**ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
DOI: https://doi.org/10.36233/0507-4088-311

© МЕЛЕНТЬЕВ Д.А., НОВИКОВ Д.В., МОХОНОВА Е.В., НОВИКОВА Н.А., КАШНИКОВ А.Ю., СЕЛИВАНОВА С.Г., ГОЛИЦЫНА Л.Н., ЛАПИН В.А., ЦЫГАНОВА М.И., ЗАЙЦЕВ Д.Е., НОВИКОВ В.В., 2025

# Иммунологические свойства химерного белка, содержащего основной капсидный белок echovirus 30 (Picornaviridae: *Enterovirus: Enterovirus betacoxsackie*)

Мелентьев Д.А.✉, Новиков Д.В., Мохонова Е.В., Новикова Н.А., Кашников А.Ю., Селиванова С.Г., Голицына Л.Н., Лапин В.А., Цыганова М.И., Зайцев Д.Е., Новиков В.В.

ФБУН «Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 603950, г. Нижний Новгород, Россия

**Резюме**

**Введение.** Энтеровирусная инфекция, широко распространенная в мире и в России, характеризуется разнообразием клинических форм, одной из которых является серозный менингит. Наиболее частой причиной энтеровирусного менингита у детей является вирус echovirus 30 (E30). Ранее нами получен химерный белок, состоящий из S-домена белка VP1 норовируса ($S_N$), слитого в одну молекулу с VP1 E30 ($S_N$-$VP1_{E30}$), который в перспективе может быть использован для разработки вакцины для профилактики энтеровирусного менингита, вызванного вирусом E30.

**Целью** настоящей работы явилось изучение иммунологических свойств белка $S_N$-$VP1_{E30}$.

**Материалы и методы.** Мышей линии Balb/c и морскую свинку иммунизировали белком $S_N$-$VP1_{E30}$. Продукцию антител класса G (IgG) и M (IgM) исследовали методом иммуноферментного анализа. Взаимодействие антител против $S_N$-$VP1_{E30}$ с вирионами энтеровирусов E30 разных генотипов изучали методом электронной микроскопии. Реакцию нейтрализации E30 антителами проводили в культуре клеток RD.

**Результаты.** У мышей, иммунизированных $S_N$-$VP1_{E30}$ без адъюванта, средние титры суммарных антител против VP1 E30 составили 1 : 19 000. Использование адъюванта повышало средний титр антител в 3 раза. Уровень IgM был значительно ниже и составил в среднем 1 : 1500. С помощью иммуноэлектронной микроскопии показано, что антитела морской свинки против химерного $S_N$-$VP1_{E30}$ способны связывать вирионы E30 генотипов h и eC2. Антитела мышей и морской свинки способны нейтрализовать E30 в культуре клеток RD. У мышей титры нейтрализующих антител варьировали от 20 до 40, у морской свинки составили 40.

**Заключение.** Иммуногенность $S_N$-$VP1_{E30}$ у двух видов животных и способность антител связывать и нейтрализовать энтеровирус E30 позволяет предложить его в качестве антигена в составе вакцины для профилактики заболеваний, вызванных E30.

**Ключевые слова:** *вирусоподобные частицы; VP1 норовируса; VP1 echovirus 30; химерные белки; вакцины*

**Для цитирования:** Мелентьев Д.А., Новиков Д.В., Мохонова Е.В., Новикова Н.А., Кашников А.Ю., Селиванова С.Г., Голицына Л.Н., Лапин В.А., Цыганова М.И., Зайцев Д.Е., Новиков В.В. Иммунологические свойства химерного белка, содержащего основной капсидный белок echovirus 30 (Picornaviridae: *Enterovirus: Enterovirus betacoxsackie*). *Вопросы вирусологии.* 2025; 70(2): 189–198. DOI: https://doi.org/10.36233/0507-4088-311 EDN: https://elibrary.ru/peagdt

**Финансирование.** Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Этическое утверждение.** Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus Author Guidelines for Animal Use (IAVES, 23.07.2010). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора (Протокол № 5 от 25.11.2021).

**ORIGINAL STUDY ARTICLE**
DOI: https://doi.org/10.36233/0507-4088-311

# Immunological properties of a chimeric protein containing the major capsid protein of echovirus 30 (Picornaviridae: *Enterovirus: Enterovirus betacoxsackie*)

Dmitry A. Melentev✉, Dmitry V. Novikov, Ekaterina V. Mokhonova, Nadezhda A. Novikova, Alexander Yu. Kashnikov, Svetlana G. Selivanova, Lyudmila N. Golitsyna, Vladislav A. Lapin, Maria I. Tsyganova, Dmitry E. Zaitsev, Viktor V. Novikov

Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare (Rospotrebnadzor), 603950, Nizhny Novgorod, Russia

**Abstract**

**Introduction.** Enterovirus infection, widespread in the world and in Russia, is characterized by a variety of clinical forms, one of which is serous meningitis. The most common cause of enterovirus meningitis in children is echovirus 30 (E30). Previously, we obtained a chimeric protein consisting of the S domain of norovirus VP1 protein($S_N$), fused into one molecule with VP1 protein of E30 ($S_N$-$VP1_{E30}$), which in the future can be used to develop a vaccine for the prevention of enterovirus meningitis caused by the E30 virus.

**The aim** of this work was to study the immunological properties of the $S_N$-$VP1_{E30}$ protein.

**Materials and methods.** Balb/c mice and a guinea pig were immunized with the $S_N$-$VP1_{E30}$ protein. The production of IgG and IgM antibodies was studied by ELISA. The interaction of antibodies against $S_N$-$VP1_{E30}$ with virions of enteroviruses E30 of different genotypes was studied by electron microscopy. The reaction of neutralization of E30 by antibodies was carried out *in vitro* in RD cells.

**Results.** In mice immunized with $S_N$-$VP1_{E30}$ without adjuvant, the average titers of total antibodies against E30 VP1 protein were 1 : 19,000. The use of adjuvant increased the average titer of antibodies by 3 times. The level of IgM antibodies was significantly lower and amounted to, on average, 1 : 1500. Using immunoelectron microscopy, it was shown that guinea pig antibodies against chimeric $S_N$-$VP1_{E30}$ are able to bind virions of E30 genotypes h and eC2. Mouse and guinea pig antibodies were able to neutralize E30 in RD cell line. Neutralizing antibody titers in mice varied from 20 to 40, and were  40 in guinea pigs.

**Conclusion.** The immunogenicity of $S_N$-$VP1_{E30}$ in two animal species and the ability of antibodies to bind and neutralize enterovirus E30 allows us to propose it as an antigen in a vaccine for the prevention of diseases caused by E30.

