

6. Wirth T., Falush D., Lan R., Colles F., Mensa P., Wieler L.H. et al. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Molecular Microbiology*. 2006; 60 (5): 1136 – 1151.

## References

1. Beljakov V.D., Jafaev R.H. *Epidemiology*. Moscow: Medicina; 1989 (in Russian).
2. Cherkassky B.L. *Guide to general epidemiology*. Moscow: Medicina; 2001 (in Russian).
3. Drinking water. Hygienic requirements to quality of water of the centralized systems of drinking water supply. Quality control. Hygienic requirements to safety of hot water supply. SanPiN 2.1.4.1074-01 (Are approved the resolution of the Chief state health officer of the Russian Federation of April 7, 2009 № 20) (in Russian).
4. Methodical instructions on microbiological diagnosis of the diseases caused by enterobakteriya. Moscow; 1984 (in Russian).
5. Determination of sensitivity to antibacterial preparations. Methodical instructions 2.4.1890-04. Moscow; 2004 (in Russian).
6. Wirth T., Falush D., Lan R., Colles F., Mensa P., Wieler L.H. et al. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Molecular Microbiology*. 2006; 60 (5): 1136 – 1151.

## Эпидемия гриппа в России в сезон 2013 – 2014 годов: этиология, антигенные свойства гемагглютиниона и активность нейраминидазы вирусов

Т.Г. Лобова (lobova@influenza.spb.ru), Д.М. Даниленко, Н.И. Коновалова,  
Е.М. Еропкина, С.М. Щеканова, П.А. Петрова, Е.Г. Корнилова, М.Ю. Еропкин

ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, Санкт-Петербург

### Резюме

Изучена структура популяции вирусов гриппа, циркулировавших в России в эпидемический сезон 2013 – 2014 годов. Установлено, что среди 495 изолятов на долю A(H1N1)pdm09 приходилось 46,3%, A(H3N2) – 44,2%, гриппа B – 9,5%, причем среди последних преобладали штаммы Ямагатской разновидности. На основании данных реакции торможения гемагглютинации (РТГА) и метода трехмерной антигенной картографии проведен сравнительный анализ антигенных свойств поверхностного белка гемагглютиниона вирусов гриппа, циркулировавших в России, и эталонных штаммов. Установлено соответствие вирусов гриппа, циркулировавших в РФ, рекомендованному Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) штаммовому составу противогриппозной вакцины на сезон 2013 – 2014 годов.

Количественный анализ активности второго поверхностного белка нейраминидазы для 203 вирусов гриппа A различных антигенных формул, лет и источников выделения показал наиболее высокую активность фермента у вирусов гриппа птиц A(H5N1). В целом активность нейраминидазы подтипа N1 была выше, чем N2, однако отмечен большой индивидуальный разброс ферментативной активности в пределах каждого подтипа.

**Ключевые слова:** эпидемия, вирусы гриппа, антигенный анализ, РТГА, антигенная картография, MUNANA-тест

### The Flu Epidemic in Russia in the 2013 – 2014 Season: Etiology, Antigenic Properties of Hemagglutinin and Neuraminidase Activity

T.G. Lobova (lobova@influenza.spb.ru), D.M. Danilenko, N.I. Konovalova, E.M. Yeropkina, S.M. Shchekanova, P.A. Petrova, E.G. Kornilova, M.Yu. Yeropkin

The Federal State Budgetary Institution «Research Influenza Institute» of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Saint-Petersburg

### Abstract

The present study describes etiological structure of population of influenza viruses that circulated in Russian Federation in epidemic season 2013 – 2014. It was shown that from 495 isolates influenza A(H1N1)pdm09 viruses comprise 46.3%, influenza A(H3N2) – 44.2% and influenza B – 9.5% with domination of Yamagata lineage. Comparative study of antigenic properties of major influenza surface protein hemagglutinin was conducted based on the results of HI test and three-dimensional antigenic cartography. The correspondence between WHO recommended strains for vaccine composition 2013 – 2014 and Russian strains of the analyzed period was shown.

Quantitative analysis of enzyme activity of the second surface influenza protein – neuraminidase – for 203 influenza strains differing in year of isolation, antigenic composition and host specificity showed that the highest activity was registered for the neuraminidase of A(H5N1) influenza viruses. In general, the activity of N1 neuraminidase was higher than that of N2 subtype, but sufficient individual variation of NA activity within the subtype could be registered.

**Key words:** epidemic, influenza viruses, antigenic analysis, HI-test, antigenic cartography, MUNANA-test

## Введение

Грипп и ОРВИ являются самыми массовыми заболеваниями человека. Ежегодно на долю этих нозологических форм приходится около 90% всей регистрируемой инфекционной заболеваемости в мире.

Особенности строения генома вируса, его широкое распространение и наличие природных резервуаров вирусов гриппа приводит к эпидемической опасности, связанной с инфицированием людей возбудителями, имеющими зоонозное происхождение [1]. Следствием реассортации сегментов генома вирусов гриппа свиней явилось возникновение в 2009 году пандемического штамма A(H1N1)pdm09, вызвавшего первую в XXI веке пандемию гриппа. Случаи инфицирования людей штаммами вирусов гриппа, имеющими зоонозное происхождение, известны давно [2, 3]. Так, высокопатогенный вирус гриппа птиц A(H5N1) с 2003 года послужил причиной 667-ти лабораторно подтвержденных случаев заболевания человека, приведших к 393-м летальным исходам [4]. С февраля 2013 года в Китае развилась вспышка гриппа, вызванного высокопатогенным вирусом птичьего происхождения – A(H7N9) [5]; появились сообщения о заболеваниях людей в Китае гриппом A(H10N8) с летальными исходами, а также о случаях инфицирования вирусом A(H9N2) [4].

