции клеток с возможностью последующей сортировки их в соответствии с критериями поиска. Таким инструментом является открытая скрининговая система scan<sup>R</sup> компании Олимпас.

Современный высокотехнологичный скрининг — это синтез оборудования, которое позволяет работать с флюоресценцией в живых клетках и с максимально щадящими условиями, и программного обеспечения, сочетающего высокую производительность обработки данных с максимально понятным интерфейсом и предоставлением данных в виде, как гистограмм, так и двухмерных спот-диаграмм.

Новейшая скрининговая станция scan<sup>R</sup> компании Олимпас в полной мере соответствует всем требованиям, применимым к скрининговым станциям. Открытый модульный дизайн позволяет исследователю самому решать, какой набор модулей оптимален для его конкретной задачи. Система оптимизирована для работы с живыми клетками, но подразумевает также и работу с фиксированными образцами на предметных стеклах или иных препаратоносителях, сконструированных самим пользователем.

**ПРОЧИЕ ТЕЗИСЫ****СЕРОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ЦИРКУЛЯЦИИ ВИРУСОВ ГРИППА СРЕДИ НАСЕЛЕНИЯ АЛМАТИНСКОЙ ОБЛАСТИ В 2014 ГОДУ**

Таубаева Ш.Ж., Кливлеева Н.Г., Шаменова М.Г., Кузнецова Т.В.

РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, Алматы, Республика Казахстан

Грипп является одной из приоритетных задач здравоохранения многих стран мира. По данным ВОЗ, ежегодно в мире болеет гриппом от 3 до 5 млн. человек. В последние годы число официально регистрируемых случаев гриппа и ОРВИ значительно увеличилось. В структуре всей инфекционной патологии на их долю приходится в среднем от 85 до 92%. Несмотря на определенные успехи в вакцино- и химиопрофилактике, они остаются одной из самых актуальных медицинских и социально-экономических проблем.

Важное место в комплексном изучении циркуляции вирусов гриппа среди людей занимает серологическое обследование сывороток крови на наличие специфических антител. Оценка состояния популяционного иммунитета позволяет выявить более полную картину эпидемиологического процесса и способствует расшифровке этиологии заболевания.

В эпидемический сезон с января по апрель месяцы 2014 г. в больницах и поликлиниках г. Алматы и Алматинской области от людей с диагнозами «ОРВИ», «ОРЗ», «грипп» и «пневмония» было собрано 120 сывороток крови. Серологическое исследование проводили в РТГА с использованием набора диагностикумов гриппозных типа А(Н1N1), А(Н3N2) и В производства ООО «ППДП» (Санкт-Петербург, Россия), а также набора эталонных штаммов, полученных из центра CDC (Атланта, США): А/New Jersey/8/76 (Н1N1), А/Swine Iowa (Hsw1N1), А/Wisconsin/67/05 (Н3N2), В/Shandong/07/07 и В/Florida/09/06.

Результаты серологического анализа показали, что серопозитивными по отношению к вирусу гриппа оказались 96 сывороток крови. В 60 сыворотках крови (62,5% от общего числа положительных) обнаружены антигемагглютинины к вирусу сероподтипа А/Н3N2. Титры антител составили 1:160–1:320. 24 сыворотки крови (25,0%) оказались положительными по отношению к вирусу гриппа А/Н1N1, антитела отмечены в титрах 1:80–1:160. Лишь в трех сыворотках крови (3,1%) обнаружены антигемагглютинины к вирусу гриппа В.

Таким образом, результаты серологических исследований подтверждают роль вирусов гриппа А/Н1N1, А/Н3N2 и В в эпидемическом процессе и свидетельствуют о необходимости проведения постоянного мониторинга наличия антител к вирусам гриппа среди населения.

## **ИЗОЛЯЦИЯ ВИРУСОВ ГРИППА, ЦИРКУЛИРОВАВШИХ В ЭПИДЕМИЧЕСКИЙ СЕЗОН 2013–2014 ГГ. В ЦЕНТРАЛЬНОМ КАЗАХСТАНЕ**

Байсейіт С.Б., Глебова Т.И., Кливлеева Н.Г., Лукманова Г.В.

РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, Алматы, Республика Казахстан

Грипп относится к числу инфекций, которые вызывают непредсказуемые, чрезвычайные эпидемические ситуации. Это — высококонтагиозное острое заболевание, поражающее людей с незапамятных времен. Каждый год в Республике Казахстан регистрируется более 1 млн. случаев гриппа и гриппоподобных заболеваний, не учитывая не обратившихся в медицинские учреждения. Однако ущерб здоровью населения, который наносит грипп и ОРЗ существеннее, т.к. во время эпидемии эти инфекции понижают сопротивляемость организма к другим заболеваниям, вызывая осложнения и повышая смертность.

Проблема ОРВИ, в том числе гриппа, остается одной из важнейших актуальных медицинских и социальных проблем нашего времени. Надзор за гриппом с лабораторной расшифровкой природы инфекции приобретает все большую значимость, в том числе на региональном, общегосударственном и глобальном уровне.

С ноября 2013 по март 2014 г. в лечебных учреждениях Центрального Казахстана от больных с диагнозом «ОРВИ», «ОРЗ», «бронхит», «пневмония» и «ларингит» собрано 87 носоглоточных смывов. Наличие вирусов гриппа человека в пробах определяли с помощью иммуноферментного анализа на нитроцеллюлозной мембране и реакции иммунофлуоресценции. Процент положительных образцов в иммуноферментном анализе составил 13,8% случаев (12 смывов), в иммунофлуоресцентном — 9,2% (8 пробы): Н1 1 37,5%, Н3 — 25%. К вирусу гриппа В получены отрицательные результаты.

Первичный скрининг 87 биопроб на наличие антигена вируса гриппа типов А и В с помощью РТ-ПЦР с использованием ПЦР–тест системы «АмплиСенс», производства ЦНИИ эпидемиологии (г. Москва), показал положительные результаты в 18 образцах к вирусу гриппа типа А.

Изоляцию вируса проводили путем инокуляции каждой пробы ПЦР положительного материала в аллантоисную полость трех 9–10 дневных куриных эмбрионов. В ходе первичного заражения и двух последовательных пассажей из носоглоточных смывов удалось выделить шесть гемагглютинирующих агентов с титрами гемагглютинации 1:16–1:32. В настоящее время проводятся исследования по определению антигенной формулы казахстанских изолятов.



## ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГЕНОВ ПОВЕРХНОСТНЫХ БЕЛКОВ ВИРУСОВ ГРИППА H1N1, ВЫДЕЛЕННЫХ В Г. АТЫРАУ В 2012–2013 ГГ.