**Keywords:** *virus-like particles; norovirus VP1; echovirus 30 VP1; chimeric proteins; vaccines*

**For citation:** Melentev D.A., Novikov D.V., Mokhonova E.V., Novikova N.A., Kashnikov A.Yu., Selivanova S.G., Golitsyna L.N., Lapin V.A., Tsyganova M.I., Zaitsev D.E., Novikov V.V. Immunological properties of a chimeric protein containing the major capsid protein of echovirus 30 (Picornaviridae: *Enterovirus: Enterovirus betacoxsackie*). *Problems of Virology* (*Voprosy Virusologii*). 2025; 70(2): 189–198 (In Russ.). DOI: https://doi.org/10.36233/0507-4088-311 EDN: https://elibrary.ru/peagdt

**Funding.** This study was not supported by any external sources of funding.

**Conflict of interest.** The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

**Ethics approval.** Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with Consensus author guidelines for animal use (IAVES 23 July 2010). The research protocol was approved by the Ethics Committee of the FSBI «Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology» (Protocol No. 5 dated 25 November 2021).

## Введение

Echovirus 30 (E30, ECHO30; сем. Picornaviridae, род *Enterovirus*, вид *Enterovirus betacoxsackie*) и другие представители вида *E. betacoxsackie* являются доминирующими возбудителями энтеровирусного менингита (ЭВМ) во многих странах. В РФ ежегодно регистрируется от одного до нескольких тысяч случаев заболевания ЭВМ. В периоды с высокой заболеваемостью ЭВМ вирус E30 чаще других энтеровирусов обнаруживается у больных. В возрастной структуре заболевших ЭВМ более 90% приходится на долю детского населения. В последние годы в РФ зафиксирован рост заболеваемости энтеровирусной инфекцией. В возрастной структуре заболевших ЭВМ на территории РФ в 2023 г. доля детского населения составила 91,2%. Чаще других энтеровирусов у больных ЭВМ обнаруживался вирус E30 (32,39%) [1]. Для успешного выздоровления больного от энтеровирусной инфекции требуется эффективный иммунный ответ. Подобный иммунный ответ включает в себя активацию клеток врожденной иммунной системы и продукцию

высоких титров антител плазматическими клетками. При энтеровирусной инфекции особенно важен именно антительный ответ, который развивается при инфицировании и способен предотвратить повторное заражение [2, 3]. Наиболее эффективным способом сформировать гуморальный ответ является профилактическая вакцинация, однако вакцины против большинства энтеровирусов, включая вирус E30, отсутствуют.

Поверхность капсида энтеровирусов сформирована белками VP1, VP2 и VP3. Среди них VP1 является основным структурным белком капсида E30. У многих энтеровирусов в составе VP1 обнаружены линейные и конформационные эпитопы, связывание антител с которыми приводит к нейтрализации вируса [4]. На данный момент существует множество исследований, направленных на создание вакцин против энтеровирусов с использованием белка VP1 или пептидов, входящих в его состав. Однако рекомбинантные белки VP1 обычно проявляли меньшую иммуногенность у мышей по сравнению с иммунизацией инактивированными энтеровирусами. Среди подходов, используемых для повышения иммуногенности рекомбинантных белков, применяется конструирование химерных вирусоподобных частиц (англ. virus-like particles, VLP, ВпЧ). ВпЧ в своем строении имитируют размеры и структуру вирусных патогенов, а их поверхность может быть декорирована различными гетерологичными антигенами. Показано, что вакцины, использующие в качестве антигена ВпЧ, обладают высокой иммуногенностью [5–7].

В предыдущем исследовании нами был получен химерный белок, состоящий из S-домена белка VP1 норовируса ($S_N$), слитого в одну молекулу с белком VP1 E30 ($S_N$-$VP1_{E30}$). Химерный белок был способен образовывать ВпЧ [8]. В настоящей работе проведено изучение иммуногенных свойств белка $S_N$-$VP1_{E30}$.

## Материалы и методы

### *Получение рекомбинантных белков*

Рекомбинантные белки $S_N$ (S-домен капсидного белка VP1 норовируса), $VP1_{E30}$ (полноразмерный капсидный белок VP1 энтеровируса E30) и $S_N$-$VP1_{E30}$ (рекомбинантный химерный белок) в составе плазмид pET22b экспрессировали в *Escherichia coli* Rosetta 2 (DE3), очищали методом аффинной хроматографии в денатурирующих условиях и ренатурировали, как описано ранее [8–10].

### *Получение антисывороток*

Для исследования иммуногенности $S_N$-$VP1_{E30}$ использовали самок мышей ($n$ = 30) линии Balb/c (возраст 8 нед, масса 18–20 г). Мышей иммунизировали внутрибрюшинно дважды с интервалом в 2 нед. Для одной инъекции использовали 10 мкг $S_N$-$VP1_{E30}$ в 500 мкл растворителя (50 мМ трис-HCl, 150 мМ NaCl и 20% глюкозы, pH 7,4). Для иммунизации с адъювантом 10 мкг рекомбинантного белка смешивали с 100 мкг $Al(OH)_3$ («ИмБио», Россия), инкубировали в течение 12 ч при 4 °C, доводили объем до 500 мкл растворителем. В качестве отрицательного контроля мышей иммунизировали только растворителем. Через 19 сут после второй иммунизации производили забор крови, из которой готовили сыворотку крови стандартным методом.

Для исследования взаимодействия антител против $S_N$-$VP1_{E30}$ с вирусом E30 самку морской свинки (*Cavia porcellus*) иммунизировали подкожно в двух повторах с интервалом в 2 нед. Для одной инъекции использовали 500 мкг $S_N$-$VP1_{E30}$ в смеси с 5 мг $Al(OH)_3$ в 5 мл растворителя (50 мМ трис-HCl, 150 мМ NaCl и 20% глюкозы, pH 7,4). Через 21 сут после бустерной иммунизации проводили забор крови и получали сыворотку. Для приготовления суммарной фракции IgG-антител к сыворотке крови добавляли сульфат аммония до 33%, инкубировали в течение ночи при 4 °C и центрифугировали при 14 000 об/мин в микроцентрифуге Minispin (Eppendorf). Осадок растворяли в буфере (50 мМ трис-HCl, 150 мМ NaCl и 10% глицерина, pH 7,4) и проводили диализ против того же буфера.