Наиболее эффективным способом предупреждения гриппа, как и других воздушно-капельных инфекций, является вакцинация. Протективные свойства вакцины зависят от степени соответствия компонентов вакцины и эпидемических штаммов, циркулирующих в человеческой популяции. Непрерывная изменчивость, а также одновременная циркуляция двух подтипов вирусов гриппа типа А с антигенной формулой (H1N1) и (H3N2) и двух антигенных разновидностей – Викторианской и Ямагатской – вирусов гриппа типа В затрудняют борьбу с этой инфекцией и определяют необходимость ежегодного обновления штаммового состава противогриппозных вакцин.

Все вышесказанное подчеркивает важность постоянного мониторинга гриппа, осуществляемого в рамках деятельности Федерального центра по гриппу (ФЦГ), функционирующего на базе НИИ гриппа, и его 49-ти базовых вирусологических лабораторий на территории России, а также тесного взаимодействия служб здравоохранения и ветеринарии.

Изучение антигенных и биологических свойств поверхностных белков возбудителя – гемагглютинаина (HA) и нейраминидазы (NA) – является первоочередной задачей при надзоре за гриппозной инфекцией. Баланс функциональной активности этих двух белков на поверхности вириона необходим для прохождения полноценного инфекционного цикла вируса гриппа в восприимчивом организме как человека, так и животных. Вируснейтрализующие антитела, вырабатываемые в инфицированном ор-

ганизме, направлены в большей степени именно против HA [6], а активность нейраминидазы определяет эффективность распространения новых инфекционных вирусных частиц [7]. Эффективность современных противогриппозных препаратов определяется также свойствами NA, поскольку именно соединения, ингибирующие активность NA вирусов гриппа (такие, как озельтамивир и занамивир), признаны на сегодняшний день наиболее эффективными средствами специфической противогриппозной этиотропной терапии [8].

**Цель работы** – оценка соответствия вирусов, выделяемых от больных гриппом, штаммам, входящим в состав сезонных вакцин, применяемых на территории РФ.

## Материалы и методы

Материалы для выделения вирусов гриппа (назофарингеальные мазки и секционные материалы) были получены из больниц и поликлиник Санкт-Петербурга, а также из базовых вирусологических лабораторий Федерального центра по гриппу (БВЛ). Кроме эпидемических изолятов 2013 – 2014 годов выделения в работе были использованы вирусы гриппа человека, птиц и свиней из коллекции НИИ гриппа, а также присланные из международных центров ВОЗ (CDC&P, Атланта, США; NIMR, Лондон, Великобритания) и НИИ проблем биологической безопасности (Казахстан). Все работы со штаммами гриппа птиц осуществлялись в боксах биобезопасности стандарта BSL-3.

Выделение и восстановление вирусов осуществлялись на клеточных линиях MDCK или MDCK-Siat1 (CDC, Атланта, США) и на 10-дневных куриных эмбрионах («Племрепродуктор», пос. Синявино Ленинградской области).

**Идентификацию вирусов гриппа** проводили согласно Методическим рекомендациям ВОЗ [9] и «Выделение вирусов в клеточных культурах и куриных эмбрионах и их идентификация» [10]. Идентифицировали вирусы в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) с набором диагностических сывороток ВОЗ.

**Антигенный анализ** проводили в РТГА с использованием панели гипериммунных крысиных антисывороток, полученных к эпидемическим и референс-штаммам вирусов гриппа разных лет выделения.

**Антигенное картирование** выполняли по методу, приведенному в работе [11], с использованием программного обеспечения, доступного на сайте <http://antigenic-cartography.org>; впервые был применен метод 3D-антигенных карт.

Филогенетический анализ ряда российских штаммов последнего сезона был проведен в Сотрудничавшем центре (СЦ) ВОЗ в Лондоне [12].

**Определение активности нейраминидазы** проводили согласно методике, приведенной в Руководстве ВОЗ [9]. Учет результатов флуоресценции осуществляли на планшетном ридере VarioScan

(ThermoFisher Scientific, Германия) при длинах волн возбуждения 360 нм, испускания – 460 нм соответственно. Активность фермента выражали в мкмоль 4-метилумбеллиферона (4-MU) по флуоресцентному продукту ферментативной реакции нейраминидазы с синтетическим субстратом MUNANA, отщепленному от субстрата за 1 мин на 1 мл вирусной суспензии. Активность вычисляли по калибровочной кривой, построенной по различным концентрациям 4-MU.

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ Statistica 10.0, используя t-критерий Стьюдента (уровень значимости  $p < 0,05$ ), однофакторный дисперсионный, корреляционный и регрессионный анализы.

### Результаты и обсуждение

Сезон 2013 – 2014 годов в России характеризовался относительно низкой интенсивностью эпидемического процесса. В эпидемический по гриппу период в НИИ гриппа и в БВЛ Федерального центра по надзору за гриппом было проанализировано 495 штаммов вируса гриппа.