Глебова Т.И., Кливлеева Н.Г., Кузнецова Т.В., Шаменова М.Г.

РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, Алматы, Республика Казахстан

Проведено секвенирование HA, NA и M генов вирусов гриппа H1N1 A/Атырау/880/12, A/Атырау/874/12, A/Атырау/876/12, A/Атырау/890/13, A/Атырау/894/13 и A/Атырау/901/13. Выравнивание секвенированных последовательностей, филогенетический анализ и построение древ проведены с помощью компьютерных программ BioEdit и MEGA версии 4 методом «присоединения соседей» на основе 1000 повторов с использованием последовательностей из GeneBank [Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S., 2007].

Изучение последовательностей гена HA показало, что все исследованные вирусы на 98-99% идентичны между собой и со свиным вирусом A/swine/Guangdong/L3/2009 (H1N1).

При филогенетическом анализе генов NA установлено, что вирусы гриппа H1N1 A/Атырау/880/12, A/Атырау/874/12, A/Атырау/876/12, A/Атырау/890/13, A/Атырау/894/13 проявляли 99% идентичности с A/swine/Changhua/199-3/2000 (H1N1), A/swine/USA/1976-M/1931 (H1N1) и A/swine/Guangdong/L3/2009 (H1N1) и на 98% гомологии — с A/swine/Iowa/1973 (H1N1). Изолят A/Атырау/901/13 по нуклеотидным последовательностям гена NA в сравнении с классическими вирусами свиней A/swine/Jamesburg/1942 (H1N1), A/swine/1931 (H1N1), A/swine/Iowa/1973 (H1N1) идентичен на 99%.

По M-гену выявлена высокая степень филогенетического родства атырауских штаммов вирусов гриппа А подтипа H1N1 между собой и с вирусом A/swine/Guangdong/L3/2009 (H1N1), выделенным в 2009 г. от свиньи в Гуанжоу (Китай), что позволяет отнести изучаемые вирусы к кластеру, образованному свиньями вирусами евразийской линии.

Таким образом, филогенетический анализ HA, NA и M генов показал, что все исследуемые вирусы образуют отдельный кластер, в который входят изоляты, выделенные от свиньи в Китае в 2009 г. A/swine/Guangdong/L3/2009 (H1N1).

## КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ

### ТЕЗИСЫ УСТНЫХ ДОКЛАДОВ

#### **МЕТОДИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ЭКЗОСОМ ИЗ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ СРЕДЫ, СОДЕРЖАЩЕЙ ВИРУС ГРИППА**

Забродская Я.А., Шалджян А.А., Максимова Ю.А., Егорова М.А., Горшков А.Н., Кадырова Р.А., Клотченко С.А., Егоров В.В., Васин А.В.

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

В процессе жизнедеятельности клетки выделяют в окружающую среду не только свободные биологически активные молекулы, но и мембранные везикулы, в частности, экзосомы, содержащие белки, и РНК [1]. Для некоторых вирусов известно, что они используют пути образования экзосом, например, для уклонения от иммунного ответа и передачи вирусного материала в соседние незаражённые клетки. Можно предположить, что вирус гриппа также использует экзосомы в своём жизненном цикле [2].

Целью данного исследования являлась разработка методики выделения высокоочищенной фракции экзосом, секретлируемых зараженными вирусом гриппа клетками, для дальнейшего анализа их белкового состава.

Ранее отработали методику выделения экзосом, содержащихся в культуральной среде незаражённых клеток ECV и Jurkat. Полученные фракции экзосом характеризовали методами атомно–силовой и электронной микроскопии, а также вестерн–блоттинга с антителами к маркерным белкам экзосом. Для выделения фракции экзосом, секретлируемых зараженными вирусом гриппа клетками, необходимо было доработать имеющийся подход, так как вирус гриппа имеет сходный с экзосомами размер и плавучую плотность в градиенте сахарозы. Для очистки образцов от вирусных частиц предложили метод аффинной хроматографии с антителами к гемагглютину. В выделенную фракцию экзосом, секретлируемых незараженными клетками, добавляли известное количество вирусных частиц. Полученную смесь разделяли на колонке с иммобилизованными на белке G моноклональными антителами мыши к гемагглютину. Полученные в результате хроматографического разделения фракции анализировали на наличие экзосом, антител и вируса методами SDS-электрофореза в ПААГ и вестерн–блоттинга с антителами к вирусным белкам и иммуноглобулинам мыши. Было показано, что целевые фракции содержали экзосомы, в то время как вирусные частицы связывались с антителами, иммобилизованными на колонке. Таким образом, предложена методика выделения фракции экзосом, свободных от вирионов вируса гриппа.

#### **Список литературы:**

1. Chaput N., Théry C. Exosomes: immune properties and potential clinical implementations. *Seminars in Immunopathology*, 2011. Vol. 33, p.419-440.
2. Киселев О.И., Покровский В.И. Грипп при беременности: сочетание функциональной и инфекционной иммуносупрессии. ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава РФ, 2012

## **НОВЫЕ ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СОВРЕМЕННЫХ ГРИППОЗНЫХ ВАКЦИН И ИХ КОМБИНАЦИЙ С ПРЕПАРАТОМ «РИБОНУКЛЕАТ НАТРИЯ»**

Полосков В.В., Шувалов А.Н., Соколова Т.М., Костинов М.П.

ФГБУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия  
ФГБУ «НИИ Вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» РАМН, Москва, Россия

Вакцины «Гриппол», «Ваксигрип» и «Инфлювак» находятся в арсенале основных медицинских препаратов, применяемых в настоящее время в России для защиты населения от заболеваемости гриппом. Они приготовлены из актуальных штаммов вируса гриппа, рекомендуемых Всемирной организацией здравоохранения на основании анализа эпидемической ситуации 2012–2013 гг. Информация о развитии ими протективного иммунного ответа получена, главным образом, в серологических исследованиях специфического гуморального ответа. В меньшей степени, изучались реакции клеточного иммунитета. Сравнительный анализ действия вакцин «Гриппол», «Ваксигрип» и «Инфлювак» на генном уровне ранее не проводился. В нашей работе с гриппозными вакцинами изучены активности генов рецепторов врожденного и адаптивного иммунитета (Толл-подобных рецепторов) TLR3 и TLR4 и корцептора Т-лимфоцитов — B2M (бета2-микроглобулина). Эти виды TLR осуществляют внутриклеточную передачу сигналов на гены интерферонов и интерлейкинов — регуляторов Т- и В-клеточного иммунитета. Эксперименты выполнены на клетках крови здоровых доноров в условиях *ex vivo*. Исследования проведены методом количественной ОТ-ПЦР и иммуноферментного анализа (ИФА). Каждая вакцина имеет характерные особенности действия на генном уровне. Отечественная субъединичная вакцина «Гриппол» стимулирует гены TLR3, TLR4, B2M и Dicer1 (ген TLR4 наиболее восприимчив). Следует отметить выраженную активацию Грипполом гена Dicer1 — ключевого фермента РНК-интерференции. Голландская субъединичная вакцина «Инфлювак» преимущественно активирует ген рецептора TLR3 и слабее рецептора TLR4, существенно не влияет на активность гена B2M и подавляет экспрессию гена Dicer1. Французская сплит-вакцина «Ваксигрип» — наиболее «сильный» стимулятор генной активности, оказывает стимулирующие эффекты на исследованные гены при сниженных дозах. Наличие в составе сплит-вакцины «Ваксигрип» вирионных РНК и внутренних белков существенно повышает её иммуногенные активности.

