

РОЛЬ ПРЕДСУЩЕСТВУЮЩИХ ВИРУССПЕЦИФИЧНЫХ IgG В ПАТОГЕНЕЗЕ РЕСПИРАТОРНО- СИНЦИТИАЛЬНОЙ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ ПРИ ПЕРВИЧНОМ И ПОВТОРНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

В.З. Кривицкая¹, Е.М. Войцеховская¹, В.Ф. Суховецкая¹,
Е.Г. Головачева¹, Н.И. Львов², А.А. Соминина¹

¹ФГБУ НИИ гриппа Минздрава России, Санкт-Петербург

²ФГКВ ОУ ВПО Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова Министерства обороны Российской Федерации, Санкт-Петербург

Резюме. Цель работы — оценка связи между содержанием в крови предсуществующих IgG, специфичных к респираторно-синцициальному вирусу (РСВ), течением РСВ-инфекции и характером РСВ-специфического гуморального ответа у пациентов различных возрастных групп. Детекцию антител проводили в ИФА с использованием цельновирионного РСВ или синтетических пептидов, имитирующих структуру отдельных эпитопов поверхностных белков РСВ. Показано, что РСВ-специфические материнские IgG, пассивно приобретенные *in utero*, могут циркулировать в крови детей вплоть до 10 месяцев жизни. Анализ парных сывороток 45 детей в возрасте 1–10 месяцев впервые выявил, что наличие материнских IgG, специфичных к консервативным В-клеточным иммуногенным детерминантам F-белка (аминокислотная последовательность 221–232) и/или G-белка РСВ (последовательности 152–164 и 184–198), сопряжено с более высокой частотой заболеваемости первичной РСВ-инфекцией (89% против 56%, $p = 0,023$), а также повышенной частотой осложненного бронхообструкцией течения заболевания (81% против 20%, $p = 0,001$) по сравнению с детьми, серонегативными в отношении материнских эпитоп-специфических антител. Корреляционный анализ показал, что высокое содержание в крови материнских эпитоп-специфических IgG при первичной РСВ-инфекции у детей до 10 месяцев жизни ассоциировано с дисбалансом гуморального противовирусного иммунного ответа: интенсивным синтезом сывороточных анти-РСВ IgA, что является признаком осложненного течения заболевания, при одновременной супрессии ответа со стороны РСВ-специфических IgG. В отличие от первичной РСВ-инфекции, у пациентов старше 3 лет ($n = 121$) не было выявлено связи между анамнестическими эпитоп-специфическими IgG, синтезированными собственной иммунной системой в результате предшествующих эпизодов заболевания, и синтезом анти-РСВ IgG, IgM, IgE и IgA при РСВ-реинфекциях. В противоположность грудным детям для пациентов старшего возраста была установлена обратная связь между уровнем предсуществующих эпитоп-специфических «IgG памяти» и частотой диагностирования РСВ-инфекции.

Ключевые слова: респираторно-синцициальная вирусная инфекция, первичное и повторное заболевание, дети и взрослые, предсуществующие эпитоп-специфические IgG, иммуноферментный анализ.

поступила в редакцию 16.10.2012
принята к печати 19.10.2012

Адрес для переписки:

Кривицкая Вера Зорьевна,
к.б.н., ведущий научный сотрудник
лаборатории биотехнологии
диагностических препаратов
ФГБУ НИИ гриппа МЗиСР РФ

197376, Санкт-Петербург,
ул. Проф. Попова, 15/17,
ФГБУ НИИ гриппа МЗиСР РФ
Тел./факс: (812) 499-15-72 (служебн.);
8 921 886-37-95 (моб.).
E-mail: vera.kriv@influenza.spb.ru

© Кривицкая В.З. и соавт., 2012

ROLE OF PREEXISTING VIRUS-SPECIFIC IgG IN PRIMARY DISEASE AND IN REINFECTION WITH RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS**Krivitskaya V.Z., Voitsehovskaya E.M., Suhovetskaya V.F., Golovachova E.G., Lvov N.I., Sominina A.A.**

Abstract. The aim of the study is evaluation of links between presence in blood of specific pre-existing IgG to respiratory-syncytial virus (RSV), clinical course of RSV infection and character specific to RSV humoral immune response in patients of different ages. The antibodies were detected by ELISA using whole RS virus or synthetic peptides corresponded to the selected determinants of the envelope RSV proteins. It was shown that RS specific maternal IgG antibodies passively transferred to babies in utero can circulate in the blood up to 10 months of life. The analysis of paired sera of 45 babies in the age of 1–10 months revealed firstly that presence of maternal IgG specific antibodies to the conservative B-cell immunogenic determinants of the F-protein (amino acids 221–232) and/or the G-protein (amino acids 152–164 and 184–198) is coupled with more high morbidity of primary RSV infection (89% versus 56%, $p = 0.023$), and also with more high frequency of complicated by bronchus obstruction course of the disease (81% versus 20%, $p = 0.001$) in compare with babies who were serologically negative to the maternal determinants specific antibodies. The correlation analysis has shown that the high presence of maternal determinant-specific IgG in the blood in babies till 10 months of life is associated in the case of primary infection with disbalance of humoral anti-viral immune response: intensive synthesis of serum RSV IgA. This is evidence of complicated course of infection with simultaneous suppression of response to RSV specific IgG. As opposed to the primary RSV infection in patients older than 3 years ($n = 121$) it was not detected links between anamnestic determinant-specific IgG synthesized by own immune system as the results of previous disease episodes and synthesis of anti-RSV IgG, IgM, IgE and IgA in RSV re-infections. In the contrast to babies in more older patients the feedback connection between level of pre-existing determinant-specific “memory IgG” and diagnostics of RSV infection has been established. (*Infekc. immun.*, 2012, vol. 2, N 4, p. 705–714)

Key words: respiratory syncytial virus infection, primary disease and in reinfection, children and adults, preexisting epitope-specific IgG, enzyme-linked immunosorbent assay.