В структуре общей популяции доля вирусов гриппа А обоих подтипов была примерно одинакова, удельный вес штаммов с антигенной формулой А(Н1N1)pdm09 составил 46,3%, А(Н3N2) – 44,2%. Было выявлено, что в азиатской части России преимущественно циркулировали вирусы гриппа А(Н1N1)pdm09 – 89,5% всех изолятов, выделенных на этой территории, а в европейской части доминировали вирусы гриппа А(Н3N2) – 83,9%.

Доля вирусов гриппа В составила 9,5% (47 штаммов) от всех изолятов. В отличие от 2005 – 2012 годов [13] вирусы гриппа В Ямагатской ветви получили наибольшее распространение (43 вируса) в сравнении с представителями Викторианской группы этого возбудителя и циркулировали во всех федеральных округах России. Вирусы гриппа В Викторианской разновидности (4 изолята) были выделены только в Сибири и на Дальнем Востоке.

В октябре–декабре 2013 года были выделены три предэпидемических штамма: А/С.-Петербург/428/13 (Н3N2), В/Хабаровск/43/13 и А/Москва/18/13 (Н1N1)pdm09. Основная масса вирусов гриппа А обоих подтипов была выделена в марте. Вирусы гриппа В были изолированы в основном в апреле–мае 2014 года, что характерно для этого возбудителя, циркулирующего, как правило, в конце эпидемий, вызываемых вирусами гриппа типа А.

Все вирусы А(Н3N2) и В были выделены в культуре клеток MDCK или MDCK-Siat1, и только вирусы подтипа А(Н1N1)pdm09 (21 штамм) были изолированы или восстановлены на куриных эмбрионах. Эти данные свидетельствуют о том, что вирусы гриппа подтипов А(Н3N2) и В практически полностью утратили сродство к клеткам и тканям куриных эмбрионов, в отличие от вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09, что указывает на разную рецепторную специфичность этих возбудителей [14, 15].

### Результаты антигенного анализа

Вирусы А(Н1N1)pdm09. Основная масса проанализированных в РТГА штаммов сезона 2013 – 2014 годов была антигенно близка к эталону А/Калифорния/07/09, входящему в состав трехвалентной противогриппозной вакцины этого сезона. Выделенные вирусы также реагировали с титрами до 1 – 1/4 гомологичного титра с антисыворотками к современным референс-штаммам А/Южная Каролина/20/10, А/Крайстчерч/16/10, А/Гонконг/5659/12, А/С.-Петербург/27/11 и к российским изолятам, выбранным нами в качестве референс-штаммов (А/С.-Петербург/26/13 и А/С.-Петербург/6/2014). Исключением был штамм пандемического гриппа 2009 года, выделенный от больной, прибывшей из Саудовской Аравии. Вирус А(Н1N1)/Москва/18/13pdm09 существенно отличался от эталона А(Н1N1)/Калифорния/07/09 и взаимодействовал с сывороткой к нему лишь до 1/8 гомологичного титра. По результатам секвенирования и филогенетического анализа, проведенного СЦ ВОЗ в Лондоне, данный вирус принадлежит к редко регистрируемой в сезоне 2012 – 2013 годов в России генетической группе 6В [12, 16], что и объясняет его антигенное отличие от остальных изолятов прошедшего сезона.

Данные исследования указывают на отсутствие значимых изменений антигенных свойств молекулы НА вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 с момента его появления в человеческой популяции в 2009 году, несмотря на постепенное накопление точечных мутаций в соответствующем гене. Такая «молчащая изменчивость» считается характерной эволюционной чертой вирусов подтипа А(Н1N1) [16 – 18].

На основании данных РТГА было произведено трехмерное антигенное картирование изолятов 2009 – 2014 годов выделения. По результатам математического моделирования итогов РТГА была получена трехмерная карта (рис. 1), на которой видна тенденция обособления ряда штаммов 2013 года и всех штаммов 2014 в отдельную группу, хотя большинство штаммов предыдущих лет выделения сгруппировано в единое «пятно» вокруг сывороток, полученных к эталонным и референс-штаммам, что указывает на возможное начало антигенного дрейфа вирусов А(Н1N1)pdm09 в сравнении с ранними изолятами.