Инактивированные вакцины, по сравнению с живыми, обладают более слабой иммуногенностью, поэтому актуален поиск оптимальных иммуномодуляторов. В настоящей работе показана возможность усиления иммуногенных свойств инактивированных гриппозных вакцин комбинацией с известным индуктором интерферона — препаратом «Рибонуклеат натрия» (смесь дсРНК и осРНК дрожжей Вектор «Медика»). Препарат обладает широким спектром выраженного противовирусного действия, способен активировать гены и ферменты системы интерферона в клетках человека различного происхождения. Ранее в исследованиях на экспериментальных животных показана эффективность Рибонуклеата натрия в комбинации с убитыми вакцинами. Аденовирусная вакцина с дсРНК-адьювантом защищала экспериментальных животных от летальной гриппозной инфекции при оральном применении. Рибонуклеат натрия является сильным активатором транскрипции генов TLR3, TLR8 и MDA5. Гены рецептора TLR4 и фермента Dicer1 слабовосприимчивы к Рибонуклеату натрия, но высоковосприимчивы к вакцинным препаратам. Стимулирующие эффекты Рибонуклеата натрия нарастают при снижении концентрации от 100 до 1 мкг\мл. Подбор вида вакцины и дозы Рибонуклеата натрия позволяет получать выраженный иммуностимулирующий эффект на генном уровне.

В культуральной жидкости клеток крови определены спонтанные и индуцированные

вакцинами цитокины, имеющие сигнальное значение (ИЛ1-бета), оказывающие противовирусное действие (ИФН-альфа и ИФН-гамма), цитотоксический (ФНО-альфа) и иммурегуляторные эффекты (ИЛ10). Все 3 вида исследованных вакцин индуцируют значительные количества ИФН-гамма, ответ является зависимым от дозы. Максимально высокие количества гамма-ИФН дает сплит-вакцина «Ваксигрип», немного ниже — субъединичная вакцина «Инфлювак». Стимуляция вакциной «Гриппол» синтеза гамма-ИФН слабее. Полученные результаты убедительно демонстрируют участие Т-хелперов типа 1 в реализации противовирусного действия вакцин. «Гриппол», в отличие от вакцин «Ваксигрип» и «Инфлювак», стимулирует секрецию сигнального ИЛ1-бета. Вероятно, это обусловлено наличием в составе вакцины иммуномодулятора Полиоксидония. ИФН-альфа индуцирующая активность присуща только сплит-вакцине «Ваксигрип». Имеется позитивная корреляция в действии вакцин на синтез гамма-ИФН и ФНО-альфа. Субъединичные вакцины «Гриппол» и «Инфлювак» индуцируют ИЛ10, который активирует Т-хелперы типа 2. ДсРНК — сигнальный индуктор многих цитокиновых реакций в клетках различного происхождения. Рибонуклеат натрия вызывают стабильно высокую продукцию ИЛ1-бета и ФНО-альфа. Вакцины, по сравнению с Рибонуклеатом натрия, являются слабыми индукторами этих цитокинов. Комбинация препаратов вызывает существенное повышение их продукции. Рибонуклеат натрия индуцирует значительные количества альфа-ИФН и определяемые уровни гамма-ИФН. Комбинированное действие вакцин с дсРНК даёт усиление продукции гамма-ИФН. При этом комбинация дсРНК + Инфлювак наиболее эффективная. Представленные результаты демонстрируют высокий иммуноадыювантный потенциал отечественного препарата «Рибонуклеат натрия» при отдельном и сочетанном применении с гриппозными вакцинами.

## **ВЛИЯНИЕ ИНФИЦИРОВАНИЯ ВИРУСОМ ГРИППА А НА ИЗМЕНЕНИЕ ПРОФИЛЯ ЭКСПРЕССИИ мРНК СУБЪЕДИНИЦ NMDA-РЕЦЕПТОРА В МОЗГЕ МЫШЕЙ**

Егорова М.А., Плотникова М.А., Клотченко С.А., Зарубаев В.В., Васин А.В.

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

NMDA-рецептор (NMDAR) представляет собой тетрамерный комплекс, формируемый комбинацией различных субъединиц: NR1, NR2 и NR3. Каждая из субъединиц NMDAR представлена рядом изоформ, экспрессирующихся в результате альтернативного сплайсинга (NR1, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D, NR3A и NR3B). Наибольшая плотность NMDAR наблюдается в конечном мозге, прежде всего в гиппокампе, коре больших полушарий, миндалине и стриатуме. NMDAR участвуют в регуляции нейрональной возбудимости, синаптической пластичности, а также в патогенезе эпилепсии и судорог.

Нарушения функционирования NMDAR приводит к возникновению ряда нейродегенеративных расстройств. Среди возможных негативных факторов, ассоциированных с нарушениями функционирования NMDAR, присутствует и грипп, однако механизмы развития неврологических осложнений при гриппе остаются практически неизученными. Целью данной работы являлась оценка изменения экспрессии NMDAR в мозге мышей в ответ на инфицирование вирусом гриппа А.

В качестве биологического материала использовали мозг мышей, зараженных штаммом вируса A/Anhui/1/2013 (H7N9) в дозе 0,3LD50. Материал получали через 8, 20, 48, 72, 120 и 240 часов после заражения. Ткани гомогенизировали, тотальную РНК экстрагировали с использованием реагента TRIzol («Invitrogen») и далее проводили анализ методом ПЦР в режиме реального времени. Специфические праймеры к генам субъединиц NMDAR были подобраны и валидированы предварительно. Инфицирование мышей вирусом A/Anhui/1/2013 (H7N9) привело к возрастанию уровней мРНК NR2A и NR3A в мозге мышей через 72 ч после заражения. В дальнейшем планируется продолжить работу по изучению влияния вирусов гриппа на экспрессию генов, кодирующих NMDAR (в том числе на уровне белка), а также других генов, участвующих в регуляции центральной нервной системы.