### *Иммуноферментный анализ (ИФА)*

Очищенные рекомбинантные белки $VP1_{E30}$ или $S_N$ разводили физиологическим раствором до концентрации 1 мкг/мл и сорбировали в лунках 96-луночных планшетов в течение 24 ч при 4 °C. Для определения титра антител готовили серийные разведения сыворотки крови в ФСБ-Т (0,01 М натрий-фосфатный буферный раствор, 0,9% NaCl и 0,1% Твин-20, pH 7,4, 5% осветленного лизата клеток *E. coli* Rosetta 2) в диапазоне от 100 до 164 025 раз. В качестве вторых антител применяли антитела козы к суммарным иммуноглобулинам (Ig) мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена (ИМТЕК, Россия), антитела против мышиных иммуноглобулинов класса M (IgM) (Elabscience, Китай) или белок A, меченный пероксидазой хрена, для обнаружения антител морской свинки. Для визуализации реакции в лунки планшетов вносили по 100 мкл 0,04% тетраметилбензидина и 0,02% перекиси водорода в натрий-цитратном буферном растворе, pH 5,0. Реакцию останавливали 1N серной кислотой и измеряли величину оптической плотности (ОП) на спектрофотометре Infinite M200 Pro (Tecan, Австрия) в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения 680 нм.

Для определения авидности антител образцы анализировали в дублях иммуноферментным методом с описанными ниже модификациями. Перед добавлением конъюгата в одну из двух лунок каждого из образцов вносили 100 мкл раствора 8М мочевины в ФСБ-Т, инкубировали в течение 3 мин, отмывали 5 раз и проводили ИФА, как описано выше. Индекс авидности рассчитывали как отношение величины ОП в лунках с 8М мочевиной к величине ОП в лунках без мочевины, полученной для одного образца сыворотки крови, выраженной в процентах.

*Реакция нейтрализации*

Вируснейтрализующие свойства антител исследовали с помощью реакции нейтрализации вируса E30 в культуре клеток эмбриональной рабдомиосаркомы – RD («Биолот», Россия). Клетки выращивали в среде DMEM, содержащей 2% витаминов для среды RPMI-1640, 2% аминокислот, заменимых для MEM, 2% L-глутамина 200 мМ, пенициллина-стрептомицина («ПанЭко», Россия), 10% эмбриональной телячьей сыворотки («Biosera», Франция). Для заражения использовали вирусы E30 с генотипом eC2 (изолят 2045/23) и генотипом h (изолят 2700/16), ранее выделенные с использованием клеток RD от больных с подтвержденным методом полимеразной цепной реакции диагнозом «энтеровирусный менингит» [11]. Сыворотку крови иммунизированных лабораторных животных прогревали в течение 30 мин при 56 °C. Далее в 4 повторах проводили последовательные 10-кратные разведения сыворотки полной питательной средой, содержащей 100 50% тканевых цитопатических доз ($ТЦД_{50}$) E30, и инкубировали в течение 1 ч при 37 °C. Из лунок 96-луночного планшета, содержащих 100% монослой клеток RD, удаляли ростовую среду и вносили разведения сыворотки крови иммунизированных животных. В качестве контролей использовали сыворотку крови неиммунизированных мышей, питательную среду, не содержащую вирус, и питательную среду, содержащую 100 $ТЦД_{50}$ E30. Клетки инкубировали в течение 4 сут при 37 °C и 5% $CO_2$. Результаты оценивали с использованием колориметрического теста для оценки метаболической активности клеток (МТТ-тест). Для этого в каждую лунку добавляли 10 мкл 0,0005% метилтиазолилтетразолия бромида, растворенного в DMEM, инкубировали в течение 2 ч при 37 °C и 5% $CO_2$, вносили 100 мкл растворителя (40% ДМСО, 16% SDS и 2% уксусной кислоты, pH 4,7) и перемешивали до полного растворения кристаллов формазана. Учет результатов проводили спектрофотометрически при ОП 570 нм с учетом фоновых значений при 620 нм. Нейтрализующий титр определяли по последнему разведению сыворотки, в которой средний показатель ОП был равен или превышал пороговое значение, рассчитанное как половина разницы между ОП в лунках с незараженными клетками и ОП в лунках с клетками, зараженными вирусом E30.

*Электронная микроскопия*

Способность антител против $S_N$-$VP1_{E30}$, полученных из сыворотки морской свинки, взаимодействовать с вирионами энтеровируса E30 разных генотипов изучали методом электронной микроскопии (ЭМ). Использовали фекалии двух пациентов, в которых были обнаружены E30 с генотипом eC2 (E30-eC2 1194/24) и h (E30-h 2671/17). В качестве контрольного образца использовали фекалии, в которых был обнаружен Norovirus GII.4 130/24. Готовили 10% суспензию вируссодержащих фекалий в физиологическом растворе, центрифугировали при 5000 об/мин в течение 10 мин, супернатант последовательно фильтровали через мембранные фильтры PES Female Luer Lok/Male Luer slip с размером пор 0,45 мкм, а затем 0,22 мкм (Membrane Solutions LLC (MS), Китай) и использовали в работе.

Для проведения иммуноэлектронной микроскопии на медную сетку для ЭМ, покрытую парлодиевой пленкой-подложкой, сорбировали фракцию иммуноглобулинов морской свинки, содержащую антитела класса G (IgG) против $S_N$-$VP1_{E30}$, в течение 60 мин при комнатной температуре. Избыток иммуноглобулинов отмывали водой, сетку помещали на каплю вирусной суспензии и инкубировали в течение 60 мин при 37 °C. Препараты окрашивали водным раствором 2% уранилацетата (pH 4,5). В качестве контроля использовали сетку без сорбированных антител.

Для исследования возможности формирования иммунных комплексов к 20 мкл вирусной суспензии добавляли 20 мкл антител морской свинки и инкубировали в течение 30 мин при 37 °C, затем в течение 12 ч при 4 °C. После инкубации препараты центрифугировали в течение 30 мин при 10 000 об/мин. Полученные осадки разводили в 20 мкл воды и наносили на электронно-микроскопическую сетку, покрытую парлодиевой пленкой, контрастировали в водном растворе 2% фосфорно-вольфрамовой кислоты. Результаты визуализировали с помощью электронного микроскопа просвечивающего типа HT7700 (Hitachi, Япония).

