

КОМПЛЕКСНАЯ ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ НА ИНФЕКЦИОННУЮ АКТИВНОСТЬ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

Г.Н. Леонова¹, О.С. Майстровская¹, В.А. Лубова¹, Н.М. Санина²

¹ ФГБНУ НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова, г. Владивосток, Россия

² Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток, Россия

Резюме. Вакцинопрофилактика обеспечивает наиболее надежную и эффективную иммунологическую защиту против любого инфекционного заболевания. Клещевой энцефалит (КЭ) остается актуальной проблемой для территории Евразийского континента. Большое значение имеет оценка роли разных титров антител и, особенно, низких титров, которые довольно часто встречаются у вакцинированных лиц и в отдельных случаях представляют сложность при решении вопросов порога серопозитивности и уровня специфической защиты против вируса КЭ. Цель работы — на основе экспериментальных исследований *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo* получить данные по обоснованию противовирусной активности специфических антител с разными титрами по отношению к высоковирулентному дальневосточному штамму вируса КЭ. Были проведены комплексные экспериментальные исследования *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*, и на основании динамики наблюдения (от 1 до 96 ч) обоснована противовирусная активность специфических антител с разными титрами (от 1:100 до 1:3200) по отношению к эпидемически значимой дозе вируса КЭ, равной $3 \log$ ТЦД/мл. Показано *in vitro*, что антитела класса IgG в титре 1:100 во все сроки наблюдения оказывали слабое нейтрализующее действие по отношению к вирусу КЭ. Иммуноглобулин с титром 1:400 спустя 72 ч после инфицирования тормозил накопление штамма Dal'negorsk вируса КЭ на $2 \log$ БОЕ/мл, с титром 1:3200 во все сроки наблюдения полностью задерживал размножение вируса. На экспериментальной модели *ex vivo* (кровь вакцинированных лиц с разными титрами антител к вирусу КЭ) и *in vivo* (неинбредные белые мыши) показана замедленная элиминация вируса при титрах антител 1:100 и 1:200 и быстрая (спустя 1–2 суток) — при титрах антител более чем 1:400. Титр антител 1:400 можно принять за порог защиты от вируса КЭ. Чтобы принять правильное решение о сроках ревакцинации, первоначально рекомендовано исследование крови в ИФА на напряженность иммунитета к вирусу КЭ. Лицам с антителами в титрах 1:100 и 1:200 следует предлагать обязательное проведение ревакцинации. Такой подход является наиболее результативным способом повышения эффективности вакцинопрофилактики КЭ.

Ключевые слова: вирус клещевого энцефалита, защитный титр антител, динамика нейтрализации вируса *in vitro*, *ex vivo*, *in vivo*.

Адрес для переписки:

Леонова Галина Николаевна
690087, Россия, г. Владивосток, ул. Сельская, 1,
ФГБНУ НИИ эпидемиологии и микробиологии имени
Г.П. Сомова Минобрнауки России.
Тел.: 8 (966) 280-28-45 (служебн.).
E-mail: galinaleon41@gmail.com

Contacts:

Galina N. Leonova
690087, Russian Federation, Vladivostok, Selskaya str., 1,
Somov Institute of Epidemiology and Microbiology,
Russian Ministry of Education and Science.
Phone: +7 (966) 280-28-45 (office).
E-mail: galinaleon41@gmail.com

Библиографическое описание:

Леонова Г.Н., Майстровская О.С., Лубова В.А., Санина Н.М. Комплексная оценка влияния специфических антител на инфекционную активность вируса клещевого энцефалита // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 3–4. С. 559–567. doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-559-567

Citation:

Leonova G.N., Majstrovskaya O.S., Lubova V.A., Sanina N.M. Comprehensive assessment of specific antibodies on infectious activity of tick-borne encephalitis virus // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 3–4, pp. 559–567. doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-559-567

Работа выполнена в рамках научных проектов: (0545-2014-0011) Федерального агентства научных организаций, РФФ (15-15-00035-Р)

© Леонова Г.Н. и соавт., 2019

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-2019-3-4-559-567>

COMPREHENSIVE ASSESSMENT OF SPECIFIC ANTIBODIES ON INFECTIOUS ACTIVITY OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS

Leonova G.N.^a, Majstrovskaya O.S.^a, Lubova V.A.^a, Sanina N.M.^b

^a Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russian Federation

^b Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

Abstract. Vaccines for prophylactic immunization provide the most reliable and effective protection against the vast majority of infectious diseases. Tick-borne encephalitis (TBE) represents a high-priority medical issue at the territory of the Eurasian continent. Of great importance is assessing a role of distinct antibody titers especially low titers, observed quite often in vaccinated individuals, sometimes posing obstacles in determining a threshold of seropositivity as well as the level of specific protection against TBE virus. We aimed at obtaining data to assess antiviral activity of virus-specific antibodies with distinct titer levels based on the *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* experimental studies with a highly virulent Far-Eastern strain of tick-borne encephalitis virus. The *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* comprehensive experimental studies with a highly virulent Far-Eastern strain of tick-borne encephalitis virus (TBEV) were conducted and the dynamics of antiviral activity of virus-specific antibodies at variable titers (1:100–1:3200) was measured (timeframe ranged within 1–96 hours p.i.) to provide a rationale for evaluating the antiviral immune response. It was found that the *in vitro* experiments demonstrated that the IgG at 1:100 titer exerted a weak anti-TBEV neutralizing effect at all time-points examined. The IgG 1:400 titer caused a 2 log PFU/mL decline in TBEV Dal strain yield at 72 h post-infection, whereas at 1:3200 titer it completely suppressed TBEV replication throughout the observation period. The *ex vivo* experiments with blood serum obtained from vaccinated subjects demonstrating a range of TBEV antibody titers (sera from vaccinated individuals with varying anti-TBEV antibody titers) and *in vivo* (outbred white mice) experiments revealed a delayed virus elimination for antibody titers at 1:100 and 1:200 as well as rapid virus elimination (1–2 days p.i.) for antibody titers greater than 1:400. Thus, antibody titer at 1:400 may be considered as the universal anti-TBEV protection threshold. In order to properly conclude regarding the revaccination schedule it is advised to start with testing blood serum for durability of anti-TBEV immune response. Subjects with TBEV antibody titers at 1:100 and 1:200 should be strongly recommended to undergo a mandatory revaccination. Such an approach is believed to be the most effective way toward enhancing efficacy of vaccine-mediated protection against TBE.