## МОЛЕКУЛЯРНО–ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ВАРИАНТЫ ВИРУСА ГЕПАТИТА В

Елпаева Е.А., Писарева М.М., Грудинин М.П.

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

В последние десятилетия основные успехи в лечении гепатита В связаны с развитием знаний о молекулярно-биологических особенностях вируса. Показано, что генотип ВГВ одним из наиболее важных факторов, влияющих на тяжесть течения болезни, эффективность противовирусного лечения и вероятность развития терминальных стадий инфекции (цирроз и ГЦК), является. Генетическая гетерогенность вирусной популяции у пациента обусловлена двумя ключевыми факторами. Первый из них связан с адаптацией вируса к организму хозяина и противостоянием противовирусной защите, обусловленной действием иммунной системы организма. Например, показано, что нуклеотидные несинонимические замены в *preS2/core* и *preS1/s* областях генома вируса гепатита В приводят к снижению уровня экспрессии вирусных белков HBeAg и HBsAg, что, в свою очередь, приводит к ложноотрицательным результатам серологической диагностики. Второй связан с воздействием внешних факторов, таких как противовирусная терапия. Применяемое в настоящее время длительное лечение с помощью препаратов на основе аналогов нуклеозидов и нуклеотидов зачастую приводит к развитию лекарственной устойчивости.

Цель исследования: идентификация и характеристика генетических вариантов вируса гепатита В, циркулирующих на территории Санкт-Петербурга и Ленинградской области.

Результаты: В период с 2008-2013 гг. методом ПЦР на наличие ДНК вируса гепатита В (ВГВ) в сыворотке крови были обследованы 1261 пациент из Санкт–Петербурга и Ленинградской области. В Санкт–Петербурге и Ленинградской области наиболее распространен вирус гепатита В генотипа D, для которого характерна более низкая вирусная нагрузка. У 124 пациентов с хронической ВГВ-инфекцией была определена нуклеотидная последовательность фрагмента гена полимеразы ВГВ и были выявлены первичные, вторичные и паттерн–мутации устойчивости к аналогам нуклеозидов. Анализ S гена показал, что мутации в полимеразе влияют и на поверхностный белок. У 3х пациентов была обнаружена замена rtA181T, которая привела к образованию стоп-кодона (sW172\*) и изменению поверхностного белка. У 1го пациента точечные аминокислотные замены в *preS* области (S135R, A151V и H160P), а также делеции 136–141 а.к., возможно, привело к невозможности определить HBsAg стандартными серологическими методами. Отсутствие HBeAg у 2–х пациентов из Ленинградской области может быть следствием выявленных мутаций в CORE гене (G1896A, A1762T, G1764A).

## **ВЫСОКОРЕПРОДУКТИВНЫЕ АТТЕНУИРОВАННЫЕ РЕАССОРТАНТЫ H2N2 НА ОСНОВЕ ДОНОРА А/ГОНКОНГ/1/68/162/35**

Петров С.В., Потапчук М.В., Репко И.А., Цыбалова Л.М.

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

Пандемия «азиатского» гриппа 1957–58 гг. вызванная вирусом гриппа серотипа H2N2 унесла жизни около миллиона человек. К 1968 г. подтип H2N2 перестал циркулировать среди людей и сохранился в популяции птиц. В настоящее время вирус рассматривается как наиболее вероятный возбудитель новой пандемии.

В 2013 году в журнале *Virology* опубликовано исследование (Jones J.C. et al.), показавшее, что против циркулирующих в настоящее время среди птиц вирусов подтипа H2N2 могут быть эффективны прототипы вакцин на основе пандемического вируса середины XX века.

С целью получить вакцинный реассортант эффективный против вероятного возбудителя пандемии, мы проанализировали изменчивость первой субъединицы гемагглютинаина H2 на протяжении десяти лет циркуляции вирусов H2N2, и выбрали два штамма, как основу для создания вакцины. Первый штамм, А/Япония/305/1957 (H2N2), идентичный по последовательности аминокислотных остатков первой субъединицы гемагглютинаина эталонному штамму А/Сингапур/1/57, второй, А/Калифорния/1/1966 (H2N2), филогенетически наиболее удаленный по эволюционному дереву от эталонного штамма и соответствующим антигенным и генетическим свойствам, отражающий состояние вируса на момент его элиминации из человеческой популяции.

Методом прямой генетической реассортации двух названных вирусов со штаммом–донором аттенуации и высокой репродуктивности А/Гонконг/1/68/162/35 (H3N2) были получены реассортанты RA-36 (А/Япония/ГК/6:2 H2N2) и RA-40 (А/Калифорния/ГК/6:2 H2N2), заимствовавшие поверхностные антигены от потенциально пандемических штаммов, а гены внутренних белков от штамма-донора, т.е. имеющие соотношение генов 6:2.

Для подтверждения генетического состава реассортантов была разработана схема ОТ-ПЦР-рестрикционного анализа, включающая в себя подбор рестриктаз, позволяющих отличить по наличию однонуклеотидных замен сегменты генома потенциально пандемических штаммов от сегментов штамма–донора А/Гонконг/1/68/162/35 (H3N2), и пар праймеров, позволяющих специфично амплифицировать участки, содержащие указанные замены. Стабильность генетического состава полученных реассортантов подтверждена после их пятикратного пассирования в системе развивающихся куриных эмбрионов (РКЭ).

Гемагглютинирующая активность реассортанта RA-36 составила 1:1024 ГАЕ, RA-40 – 1:2048 ГАЕ, что соответствует повышению титра вируса в 8 раз по сравнению с исходными вариантами для обоих штаммов. Инфекционная активность в РКЭ возросла на 2 порядка и для RA-36 достигла 8,75 lgЭИД50/0,2мл, а для RA-40 — 9,5 lgЭИД50/0,2мл. Оба реассортанта были специфичны в РТГА взаимодействуя с гомологичной сывороткой до титра 1:320 и не взаимодействуя с гетерологичными. Оба реассортанта оказались безвредны при подкожном введении морским свинкам и внутрибрюшинном введении мышам.

Полученные реассортанты могут быть использованы в качестве вакцинных штаммов в условиях предпандемической ситуации для производства гриппозной вакцины как инактивированной, так и живой за счет ярко выраженных свойств высокой репродуктивности и аттенуированности, привносимых универсальным донором.

## ДИАГНОСТИКА И КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АДЕНОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ 4 И 7 ТИПОВ

Янина М.А., Комиссаров А.Б., Осидак Л.В., Львов Н.И.