## Результаты

*Иммуногенность $S_N$-$VP1_{E30}$*

На первом этапе работы сравнивали титры антител к белку $VP1_{E30}$ у мышей, иммунизированных слитым белком $S_N$-$VP1_{E30}$ с адъювантом и без. Поскольку $VP1_{E30}$ растворялся только в 4М мочевине, он использовался только в качестве антигена для выявления антител методом ИФА. В контрольных образцах сыворотки крови мышей, иммунизированных только буфером для растворения белков, антитела к рекомбинантным белкам $VP1_{E30}$ и $S_N$ норовируса не выявлены. Титры суммарных антител против $VP1_{E30,}$ иммунизированных $S_N$-$VP1_{E30}$, в среднем достигали 1 : 19 000 (**рис. 1** *а*). Использование адъюванта повышало средний титр антител в 3 раза ($p = 0,0471$). Для того чтобы определить, какая из частей химерного белка обладала большей иммуногенностью, проводили исследование титров антител против норовирусной части ($S_N$) химерного белка. Установлено, что титры антител против $VP1_{E30}$ были значительно выше, чем титры против $S_N$ (рис. 1 *а*) как при использовании адъюванта ($p = 0,0078$), так и без него ($p = 0,0078$). Уровни IgM-антител не отличались между группами мышей, иммунизированных с адъювантом и без него (рис. 1 *б*).

Установлено, что в среднем индекс авидности суммарных антител против $VP1_{E30}$ составил 47% и использование адъюванта не влияло на этот показатель (**рис. 2** *а*). В то же время авидность антител против $VP1_{E30}$ была выше, чем авидность антител против $S_N$ ($p = 0,044$), использование адъюванта сглаживало данный эффект. Индекс авидности IgM-антител к белку $VP1_{E30}$ не отличался от показателя

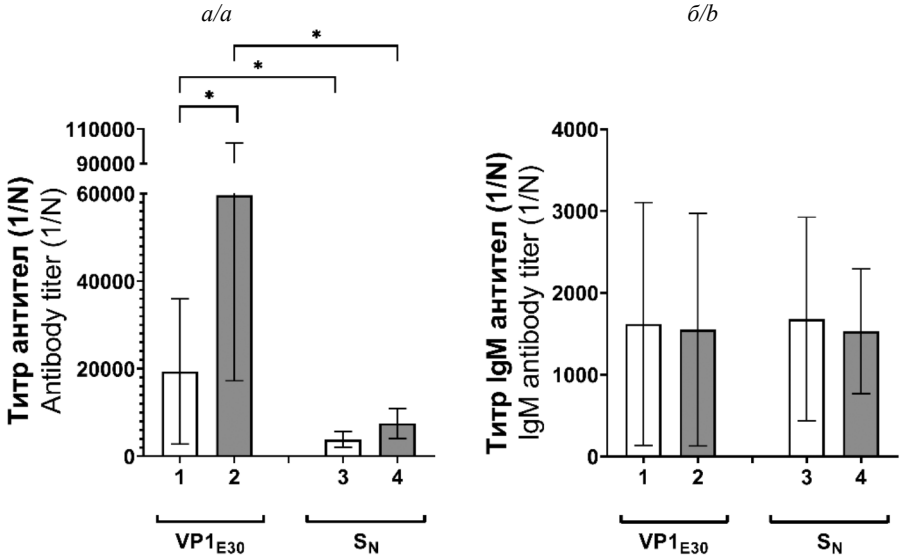


**Рис. 1.** Сравнение титров антител к белкам $VP1_{E30}$ и $S_N$ после иммунизации мышей химерным белком $S_N$-$VP1_{E30}$.

*а* – титры суммарных антител ($n$ = 10); *б* – титры IgM-антител ($n$ = 10). 1 – титр антител против $VP1_{E30}$ при иммунизации без адъюванта, 2 – титр антител против $VP1_{E30}$ при иммунизации с адъювантом, 3 – титр антител против $S_N$ при иммунизации без адъюванта, 4 – титр антител против $S_N$ в смеси с адъювантом. * – $p \leq 0{,}05$.

**Fig. 1.** Comparison of antibody titers to $VP1_{E30}$ and $S_N$ proteins after immunization of mice with the chimeric $S_N$-$VP1_{E30}$ protein.

*a* – total antibody titers ($n$ = 10); *b* – IgM antibody titers ($n$ = 10). 1 – titer of antibodies against $VP1_{E30}$ upon immunization without adjuvant, 2 – titer of antibodies against $VP1_{E30}$ upon immunization with adjuvant, 3 – titer of antibodies against $S_N$ upon immunization without adjuvant, 4 – titer of antibodies against $S_N$ in a mixture with adjuvant. * – $p \leq 0.05$.

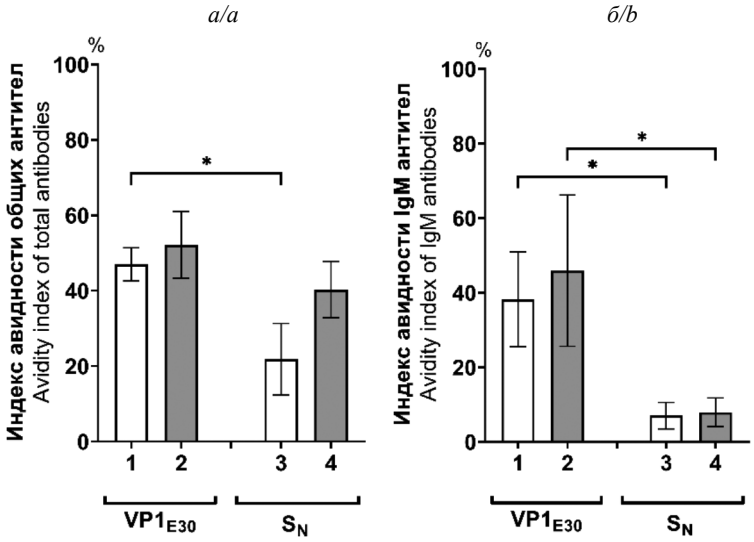


**Рис. 2.** Сравнение индексов авидности антител против $VP1_{E30}$ и $S_N$ после иммунизации мышей химерным белком $S_N$-$VP1_{E30}$.

*а* – индекс авидности суммарных иммуноглобулинов ($n$ = 10); *б* – индекс авидности IgM-антител ($n$ = 10). 1 – индекс авидности антител против $VP1_{E30}$ после иммунизации мышей $S_N$-$VP1_{E30}$ без адъюванта, 2 – индекс авидности антител против $VP1_{E30}$ после иммунизации мышей $S_N$-$VP1_{E30}$ в смеси с адъювантом, 3 – индекс авидности антител против $S_N$ после иммунизации мышей $S_N$-$VP1_{E30}$ без адъюванта, 4 – индекс авидности антител против $S_N$ после иммунизации мышей в смеси с адъювантом. * – $p \leq 0{,}05$.

**Fig. 2.** Comparison of the avidity indices of antibodies against $VP1_{E30}$ and $S_N$ after immunization of mice with the chimeric protein $S_N$-$VP1_{E30}$.