Key words: tick-borne encephalitis, protective antibody titer, dynamics of virus neutralization *in vitro*, *ex vivo*, *in vivo*.

Введение

Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ), широко распространенный на Евразийском континенте, является членом рода *Flavivirus*, семейство *Flaviviridae*. Заболеваемость КЭ регистрируется более чем в 30 странах Европы и Азии в умеренной климатической зоне [4]. Резкий подъем заболеваемости клещевым энцефалитом (КЭ) в 1990-х гг. на всех территориях континента значительно активизировал научный интерес к изучению этой проблемы. Установлено, что геном ВКЭ содержит РНК положительной полярности длиной около 11 000 оснований, которая кодирует один белок — полипротеин длиной 3414 аминокислотных остатков. Полипротеин, в свою очередь, в процессе созревания расщепляется вирусными и клеточными протеазами с образованием 10 белков, 3 из которых являются структурными (М, С, Е). На основе генетической структуры и антигенных свойств вируса КЭ был подразделен на 3 субтипа: Дальневосточный (I), Европейский (II) и Сибирский (III) [16, 18].

Вирус КЭ Европейского субтипа представляет меньшую опасность для человека, а по мере продвижения вируса на восток тяжесть течения инфекционного процесса и уровень ле-

тальности при этом заболевании возрастает [3]. На Дальнем Востоке России летальность при КЭ остается самой высокой: за 80-летний период изучения она составляет в среднем 17,0% [5].

При многих вирусных инфекциях с помощью вакцинопрофилактики достигается наиболее надежная и эффективная защита. Клещевой энцефалит как особо опасная инфекция для человека не является исключением. Практика применения противоклещевых вакцин различного производства показывает, что иммунизация населения является ключевым звеном в плане массовой профилактики КЭ на высокоэндемичных территориях [4, 7, 11, 17].

Особое значение имеет оценка роли низких титров специфических антител, которые довольно часто встречаются у вакцинированных лиц и представляют сложность в отдельных случаях при решении вопросов порога серопозитивности и специфической защиты против вируса КЭ.

Цель исследований — на основе экспериментальных исследований *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo* получить данные по обоснованию противовирусной активности специфических антител с разными титрами по отношению к высоковирулентному дальневосточному штамму вируса КЭ.

Материалы и методы

В работе был использован штамм Dal'negorsk (Dal') вируса КЭ дальневосточного субтипа, выделенный в 1973 г. из мозга умершего больного очаговой формой КЭ. Ранее мы провели полногеномное секвенирование штамма (номер в GenBank FJ402886) и изучили его биологические свойства [15, 21]. Исходный титр штамма, взятого в настоящее исследование на 6 пассаже, составлял — $8,0 \log \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$.

Количество антител в исследуемых образцах определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) и реакции нейтрализации (РН). Для определения антител класса IgG использовали «Vecto-TBE-IgG» набор (АО «Вектор-Бест», Новосибирск) согласно инструкции производителя.

Для определения нейтрализующих антител использовали однодневный монослой перевиваемых клеток СПЭВ, выращенный на 24-луночных планшетах. Штамм Dal' вируса КЭ, содержащий стандартную дозу вируса $2 \log \text{ТЦД}/\text{мл}$, соединяли с 2-кратными разведениями от 1:10 до 1:3200 исследуемых образцов сывороток крови. Смесь выдерживали при температуре 37°C в течение 1 ч с последующим нанесением на монослой клеток СПЭВ. Результаты инфекционной активности не нейтрализованного вируса учитывали на 5–6 сутки.

Описание эксперимента in vitro. В работе использован «Иммуноглобулин человека против клещевого энцефалита» производства «НПО «Микроген» (серия П609), титр в ИФА составлял 1:3200. Приготовлено 3 разведения иммуноглобулина (IgG) с титрами в ИФА 1:100, 1:400 и 1:3200. Затем 0,9 мл каждого разведения IgG соединяли с 0,1 мл вирусосодержащей суспензии штамма в количестве $4,0 \log \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$, после чего рабочая доза вируса в опыте составила $3,0 \log \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$ (МОИ 0,001 $\text{ТЦД}_{50}/\text{клетку}$). Приготовленные пробы помещали на 2 ч в холодильник $+4^\circ\text{C}$, которыми затем заражали монослой клеток СПЭВ на пробирках (по 3 пробирки на каждую пробу). После 1 ч контакта в термостате монослой зараженных клеток трижды промывали средой 199, заливали поддерживающей средой и помещали в термостат для дальнейшего наблюдения за накоплением вируса в клетках и в культуральной жидкости спустя 3, 24, 48, 72 ч после инфицирования. Для получения средних показателей образцы из трех пробирок каждого срока наблюдения объединяли. Из смеси клеток готовили слайды на предметных стеклах для подсчета процента клеток с антигеном вируса, используя непрямой метод иммунофлуоресценции (НМФА). Антиген вируса КЭ внутри клеток выявляли с помощью нанесения иммунной сыворотки

против вируса КЭ и затем флуоресцирующих иммуноглобулинов (ФИТС) в рабочем разведении, указанном в инструкции изготовителя (Филиал «МЕДГАМАЛ», ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ). Просмотр слайдов проводили на флуоресцентном микроскопе MC-200 TF (Австрия). Для вычисления процента антигенсодержащих клеток СПЭВ, инфицированных экспериментальными пробами, для каждого образца в пяти микроскопных полях (100 клеток на поле) просчитывали общее количество клеток и антигенпозитивных клеток. Количество вирусинфицированных клеток, окрашенных положительно, к общему количеству клеток, выражали как процент антиген положительных клеток.