Уровень восприимчивости ко многим инфекционным заболеваниям, включая РСВ-инфекцию (РСВИ), зависит от возраста индивидуума. По мере взросления человека увеличивается число контактов с чужеродными антигенами. Параллельно с этим происходит «созревание» иммунной системы. В этой связи иммунный ответ при повторных эпизодах заболевания значительно отличается от такового при первичном контакте с вирусом. Реинфекции, как правило, развиваются на фоне предсуществующих вирусспецифических антител (АТ), являющихся «иммуноглобулинами памяти», синтезированными в результате перенесенных ранее заболеваний.

Роль предсуществующих АТ неоднозначна. Помимо быстрой элиминации чужеродных антигенов они выполняют функцию иммуномодуляторов: в зависимости от обстоятельств, работая по принципу обратной связи, они могут стимулировать или, наоборот, ингибировать иммунный ответ, формирующийся при воздействии соответствующего антигена (АГ). Такие механизмы описаны для АГ-специфических АТ как пассивно приобретенных, так и синтезированных собственной иммунной системой [13, 14]. Активно дискутируемым вопросом внутри проблемы является роль материнских АТ. В крови новорожденных детей изначально присутствуют высокоаффинные IgG различной специфичности, включая противовирус-

ные. При этом в отличие от предсуществующих АТ у лиц старшего возраста, которые образуются в результате деятельности собственной иммунной системы, у грудных детей они являются экзогенными, пассивно приобретенными *in utero* в результате рецептор-зависимого трансплацентарного переноса IgG из крови матери (АТ других классов не проникают через плаценту). Так, у женщин, серопозитивных к РСВ, рождаются дети с содержанием в крови анти-РСВ IgG, равным материнскому [11]. При этом роль материнских IgG (m-IgG) в защите от РСВИ, а также степень их влияния на формирование собственного противовирусного адаптивного иммунитета у детей первого года жизни во многом не ясна, имеющиеся в литературе данные противоречивы. С одной стороны, протективные свойства пассивно введенных анти-РСВ IgG продемонстрированы в модельных экспериментах по инфицированию лабораторных животных [20]. Результаты ряда эпидемиологических исследований также свидетельствуют об обратно пропорциональной зависимости между заболеваемостью РСВИ среди новорожденных детей и содержанием у них в крови РСВ-специфических m-IgG [10]. По данным других исследователей m-IgG не обеспечивают протекцию от инфекции. Напротив, они могут оказывать супрессорное действие на формирование собственного гуморального противовирусного ответа у ин-

фицированных новорожденных телят и детей [21, 23]. Характерно, что наибольшая частота тяжелого течения РСВИ наблюдается в первые 2–3 месяца жизни, когда у большинства новорожденных детей в крови присутствуют РСВ-специфические материнские АТ.

Для прояснения вопроса нами был проведен анализ связи между предсуществующими IgG, взаимодействующими как с цельновирионным РСВ (РСВ-ЦВ), так и с тремя функционально важными антигенными детерминантами поверхностных гликопротеинов РСВ, течением РСВИ и характером РСВ-специфического гуморального ответа, формирующимся у пациентов различных возрастных групп.

Материалы и методы

Клинические материалы. Были проанализированы парные сыворотки, полученные в острой (не позднее третьего дня заболевания) и реконвалесцентной фазах ОРВИ (в среднем через 2,5 и 9,7 дней после появления симптомов заболевания) от 65 детей в возрасте от месяца до года, впервые заболевших респираторными заболеваниями, а также от 268 пациентов старших возрастных групп — детей и подростков от 3 до 18 лет и взрослых от 18 до 45 лет.

Диагностика заболевания. РСВИ диагностировали комплексом методов: детекцией вирусных АГ в клетках эпителия носовых ходов и секретах носовой полости в реакции иммунофлюоресценции и ИФА (флюоресцентные диагностикумы и ИФА-тест-системы производства ООО «ППДП» НИИ гриппа), выявлением сывороточных РСВ-специфических IgM, сероконверсий IgG, взаимодействующих в ИФА с РСВ-ЦВ, а также сероконверсий вируснейтрализующих АТ. РСВИ считали установленной в случае положительных результатов, регистрируемых, по крайней мере, двумя тестами.

Синтетические пептиды (СП). Для детекции эпитоп-специфических IgG по результатам анализа литературы были синтезированы СП (F-SP12, G-T15 и G-H13), представляющие первичную структуру трех консервативных линейных В-клеточных детерминант поверхностных гликопротеинов РСВ (F- и G-белков). Эпитоп F-SP12 с аминокислотной последовательностью (АП) 221–232 (IEFQQKNNRLLLE) идентифицирован как часть «главного вируснейтрализующего домена» F-белка РСВ, поскольку индуцирует синтез вируснейтрализующих АТ [22]. Эпитопы G-T15 (АП 184–198, AIC(Acm)KRIPNKKPQKKT) и G-H13 (АП 152–164, QNKPPNKPNNDFH) входят в состав домена G-белка, играющего важную роль

в присоединении РСВ к клетке, и стимулируют формирование защитного анти-РСВ иммунитета у лабораторных животных [16, 17]. Синтез пептидов был осуществлен в НИИ высокомолекулярных соединений РАН (Санкт-Петербург).