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

### Введение

Впервые ДНК–геномные аденовирусы были выделены в 1953 году американскими учеными W. P. Rowe, R. J. Huebner, L. K. Gilmore, T. H. Parrott, T. E. Ward в культурах тканей аденоидов и миндалин, удаленных у здоровых детей и от больных острыми катарам верхних дыхательных путей.

Вирион аденовируса представляет собой икосаэдр размером от 70 до 80 нм. Капсид содержит 11 вирусных белков, но строится из двух основных — пентона (penton) и гексона (hexon). 240 молекул гексона составляют грань икосаэдра. 12 вершин образованы молекулами пентона. От каждой вершины, образуя тройную спиральную структуру, отходят нити (fiber).

Геном аденовируса представлен несегментированной двухцепочечной молекулой ДНК длиной 26–45 тысяч пар нуклеотидов. Размер и организация генома аденовирусов позволяет использовать их в качестве векторов для вакцинации и генной терапии. Перспективным направлением использования рекомбинантных аденовирусов является терапия онкологических заболеваний.

В настоящее время выделяют более 90 типов аденовирусов, 50 из которых вызывают заболевания у человека.

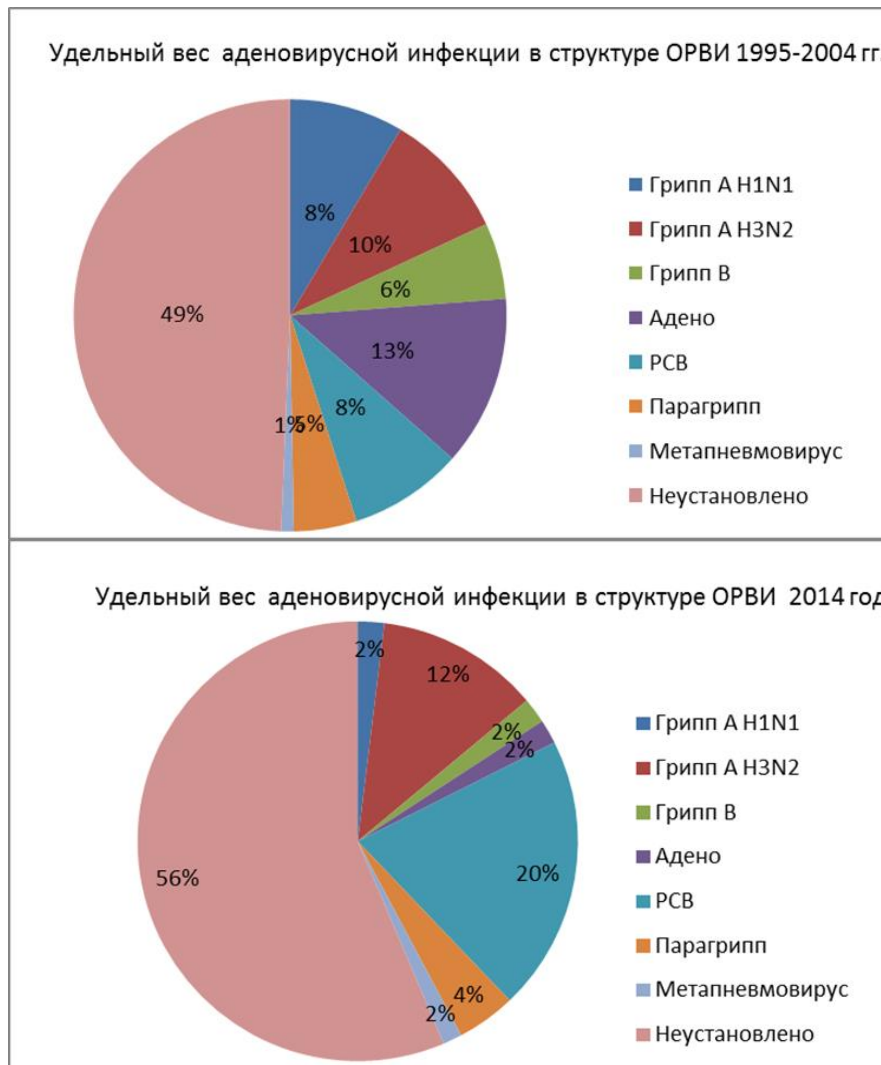
Аденовирус человека (HADV) представлен более 50 генотипами и разделен на 7 подгрупп (A, B1, B2, C, D, E, F), имеющих общий комплементсвязывающий антиген, но различающихся по ряду признаков: антигенных, молекулярно–биологических, тропизму к различным тканям и патогенности для человека.

По имеющимся литературным данным серотипы 4, 7, 14 и 21 вызывают ОРВИ у военнослужащих, преимущественно вспышки среди новобранцев. В 10% случаев развивается пневмония. Также для них характерны вспышки ринофарингитов, вызванных серотипами 3, 4, 7, 14, 21, и кератоконъюнктивита, связанного с серотипами 8, 11 и 19.

Среди детей наблюдаются спорадические случаи заболеваний и, наиболее часто, вспышки в закрытых детских коллективах (например, дошкольные учреждения, дома ребенка, интернаты). У детей ОРВИ чаще всего вызывают серотипы 1–3, 5–7. Заболевание протекает тяжело у новорожденных и детей с сопутствующей патологией, нередко с развитием пневмонии.

Удельный вес аденовирусной инфекции занимает немаловажное место после гриппа, наравне с респираторно–синцитиальной инфекцией и вирусом парагриппа, в этиологической структуре острых респираторных вирусных инфекций и составляет около 10–15%. Однако последние два года наблюдается снижение этого показателя до 1–2%.





Необходимость определять серотипы аденовируса возникла в связи с тем, что была очевидна связь между определенными серотипами и тяжестью течения заболевания, клинических проявлений. Для выявления вируса в образцах проводилось вирусовыделение на культуре клеток HEp-2 и клетках почки обезьян, а также РСК и иммунофлюоресценция. Серологическое определение типов осуществлялось с помощью реакции торможения гемагглютинации с животными сыворотками к каждому серотипу, однако эти результаты бывает трудно идентифицировать, реакция не может выявить все типы, а эритроциты с необходимыми показателями агглютинации можно получить не от всех животных. Типоспецифическая реакция нейтрализации предоставляет качественную идентификацию, но является долгосрочной. Аденовирусная серо-специфическая кроличья сыворотка и моноклональные антитела также успешно использовались для определения серотипа возбудителя, но эти реагенты были достаточно труднодоступными.