В надосадочной культуральной жидкости экспериментальных проб определяли титр вируса. Десятикратными разведениями этих проб заражали односуточный монослой клеток СПЭВ, приготовленный на 24-луночных планшетах. После 1 ч контакта при температуре 37°C зараженный монослой клеток промывали культуральной средой 199, затем добавляли поддерживающую среду 199 с гентамицином и с 1% эмбриональной сыворотки коров и планшеты помещали в CO_2 -термостат. Учет количества вируса в экспериментальных пробах проводили на 6 сутки в БОЕ/мл.

Описание эксперимента ex vivo. В опытах *ex vivo* была использована кровь лиц, привитых против КЭ с определенным титром антител (IgG) в крови по данным ИФА. Исходный титр антител образца № 1 — 1:200, № 2 — 1:400, № 3 — 1:800, № 4 — 1:1600, № 5 — 1:3200. Для эксперимента кровь у этих лиц забирали шприцом из локтевой вены, помещали в пробирки с ЭДТА. Для разведения крови была подготовлена среда RPMI 1640 (Sigma), содержащая 0,3 мг/мл глутамин (Sigma) и 80 мкг/мл гентамицина. Для каждого образца было подготовлено по 6 пробирок, содержащих 1 мл среды и 0,9 мл цельной крови. Затем во все пробирки добавлен вирус КЭ ($5,0 \log \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$) по 0,1 мл. Заражающая доза вируса стала равна $4,0 \log \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$, а титры антител во всех образцах стали ниже на одно разведение по сравнению с исходным титром. Все пробы помещали в термостат при 37°C , наблюдения за содержанием вируса в экспериментальных пробах проводили через 1, 3, 24, 48, 72, 96 ч. Учет количества не нейтрализованного вируса проводили на 6 сутки в БОЕ/мл.

Описание эксперимента in vivo. Надосадочную жидкость (опыты *ex vivo*) экспериментальных проб, собранную спустя 1–72 ч, инокулировали по 0,03 мл в мозг неинбредным белым мышам весом 12 г (по 10 мышей на точку). Срок наблюдения составил 21 сутки. Инфекционная актив-

ность вируса в экспериментальных образцах определяли по проценту умерших животных и их средней продолжительности жизни (СПЖ).

Животные содержались в условиях вивария регламентируемых приказом Минздрава СССР № 1179 от 10.10.1983 г. Опыты проводили в соответствии с приказами Минздрава СССР № 755 от 12.09.1977 г. и № 701 от 27.07.1978 г. «Об обеспечении принципов гуманного обращения с животными».

Результаты

В ранее опубликованных работах [20, 22] нами были определены уровни иммунологической памяти (1:100) и защитного титра (1:400) специфических антител при действии эпидемически значимой заражающей дозы вируса КЭ, равной $3,0 \log TCID_{50}/ml$. В настоящем исследовании мы расширили задачи, которые заключались в определении *in vitro* количества остаточного вируса после взаимодействия штамма Dal' вируса КЭ со специфическими антителами (IgG в титрах 1:100, 1:400 и 1:3200) в динамике наблюдения (3, 24, 48, 72 ч). Для этого одновременно были проведены наблюдения за процессом внутриклеточного и внеклеточного накопления штамма Dal' вируса КЭ в экспериментальных пробах с разными титрами антител IgG в сравнении с контролем вируса (без антител).

Под действием антител класса IgG внутриклеточное накопление антигена вируса КЭ более активно происходило при низком титре 1:100, замедленно — при титре 1:400. Антиген вируса КЭ практически не обнаружен в зараженных клетках СПЭВ пробами с IgG в титре 1:3200 (рис. 1А). Кроме того, спустя 72 ч интенсивность специ-

фического свечения антигена вируса в клетках СПЭВ, зараженных опытными пробами (с титрами IgG 1:100 и 1:400) по сравнению с контролем, наглядно показана с помощью конфокальной микроскопии. На рисунке 2 (см. III обложку) видно, что светящихся клеток опытной пробы (IgG с титром 1:100) много, но свечение антигена менее интенсивно по сравнению с контролем вируса. При титре IgG 1:400 светящиеся клетки встречались значительно реже.

Об уровне не нейтрализованного вируса под действием специфических антител класса IgG можно судить не только по показателям антигена в клетках, но и по выявлению вируса в культуральной жидкости клеток СПЭВ, зараженных указанными пробами. На рисунке 1Б видно, что антитела IgG в титре 1:100 во все сроки наблюдения оказывали слабое нейтрализующее действие по отношению к вирусу КЭ, накопление которого по сравнению с контролем наблюдалось с запозданием на 1 сутки. Иммуноглобулин в титре 1:400 спустя 72 ч тормозил на $2 \log BOE_{50}/ml$ накопление штамма Dal' в культуральной жидкости. И только IgG с титром 1:3200 во все сроки наблюдения *in vitro* полностью задерживал размножение вируса КЭ.

Следующим этапом экспериментов явилось изучение *ex vivo* защитного противовирусного действия специфических антител с разными титрами (1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600) по отношению к штамму Dal' вируса КЭ. Динамика постепенного снижения количества инфекционной активности вируса в надосадочной жидкости экспериментальных проб крови, исследованная с помощью бляшкообразующего теста на модели клеток СПЭВ, показана на рисунке 3. Скорость элиминации вируса зависела