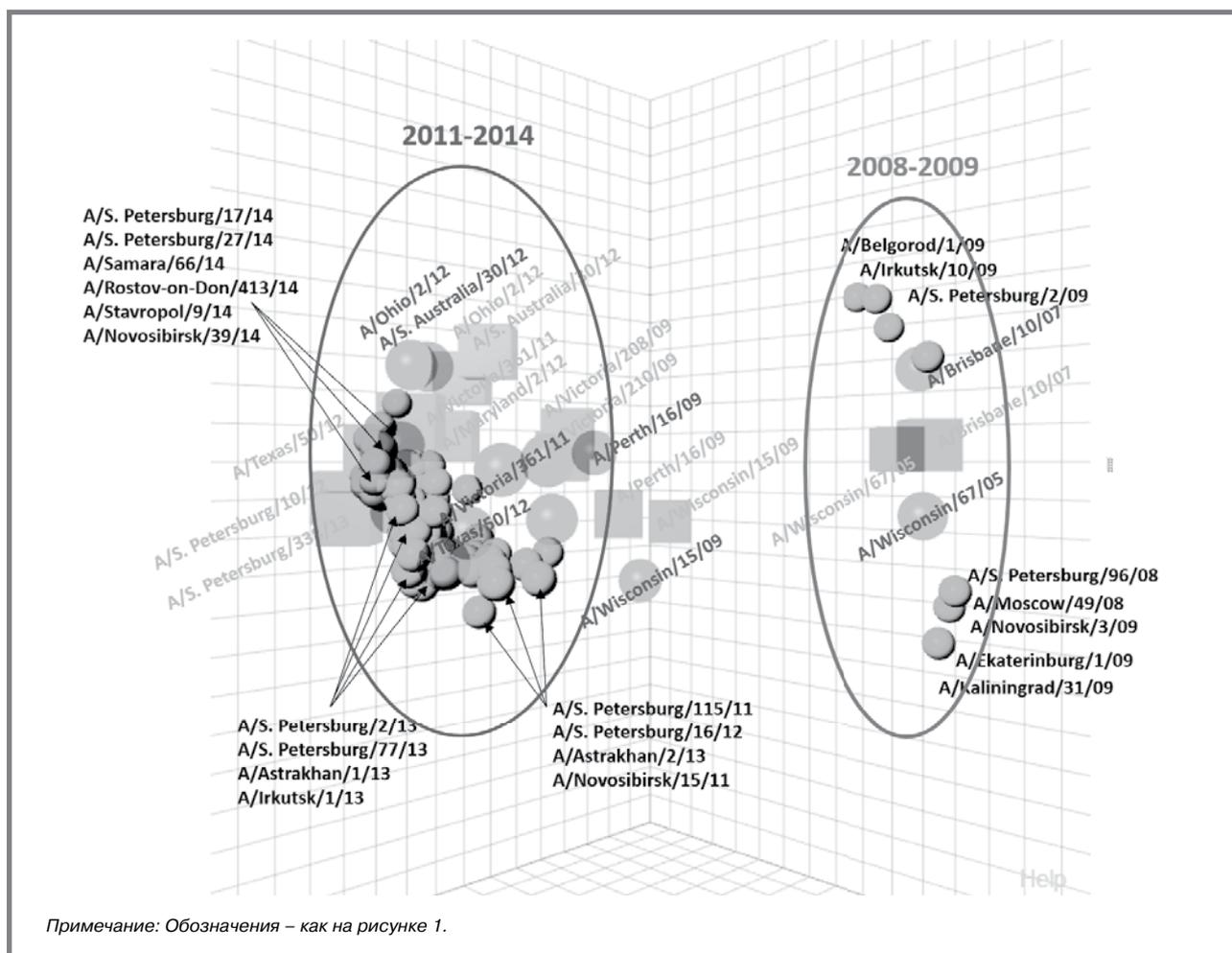
Филогенетический анализ ряда российских штаммов последнего сезона, проведенный СЦ ВОЗ в Лондоне, показал, что в отличие от предыдущего сезона 2012 – 2013 годов, в котором наибольшее распространение получили вирусы генетической группы 6С [12], абсолютное большинство штаммов сезона 2013 – 2014 годов принадлежало к генетической группе 6В (эталонный штамм – А/Стокгольм/15/13), что совпадало с общемировыми тенденциями циркуляции вирусов А(Н1N1)pdm09 [19].

**Вирусы А(Н3N2).** Основная масса вирусов, циркулировавших на территории России в 2013 – 2014 годах, была близка по антигенным свойствам



Рисунок 2.

3D-антигенная карта вирусов гриппа А(Н3N2), выделенных в России в 2009 – 2014 годах



Примечание: Обозначения – как на рисунке 1.

Трехмерная антигенная карта наглядно демонстрирует последовательный антигенный дрейф вирусов А(Н3N2) в течение нескольких эпидемических сезонов.

**Вирусы гриппа В.** Представители двух антигенных линий вируса гриппа В – Ямагатской и Викторианской – имеют настолько выраженные антигенные отличия, что не взаимодействуют между собой в РТГА. Поэтому данные по антигенной картографии представлены отдельно для каждой ветви изученных вирусов В.

Вирусы Ямагатской разновидности 2014 года выделения хорошо взаимодействовали с антисыворотками к изолятам 2011 – 2012 годов (практически все – до гомологичного титра), несколько хуже – с антисыворотками к вирусам предыдущего эпидемического сезона 2012 – 2013 годов и вакцинному штамму В/Массачусетс/2/12 (1/4 гомологичного титра), что наглядно представлено на 3D-антигенной карте Ямагатских штаммов (рис. 3).

Эти исследования подтверждаются также данными секвенирования: филогенетический анализ показал, что вирусы 2013 – 2014 годов выделения, так же как вирусы сезона 2011