В последние десятилетия XX века серодиагностику аденовирусов, основанную на реакции связывания комплемента, реакции нейтрализации, а так же ИФА и иммунофлюоресценции, сменила более точная технология генотипирования с помощью ПЦР и секвенирования. Однако, несмотря на повсеместное распространение вируса, высокую частоту встречаемости и способность поражать все возрастные группы и различные органы и системы, с высоким риском осложнений и даже смертности, у лиц со сниженным иммунитетом, в нашей стране аденовирусная инфекция все еще остается недостаточно изученной. Крайне мало данных о том, какие генотипы преимущественно циркулируют в популяции, какая клиническая картина и осложнения развиваются, при инфицировании различными генотипами, а так же

недостаточно изучено влияние определенных генотипов на конкретные органы и системы в разных возрастных группах, что подчеркивает актуальность данной темы.

**Материалы и методы.** В ходе работы было обследовано 100 мазков из носоглотки и носовых ходов и данных историй болезни детей и молодых людей в возрасте до 22. Все пациенты находились на стационарном лечении с клиническими проявлениями аденовирусной инфекции.

У 100% отмечались повышение температуры тела, недомогание и интоксикация. У большинства были катаральные явления: гиперемия зева, кашель, заложенность носа и отделяемое (от слизистого, до слизисто-гнойного). В клиническом анализе крови у всех пациентов отмечались умеренные воспалительные изменения: ускорение СОЭ, лейкоцитоз, лимфопения). У пятерых человек течение заболевания было осложнено пневмонией.

Подбор праймеров на ген нити осуществлялся путем выявления консервативных участков в нуклеотидных последовательностях. Из полногеномных нуклеотидных последовательностей аденовирусов человека различных серотипов, депонированных в базе данных GenBank, были извлечены последовательности гена нити, построены множественные выравнивания и определены границы консервативных участков. Для решения этой задачи использовался программный пакет Vector NTI Advance.

Дизайн праймеров и зондов к консервативным областям проводился с помощью программного обеспечения Primer Premier. Синтез праймеров был заказан в ООО «Синтол».

Экспериментальная проверка праймеров осуществлялась с использованием набора реагентов и термоциклера BioRad MJ Mini (BioRad). Электрофоретический анализ проводится стандартным образом в агарозных гелях с окрашиванием бромистым этидием.

На электрофореграммах должен быть один ПЦР-продукт ожидаемого размера, соответствующий по результатам секвенирования фрагменту гена нити аденовируса, к которому были подобраны праймеры.

Секвенированные нуклеотидные последовательности участка гексона (область HVR-7) обрабатываются с использованием программного обеспечения Vector NTI Advance. Производится множественное выравнивание с последовательностями серотипов аденовирусов человека, депонированными из базы данных GenBank. Затем проводился филогенетический анализ, с помощью программы MEGA5 (Tamura et al., 2011), и на его основе будут определены циркулирующие генотипы.

Установить генотип возбудителя удалось в 67 образцах, что составляет 67% случаев. Генотипирование показало принадлежность 37 образцов к 7 генотипу и 27 образцов к 4 генотипу, ассоциированным преимущественно с острыми респираторными заболеваниями. В 36 образцах не удалось определить принадлежность Адв к какому-то генотипу. При анализе течения заболевания у данных пациентов не было выявлено существенных различий в клинической картине инфекционного процесса, вызванного данными генотипами и выраженности осложнений. Можно лишь отметить, что при инфицировании 4м генотипам, чаще наблюдался более длительный лихорадочный период, более выраженное недомогание и интоксикация. Также 4 случая пневмонии из пяти отмечались при перенесении аденовирусной инфекции 4-го генотипа.

**Выводы.** Таким образом, на данный момент, в полученных образцах выявлено 2 генотипа аденовируса, являющихся распространенными возбудителями ОРВИ, как у детей, так и у взрослых. Однако образцов не достаточно много, чтобы достоверно установить, только ли эти генотипы характерны для нашего региона, а также выявить характерные для них особенности клинической картины и осложнения. Планируется дальнейшее внедрение данной методики и продолжение обработки и последующего анализа данных, получаемых от больных.

## ТЕЗИСЫ ПОСТЕРНЫХ ДОКЛАДОВ

### МУТАЦИИ В ГЕНАХ ПОЛИМЕРАЗНОГО КОМПЛЕКСА ОПРЕДЕЛЯЮТ ХОЛОДОАДАПТИРОВАННЫЙ ФЕНОТИП ШТАММА-ДОНОРА А/ГОНКОНГ/1/68/162/35

Сергеева М.В.<sup>1</sup>, Петров С.В.<sup>1</sup>, Пулькина А.А.<sup>2</sup>, Фадеев А.В.<sup>1</sup>, Потапчук М.В.<sup>1</sup>, Цыбалова Л.М.<sup>1</sup>

1–Научно–исследовательский институт гриппа Минздрава России, Санкт–Петербург, Россия

2–Санкт–Петербургский государственный политехнический университет, Санкт–Петербург, Россия

Штаммы–доноры для производства живой гриппозной вакцины характеризуются свойствами температурочувствительности и холодной адаптации (ХА), которые являются маркерами аттенуации вакцинных штаммов для человека. Доноры аттенуации имеют ряд мутаций в генах, кодирующих внутренние и неструктурные белки, что отличает их от вирусов предшественников (Сох et al., 1988, Klimov et al., 1992). Штамм–донор А/Гонконг/1/68/162/35 (H3N2) имеет 14 аминокислотных замен, отличающих его от исходного дикого вируса А/Гонконг/1/68 (H3N2) (Цыбалова и др., 2012). Причем 4 замены появились за период пассажей донора в куриных эмбрионах при пониженной температуре: три в полимеразном комплексе (R465G в PB1, M441I в PA, E292G в NP) и одна в белке М (С151S). Целью данной работы было изучение роли указанных мутаций в формировании ХА фенотипа штамма–донора А/Гонконг/1/68/162/35.

В рамках исследования были получены реассортантные штаммы, содержащие гены внутренних и неструктурных белков донора А/Гонконг/1/68/162/35 (с мутациями и без) и поверхностные антигены штамма А/Техас/4/2009 (H1N1pdm). Реассортант RA-41, не содержащий реверс–мутаций, был получен методом классической генетической реассортации, состав его генома (6:2) был подтвержден методом ПЦР–рестрикционного анализа. Реассортанты с одиночными реверс–мутациями, а также их комбинацией были получены методом обратной генетики. Всего было получено 4 варианта: RA-42 с мутацией 292G→E в NP, RA-43 с мутацией 465G→R в PB1, RA-44 с мутацией 151S→C в М и RA-45 с комбинацией PB1 (465G→R), PA (441I→M) и NP (292G→E). Наличие мутаций в генах подтверждали методом частичного секвенирования. ХА фенотип оценивали по разнице показателей инфекционной активности вирусов в куриных эмбрионах при оптимальной (34°C) и пониженной (26°C) температурах (RCT<sub>26</sub>). Штамм считали ХА, если RCT<sub>26</sub> составляло не более 3,5 lg ЭИД<sub>50</sub>/0,2 мл.