Выявление в ИФА вирусспецифических иммуноглобулинов (Ig) различных изотипов проводили с использованием ИФА-тест-систем, созданных в лаборатории биотехнологии диагностических препаратов НИИ гриппа. Наличие анти-РСВ IgM определяли методом ИФА «с захватом IgM» с использованием планшетов, сенсibilизированных МКА М/2В9 к μ -цепи молекулы IgM человека (производство НПО «Полигност», Санкт-Петербург) [4]. IgM, взаимодействующие с РСВ, детектировали при последовательном внесении концентрата РСВ-ЦВ, очищенного ультрацентрифугированием в градиенте плотности сахарозы, и меченных пероксидазой МКА 9С5, специфичных к F-белку РСВ (получены в НПО «Полигност» совместно с НИИ гриппа).

Сероконверсии анти-РСВ АТ (классов G, A, E) выявляли непрямым ИФА с использованием в качестве АГ для сенсibilизации планшетов очищенного РСВ-ЦВ с последующей детекцией связавшихся АТ пероксидазными конъюгатами МКА, взаимодействующих с соответствующим изотипом иммуноглобулинов человека (НПО «Полигност»). Условия получения вирусных АГ и процедура проведения ИФА были определены ранее [2, 4].

Анализ эпитоп-специфических анти-РСВ IgG непрямым ИФА. На основе синтезированных СП нами были сконструированы иммуноферментные тест-системы для детекции эпитоп-специфических IgG в сыворотках крови. Сенсibilизацию планшетов раствором СП (10 мкг/мл) в карбонатно-бикарбонатном буфере (рН 9,5) проводили в течение 18 ч при комнатной температуре. Детекцию связавшихся с ними АТ при разведении сывороток 1:25 проводили пероксидазным конъюгатом к IgG человека (НПО «Полигност»). Специфичность систем при выявлении анти-РСВ IgG была доказана в предварительных экспериментах способностью пептидов конкурировать с вирионами РСВ за связь в ИФА с РСВ-специфическими АТ из сывороток людей, переболевших РСВИ.

Во всех вариантах ИФА пероксидазную реакцию проявляли добавлением субстратной смеси, содержащей 3,3',5,5'-тетраметилбензидин и H₂O₂, после чего определяли оптическую плотность при длине волны 450 нм (OD₄₅₀).

Выражение результатов детекции РСВ-специфических АТ. Сероконверсии в парных сыво-

ротках считали доказанными, если показатель OD_{450} в материале, полученном в реконвалесцентный период заболевания, превышал OD_{450} пробы, взятой в острой фазе РСВИ, не менее чем на 0,3 или 0,2 при использовании в качестве АГ РСВ-ЦВ или СП соответственно. В предварительных экспериментах с титрованием сывороток в ИФА, этому показателю соответствовали приросты титров АТ в 4 и более раз.

Отрицательными по содержанию специфических АТ считались сыворотки, для которых значения OD_{450} при анализируемом разведении, не превышали «пороговое» значение ($2 \times OD_{450}K^-$). $OD_{450}K^-$ были предварительно рассчитаны для Ig каждого изотипа и представлены как средние арифметические значения показателей OD_{450} , полученных при анализе 10 отрицательных сывороток, взятых в рабочем разведении. В контрольную группу K^- были включены впервые заболевшие дети от 9 до 12 месяцев ($n = 10$) с ОРЗ не РСВ-этиологии. Поскольку к этому возрасту материнские противовирусные АТ уже элиминируют из циркуляции, анти-РСВ АТ в крови детей данной группы практически отсутствуют. Положительными по содержанию вирусспецифических АТ считались сыворотки, OD_{450} которых превышали «пороговое» значение ($2 \times OD_{450}K^-$).

Содержание АТ в сыворотке считали низким или высоким в том случае, если значения OD_{450} анализируемых проб составляли соответственно менее 30% или более 60% от OD_{450} положительных сывороток (K^+), используемых в качестве внутреннего стандарта для анализа определенного вида АТ.

Для стандартизации результатов средний групповой уровень анти-РСВ АТ представлен в виде нормализованного показателя $OD_{450}/OD_{450}K^+$, где OD_{450} — средняя арифметическая всех индивидуальных показателей, полученных для исследуемых проб, $OD_{450}K^+$ — уровень Ig исследуемого изотипа в высокотитражных сыворотках человека (внутренний лабораторный положительный контроль), используемых в рабочих разведениях в качестве референс-препарата во всех опытах.

Статистическая обработка результатов. Статистическая обработка результатов проводилась с помощью компьютерной программы «Statistica» (версия 6). Среднегрупповой уровень АТ, выявленный в ИФА (OD_{450}), представлен в виде средней арифметической \pm стандартное отклонение. При множественных попарных сравнениях независимых выборок (уровень Ig различных изотипов в нескольких группах) использовали критерий Данна после проведения рангового дисперсионного ана-

лиза с применением Н-критерия Крускала–Уоллиса. Для анализа качественных признаков (сравнение частоты сероконверсий Ig одного изотипа в двух группах пациентов) использовали точный критерий Фишера. Мерой связи между двумя качественными измерениями при анализе таблиц сопряженности служил коэффициент ассоциации Пирсона (RA). Проверяемые критериями нулевые гипотезы отвергались при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

На первом этапе исследования были проанализированы сыворотки, полученные в первые три дня острого респираторного заболевания от 65 детей в возрасте до 1 года, впервые заболевших ОРЗ. По результатам ИФА сыворотки части заболевших пациентов, возраст которых не превышал 10 месяцев, оказались положительными по содержанию IgG, специфичных к анализируемому РСВ-антигену. Согласно данным литературы [18], с которыми согласуются результаты наших наблюдений, при первичной РСВИ у детей первого года жизни собственные анти-РСВ IgG не продуцируются раньше 5–6 дня заболевания. В этой связи, ранние сроки забора крови у обследованных нами пациентов в возрасте до 10 месяцев позволили считать выявленные анти-РСВ АТ предсуществующими материнскими.