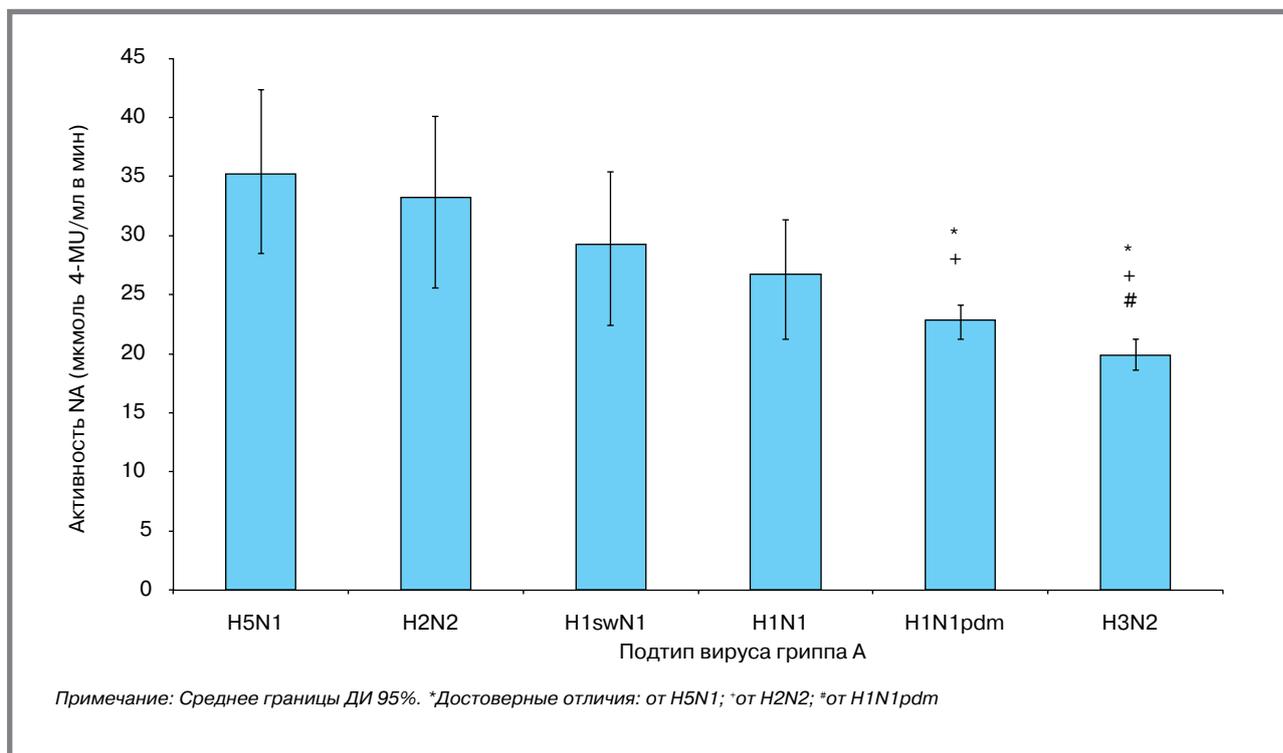
– 2012 годов, принадлежат к генетической группе 3 (В/Висконсин/1/10-подобные), а возбудители предыдущего сезона 2012 – 2013 года – к генетической группе 2 (Массачусетс/02/12-подобные) [12, 19].

Вирусы Викторианской линии так же хорошо реагировали с антисывороткой к актуальному вакцинному штамму В/Брисбен/60/08, как и с антисыворотками к штаммам, циркулировавшим на территории России в сезоны 2010 – 2013 годов (до 1 – 1/2 гомологичного титра) (рис. 4). По результатам филогенетического анализа эти вирусы относятся к генетической группе 1А В/Брисбен/60/08-подобных штаммов [12, 19].

Таким образом, было установлено, что вирусы гриппа В Ямагатской разновидности, циркулировавшие на территории России в сезон 2013 – 2014 годов, несколько отличались по антигенным свойствам от штамма В/Массачусетс/2/12, рекомендованного в качестве вакцинного компонента на указанный сезон, в то время как вирусы Викторианской разновидности, получившие меньшее распространение в описываемый эпидемический сезон, полностью соответствовали вакцинному штамму В/Брисбен/60/08.



**Рисунок 5.**  
Активность нейраминидазы различных подтипов вируса гриппа А



#### Чувствительность штаммов к противовирусным препаратам и анализ их нейраминидазной активности

В результате секвенирования гена нейраминидазы вирусов 2013 – 2014 годов в НИИ гриппа и СЦ ВОЗ в Атланте (США) и Лондоне (Великобритания) не было обнаружено мутаций, определяющих устойчивость к озельтамивиру и занамивиру. При этом все проанализированные штаммы оказались генетически резистентными к ремантадину, а также чувствительными к ингибиторам нейраминидазы по результатам флуоресцентного MUNANA-теста.

Флуоресцентный MUNANA-тест дал возможность количественно проанализировать в широком масштабе активность нейраминидазы вирусов гриппа А различных антигенных формул, лет выделения и хозяев (человек, птицы, свиньи), что, по нашему мнению, могло бы явиться дополнительной важной биологической характеристикой штаммов. С применением MUNANA-теста нами было исследовано 203 штамма. Прежде всего была отмечена довольно слабая, хотя и достоверная корреляция ( $r = 0,515$ ;  $p < 0,05$ ) между активностью нейраминидазы и титрами гемагглютинаина. Существование зависимости между активностью фермента и титром вируса было однозначно подтверждено однофакторным дисперсионным анализом ( $F = 10,3$  ( $df = 8$ ;  $n = 189$ ),  $p = 0,000...$ ), а также регрессионным анализом ( $R = 0,505$  ( $F = 66,32$ ;  $df = 1,194$ ;  $p = 0,000...$ )). Это подтверждает связь между активностями двух основных поверхностных белков вируса гриппа и свидетельствует о важности функционального ба-