*a* – avidity index of total immunoglobulins ($n$ = 10); *b* – avidity index of IgM antibodies ($n$ = 10). 1 – avidity index of antibodies against $VP1_{E30}$ after immunization of mice with $S_N$-$VP1_{E30}$ without adjuvant, 2 – avidity index of antibodies against $VP1_{E30}$ after immunization of mice with $S_N$-$VP1_{E30}$ mixed with adjuvant, 3 – avidity index of antibodies against $S_N$ after immunization of mice with $S_N$-$VP1_{E30}$ without adjuvant, 4 – avidity index of antibodies against $S_N$ after immunization of mice mixed with adjuvant. * – $p \leq 0.05$.

у суммарных антител и был выше, чем аналогичный показатель у IgM против $S_N$ вне зависимости от того, использовали адъювант ($p$ = 0,033) или нет ($p$ = 0,015) (рис. 2 *б*).

### *Взаимодействие антител против $S_N$-$VP1_{E30}$ с E30*

Способность антител к $S_N$-$VP1_{E30}$ взаимодействовать с вирионами E30 исследовали с помощью ЭМ.

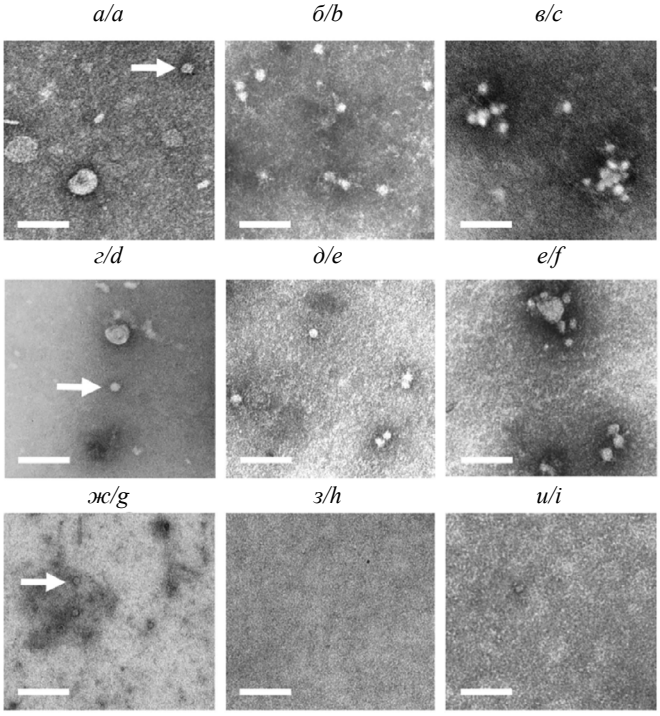


**Рис. 3.** Электронные микрофотографии иммунокомплексов. Цена деления – 100 нм.

*а* – исходный препарат E30-eC2 1194/24; *б* – взаимодействие антител против $S_N$-$VP1_{E30}$ и энтеровируса E30-eC2; *в* – образования иммунных комплексов с E30-eC2; *г* – исходный препарат E30-h 2671/17; *д* – взаимодействия антител против $S_N$-$VP1_{E30}$ и энтеровируса E30-h; *е* – образования иммунных комплексов с E30-h; *ж* – исходный препарат Norovirus GII.4 130/24; *з* – взаимодействия антител против $S_N$-$VP1_{E30}$ и Norovirus GII.4; *и* – образования иммунных комплексов с Norovirus GII.4.

**Fig. 3.** Electron micrographs of immune complexes. The bar represents 100 nm.

*a* – original preparation E30-eC2 1194/24; *b* – interactions of antibodies against $S_N$-$VP1_{E30}$ and enterovirus E30-eC2; *c* – formation of immune complexes with E30-eC2; *d* – original preparation E30-h 2671/17; *e* – interactions of antibodies against $S_N$-$VP1_{E30}$ and enterovirus E30-h; *f* – formation of immune complexes with E30-h; *g* – original preparation Norovirus GII.4 130/24; *h* – interactions of antibodies against $S_N$-$VP1_{E30}$ and Norovirus GII.4; *i* – formation of immune complexes with Norovirus GII.4.

На первом этапе подтверждали присутствие в исследуемом препарате вирусных частиц E30 и норовируса (**рис. 3** *а, г, ж*). Далее с использованием сеток, на поверхности которых сорбированы иммуноглобулины против $S_N$-$VP1_{E30}$, было показано, что исследуемые антитела способны связывать вирусные частицы E30 генотипов h и eC2 (рис. 3 *б, д*), что проявилось в увеличении количества наблюдаемых вирионов. Норовирус не выявлялся с использованием сеток, покрытых антителами против $S_N$-$VP1_{E30}$ (рис. 3 *з*). Исследование образования иммунокомплексов антител против $S_N$-$VP1_{E30}$ с вирусными частицами показало сходные результаты. Добавление к препаратам вирусов E30-eC2 и E30-h антител против $S_N$-$VP1_{E30}$ приводило к появлению агрегатов вирусных частиц (рис. 3 *в, е*), которых не наблюдалось с вирионами норовируса (рис. 3 *и*).

В реакции нейтрализации вируса E30 в культуре клеток были исследованы сыворотки крови 3 мышей, иммунизированных $S_N$-$VP1_{E30}$ без адъюванта, 3 мышей, иммунизированных $S_N$-$VP1_{E30}$ с адъювантом, и сыворотка морской свинки, иммунизированной $S_N$-$VP1_{E30}$ с адъювантом. Установлено, что антитела мыши и морской свинки были способны нейтрализовать E30 генотипов h и eC2. У мышей титры нейтрализующих антител варьировали от 20 до 40, а у морской свинки составили 40.

## Обсуждение

Многолетний опыт применения вакцин против полиомиелита показывает, что аттенуированные штаммы энтеровирусов способны к быстрому восстановлению вирулентности, а производство инактивированной вакцины сопряжено с биологическими рисками [12]. В связи с этим исследования направлены на разработку альтернативных вакцин, в которых присутствие генетического материала энтеровирусов сведено к минимуму. Субъединичные вакцины показали низкую иммуногенность. Например, при использовании гена VP1 EV-A71 в составе ДНК-вакцины была показана индукция специфичного, но низкого антительного ответа против VP1 EV-A71 у мышей [13]. В другом исследовании при иммунизации короткими пептидами SP55 и SP70 из области VP1 EV-A71 титры антител против них были ниже, чем против инактивированного вируса EV-A71 [14]. Для повышения иммуногенности энтеровирусных белков широкое распространение получили ВпЧ [15]. Полученный в нашем исследовании путем генетического слияния с S-доменом белка VP1 норовируса и VP1 E30 химерный белок $S_N$-$VP1_{E30}$ образовывал полые сферические ВпЧ диаметром 30–50 нм [8]. Иммунизация мышей раствором $S_N$-$VP1_{E30}$ без адъю-

ванта, приводила к продукции высоких титров антител против $VP1_{E30}$ с авидностью, превышающей 50%. Титры антител против $VP1_{E30}$ были сопоставимы с титрами антител против VP1 EV-A71, полученными другими авторами при иммунизации мышей инактивированным вирусом [16, 17].