Таким образом, было показано, что материнские АТ, взаимодействующие как с цельновирионным РСВ, так и с отдельными эпитопами поверхностных гликопротеинов вируса, могут циркулировать в крови детей вплоть до 10 месяцев жизни. Эти результаты согласуются с данными других авторов, наблюдавших циркуляцию материнских РСВ-специфических IgG в крови детей в течение первых 6–9 месяцев жизни [18].

Известно, что длительность циркуляции материнских IgG, специфичных к различным вирусам, составляет 6–12 месяцев. Учитывая то, что время жизни циркулирующих IgG в среднем не превышает 1 месяца, а также то, что у человека (в отличие от многих видов млекопитающих) не происходит проникновения IgG из материнского молока в кровь новорожденных в результате взаимодействия с Fc-рецепторами кишечного эпителия [6], источник длительно синтезируемых вирусспецифических АТ в крови грудных детей, не перенесших еще вирусную инфекцию, до сих пор не идентифицирован.

В соответствии с установленным возрастным порогом для изучения влияния материнских АТ на патогенез первичной РСВИ

была сформирована группа из 45 пациентов в возрасте 1–10 месяцев. Из них у 31 ребенка комплексом лабораторных методов была диагностирована РСВИ, которая в 16 случаях была осложнена бронхообструкцией. Группу сравнения составили 14 детей с ОРЗ не РСВ-этиологии, заболевших впервые. Средний возраст групп с РСВИ и ОРЗ иной этиологии не имел статистических отличий и составлял $7,2 \pm 1,5$ и $6,3 \pm 1,7$ месяцев соответственно. Наличие активного синтеза Ig различных изотипов, специфичных к РСВ-ЦВ (классов G, A, M, E), а также АТ класса G, направленных к эпитопам с АП F-SP12, G-T15, G-H13, устанавливали методом ИФА по значимому приросту содержания анти-РСВ АТ (сероконверсиям) в реконвалесцентной фазе (через 7–14 дней после появления симптомов ОРЗ) по сравнению с начальным периодом заболевания (1–3 день болезни).

Проведенное исследование показало, что предсуществующие m-IgG, взаимодействующие с РСВ-ЦВ, присутствовали в крови детей с установленной РСВИ и ОРЗ иной этиологии приблизительно с одинаковой частотой — в 61 и 57% случаев, соответственно. Напротив, частота детекции материнских IgG, специфичных хотя бы к одному из трех выбранных эпитопов поверхностных гликопротеинов РСВ, структуру которых имитировали СП, была в 3,7 раз выше ($p = 0,023$) в группе детей с РСВИ (52%), чем у пациентов с ОРЗ иной этиологии (14%).

В дополнение к этому в группе детей с РСВИ материнские АТ чаще ($p = 0,035$) синхронно реагировали со всеми тремя СП. Так, коэффициент, вычисляемый как отношение частоты

выявления проб (сывороток крови), положительных по содержанию m-IgG и реагировавших в ИФА одновременно с тремя СП, к частоте выявления сывороток, содержащих m-IgG только к одному из эпитопов, составил 8,0 и 0,7 для групп пациентов с РСВИ и ОРЗ иной этиологии соответственно. Эти данные показывают, что у детей, заболевших РСВИ, спектр антигенного реагирования предсуществующих материнских анти-РСВ IgG был шире, чем у детей, не болевших еще РСВИ на момент обследования.

Дальнейший анализ позволил впервые показать негативное влияние m-IgG, специфичных к консервативным иммуногенным детерминантам F-белка (АП 221–232) и G-белка (АП 152–164 и АП 184–198), на течение первичной РСВИ, а также на характер РСВ-специфического гуморального ответа у заболевших пациентов в возрасте до 10 месяцев.

Так, у детей, в крови которых присутствовали m-IgG, направленные хотя бы к одному из трех анализируемых эпитопов, интенсивный синтез (сероконверсии) собственных IgG, взаимодействующих в ИФА как с РСВ-ЦВ, так и с СП, наблюдали в 4,6 раза реже по сравнению с пациентами, у которых отсутствовали материнские эпитоп-специфические АТ. В противоположность IgG, конверсии сывороточных анти-РСВ IgA были показаны в 13 раз чаще у детей, имеющих эпитоп-специфические m-IgG. При этом образование анти-РСВ IgM и IgE у детей не зависело от наличия у них материнских IgG (табл. 1).

В дополнение к вышеизложенному, у детей с материнскими эпитоп-специфичными m-IgG в крови РСВИ была диагностирована

ТАБЛИЦА 1. ОСОБЕННОСТИ РСВ-СПЕЦИФИЧЕСКОГО ГУМОРАЛЬНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА НА ПЕРВИЧНУЮ РСВИ У ДЕТЕЙ В ВОЗРАСТЕ ОТ 1 ДО 10 МЕСЯЦЕВ, ВЫЯВЛЕННЫЕ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ НАЛИЧИЯ В КРОВИ МАТЕРИНСКИХ IgG, ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИХ С КОНСЕРВАТИВНЫМИ ЭПИТОПАМИ F- И/ИЛИ G-БЕЛКОВ РСВ

Присутствие/отсутствие в крови детей материнских IgG, специфичных к эпитопам поверхностных белков РСВ	Частота детекции синтеза собственных вирус-специфических АТ у детей с первичной РСВИ (% сероконверсий)				
	IgG, специфичных к СП с аминокислотной последовательностью F- и/или G-белков РСВ	IgG, специфичных к РСВ-ЦВ	IgM, специфичных к РСВ-ЦВ	IgA, специфичных к РСВ-ЦВ	IgE, специфичных к РСВ-ЦВ
m-IgG присутствуют (n = 16)	13	13	68	88	19
m-IgG отсутствуют (n = 15)	60	60	60	7	13
уровень значимости отличий (p)*	0,009	0,009	0,7	$6,8 \times 10^{-6}$	0,7

Примечание. * уровень значимости отличий между показателями, полученными для групп детей, имеющих и не имеющих в крови материнские эпитоп-специфические IgG (согласно точному критерию Фишера).