Исходный реассортант RA-41 обладал явным ХА фенотипом — показатель RCT<sub>26</sub> составлял 2,75 lg ЭИД<sub>50</sub>. Реассортант RA-44 с реверс–мутацией в гене М также обладал ХА фенотипом (RCT<sub>26</sub>=3,25). Реассортанты RA-42 и RA-43 с реверс–мутациями в генах NP и PB1 имели более высокий показатель RCT<sub>26</sub> (3,75 и 3,87, соответственно), который не позволяет отнести их к группе ХА вирусов. Реассортант RA-45 с комбинацией трех реверс–мутаций практически полностью утратил способность репродуцироваться при пониженной температуре (RCT<sub>26</sub>=5). Следовательно, реверс–мутации в генах полимеразного комплекса снижали проявление ХА фенотипа, в отличие от мутации в гене М.

Таким образом, мутации в генах полимеразного комплекса играют существенную роль в формировании ХА фенотипа штамма–донора А/Гонконг/1/68/162/35.

## РЕКОМБИНАНТНЫЕ БЕЛКИ НА ОСНОВЕ НВс И ЭКТОДОМЕНОВ КОНСЕРВАТИВНОГО БЕЛКА М2 ВИРУСА ГРИППА А

Касьяненко М.А., Шалджян А.А., Горшков А.Н., Ковалева А.А., Степанова Л.А.

ФГБУ «НИИ Гриппа» Минздрава России, Санкт–Петербург, Россия

Наиболее эффективным способом предупреждения гриппа является вакцинопрофилактика. Альтернативой традиционным вакцинам являются рекомбинантные вакцины, основанные на отдельных белках вируса гриппа или пептидах. Из–за высокой консервативности белок М2 и, особенно, его эктодомен (М2е) стал объектом для создания универсальной вакцины против гриппа. Однако пептид М2е слабо иммуногенен и требует присоединения к носителю. Одним из наиболее перспективных носителей для презентации чужеродных пептидов является коровий антиген вируса гепатита В — НВс, который способен к самосборке в вирусоподобные частицы (ВПЧ) *in vitro*.

Целью данной работы стала физико–химическая характеристика рекомбинантных белков, в которых эктодомен М2 белка вируса гриппа А (М2е) был генетически слит с высокоиммуногенным белковым носителем — НВс.

Были исследованы следующие рекомбинантные белки: НВс-his (без вставок чужеродных эпитопов), 2М2ек2М2еhНВс (2 копии консенсусной последовательности М2е вирусов гриппа А человека (М2еh) и 2 копии М2е (М2ек) вируса гриппа А/Kurgan/05/05 (H5N1) встроены в иммунодоминантную петлю НВс), 4М2еhНВс (4 копии М2еh). Накопление рекомбинантных белков осуществляли в штамме-продуценте *E.coli* DLT 1270. Очистку целевого белка проводили методом изоплотностного центрифугирования в комбинированном градиенте сахарозы и хлористого цезия, который является оптимальным для выделения вирусоподобных частиц. Экспрессия белков и степень очистки были подтверждены методом электрофореза в ПААГ, чистота целевого белка составила 96%. Методом электронной микроскопии было показано, что рекомбинантный белок НВс образует вирусоподобные частицы диаметром 30–33 нм, что согласуется с литературными данными. В препаратах 4М2еhНВс и 2М2еh2М2екНВс обнаружены частицы двух типов: около 30 нм и больше 100 нм. Гидродинамический радиус ВПЧ был определен методом динамического светорассеяния. В препарате НВс присутствуют частицы с динамическим диаметром 45 нм. В препарате белка 4М2еhНВс обнаружено наличие двух типов частиц: диаметром 45–49 нм и крупных частиц (агрегатов частиц) диаметром около 330 нм. В препарате белка 2М2еh2М2екНВс выявлено также наличие двух типов частиц: нестандартных частиц малого диаметра и частиц большого размера, преобладающих в препарате. Показано влияние структуры целевого антигена, встроенного в иммунодоминантную петлю НВс, на тип вирусоподобных частиц.

## ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ 22 ОКТЯБРЯ 2014 ГОДА

### Заседание Проблемной комиссии «грипп и гриппоподобные инфекции»

#### **О СООТВЕТСТВИИ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ШТАММОВ СОСТАВУ СЕЗОННОЙ ВАКЦИНЫ. НОВЫЕ ОПАСНОСТИ ЗООНОЗНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ**

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

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

Рекомендации ВОЗ по штаммовому составу вакцин на сезон 2014–2015 гг. для Северного Полушария не изменились по сравнению с прошлым сезоном: в состав вакцин вошли штаммы: A/California/07/09 (H1N1)pdm09–подобный, A/Victoria/361/11–подобный (A/Texas/50/12)(H3N2) и B/Massachusetts/2/12–подобный (Yamagata). Для квадριвалентных вакцин дополнительно был рекомендован штамм B/Brisbane/60/08–подобный (Victoria).

В то же время, по данным международного референс–центра по гриппу в Лондоне (NIMR)<sup>1</sup>, в прошедшем эпидсезоне 86,7 % штаммов A(H3N2), 33,3 % штаммов гриппа В Ямагатской линии и до 23,3 % штаммов гриппа В Викторианской линии показывали титры РТГА, пониженные в 8 и более раз по сравнению с гомологичными. В наших исследованиях мы не отмечали столь существенного снижения титров РТГА вирусов A(H3N2) с антисывороткой к референс–штамму A/Texas/50/12, однако титры РТГА вирусов гриппа В Ямагатской линии с антисывороткой к вакцинному штамму B/Массачусетс/02/12 были также понижены (1/8 гомологичного титра). В значительной степени это снижение объясняется не действительным антигенным дрейфом вирусов соответствующих подтипов, а особенностями выделения штаммов на куриных эмбрионах или культуре клеток MDCK/MDCK-Siat1. Однако исчерпывающего объяснения этому феномену, обнаруженному в последние несколько лет, еще не найдено. Дело в том, что «девиантные» штаммы не имеют существенных генетических отличий от эталонных вирусов, характерных для соответствующих подгрупп. Референс–центр по гриппу в Лондоне в последние годы также рекомендует проводить РТГА в присутствии 20 нМ озельтамивира, чтобы исключить влияние гемагглютинирующей активности нейраминидазы<sup>1</sup>. В своих опытах мы не обнаружили отличий титров РТГА в присутствии 20 нМ озельтамивира.