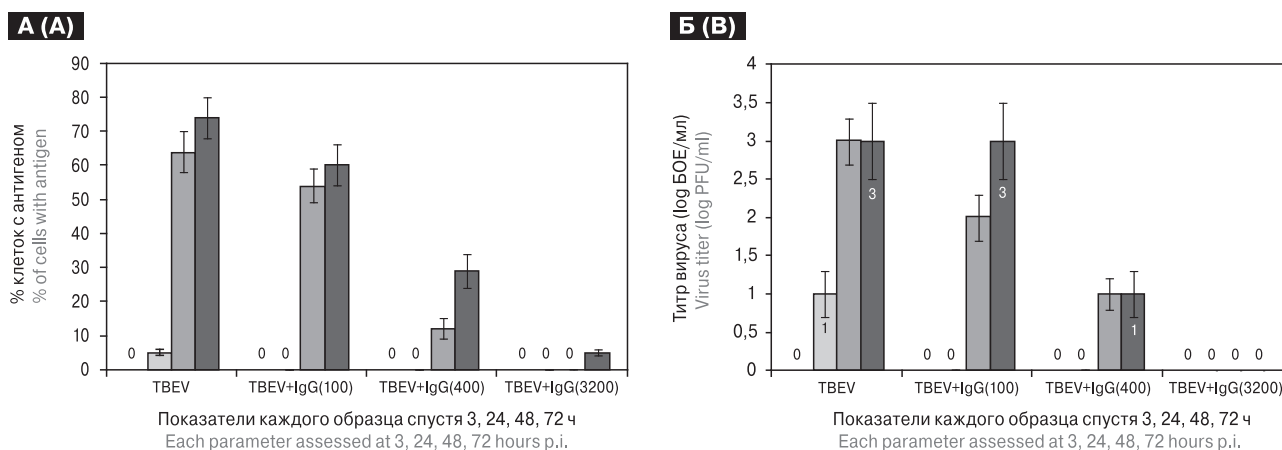


Рисунок 1. Динамика накопления антигена в клетках (А) и вируса в культуральной жидкости (Б) клеточной культуры СПЭВ, зараженной вирусом КЭ (контроль вируса) и вирусом КЭ+IgG в титрах 1:100, 1:400, 1:3200 (опытные пробы) спустя 3, 24, 48, 72 ч после инфицирования

Figure 1. Dynamics of intracellular antigen (A) and extracellular virus (B) accumulation in TBЕV-infected PKЕ cells (virus control) and TBЕV IgG with titer level of 1:100, 1:400 and 1:3200 (experimental samples) at 3 h, 24 h, 48 h and 72 h p.i.

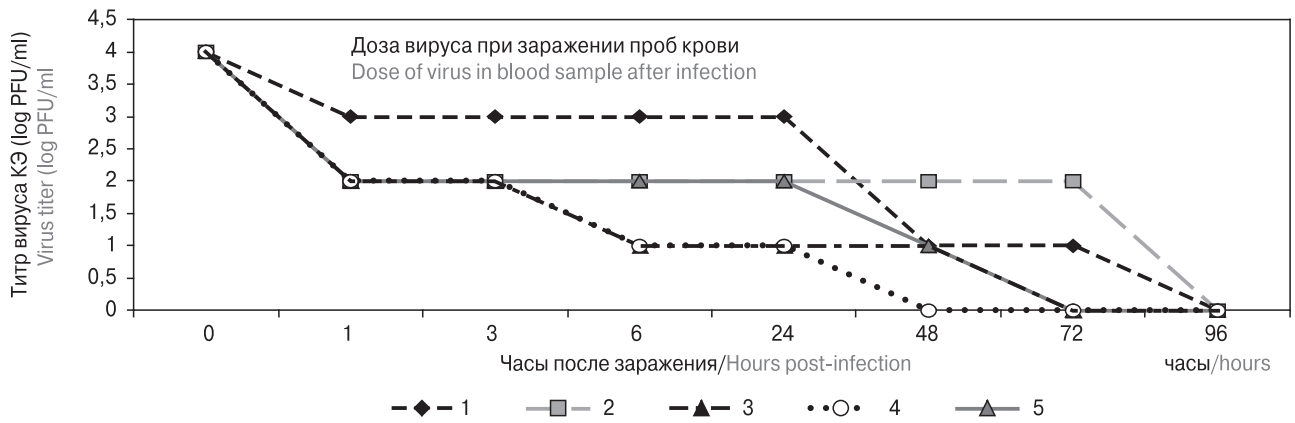


Рисунок 3. Динамика элиминации вируса КЭ в зараженных вирусом КЭ пробах крови лиц, содержащих антитела в разных титрах (№ 1 — 1:100; № 2 — 1:200; № 3 — 1:400; № 4 — 1:800; № 5 — 1:1600)

Figure 3. Dynamics of TBEV elimination in blood samples from TBEV-vaccinated subjects

Примечание. Пробы крови заражены дальневосточным штаммом Dal'negorsk вируса КЭ в титре 4 log БОЕ/мл. Накопление не нейтрализованного вируса в образцах наблюдали путем заражения ими односуточного монослоя клеток СПЭВ. Учет опыта проводили на 6 сутки по количеству БОЕ/мл.

Note. Blood samples with varying antibody titer levels (No. 1 — 1:100; No. 2 — 1:200; No. 3 — 1:400; No. 4 — 1:800; No. 5 — 1:1600) were mixed with 4 log PFU/mL of Far-Eastern TBEV Dal'negorsk strain. The mixture was used for inoculation of a one-day-old PKE cell monolayer. Virus yield was measured on day 6 p.i. by using a plaque test, expressed as PFU/mL.