ланса HA и NA для эффективной гриппозной инфекции. В то же время нами отмечено значительное число индивидуальных отклонений при анализе отдельных изолятов: зарегистрированы случаи высокой активности нейраминидазы при низком титре гемагглютинаина и наоборот; однако большой объем анализируемой выборки позволил однозначно установить их достоверную связь. Самая высокая активность нейраминидазы отмечена для вирусов гриппа птиц подтипа A(H5N1), причем как для высоко-, так и для низкопатогенных (средняя активность –  $35,26 \pm 6,93$  мкмоль 4-MU/мл в мин), на втором месте идут музейные штаммы вируса A(H2N2) –  $33,65 \pm 7,27$  мкмоль 4-MU/мл в мин, в то время как современные штаммы A(H3N2) и A(H1N1)pdm09 продемонстрировали гораздо более низкую активность, которая сильно варьировала между штаммами даже одного сезона. Средняя активность 69-ти пандемических штаммов A(H1N1)pdm09 составила  $22,82 \pm 1,46$  мкмоль 4-MU/мл в мин, а 96-ти штаммов A(H3N2) –  $19,86 \pm 1,33$  мкмоль 4-MU/мл в мин (отличие достоверно:  $t = 2,62$ ;  $n = 165$ ,  $p = 0,0096$ ).

Если рассматривать все проанализированные штаммы (человека, птиц, свиней) разных лет выделения, то в целом активность нейраминидазы подтипа N1 была несколько выше, чем подтипа N2, – соответствующие цифры составили  $23,74 \pm 1,70$  и  $20,51 \pm 1,56$  мкмоль 4-MU/мл в мин. Отличие достоверно ( $t = 3,03$ ;  $p = 0,028$ ), что подтверждено дисперсионным анализом ( $F = 7,8$ ;  $df = 1$ ;  $n = 196$ ;  $p = 0,0057$ ). На рисунке 5 представлены данные по активности нейраминидазы в зави-

симости от подтипа вируса гриппа, полученные в результате однофакторного дисперсионного анализа. Из полученных данных наиболее убедительное объяснение находит высокая активность нейраминидазы вирусов гриппа птиц A(H5N1), что согласуется с высокой инфекционной активностью этих вирусов, наиболее широким спектром чувствительных к ним клеточных линий человека и животных, способностью вызывать апоптоз клеток в культуре в широком диапазоне инфекционных доз [20].

## Выводы

1. В эпидемический сезон 2013 – 2014 годов в России циркулировали вирусы гриппа A(H1N1)pdm09, A(H3N2) и B. Их удельный вес в структуре вирусной популяции составил соответственно 46,3 (229), 44,2 (219) и 9,5% (47).

2. Антигенный анализ 495 штаммов гриппа, выделенных на территории России в эпидемический сезон 2013 – 2014 годов, продемонстрировал их соответствие рекомендованному ВОЗ штаммовому составу противогриппозной вакцины на данный эпидсезон.

3. Количественный анализ нейраминидазной активности 203 вирусов гриппа A различных антигенных формул, лет выделения и хозяев (человек, птицы, свиньи) во флуоресцентном MUNANA-тесте показал наиболее высокую среднюю активность фермента у вирусов гриппа птиц A(H5N1) и существенно более низкую – современных штаммов подтипов A(H3N2) и A(H1N1)pdm09, причем в целом активность нейраминидазы подтипа N1 была выше, чем подтипа N2.