Следует отметить, что, кроме сезонных вирусов гриппа человека, в 2013–2014 гг. появились новые опасности зоонозного происхождения. С февраля 2013 г. в Китае появились случаи заражения людей новым высокопатогенным гриппом птичьего происхождения — A/H7N9. На 28.04.2014 зафиксировано 417 лабораторно подтвержденных случаев у людей, причем, после летнего затишья, с 52-й недели 2013 по 6-ю неделю 2014 г. наблюдался новый пик заболеваемости. Практически все случаи имели место в восточных провинциях Китая, однако несколько заболевших было зафиксировано в пограничных с Дальним Востоком районах. Особенности высокопатогенного штамма A(H7N9) птичьего происхождения являются следующие: 1) Вирус размножается как в верхних, так и нижних дыхательных путях; 2) Появились небольшие кластеры передачи от человека к человеку; 3) Мутация в HA G219S увеличивает сродство к рецепторам человеческого типа, но снижает термо– и рН–стабильность HA; 4) В то же время дополнительная мутация K58I в HA2 увеличивает

стабильность HA. Аналогично действует мутация A210E. Повышенная стабильность HA увеличивает эффективность воздушно-капельного переноса вируса; 5) Молекулярные детерминанты патогенности у вируса H7N9 также находятся в белке PB2 (627K и 217L); 6) Резистентность к озельтамивиру у H7N9 приобретает путем мутации в NA R292K. Эта мутация не снижает жизнеспособность вируса и его репликативный потенциал и уже отмечена в изолятах от больных; 7) Вирус с частично или полностью делетированным геном NA — H7N9neg — вирулентен даже у взрослых кур (H5N1neg — только у однодневных цыплят). Таким образом, вирулентность H7 менее зависит от NA, чем у H5.

Другие актуальные опасности зоонозного происхождения: 1) H5N1: на 02.10.2014 — 668 лабораторно подтвержденных случаев у людей, из них 393 (58,8 %) — с летальным исходом. С 27.06.2014 по 02.10.2014 сообщалось только об одном случае в Египте у 2,5-летней девочки; 2) H5N6 — один случай в апреле 2014 г. в Китае, провинция Сычуань, больной умер; 3) H10N8 — 3 случая в Китае, двое больных умерли. Этот вирус несет генетические маркеры адаптации к млекопитающим и высокой патогенности в HA (A135T, S138A), а также в M1, NS1 и в PB2; 4) H9N2 — 2 случая в Китае с легким течением; 5) H3N2v — 2 случая в августе в США. Оба случая с легким течением. Отмечен тесный контакт пациентов (дети) со свиньями на сельскохозяйственных выставках. Потенциальную опасность представляют также: 1) Птичий вирус H2N2 — способен размножаться в респираторном тракте хорьков, но не передается воздушно-капельным путем (только при непосредственном контакте животных); 2) Свиной вирус H2N3 — появился в циркуляции у свиней в 2006 г. Несет мутацию Q226L в HA, необходимую для связывания с  $\alpha$ -2,6-рецепторами. К счастью, пока ни для одного из перечисленных штаммов не доказана возможность устойчивой передачи в человеческой популяции. Все это подчеркивает важность постоянного мониторинга потенциально пандемических новых штаммов гриппа и тесного взаимодействия служб здравоохранения и ветеринарии.

### Список литературы

WHO Influenza Centre. NIMR interim report. Sept.14.2014 [электронный ресурс]. URL: <http://www.nimr.mrc.ac.uk/documents/about/NIMR-VCM-report-Sep-14-web.pdf> (дата обращения 15.10.2014).

## ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ 23 ОКТЯБРЯ 2014 ГОДА

### Перспективные разработки диагностических и противовирусных препаратов

#### КАРКАСНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ КАК ИНГИБИТОРЫ РАННИХ СТАДИЙ ВИРУСНОЙ РЕПРОДУКЦИИ

Зарубаев В.В.<sup>1</sup>, Третьяк Т.С.<sup>1</sup>, Салахутдинов Н.Ф.<sup>2</sup>

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

2–ФГБУН «Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова» СО РАН, Новосибирск, Россия

Несмотря на наличие в жизненном цикле вируса гриппа многих стадий и компонентов, представляющих мишень для противовирусной терапии, лишь три из них в настоящее время используются в клинике. Производные адамантана ингибируют вирусный протонный канал M2, аналоги сиаловых кислот (осельтамивир, занамивир, перамивир и ланинамивир) ингибируют вирусную нейраминидазу, а аналоги нуклеозидов (рибавирин и T-705 (фавипиравир)) — полимеразный комплекс вируса. В России используется также препарат комплексного механизма активности «Арбидол».

Ранние стадии вирусной репродукции включают взаимодействие с рецептором, формирование эндосомной вакуоли, активацию гемагглютинина, приводящую к слиянию мембран, и выход сегментов вирусного генома в цитоплазму клетки. Для проникновения в клетку оболочечные вирусы присоединяются к мембранному рецептору путём контакта с поверхностными белками оболочки. Слияние мембран у вируса гриппа происходит в кислой среде эндосом, где низкие значения pH индуцируют конформационные перестройки гемагглютинина.

Нами была идентифицирована группа соединений — азотсодержащих производных камфары (1,7,7-триметилбицикло[2.2.1]гептана), проявляющих выраженную активность против пандемического вируса гриппа. Одно из наиболее активных и простых в синтезе веществ этой группы (1,7,7-триметилбицикло[2.2.1]гептан-2-илиденаминоэтанол, Камфецин) обладает низкой токсичностью и высокой эффективностью (EC<sub>50</sub>=5,1 мкМ, STD<sub>50</sub>=2561 мкМ, индекс селективности 502). При изучении стадии жизненного цикла вируса–мишени препарата было показано, что максимальной активностью он обладает на ранних стадиях вирусной репродукции. Другие соединения этой группы также проявляли наибольшую активность сразу после добавления в среду, что говорит о едином механизме их действия.

Доказательством механизма активности соединений этой группы является их прямое ингибирующее действие в отношении вирусного НА. Кроме того, при компьютерном моделировании молекула камфецина, как и других соединений–ингибиторов НА, локализовалась в области стебля, что также служит подтверждением мишени его действия.

При изучении активности камфецина на животной модели гриппозной инфекции было показано, что его протективные свойства сопоставимы с таковыми для препарата сравнения «Тамифлю». При инфицирующей дозе 10 LD<sub>50</sub> индекс защиты животных составил 66,7% для обоих препаратов.

Учитывая, что модельный штамм, на котором проводились исследования, является ремантадин–резистентным, следует рассматривать камфецин в частности и производные

камфары в целом как перспективную группу для разработки противогриппозных препаратов нового поколения.



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

© ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России  
Санкт–Петербург  
2014

[www.influenza.spb.ru](http://www.influenza.spb.ru)