Следует отметить, что титры антител против $VP1_{E30}$ были намного выше, чем титры антител против $S_N$. Индекс авидности к белку $VP1_{E30}$ также был выше ($p$ = 0,044), чем к норовирусному $S_N$, при иммунизации без адъюванта, что свидетельствует о развитии гуморального иммунного ответа преимущественно на антиген, расположенный на поверхности химерных ВпЧ. В аналогичном исследовании иммуногенных свойств ВпЧ, состоящих из $S_N$ и белка VP8 ротавируса, были получены сходные результаты, титры антител к VP8 были выше, чем к $S_N$ [18].

Особый интерес представляет продукция антител IgM против химерного белка, которые сохранялись на 33-и сутки после иммунизации в титрах, в среднем составляющих 1 : 1500. Ранее W. Zhu и соавт. показали, что небольшие дозы моноклональных IgM M20 против VP1 энтеровируса EV-A71 нейтрализовали EV-A71 *in vitro* и *in vivo* более эффективно, чем IgG. Кроме того, IgM были способны нейтрализовать другие энтеровирусы (CVA6, CVA10 и CVA16), в отличие от IgG [19, 20].

Последние 10 лет в генотиповой структуре российских штаммов вируса E30 преобладали 2 генотипа: h и eC2 [1, 21]. Для того чтобы понять, как антитела против химерного белка $S_N$-$VP1_{E30}$ взаимодействуют с разными генотипами E30, проводили иммунную ЭМ. Показано, что антитела способны связывать вирионы E30 генотипов h и eC2 как при сорбции антител на подложке микроскопической сетки, так и в свободном виде, с образованием агрегатов вирусных частиц. Данные результаты свидетельствуют о сохранении антигенных детерминант в составе химерного белка, антитела против которых способны связывать вирионы E30 разных генотипов. Полученные нами результаты совпадали с описанными ранее для EV70. D. Chen и соавт. показали, что антитела против VP1 EV70 также вызывали иммунопреципитацию разных генотипов вируса [22]. Кроме того, после иммунизации двух видов животных антитела против $S_N$-$VP1_{E30}$ нейтрализовали разные генотипы E30 *in vitro*, что свидетельствует о перспективности использования $S_N$-$VP1_{E30}$ в качестве антигена в составе вакцины.

Следует отметить, что в ответ на иммунизацию $S_N$-$VP1_{E30}$ образовывались антитела против S-части белка VP1 норовируса. Однако эти антитела не были способны связывать вирионы норовируса. Данное наблюдение объясняется структурной организацией вириона норовируса, VP1 которого состоит из P- и S-доменов. При этом P-домен формирует поверхность капсида и стерически экранирует доступ антител к S-домену, который расположен внутри капсида [23].

## Заключение

Таким образом, иммунизация двух видов лабораторных животных с использованием $S_N$-$VP1_{E30}$ показала сильный антительный ответ на VP1 E30. Антитела против VP1 E30 были способны связывать и нейтрализовать *in vitro* разные генотипы E30. Представленные данные свидетельствуют о том, что химерный белок $S_N$-$VP1_{E30}$ может быть предложен в качестве антигена в составе вакцины для профилактики заболеваний, вызванных E30.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Голицына Л.Н., Кашникова А.Д., Полянина А.В., Зайцева Н.Н., Михайлова Ю.М., Черепанова Е.А. Энтеровирусная (неполио) инфекция в Российской Федерации в 2023 г. В кн.: *Заболеваемость, этиологическая структура и вопросы профилактики энтеровирусной (неполио) инфекции: Информационный бюллетень № 11*. Нижний Новгород; 2024: 3–8. Available at: https://nniiem.ru/file/razrabotki/2024/nniiem-inf-byulleten-n-11-po-eviza-2023-dlya-sayta-korr-oformlenie-novikova-na.pdf
2. Wallace G.S., Curns A.T., Weldon W.C., Oberste M.S. Seroprevalence of poliovirus antibodies in the United States population, 2009–2010. *BMC Public Health.* 2016; 16: 721. https://doi.org/10.1186/s12889-016-3386-1
3. Zhu R., Cheng T., Yin Z., Liu D., Xu L., Li Y., et al. Serological survey of neutralizing antibodies to eight major enteroviruses among healthy population. *Emerg. Microbes Infect.* 2018; 7(1): 2. https://doi.org/10.1038/s41426-017-0003-z
4. Huang K.A. Structural basis for neutralization of enterovirus. *Curr. Opin. Virol.* 2021; 51: 199–206. https://doi.org/10.1016/j.coviro.2021.10.006
5. Al-Barwani F., Donaldson B., Pelham S.J., Young S.L., Ward V.K. Antigen delivery by virus-like particles for immunotherapeutic vaccination. *Ther. Deliv.* 2014; 5(11): 1223–40. https://doi.org/10.4155/tde.14.74
6. Chroboczek J., Szurgot I., Szolajska E. Virus-like particles as vaccine. *Acta Biochim. Pol.* 2014; 61(3): 531–9.
7. Ye X., Ku Z., Liu Q., Wang X., Shi J., Zhang Y., et al. Chimeric virus-like particle vaccines displaying conserved enterovirus 71 epitopes elicit protective neutralizing antibodies in mice through divergent mechanisms. *J. Virol.* 2014; 88(1): 72–81. https://doi.org/10.1128/JVI.01848-13
8. Новиков Д.В., Мелентьев Д.А., Мохонов В.В., Кашников А.Ю., Новикова Н.А., Лапин В.А. и др. Получение вирусоподобных частиц норовируса (Caliciviridae: Norovirus), содержащих белок VP1 энтеровируса Echovirus 30 (Picornaviridae: Enterovirus: Enterovirus B). *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(5): 383–9. https://doi.org/10.36233/0507-4088-79 https://elibrary.ru/mkbqet
9. Лапин В.А., Новиков Д.В., Мохонова Е.В., Мелентьев Д.А., Цыганова М.И., Зайцев Д.Е. и др. Получение рекомбинантного белка VP1 норовируса и его антигенные и иммуногенные свойства. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2024; 101(5): 661–7. https://doi.org/10.36233/0372-9311-552 https://elibrary.ru/ubmktf
10. Мелентьев Д.А., Новиков Д.В., Лапин В.А., Мохонова Е.В., Цыганова М.И., Манакова Э.А. и др. Антитела к поверхностным белкам Echovirus 30 (Enterovirus, Picornaviridae) в крови жителей Нижегородской области. *Инфекция и иммунитет*. 2024; 14(6): 1179–86. https://doi.org/10.15789/2220-7619-BAC-16103 https://elibrary.ru/exbfif
11. Nix W.A., Oberste M.S., Pallansch M.A. Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. *J. Clin. Microbiol*. 2006; 44(8): 2698–704. https://doi.org/10.1128/JCM.00542-06
12. Muslin C., Kain A.M., Bessaud M., Blondel B., Delpeyroux F. Recombination in enteroviruses, a multi-step modular evolutionary process. *Viruses.* 2019; 11(9): 859. https://doi.org/10.3390/v11090859
13. Yuan J., Tang X., Yin K., Tian J., Rui K., Ma J., et al. GITRL as a genetic adjuvant enhances enterovirus 71 VP1 DNA vaccine immunogenicity. *Immunol. Res.* 2015; 62(1): 81–8. https://doi.org/10.1007/s12026-015-8637-1
14. Foo D.G., Alonso S., Phoon M.C., Ramachandran N.P., Chow V.T., Poh C.L. Identification of neutralizing linear epitopes from the VP1