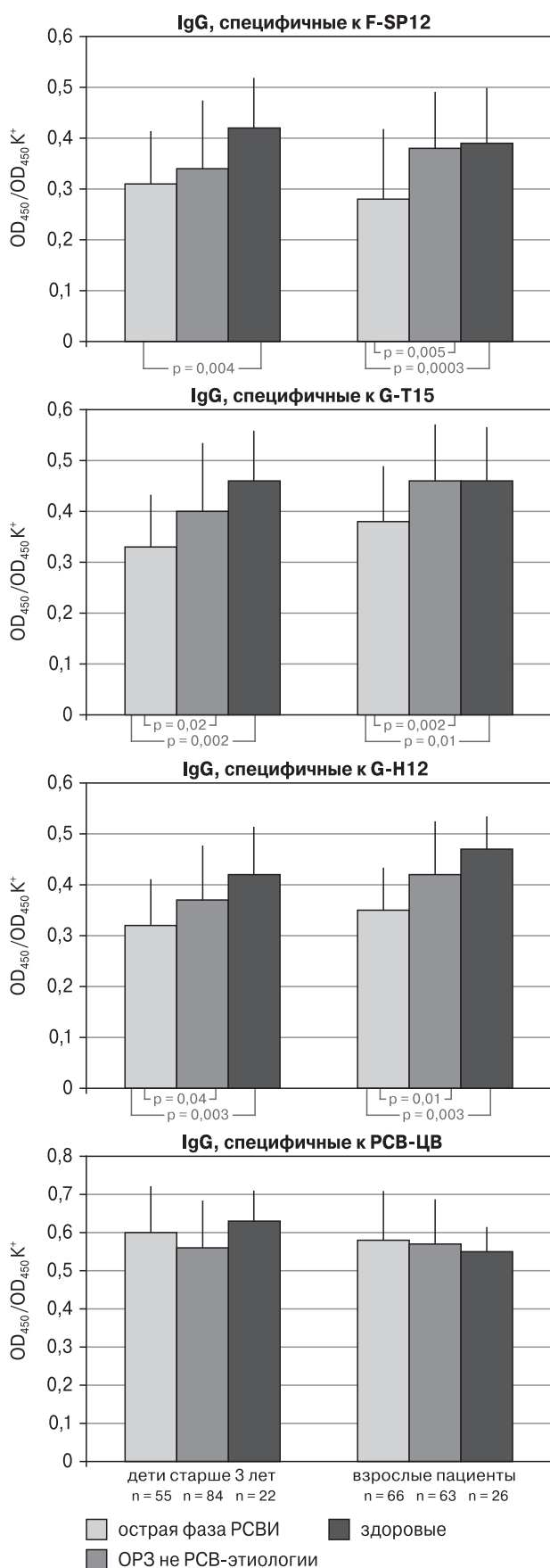


Рисунок 1. Уровень предсуществующих анти-РСВ IgG различной антигенной специфичности в сыворотках крови пациентов старшего возраста с РСВ-реинфекциями

в 1,6 раз чаще (89%), чем при их отсутствии (56%, $p = 0,023$). При установленной РСВИ частота осложненного бронхообструкцией течения инфекции также была значительно выше в группе пациентов, положительных по содержанию m-IgG (81% против 20%, $p = 0,001$).

Корреляционный анализ показал, что наличие в крови детей в возрасте до 10 месяцев материнских IgG, специфичных к трем анализируемым функционально важным антигенным детерминантам F и/или G-белков РСВ, ассоциировано:

- с большей частотой диагностирования первичной РСВИ. Степень корреляционной связи между заболеваемостью и наличием в крови детей материнских АТ невелика, однако статистически значима — коэффициент ассоциации Пирсона ($RA = 0,3$, $p < 0,05$);
- с повышенной частотой осложненного течения первичной РСВИ ($RA = 0,61$, $p < 0,01$);
- с отсутствием или сильным запаздыванием (по крайней мере, в течение двух недель наблюдения) синтеза собственных анти-РСВ IgG, специфичных как к целновирусу, так и к отдельным антигенным детерминантам F- и/или G-белков РСВ, у детей с документированной РСВИ ($RA = 0,50$; $p < 0,01$);
- с усиленным синтезом сывороточных анти-РСВ IgA ($RA = 0,81$; $p < 0,001$).

Следует подчеркнуть, что данные закономерности были выявлены в ИФА только при использовании в качестве антигенов СП, позволивших детектировать предсуществующие материнские IgG, специфичные к определенным антигенным детерминантам поверхностных белков РСВ. Использование целновирионного РСВ, с которым взаимодействуют АТ, направленные к иммуногенным эпитопам всех вирусных белков в совокупности, не позволило обнаружить влияния РСВ-специфичных материнских АТ на противовирусный ответ у детей.