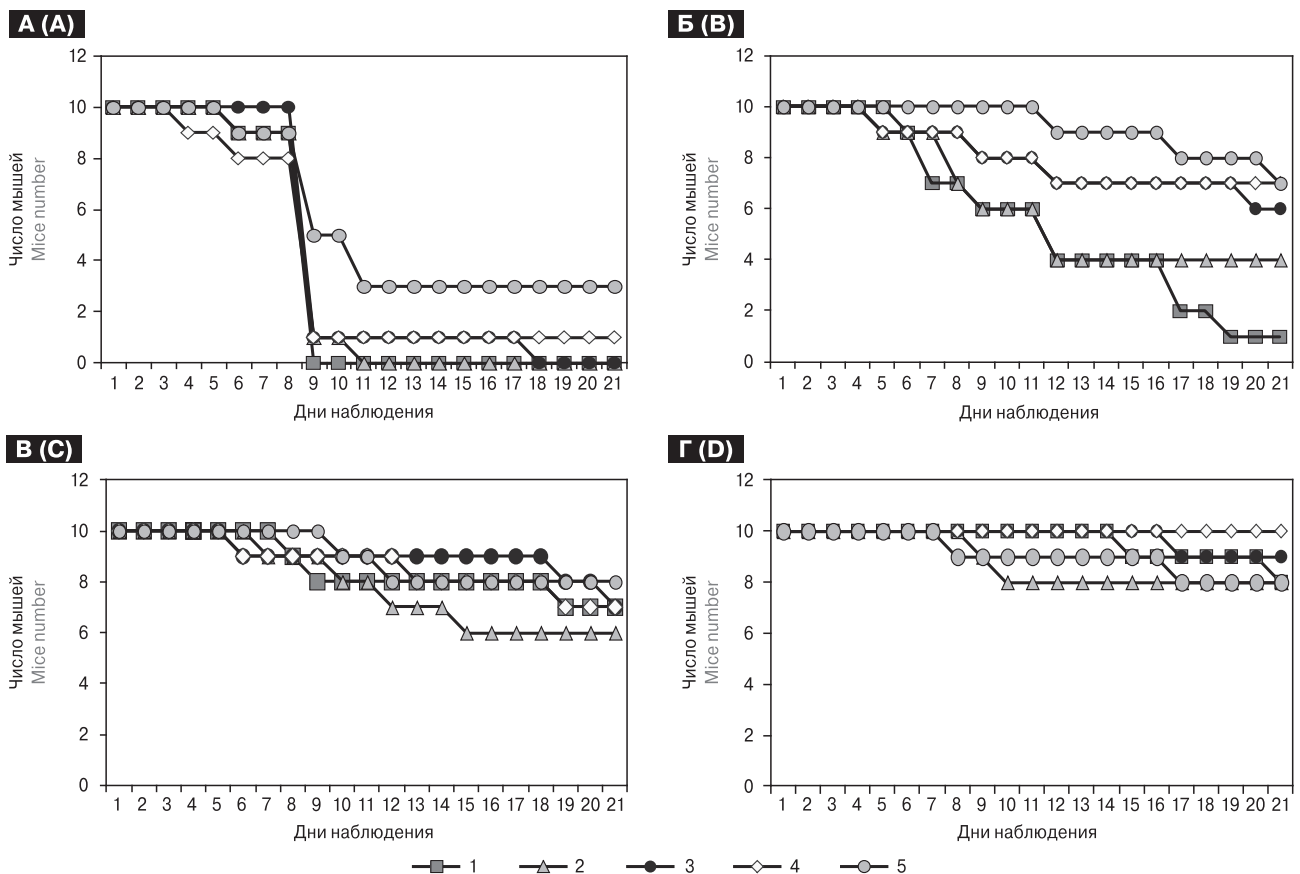


Рисунок 4. Динамика проявления инфекционных свойств не нейтрализованного вируса у белых мышей, зараженных экспериментальными пробами опыта *ex vivo* (элиминация вируса КЭ под действием антител с разными титрами в крови людей) в разные сроки наблюдения (А — 1 ч, Б — 24 ч, В — 48 ч, Г — 72 ч после инфицирования)

Figure 4. The pattern of infectious process in outbred white mice inoculated with experimental samples used in the *ex vivo* experiments (anti-TBEV effect of antibodies with varying titer levels measured in blood serum from TBEV-vaccinated subjects) at different time points post-infection (A — 1 h, B — 24 h, C — 48 h, D — 72 h p.i.)

Таблица 1. Динамика показателей (процент выживаемости и СПЖ мышей) противовирусной активности антител с разными титрами (1:100; 1:200; 1:400; 1: 800; 1:1600) в отношении вируса КЭ в разные сроки наблюдения (спустя 1 ч, 24 ч, 48 ч и 72 ч)

Table 1. Dynamics of parameters (% survival and average mouse life expectancy) of anti-TBEV antibody activity at varying titer levels (1:100; 1:200; 1:400; 1: 800; 1:1600) at different time points post-infection (1 h, 24 h, 48 h and 72 h p.i.)

№ образца/титр IgG No. of sample/IgG titer	1 ч (h p.i.)		24 ч (h p.i.)		48 ч (h p.i.)		72 ч (h p.i.)	
	СПЖ Average mouse life expectancy	% выживших мышей % survivors of mice	СПЖ Average mouse life expectancy	% выживших мышей % survivors of mice	СПЖ Average mouse life expectancy	% выживших мышей % survivors of mice	СПЖ Average mouse life expectancy	% выживших мышей % survivors of mice
1/(1:200)	8,7	0	11,0	10	18,3	70	8,7	0
2/(1:400)	8,9	0	13,8	40	17	60	8,9	0
3/(1:800)	9,9	0	17,2	60	19,3	70	9,9	0
4/(1:1600)	9,6	10	17,3	70	18,4	70	9,6	10
5/(1:3200)	12,7	30	17,6	70	19,1	80	12,7	30
Контроль дозы вируса в эксперименте Experimental TBEV dose control	10,4	30					10,4	30

от исходного титра антител в изучаемых пробах крови. Полная элиминация вируса в пробе 4 (1:800) наступила через 48 ч, в пробах 3 (1:400) и 5 (1:1600) — через 72 ч, в пробах 1 (1:100) и 2 (1:200) — только через 96 ч после инфицирования. Особенно замедленно снижалось количество вируса в пробе 1, в которой вирус в титре 3 log БОЕ/мл регистрировали до 24 ч наблюдения, в титре 1 log БОЕ/мл — спустя 48–72 ч, и только через 96 ч вирус не обнаруживали.

Несмотря на то что бляшкообразующий тест определял наличие вирусных частиц в экспериментальных пробах, антиген вируса КЭ во все сроки наблюдения (от 1 до 96 ч после инфицирования) по данным ИФА не был зарегистрирован ни в одной пробе.