## Литература

1. Покровский В.И., гл. ред., Сандахгиев Л.С., Малеев В.В., Киселев О.И., ред., Цыбалова Л.М., ред. Грипп птиц: происхождение инфекционных биокатастроф: Сборник статей. Издание 2. Санкт-Петербург: 2-е изд. Росток; 2012.
2. Киселев О.И. Геном пандемического гриппа A/H1N1v-2009. Санкт-Петербург: Димитрейд график групп; 2011.
3. Monto A.S., Sellwood C. History and epidemiological features of pandemic influenza. In: *Pandemic Influenza*, 2<sup>nd</sup> ed. Eds.: J. Van-Tam, C. Sellwood. CAB International; 2013.
4. WHO Report «Influenza at the human-animal interface». Доступно на: [www.who.int/influenza/human\\_animal\\_interface](http://www.who.int/influenza/human_animal_interface)
5. WHO Report 18 «Confirmed human cases of avian influenza A(H7N9) reported to WHO». Доступно на: [www.who.int/influenza/human\\_animal\\_interface](http://www.who.int/influenza/human_animal_interface)
6. Palese P. Why do influenza viruses die out? A Hypothesis. *mBio*. 2011; 2 (5): e00150-11.
7. Air G. Influenza neuraminidase. *Influenza and other respiratory diseases*. 2012; 6: 245 – 256.
8. Киселев О.И. Химиопрепараты и химиотерапия гриппа. Санкт-Петербург: Издательство Росток; 2012.
9. WHO Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. Доступно на: [http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241548090\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241548090_eng.pdf)
10. Соминина А.А., Бурцева Е.И., Лобова Т.Г., Коновалова Н.И., Гудкова Т.М., Литвинова О.М. и др. Выделение вирусов гриппа в клеточных культурах и куриных эмбрионах и их идентификация: Методические рекомендации. Санкт-Петербург; 2006.
11. Smith D.J., Lapedes A.S., de Jong J.C., Bestebroer T.M., Rimmelzwaan G.F., Osterhaus A.D.M.E. et al. Mapping the antigenic and genetic evolution of influenza virus. *Science*. 2004; 305: 371 – 376.
12. World Health Organization Influenza Centre. NIMR interim report February 2014. Доступно на: <http://www.nimr.mrc.ac.uk/documents/about/NIMR-report-Feb2014-web.pdf>
13. Лобова Т.Г., Прокопеч А.В., Комиссаров А.Б., Даниленко Д.М., Суховецкая В.Ф., Гудкова Т.М. и др. Эволюционная изменчивость вирусов гриппа B, циркулировавших в Российской Федерации с 2005 по 2012 г. *Вопросы Вирусологии*. 2012; 57 (6): 22 – 26.
14. Lin Y.P., Xiong X., Wharton S.A., Martin S.R., Coombs P.J., Vachieri S.G. et al. Evolution of the receptor-binding properties of the influenza A(H3N2) hemagglutinin. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*. 2012; 109: 21474 – 21479.
15. Casalegno J.-S., Ferraris O., Escuret V., Bouscambert M., Bergeron C., Lin S.L. et al. Functional balance between the hemagglutinin and neuraminidase of the influenza A(H1N1)pdm09 HA D222 variants. *PLoS ONE*. 2014; 9 (8): e104009.
16. Даниленко Д.М. Анализ эволюционной изменчивости и биологических свойств вирусов пандемического гриппа A(H1N1)pdm09, циркулировавших в России в период с 2009 по 2013 гг: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Санкт-Петербург; 2014.
17. Nelson M.I., Simonsen L., Viboud C., Miller M.A., Taylor J., St George K. et al. Stochastic processes are key determinants of short-term evolution in influenza A virus. *PLoS Pathog*. 2006; 2: e138.
18. Коновалова Н.И. Эволюционная изменчивость вирусов гриппа А, циркулировавших в России в 1997 – 2007 гг: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Санкт-Петербург; 2009.
19. World Health Organization Influenza Centre. NIMR interim report September 2014. Доступно на: <http://www.nimr.mrc.ac.uk/documents/about/NIMR-VCM-report-Sep-14-web.pdf>
20. Даниленко Д.М., Смирнова Т.Д., Гудкова Т.М., Еропкин М.Ю., Киселев О.И. Сравнительное изучение чувствительности клеточных линий различного происхождения к вирусам пандемического гриппа H1N1v, вирусам гриппа птиц, свиней и человека. *Вопросы вирусологии*. 2011; 56 (6): 14 – 19.

## References

1. Pokrovskiy V.I., Sandakhgiev L.S., Maleev V.V., Kiselev O.I., Tsybalova L.M., ed. *Avian influenza: origin of infectious biocatastrophes: Фarticle series*. 2<sup>nd</sup> ed. Saint-Petersburg: Rostok; 2012 (in Russian).
2. Kiselev O.I. *Genome of pandemic influenza A/H1N1v-2009*. Saint-Petersburg: Dimitrade graphic group; 2011 (in Russian).
3. Monto A.S., Sellwood C. History and epidemiological features of pandemic influenza. In: *Pandemic Influenza*. 2<sup>nd</sup> ed. Eds.: J. Van-Tam, C. Sellwood. CAB International; 2013.
4. WHO Report «Influenza at the human-animal interface». Available at: [www.who.int/influenza/human\\_animal\\_interface](http://www.who.int/influenza/human_animal_interface).
5. WHO Report 18 «Confirmed human cases of avian influenza A(H7N9) reported to WHO». Available at: [www.who.int/influenza/human\\_animal\\_interface](http://www.who.int/influenza/human_animal_interface)
6. Palese P. Why do influenza viruses die out? A Hypothesis. *mBio*. 2011; 2 (5): e00150-11.
7. Air G. Influenza neuraminidase. *Influenza and other respiratory diseases*. 2012; 6: 245 – 256.
8. Kiselev O.I. *Antivirals and chemotherapy of influenza*. Saint-Petersburg: Publishing house Rostok; 2012 (in Russian).
9. WHO Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. Available at: [http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241548090\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241548090_eng.pdf)
10. Sominina A.A., Burtseva E.I., Lobova T.G., Konovalova N.I., Gudkova T.M., Litvinova O.M. et al. Isolation of influenza viruses in cell lines and embryonated chicken eggs and their identification. *Guidelines Saint-Petersburg*; 2006 (in Russian).
11. Smith D.J., Lapedes A.S., de Jong J.C., Bestebroer T.M., Rimmelzwaan G.F., Osterhaus A.D.M.E. et al. Mapping the antigenic and genetic evolution of influenza virus. *Science*. 2004; 305: 371 – 376.
12. World Health Organization Influenza Centre. NIMR interim report February 2014. Available at: <http://www.nimr.mrc.ac.uk/documents/about/NIMR-report-Feb2014-web.pdf>
13. Lobova T.G., Prokopetz A.V., Komissarov A.B., Danilenko D.M., Sukhovetskaya V.F., Gudkova T.M. et al. Evolutionary variability of influenza B viruses that circulated in Russian Federation from 2005 to 2012. *Voprosy Virusologii*. 2012; 57 (6): 22 – 26 (in Russian).
14. Lin Y.P., Xiong X., Wharton S.A., Martin S.R., Coombs P.J., Vachieri S.G. et al. Evolution of the receptor-binding properties of the influenza A(H3N2) hemagglutinin. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*. 2012; 109: 21474 – 21479.