По мере взросления человека увеличивается число контактов с чужеродными антигенами и формируется определенный фон патоген-специфических АТ, синтезированных собственной иммунной системой в результате предшествующих эпизодов заболевания. За счет механизмов иммунологической памяти достаточно высокое содержание циркулирующих в крови анти-РСВ IgG поддерживается, по крайней мере, в течение года как после перенесенной первичной РСВИ у детей [15], так и у взрослых после повторных заболеваний [8].

Влияние предсуществующих (анамнестических) анти-PCB IgG на течение PCB-реинфекции было оценено при анализе сывороток, полученных от 268 пациентов старших возрастных групп. РСВИ была диагностирована в 121 случаях (55 детей от 3 до 18 лет и 66 взрослых от 18 до 45 лет). У 147 пациентов (84 ребенка и 63 взрослых из тех же возрастных групп) были выявлены ОРЗ иной (не PCB) этиологии. Средний возраст в группах составлял 6,8 и 27,9 лет. Все 268 обследованных лиц болели ранее РСВИ, поскольку содержание IgG к PCB-ЦВ на ранних сроках заболевания (не позднее третьего дня) превышало показатели, полученные для контрольных отрицательных проб (K^-), более чем в 2 раза. Данные АТ считали предсуществующими, поскольку на этой стадии сколько-нибудь значительного синтеза противовирусных IgG в ответ на инфекцию еще не регистрируется. Помимо материалов от больных ОРВИ были проанализированы сыворотки, полученные от здоровых лиц соответствующего возраста — 22 детей и 26 взрослых (средний возраст — 9,5 лет и 20,4 года).

Результаты проведенного исследования показали, что содержание анамнестических IgG, направленных к эпитопам F-SP12, G-T15, G-N13, было значительно ниже у PCB-инфицированных пациентов (как детей, так и взрослых), по сравнению с показателями, полученными для обеих групп сравнения — больных ОРЗ не PCB-этиологии и здоровых лиц. Подобно тому, что наблюдали при анализе материнских АТ у грудных детей, отличия были выявлены только для сайт-специфичного иммунитета при использовании в ИФА СП, имитирующих структуру определенных эпитопов вирусных гликопротеинов. Уровень предсуществующих анти-PCB IgG, взаимодействующих с цельновирионными вирусными частицами, у PCB-инфицированных пациентов обеих старших возрастных групп не отличался от показателей, полученных для групп сравнения (рис. 1).

При дальнейшем анализе была показана значимая обратная связь между содержанием предсуществующих сывороточных эпитоп-специфических IgG и частотой регистрации повторных РСВИ у обследованных лиц. Так, среди детей старше 3 лет и взрослых пациентов с документированной РСВИ низкий базовый уровень IgG (OD_{450} менее 30% от OD_{450} положительной сыворотки K^+), взаимодействующих с СП, наблюдали в 75–86 % случаев. В группах сравнения (у лиц, не больных РСВИ) этот показатель был значительно ниже и варьировал

в пределах 41–45% ($p < 0,01$). Коэффициент ассоциации RA между низким содержанием эпитоп-специфических АТ и диагностированием РСВИ составил 0,4 ($p < 0,001$).

При этом не было показано связи между уровнем предсуществующих эпитоп-специфических IgG и тяжестью заболевания (осложнений пневмонией или обструктивным синдромом).

В отличие от первичной РСВИ, при PCB-реинфекциях не было показано связи между уровнем предсуществующих эпитоп-специфических IgG «памяти» и образованием АТ. Так, у детей старше 3 лет и взрослых пациентов с лабораторно установленной РСВИ частота сероконверсий PCB-специфических сывороточных IgG, IgM, IgE и IgA составляла 61–68, 56–69, 21–39 и 25–38% соответственно, в группах с низким и высоким содержанием предсуществующих эпитоп-специфичных анти-PCB IgG. Межгрупповые отличия не были статистически значимыми.

Обсуждение

Известно, что антиген-специфичные IgG, как пассивно полученные, так и активно синтезированные, обладают иммунорегуляторными свойствами и могут модулировать иммунный ответ на соответствующий антиген-иммуноген [13, 14]. Механизмы IgG-опосредованной регуляции иммунного ответа до сих пор до конца не ясны. Подавляющее большинство результатов, касающихся этой проблемы, получено в модельных экспериментах на животных. Данные литературы о влиянии АТ на иммунный противовирусный ответ у человека носят весьма ограниченный характер.

Продланная нами работа показала неоднозначность роли предсуществующих анти-PCB IgG в патогенезе РСВИ: она различна при первичном заболевании и реинфекциях.

Так, при первичной РСВИ у детей грудного возраста наличие пассивно приобретенных материнских PCB-специфических АТ с большой частотой сопряжено с супрессией образования собственных анти-PCB IgG и наоборот, резкой активацией синтеза системного противовирусного IgA.

Следует отметить, что повышенная активность анти-PCB IgA в крови является характерным признаком осложненного течения РСВИ [1, 3].

Представленные данные согласуются с результатами других исследователей, свидетельствующих о том, что пассивно приобретенные материнские IgG могут ингибировать (до 90%) первичный адаптивный синтез АТ аналогич-

ной антигенной направленности, и даже оказывать патогенное действие. Так, при РСВИ у новорожденных телят [23], а также после РСВ-вакцинации грудных детей [21] интенсивный синтез вирус-нейтрализующих АТ наблюдали только в случае отсутствия анти-РСВ m-IgG. У телят, привитых против бычьего РСВ высокое содержание анти-РСВ m-IgG в крови на момент вакцинации было сопряжено с более острыми клиническими симптомами и большей вирусной нагрузкой при последующей РСВИ, чем у изначально серонегативных животных [12].