Полученные результаты *ex vivo* требовали дополнительной проверки инфекционной активности вируса на модели неинбредных белых мышей. На рисунке 4 и в таблице 1 показана противовирусная активность антител с разными титрами в отношении вируса КЭ в разные сроки наблюдения (1, 24, 48 и 72 ч). Так, экспериментальные животные, зараженные образцом крови спустя 1 ч после его инфицирования вирусом КЭ, практически не выживали. Исключение составила проба 5 (1:1600), у которой показатель СПЖ животных был выше, чем в контроле при 30% выживаемости мышей в опыте и в контроле (табл. 1, рис. 4А). Спустя 24 ч после контакта проб крови с вирусом выживаемость мышей в зависимости от титра IgG в пробах повышалась, за исключением пробы 1, показатели которой все также были низкими (табл. 1, рис. 4Б). Спустя 48 ч выживаемость животных, зараженных всеми пробами, в том числе и пробой 1, значительно повысилась (табл. 2, рис. 4В), и только спустя 72 ч эти показатели достигли 80–100% выживаемости, а СПЖ мышей составила более 20 дней (табл. 1, рис. 4Г). Это свидетельствовало о том, что во всех экспериментальных пробах крови спустя 72 ч после ее инфицирования почти полностью произошла нейтрализация вируса КЭ под действием антител с титрами от 1:100 до 1:1600.

Кроме того, наблюдение за количеством антител по данным ИФА и реакции нейтрализации в экспериментальных пробах *ex vivo* показало, что титры IgG оставались на исходных уровнях, то есть не изменялись во все сроки наблюдения. Исключение составила проба 1, показатели которой снижались в обеих реакциях до отрицательных результатов (табл. 2).

Обсуждение

Понятие защитного титра антител появилось при проведении исследований по иммунологической активности вакцин. При этом эффек-

Таблица 2. Показатели количества антител в опыте *ex vivo* по данным ИФА и нейтрализационного теста в разные сроки наблюденияTable 2. Level of neutralizing antibody titers in the *ex vivo* experiment at different time points post-infection based on ELISA and virus neutralization assay

№ образцов крови No. of blood samples	Титр IgG в крови до инфицирования ВКЭ IgG titer in the blood before TBEV infection	Титр антител в ИФА/в РН после инфицирования через: Antibody titers by ELISA/Nt post-infection at:							
		0 ч/ч	1 ч/ч	3 ч/ч	6 ч/ч	24 ч/ч	48 ч/ч	72 ч/ч	96 ч/ч
1	200/20	100	0	0	0	0/0	0	0	0/0
2	400/40	200	200	200	200	200/20	200	200	200/20
3	800/80	400	400	400	400	400/80	400	400	400/40–80
4	1600/80	800	800	800	800	800/80	800	800	800/40–80
5	3200/3200	1600	1600	1600	1600	1600/1280	1600	1600	1600/1280

тивность профилактических вакцин против какой-либо инфекции оценивается по уровню иммунологических показателей, обеспечивающих защитное действие [1]. Представление о защитном титре антител у лиц, вакцинированных против КЭ, в литературных источниках встречается нечасто [22], и до настоящего времени является предметом дискуссии [10, 14]. Впервые титр гемагглютинирующих антител 1:10 к вирусу КЭ был определен как защитный в 1980 г., австрийскими исследователями [19]. В последние годы этому вопросу стали уделять внимание в связи с тем, что у лиц, привитых против КЭ, по данным ИФА зачастую (до 40–44%) формируются невысокие (1:100) титры антител класса IgG [15]. Видимо, поэтому у вакцинированных лиц могут регистрироваться лихорадочные формы инфекции, а в редких случаях описаны даже летальные исходы [8].

В то же время у некоторых людей после курса первичной вакцинации могут вырабатываться антитела с высокими титрами, которые сохраняются долго [4, 20]. В ранее опубликованных работах [6, 20, 22] нами были определены уровни иммунологической памяти (1:100) и защитного титра (1:400) специфических антител при действии эпидемически значимой заражающей дозы вируса КЭ, равной $3,0 \log \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$. Мы посчитали, что такой уровень специфических антител способен защитить пациентов на ранних стадиях инфицированности сразу после укуса клеща, содержащего вирус КЭ. Однако в настоящее время защитным титром антител по данным ИФА официально принято считать 1:100 и по реакции нейтрализации — 1:10 [2, 12].

В настоящих исследованиях показана комплексно на моделях *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo* динамика элиминации вируса КЭ под действием специфических антител с разными титрами.

На модели *in vitro* получены доказательства прямого нейтрализующего действия антител класса IgG против вируса КЭ. При этом в динамике наблюдения до 72 ч после инфицирования

показано, что антитела в титре 1:400 не способны полностью элиминировать вирус КЭ в титре $3,0 \log \text{ТЦД}/\text{мл}$, и только антитела с высокими титрами нейтрализуют вирус и защищают монослой экспериментальной культуры клеток СПЭВ от цитопатического действия вируса КЭ.

На экспериментальной модели *ex vivo* (кровь вакцинированных лиц с разными титрами антител к вирусу КЭ) были получены дополнительные доказательства действия специфических антител в сочетании с другими факторами. Используя эту биологическую модель — наиболее приближенную к естественной модели (человек, вакцинированный против КЭ), мы показали, что в пробах со специфическими антителами в титрах более чем 1:400 нейтрализация вируса происходила быстро (спустя 24 ч). Под действием IgG в титрах 1:100 и 1:200 элиминация вируса тоже происходила, но в более поздние сроки на 3–4 сутки после инфицирования проб крови. Кроме того, мы обратили внимание также на тот факт, что титры антител (по данным ИФА и реакции нейтрализации) в надосадочной жидкости опытных проб *ex vivo* оставались на одном уровне во все сроки наблюдения, за исключением проб с титром антител 1:100. Это дает нам основание считать, что взаимодействие вируса КЭ со специфическими антителами не снижает их титры в том случае, если количество более чем 1:200. Замедленная элиминация вируса происходила под действием антител с низкими показателями, снижаясь до отрицательных значений, что указывало на быстрое истощение запаса антител в этих пробах. Видимо, такие обстоятельства (низкое количество антител в присутствии вируса КЭ более чем $3,0 \log \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$) могут способствовать возникновению случаев КЭ у вакцинированных лиц, неоднократно описанных в литературе [8, 9]. Так какой же титр антител способен защитить от развития инфекционного процесса? Видимо, этот показатель также индивидуален и включает комплекс факторов —