capsid protein of Enterovirus 71 using synthetic peptides. *Virus Res*. 2007; 125(1): 61–8. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2006.12.005
15. Collins K.A., Snaith R., Cottingham M.G., Gilbert S.C., Hill A.V.S. Enhancing protective immunity to malaria with a highly immunogenic virus-like particle vaccine. *Sci. Rep*. 2017; 7: 46621. https://doi.org/10.1038/srep46621
16. Wu C.N., Lin Y.C., Fann C., Liao N.S., Shih S.R., Ho M.S. Protection against lethal enterovirus 71 infection in newborn mice by passive immunization with subunit VP1 vaccines and inactivated virus. *Vaccine*. 2001; 20(5-6): 895–904. https://doi.org/10.1016/s0264-410x(01)00385-1
17. Zhou S.L., Ying X.L., Han X., Sun X.X., Jin Q., Yang F. Characterization of the enterovirus 71 VP1 protein as a vaccine candidate. *J. Med. Virol*. 2015; 87(2): 256–62. https://doi.org/10.1002/jmv.24018
18. Xia M., Huang P., Sun C., Han L., Vago F.S., Li K., et al. Bioengineered Norovirus S60 nanoparticles as a multifunctional vaccine platform. *ACS Nano*. 2018; 12(11): 10665–82. https://doi.org/10.1021/acsnano.8b02776
19. Zhu W., Liu Z., Zheng X., Li J., Lu K., Jiang X., et al. A broad and potent IgM antibody against tetra-EV-As induced by EVA71 and CVA16 co-immunization. *Vaccine*. 2021; 39(44): 6510–9. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.09.056
20. Zhu W., Li J., Wu Z., Li H., Zhang Z., Zhu X., et al. Dual blockages of a broad and potent neutralizing IgM antibody targeting GH loop of EV-As. *Immunology*. 2023; 169(3): 292–308. https://doi.org/10.1111/imm.13629
21. Голицына Л.Н., Зверев В.В., Епифанова Н.В., Сашина Т.А., Кашников А.Ю., Созонов Д.В. и др. Энтеровирусная (неполио) инфекция в Российской Федерации в 2017 г. В кн.: *Заболеваемость, этиологическая структура и вопросы профилактики энтеровирусной (неполио) инфекции: Информационный бюллетень № 5*. Нижний Новгород; 2018: 5–12. Available at: https://nniiem.ru/file/razrabotki/2018/byulleten-evi-2017-n5-may-18-1.pdf
22. Chen D., Duggan C., Texada D.E., Reden T.B., Kooragayala L.M., Langford M.P. Immunogenicity of enterovirus 70 capsid protein VP1 and its non-overlapping N- and C-terminal fragments. *Antiviral Res*. 2005; 66(2-3): 111–7. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2005.02.004.
23. Prasad B.V., Hardy M.E., Dokland T., Bella J., Rossmann M.G., Estes M.K. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science*. 1999; 286(5438): 287–90. https://doi.org/10.1126/science.286.5438.287