За последнее десятилетие были описаны некоторые механизмы супрессорного действия пассивно полученных Ig на синтез АТ при первичном контакте организма с антигеном. Так, введенные мышам IgG взаимодействуют с соответствующим антигеном и маскируют его узнавание В-лимфоцитами и антиген-презентирующими клетками, ингибируя тем самым адаптивный гуморальный иммунный ответ на данный антиген [9].

Еще одним супрессорным механизмом является коагрегирование образованными иммунными комплексами В-клеточных рецепторов с ингибирующими рецепторами Fc-gammaRII-bI на мембране одной В-клетки. Такие взаимодействия приводят к торможению процессов превращения лимфоцита в плазматическую клетку, секретирующую IgG, направленные к соответствующему АГ [19]. Возможно, материнские АТ могут действовать сходным образом.

Признано, что РСВ может выступать в качестве аллергена, поскольку способен индуцировать синтез анти-РСВ IgE у заболевших пациентов и инфицированных животных [5, 7]. Ранее нами было показано, что высокая активность Ig данного изотипа сопряжена у детей с повышенной частотой аллергических проявлений при РСВИ (развитием бронхообструктивного синдрома) [3]. Наблюдаемое нами отсутствие межгрупповых отличий в частоте сероконверсий РСВ-специфических IgE при первичной РСВИ у грудных детей свидетельствует о том, что материнские АТ не связаны с развитием IgE-зависимой аллергии на РСВ-антигены.

Благодаря использованию тест-систем, созданных на пептидной основе, нам впервые удалось из общего пула преобладающих АТ выделить анти-РСВ IgG, направленные к определенным эпитопам, наличие которых в крови детей ассоциировано с дисбалансом гуморального иммунного ответа (интенсивным синтезом сывороточных анти-РСВ IgA, что является признаком осложненного те-

чения РСВИ, при одновременной супрессии ответа со стороны РСВ-специфических АТ класса G, к которым относятся вируснейтрализующие Ig).

Согласно данным литературы, все эпитопы поверхностных гликопротеинов РСВ, структуру которых имитируют использованные в настоящей работе синтетические пептиды (с АП 221–232 F-белка; АП 152–164 и 184–198 G-белка), играют важную роль в репродуктивном цикле вируса, а направленные к ним АТ оказывали *in vivo* противовирусное действие в модельных экспериментах. Однако, согласно нашим результатам, АТ данной направленности, будучи пассивно полученными (материнскими), не предотвращали первичную РСВИ у детей, а напротив, оказывали на течение РСВИ отрицательное действие, которое носит эпитоп-специфичный характер.

Таким образом, повышенную частоту РСВИ и осложненного ее течения (формирования бронхообструктивного синдрома), выявленную у детей в возрасте до 10 месяцев, в крови которых циркулировали материнские АТ, специфичные к анализируемым эпитопам, можно объяснить угнетением и дисбалансом системного гуморального противовирусного иммунного ответа.

В отличие от пассивных материнских АТ, высокое содержание вирусспецифических IgG памяти, являющихся результатом активности собственной иммунной системы, не было ассоциировано с угнетением синтеза вирусспецифических АТ при повторных РСВИ у детей старше 3 лет и взрослых пациентов. Это наблюдение согласуется с экспериментальными данными о том, что влияние анамнестических АТ на гуморальный ответ при повторном воздействии АГ значительно менее выражено, чем при первичном [9, 14].

Для пациентов старших возрастных групп, в противоположность грудным детям, между содержанием преобладающих эпитоп-специфичных IgG и частотой диагностирования РСВИ была установлена обратная связь. При этом отсутствовала связь с образованием анти-РСВ антител.

Таким образом, изначально низкое содержание в крови IgG, специфичных к консервативным антигенным детерминантам поверхностных гликопротеинов РСВ (АП 221–232 F-белка, а также АП 152–164 и АП 184–198 G-белка), у лиц старше 3 лет, уже болевших РСВИ ранее, может служить прогностическим показателем для выявления контингента, подверженного повышенному риску повторного инфицирования РСВ. При этом отсут-

ствии в циркуляции материнских IgG той же эпитопной направленности у детей в возрасте до 10 месяцев, напротив, является благоприятным признаком для неосложненного течения первичной РСВИ.