количество вируса, количество антител и индивидуальные особенности макроорганизма. Вышепредставленные данные помогают понять причины разных исходов инфекции у вакцинированных лиц после укуса клеща, зараженного вирусом. Чтобы принять правильное решение о сроках ревакцинации, первоначально можно рекомендовать исследование крови на напряженность иммунитета к вирусу КЭ. Исходя из данных, полученных ранее [6, 22], а также данных настоящего исследования, мы пришли к выводу о том, что быстрая элиминация вируса (спустя 1–2 суток) может происходить у вакцинированных лиц с антителами в титрах 1:400 и более. Лицам с антителами в сыворотке крови в титрах 1:100 и 1:200, видимо, следует предлагать обязательное проведение ревакцинации.

Учитывая длительность сохранения поствакцинальных антител, схема иммунизации против КЭ, как это принято в европейских странах [13, 17], предусматривает проведение ревакцинации через 5 лет после полного курса вакцинации. Российские исследователи [2] также предлагают изменения в курсе ревакцинации путем увеличения интервала с 3 до 6 лет. Настоящие экспериментальные исследования позволяют согласиться с мнением этих авторов. Представленные результаты дают основание считать, что в рамках персонифицированной медицины вышеизложенный подход имеет не только социально-экономическое значение, но и является наиболее результативным способом повышения эффективности вакцинопрофилактики КЭ.

Список литературы/References

1. Брико Н.И. Критерии оценки эффективности вакцинации // Вакцинация. 2000. Т. 5, № 11. [Briko N.I. Criteria of vaccination effectiveness assessment. *Vaksinatsiya = Vaccination*, 2000, vol. 5, no. 11. (In Russ.)]
2. Есюнина М.С., Романенко В.В., Килиячина А.С. Длительность сохранения постпрививочного иммунитета к вирусу клещевого энцефалита после ревакцинаций // Медицинская вирусология. 2015. Т. 29, № 2. С. 132. [Yesyunina M.S., Romanenko V.V., Kilyachina A.S. Duration of post-vaccination immunity against tick-borne encephalitis following booster doses. *Meditsinskaya virusologiya = Medical Virology*, 2015, vol. 29, no 2, p. 132. (In Russ.)]
3. Иерусалимский А.П. Клещевой энцефалит. Новосибирск: Наука, 2001. 359 с. [Jerusalemky A.P. Tick-borne encephalitis. *Novosibirsk: Nauka*, 2001. 359 p. (In Russ.)]
4. Леонова Г.Н. Клещевой энцефалит: актуальные аспекты. М.: И.В. Балабанов, 2009. 168 с. [Leonova G.N. The tick-borne Encephalitis: actual aspects. *Moscow: I.V. Balabanov*, 2009. 168 p. (In Russ.)]
5. Леонова Г.Н., Беликов С.И., Кондратов И.Г. Современный взгляд на дальневосточную популяцию вируса клещевого энцефалита // Медицинская вирусология. 2017. Т. 31, № 1. С. 32. [Leonova G.N., Belikov S.I., Kondrstov I.G. A modern view of the Far Eastern population of the tick-borne encephalitis virus. *Meditsinskaya virusologiya = Medical Virology*, 2017, vol. 31, no. 1, p. 32. (In Russ.)]
6. Леонова Г.Н., Лубова В.А., Калинин А.В. Значение уровня концентрации специфических антител в элиминации разных штаммов вируса клещевого энцефалита // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2017. Т. 2, № 93. С. 50–56. [Leonova G.N., Lubova V.A., Kalinin A.V. The effect of the level of specific antibodies on elimination of different tick-borne encephalitis virus strains. *Epidemiologiya i vakcinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccine Prevention*, 2017, vol. 2, no. 93, pp. 50–56. doi: 10.31631/2073-3046-2017-16-2-50-54 (In Russ.)]
7. Онищенко Г.Г., Федоров Ю.М., Пакскина Н.Д. Организация надзора за клещевым вирусным энцефалитом и меры по его профилактике в Российской Федерации // Вопросы вирусологии. 2007. № 5. С. 8–10. [Onishchenko G.G., Fedorov Yu.M., Pakskina N.D. Organization of supervision for tick-borne encephalitis and measures on its preventive maintenance in the Russian Federation. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2007, no. 5, pp. 8–10. (In Russ.)]
8. Погодина В.В. Актуальные проблемы клещевого энцефалита на рубеже XX–XXI веков // Медицинская вирусология. 2015. Т. 29, № 2. С. 24–32. [Pogodina V.V. Actual problems of tick-borne encephalitis at the turn of XX–XXI centuries. *Meditsinskaya virusologiya = Medical Virology*, 2015, vol. 29, no. 2, pp. 24–32. (In Russ.)]
9. Погодина В.В., Левина Л.С., Скрынник С.М., Травина Н.С., Карань Л.С., Колясникова Н.М., Кармышева В.Я., Герасимов С.Г., Маленко Г.В., Перминов Л.В., Попов М.А., Бочкова Н.Г. Клещевой энцефалит с молниеносным течением и летальным исходом у многократно вакцинированного пациента // Вопросы вирусологии. 2013. № 2. С. 33–37. [Pogodina V.V., Levina L.S., Skrynnik S.M., Travina N.S., Karan L.S., Kolyasnikova N.M., Kamysheva V.Ya., Gerasimov S.G., Malenko G.V., Perminov L.V., Popov M.A., Bochkova N.G. Tick-borne encephalitis with fulminant course and lethal outcome in patients after plural vaccination. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2013, no. 2, pp. 33–37. (In Russ.)]
10. Погодина В.В., Щербинина М.С., Левина Л.С., Бочкова Н.Г. Изучение защитного титра антител против сибирского подтипа вируса клещевого энцефалита у вакцинированного населения // Медицинская вирусология. 2017. Т. 31, № 1. С. 39. [Pogodina V.V., Shcherbinina M.S., Levina L.S., Bochkova N.G. Study of the protective titer of antibodies against the Siberian subtype of tick-borne encephalitis virus in the vaccinated population. *Meditsinskaya virusologiya = Medical Virology*, 2017, vol. 31, no. 1, p. 39. (In Russ.)]
11. Романенко В.В., Килиячина А.С., Есюнина М.С., Анкудинова А.В., Пименова Т.А. Эффективность программы массовой иммунопрофилактики клещевого энцефалита // Биопрепараты. 2008. № 2. С. 9–14. [Romanenko V.V., Kilyachina A.S., Yesyunina M.S. Ankudinova A.A., Pimenova T.A. Effectiveness of the mass immunoprophylaxis program of tick-borne encephalitis. *Biopreparaty = Biopreparations*, 2008, no. 2, pp. 9–14. (In Russ.)]
12. СП 3.1.3. 2352-08 «Профилактика клещевого вирусного энцефалита». [SP 3.1.3.2352-08. «Prevention of tick-borne encephalitis» (In Russ.)]