15. Casalegno J.-S., Ferraris O., Escuret V., Bouscambert M., Bergeron C., Lines L. et al. Functional balance between the hemagglutinin and neuraminidase of the influenza A(H1N1)pdm09 HA D222 variants. *PLoS ONE*. 2014; 9 (8): e104009.
16. Danilenko D.M. Analysis of evolutionary changeability and biological properties of pandemic A(H1N1)pdm09 influenza viruses that circulated in Russia from 2009 to 2013: Author's abstract of PhD thesis. Saint-Petersburg; 2014 (in Russian).
17. Nelson M.I., Simonsen L., Viboud C., Miller M.A., Taylor J., George K. et al. Stochastic processes are key determinants of short-term evolution in influenza A virus. *PLoS Pathog.* 2006; 2: e138.
18. Konovalova N.I. Evolutionary changeability of influenza A viruses that circulated in Russia in 1997 – 2007: Doctorate of ... med. sci. diss. Saint-Petersburg; 2009 (in Russian).
19. World Health Organization Influenza Centre. NIMR interim report September 2014. Available at: <http://www.nimr.mrc.ac.uk/documents/about/NIMR-VCM-report-Sep-14-web.pdf>.
20. Danilenko D.M., Smirnova T.D., Gudkova T.M., Eropkin M.Yu., Kiselev O.I. Comparative study of susceptibility of cell lines of various origin to pandemic H1N1v, avian, swine and human seasonal influenza viruses. *Voprosi Virusologii*. 2011; 56 (6): 14 – 19 (in Russian).

## Применение мультиплексного иммуночипового анализа (ФОСФАН™) и полимеразной цепной реакции для лабораторной диагностики иксодовых клещевых боррелиозов

Т.И. Кузнецова<sup>1</sup>, В.Г. Помелова<sup>2</sup> (v.pomelova@immunoscreen.ru),  
Э.И. Коренберг<sup>3</sup>, Н.С. Осин<sup>4</sup>

<sup>1</sup>ГБУЗ Пермского края «Пермская краевая клиническая инфекционная больница», Пермь

<sup>2</sup>ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт биологического приборостроения» ФМБА России, Москва

<sup>3</sup>ФГБУ «ФНИЦЭМ им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва

<sup>4</sup>ЗАО «Иммюноскрин», Москва

### Резюме

Оценена эффективность применения методов мультиплексного иммуночипового анализа (ФОСФАН™) на основе пептида С6 и полимеразной цепной реакции (nested ПЦР) для лабораторной диагностики иксодовых клещевых боррелиозов (ИКБ). Исследование проведено с участием 155 больных с локализованной и диссеминированной стадией заболевания, в том числе с микст-инфекцией с гранулоцитарным анаплазмозом человека. Положительные результаты в ФОСФАН зарегистрированы соответственно у  $78 \pm 7,7$  и  $91 \pm 11,7\%$  пациентов с эритемной или безэритемной формой ИКБ, в ПЦР – у  $26 \pm 8,2$  и  $72 \pm 17,1\%$ . Максимальная частота выявления положительных проб обоими методами наблюдалась в основном на 2 – 4-й неделе от начала заболевания или на 22 – 35-й день после присасывания клеща. В целом ФОСФАН обеспечивал серологическое подтверждение заболевания ИКБ у 52 из 55 ( $94,5 \pm 6,2\%$ ) больных, в крови которых была обнаружена ДНК боррелий. Лишь 3 пациента с положительным результатом ПЦР (один – с эритемной и два – с безэритемной формой ИКБ) оказались серонегативными. Полученные данные подтверждают высокую эффективность ФОСФАН для серологической верификации ИКБ как на локализованной, так и на диссеминированной стадии болезни. Применение ПЦР (в дополнение к ФОСФАН) целесообразно в определенные сроки (не позднее 2 – 3-й недели от начала заболевания) в случаях, когда необходимо уточнить диагноз у серонегативных больных, имеющих клинические признаки, характерные для безэритемной формы, или нетипичные кожные проявления, вызывающие сомнения при постановке диагноза эритемной формы ИКБ.

**Ключевые слова:** иксодовые клещевые боррелиозы, гранулоцитарный анаплазмоз человека, мультиплексный иммуночиповый анализ ФОСФАН™, пептид С6, рекомбинантный белок VisE, nested ПЦР

### The Use of Multiplex Phosphorescence Analysis (PHOSPHAN™) and Polymerase Chain Reaction for Laboratory Diagnosis of Ixodid Tick-borne Borrelioses

T.I. Kuznetsova<sup>1</sup>, V.G. Pomelova<sup>2</sup> (v.pomelova@immunoscreen.ru), E.I. Korenberg<sup>3</sup>, N.S. Osin<sup>4</sup>

<sup>1</sup>State Budgetary Healthcare Institution «Perm' Regional Clinical Infectious Diseases Hospital» of Perm'

<sup>2</sup>Federal State Unitary Enterprise «Institute for Biological Instrumentation» of the Federal Biomedical Agency of Russia, Moscow

<sup>3</sup>Federal State Budgetary Institution «Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named honorary academician N.F. Gamaleya» of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

<sup>4</sup>Closed Joint Stock Company «Immunoscreen», Moscow