Список литературы

1. Кривицкая В.З., Александрова Н.И., Орлов А.В., Походзей И.В. Реакция иммуноглобулина А на респираторно-синцитиальную вирусную инфекцию у детей и взрослых с различными формами острого и хронического бронхита // Иммунология. — 1999. — № 2. — С. 51–55.
2. Кривицкая В.З., Соминина А.А., Власов Г.П., Суховецкая В.Ф., Голованова А.К. Возрастные особенности сайт-направленного иммунитета при респираторно-синцитиальной вирусной инфекции // Вопросы вирусологии. — 2004. — Т. 49, № 4. — С. 25–29.
3. Кривицкая В.З., Соминина А.А., Суховецкая В.Ф., Милькинт К.К., Сверлова М.В. Иммунопатологический аллергический Th2-тип противовирусного гуморального иммунного ответа у детей с респираторно-синцитиальной вирусной инфекцией // Цитокины и воспаление. — 2004. — Т. 3, № 3. — С. 34–41.
4. Кривицкая В.З., Сверлова М.В., Суховецкая В.Ф., Львов Н.И., Васильева И.А., Соминина А.А. Выявление аутореактивных антител класса М у пациентов с респираторными вирусными инфекциями // Медицинская иммунология. — 2008. — Т. 10, № 2–3. — С. 229–238.
5. Aberle J.H., Aberle S.W., Dworzak M.N., Mandl C.W., Rebhandl W., Vollnhofer G., Kundi M., Popow-Kraupp T. Reduced interferon-gamma expression in peripheral blood mononuclear cells of infants with severe respiratory syncytial virus disease // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 1999. — Vol. 160. — P. 1263–1268.
6. Brown W.R. Relationships between immunoglobulins and the intestinal epithelium // *Gastroenterology*. — 1978. — Vol. 75, N 1. — P. 129–138.
7. Dakhama A., Lee Y.M., Ohnishi H., Jing X., Balhorn A., Takeda K., Gelfand E.W. Virus-specific IgE enhances airway responsiveness on reinfection with respiratory syncytial virus in newborn mice // *J. Allergy Clin. Immunol.* — 2009. — Vol. 123, N 1. — P. 138–145.e5.
8. Falsey A.R., Singh H.K., Walsh E.E. Serum antibody decay in adults following natural respiratory syncytial virus infection // *J. Med. Virol.* — 2006. — Vol. 78, N 11. — P. 1493–1497.
9. Getahun A., Heyman B. Studies on the mechanism by which antigen-specific IgG suppresses primary antibody responses: evidence for epitope masking and decreased localization of antigen in the spleen // *Scand. J. Immunol.* — 2009. — Vol. 70, N 3. — P. 277–287.
10. Glezen W.P., Paredes A., Allison J.E., Taber L.H., Frank A.L. Risk of respiratory syncytial virus infection for infants from low income families in relationship to age, sex, ethnic group, and maternal antibody level // *J. Pediatr.* — 1981. — Vol. 98. — P. 708–715.
11. Hacimustafaoglu M., Celebi S., Aynaci E., Sinirtas M., Koksal N., Kucukerdogan A., Ercan I., Goral G., Ildirim I. The progression of maternal RSV antibodies in the offspring // *Arch. Dis. Child.* — 2004. — Vol. 89, N 1. — P. 52–53.
12. Hägglund S., Hu K.F., Larsen L.E., Hakhverdyan M., Valarcher J.F., Taylor G., Morein B., Belák S., Alenius S. Bovine respiratory syncytial virus ISCOMs — protection in the presence of maternal antibodies // *Vaccine*. — 2004. — Vol. 23, N 5. — P. 646–655.
13. Heyman B. Regulation of antibody responses via antibodies, complement, and Fc receptors // *Annu. Rev. Immunol.* — 2000. — Vol. 18. — P. 709–737.
14. Hjelm F., Carlsson F., Getahun A., Heyman B. Antibody-mediated regulation of the immune response // *Scand. J. Immunol.* — 2006. — Vol. 64, N 3. — P. 177–184.
15. Okiro E.A., Sande C., Mutunga M., Medley G.F., Cane P.A., Nokes D.J. Identifying infections with respiratory syncytial virus by using specific immunoglobulin G (IgG) and IgA enzyme-linked immunosorbent assays with oral-fluid samples // *J. Clin. Microbiol.* — 2008. — Vol. 46, N 5. — P. 1659–1662.
16. Plotnicky-Gilquin H., Cyblat-Chanal D., Aubry J.P., Champion T., Beck A., Nguyen T., Bonnefoy J.Y., Corvaia N. Gamma interferon-dependent protection of the mouse upper respiratory tract following parenteral immunization with a respiratory syncytial virus G protein fragment // *J. Virol.* — 2002. — Vol. 76, N 20. — P. 10203–10210.
17. Power U.F., Plotnicky-Gilquin H., Goetsch L., Champion T., Beck A., Haeuw J.F., Nguyen T.N., Bonnefoy J.Y., Corvaia N. Identification and characterisation of multiple linear B cell protectopes in the respiratory syncytial virus G protein protein // *Vaccine*. — 2001 — Vol. 19, N 17–19. — P. 2345–2351.
18. Queiroz D., Durigon E.L., Botosso V.F., Ejzemberg B., Vieira S.E., Mineo J.R., Yamashita C., Hein N., Lopes C.L., Cacharo A.L., Stewien K.E. Immune response to respiratory syncytial virus in young Brazilian children // *Braz. J. Med. Biol. Res.* — 2002. — Vol. 35, N 10. — P. 1183–1193.
19. Ravetch J.V., Nimmerjahn F. Fc receptors and their role in immune regulation and inflammation // *Fundamental Immunology*. — Ed. Paul W.E. — 6th edition. — Lippincott, Williams and Wilkins, 2008. — Chapter 22. — P. 685–705.
20. Routledge E.G., Willcocks M.M., Samson A.C., Morgan L., Scott R., Anderson J.J., Toms G.L. The purification of four respiratory syncytial virus proteins and their evaluation as protective agents against experi-

- mental infection in BALB/c mice // *J. Gen. Virol.* — 1988. — Vol. 69. — P. 293–303.
21. Siegrist C.A. Mechanisms by which maternal antibodies influence infant vaccine responses: review of hypotheses and definition of main determinants // *Vaccine.* — 2003. — Vol. 21. — P. 3406–3412.
22. Trudel M., Nadon F., Seguin C., Dionne G., Lacroix M. Identification of a synthetic peptide as a part of major neutralization epitope of respiratory syncytial virus // *J. Gen. Virology.* — 1987. — Vol. 68. — P. 2273–2280.
23. Vangeel I., Antonis A.F., Fluess M., Riegler L., Peters A.R., Harmeyer S.S. Efficacy of a modified live intranasal bovine respiratory syncytial virus vaccine in 3-week-old calves experimentally challenged with BRSV // *Vet. J.* — 2007. — Vol. 174, N 3. — P. 627–635.