13. Хайнц Ф., Хольцманн Х., Эссл А., Кундт М. Анализ эффективности вакцинации населения природных очагов Австрии против клещевого энцефалита // Вопросы вирусологии. 2008. Т. 53, № 2. С. 19–27. [Heinz F.X., Holzmann H., Essl A., Kundt M. Analysis of the efficiency of tick-borne encephalitis vaccination in the population in the natural foci of Austria. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2008, vol. 53, no. 2, pp. 19–27. (In Russ.)]
14. Чернохаева Л.Л., Майкова Г.Б., Рогова Ю.В., Романенко В.В., Есюнина М.С., Анкудинова А.А., Килячина Е.С., Ворович М.Ф., Карганова Г.Г. Сравнительная оценка серологических методов оценки защищенности населения от ВКЭ // Медицинская вирусология. 2017. Т. 31, № 1. С. 52. [Chernokhaeva L.L., Maikova G.B., Rogova Yu.V., Romanenko V.V., Yesyunina M.S., Ankudinova A.A., Kilyachina A.S., Vorovoch M.F., Karganova G.G., Comparative assessment of serological methods of assessment of security of the population from TBEV. *Meditinskaya virusologiya = Medical Virology*, 2017, vol. 31, no. 1, p. 52. (In Russ.)]
15. Belikov S.I., Kondratov I.G., Potapova U.V., Leonova G.N. The relationship between the structure of the tick-borne encephalitis virus strains and their pathogenic properties. *PLoS One*, 2014, vol. 9, no. 4. doi: 10.1371/journal.pone.0094946
16. Ecker M., Allison S.L., Meixner T., Heinz F.X. Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europa and Asia. *J. Gen. Virol.*, 1999, no. 80, pp. 179–185. doi: 10.1099/0022-1317-80-1-179
17. Heinz F.X., Kunz C. Tick-borne encephalitis and the impact of vaccination. *Arch. Virol.*, 2004, vol. 18, pp. 201–205.
18. King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *San Diego: Elsevier*, 2012, pp. 1003–1020.
19. Kunz C.H., Heinz F., Hofmann H. Immunogenicity and reactogenicity of a highly purified vaccine against tick-borne encephalitis. *J. Med. Virol.*, 1980, no. 6, pp. 103–109. doi: 10.1002/jmv.1890060202
20. Leonova G.N., Belikov S.I., Kondratov I.G., Takashima I. Comprehensive assessment of the genetics and virulence of tick-borne encephalitis virus strains isolated from patients with inapparent and clinical forms of the infection in the Russian Far East. *Virology*, 2013, vol. 443, pp. 89–98. doi: 10.1016/j.virol.2013.04.029
21. Leonova G.N., Pavlenko E.V. Characterization of neutralizing antibodies to Far Eastern of tick-borne encephalitis virus subtype and the antibody avidity for four tick-borne encephalitis vaccines in human. *Vaccine*, 2009, vol. 27, no. 21, pp. 2899–2904. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.02.069
22. Leonova G.N., Pavlenko E.V., Maistrovskaya O.S., Chausov E.V. Protective antibody titer for patients vaccinated against tick-borne encephalitis. *Procedia Vaccinol.*, 2011, vol. 4, pp. 84–91. doi: 10.1016/j.provac.2011.07.012

Авторы:

Леонова Г.Н., д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории природноочаговых трансмиссивных инфекций ФГБНУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, г. Владивосток, Россия;

Майстровская О.С., младший научный сотрудник лаборатории природноочаговых трансмиссивных инфекций ФГБНУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, г. Владивосток, Россия;

Лубова В.А., младший научный сотрудник лаборатории природноочаговых трансмиссивных инфекций ФГБНУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, г. Владивосток, Россия;

Санина Н.М., д.б.н., профессор, ведущий научный сотрудник Дальневосточного федерального университета, г. Владивосток, Россия.

Authors:

Leonova G.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Head Researcher, Laboratory of Natural Focal Transmissible Infections, Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russian Federation;

Majstrovskaya O.S., Junior Researcher, Laboratory of Natural Focal Transmissible Infections, Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russian Federation;

Lubova V.A., Junior Researcher, Laboratory of Natural Focal Transmissible Infections, Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russian Federation;

Sanina N.M., PhD, MD (Biology), Professor, Leading Researcher, Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation.

Поступила в редакцию 19.11.2018
Отправлена на доработку 09.04.2019
Принята к печати 30.04.2019

Received 19.11.2018
Revision received 09.04.2019
Accepted 30.04.2019