## REFERENCES

1. Golitsyna L.N., Kashnikova A.D., Polyanina A.V., Zaitseva N.N., Mikhailova Yu.M., Cherepanova E.A. Enterovirus (non-polio) infection in the Russian Federation in 2023. In: *Incidence, Etiological Structure and Prevention Issues of Enterovirus (Non-Polio) Infection: Electronic Resource [Zabolevaemost', etiologicheskaya struktura i voprosy profilaktiki enterovirusnoi (nepolio) infektsii: Informatsionnyi byulleten']*. Nizhnii Novgorod; 2024: 3–8. Available at: https://www.nniiem.ru/file/razrabotki/2024/nniiem-inf-byulleten-n-11-po-evi-za-2023-dlya-sayta-korr-oformlenie-novikova-na.pdf (in Russian)
2. Wallace G.S., Curns A.T., Weldon W.C., Oberste M.S. Seroprevalence of poliovirus antibodies in the United States population, 2009–2010. *BMC Public Health*. 2016; 16: 721. https://doi.org/10.1186/s12889-016-3386-1
3. Zhu R., Cheng T., Yin Z., Liu D., Xu L., Li Y., et al. Serological survey of neutralizing antibodies to eight major enteroviruses among healthy population. *Emerg. Microbes Infect*. 2018; 7(1): 2. https://doi.org/10.1038/s41426-017-0003-z
4. Huang K.A. Structural basis for neutralization of enterovirus. *Curr. Opin. Virol*. 2021; 51: 199–206. https://doi.org/10.1016/j.coviro.2021.10.006
5. Al-Barwani F., Donaldson B., Pelham S.J., Young S.L., Ward V.K. Antigen delivery by virus-like particles for immunotherapeutic vaccination. *Ther. Deliv*. 2014; 5(11): 1223–40. https://doi.org/10.4155/tde.14.74
6. Chroboczek J., Szurgot I., Szolajska E. Virus-like particles as vaccine. *Acta Biochim. Pol*. 2014; 61(3): 531–9.
7. Ye X., Ku Z., Liu Q., Wang X., Shi J., Zhang Y., et al. Chimeric virus-like particle vaccines displaying conserved enterovirus 71 epitopes elicit protective neutralizing antibodies in mice through divergent mechanisms. *J. Virol*. 2014; 88(1): 72–81. https://doi.org/10.1128/JVI.01848-13
8. Novikov D.V., Melentev D.A., Mokhonov V.V., Kashnikov A.Yu., Novikova N.A., Lapin V.A., et al. Construction of Norovirus (Caliciviridae: Norovirus) virus-like particles containing VP1 of the Echovirus 30 (Picornaviridae: Enterovirus: Enterovirus B). *Voprosy virusologii*. 2021; 66(5): 383–9. https://doi.org/10.36233/0507-4088-79 https://elibrary.ru/mkbqet (in Russian)
9. Lapin V.A., Novikov D.V., Mokhonova E.V., Melentyev D.A., Tsyganova M.I., Zaitsev D.E., et al. Production of recombinant norovirus VP1 protein and its antigenic and immunogenic properties. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2024; 101(5): 661–7. https://doi.org/10.36233/0372-9311-552 https://elibrary.ru/ubmktf (in Russian)
10. Melentev D.A., Novikov D.V., Lapin V.A., Mokhonova E.V., Tsiganova M.I., Manakova E.A., et al. Blood anti-surface proteins Echovirus 30 (Enterovirus, Picornaviridae) antibodies in residents of the Nizhny Novgorod region. *Infektsiya i immunitet*. 2024; 14(6): 1179–86. https://doi.org/10.15789/2220-7619-BAC-16103 https://elibrary.ru/exbfif (in Russian)
11. Nix W.A., Oberste M.S., Pallansch M.A. Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. *J. Clin. Microbiol*. 2006; 44(8): 2698–704. https://doi.org/10.1128/JCM.00542-06
12. Muslin C., Kain A.M., Bessaud M., Blondel B., Delpeyroux F. Recombination in enteroviruses, a multi-step modular evolutionary process. *Viruses*. 2019; 11(9): 859. https://doi.org/10.3390/v11090859
13. Yuan J., Tang X., Yin K., Tian J., Rui K., Ma J., et al. GITRL as a genetic adjuvant enhances enterovirus 71 VP1 DNA vaccine immunogenicity. *Immunol. Res*. 2015; 62(1): 81–8. https://doi.org/10.1007/s12026-015-8637-1
14. Foo D.G., Alonso S., Phoon M.C., Ramachandran N.P., Chow V.T., Poh C.L. Identification of neutralizing linear epitopes from the VP1 capsid protein of Enterovirus 71 using synthetic peptides. *Virus Res*. 2007; 125(1): 61–8. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2006.12.005
15. Collins K.A., Snaith R., Cottingham M.G., Gilbert S.C., Hill A.V.S. Enhancing protective immunity to malaria with a highly immunogenic virus-like particle vaccine. *Sci. Rep*. 2017; 7: 46621. https://doi.org/10.1038/srep46621
16. Wu C.N., Lin Y.C., Fann C., Liao N.S., Shih S.R., Ho M.S. Protection against lethal enterovirus 71 infection in newborn mice by passive immunization with subunit VP1 vaccines and inactivated virus. *Vaccine*. 2001; 20(5-6): 895–904. https://doi.org/10.1016/s0264-410x(01)00385-1
17. Zhou S.L., Ying X.L., Han X., Sun X.X., Jin Q., Yang F. Characterization of the enterovirus 71 VP1 protein as a vaccine candidate. *J. Med. Virol*. 2015; 87(2): 256–62. https://doi.org/10.1002/jmv.24018
18. Xia M., Huang P., Sun C., Han L., Vago F.S., Li K., et al. Bioengineered Norovirus S60 nanoparticles as a multifunctional vaccine platform. *ACS Nano*. 2018; 12(11): 10665–82. https://doi.org/10.1021/acsnano.8b02776
19. Zhu W., Liu Z., Zheng X., Li J., Lu K., Jiang X., et al. A broad and potent IgM antibody against tetra-EV-As induced by EVA71 and CVA16 co-immunization. *Vaccine*. 2021; 39(44): 6510–9. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.09.056
20. Zhu W., Li J., Wu Z., Li H., Zhang Z., Zhu X., et al. Dual blockages of a broad and potent neutralizing IgM antibody targeting GH loop of EV-As. *Immunology*. 2023; 169(3): 292–308. https://doi.org/10.1111/imm.13629
21. Golitsyna L.N., Zverev V.V., Epifanova N.V., Sashina T.A., Kashnikov A.Yu., Sozonov D.V., et al. Enterovirus (non-polio) infection in the Russian Federation in 2017. In: *Incidence, Etiological Structure and Prevention Issues of Enterovirus (Non-Polio) Infection: Electronic Resource [Zabolevaemost', etiologicheskaya struktura i voprosy profilaktiki enterovirusnoi (nepolio) infektsii: Informatsionnyi byulleten']*. Nizhnii Novgorod; 2024: 3–8. Available at: https://nniiem.ru/file/razrabotki/2018/byulleten-evi-2017-n5-may-18-1.pdf (in Russian)
22. Chen D., Duggan C., Texada D.E., Reden T.B., Kooragayala L.M., Langford M.P. Immunogenicity of enterovirus 70 capsid protein VP1 and itsnon-overlapping N- and C-terminal fragments. *Antiviral Research*. 2005; 66: 111–117. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2005.02.004.
23. Prasad B.V., Hardy M.E., Dokland T., Bella J., Rossmann M.G., Estes M.K. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science*. 1999; 286(5438): 287–90. https://doi.org/10.1126/science.286.5438.287

**Информация об авторах:**

**Мелентьев Дмитрий Александрович✉ –** младший научный сотрудник лаборатории иммунохимии Нижегородского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия. E-mail: dim-melente@yandex.ru; https://orcid.org/0000-0002-2441-6874

**Новиков Дмитрий Викторович –** канд. биол. наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунохимии Нижегородского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия. E-mail: novikov.dv75@mail.ru; https://orcid.org/0000-0001-7049-6935

**Мохонова Екатерина Валерьевна –** научный сотрудник лаборатории иммунохимии Нижегородского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия. E-mail: ekaterinamohonova@yandex.ru; https://orcid.org/0000-0002-9742-7646

**Новикова Надежда Алексеевна –** д-р биол. наук, профессор, ведущий научный сотрудник, заведующая лабораторией молекулярной эпидемиологии вирусных инфекций Нижегородского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия. E-mail: novikova_na@mail.ru; https://orcid.org/0000-0002-3710-6648

**Кашников Александр Юрьевич –** научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии вирусных инфекций Нижегородского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия. E-mail: mevirfc@mail.ru; https://orcid.org/0000-0003-1033-7347

**Селиванова Светлана Григорьевна –** канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии вирусных инфекций Нижегородского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия. E-mail: svetafor22@mail.ru; https://orcid.org/0000-0002-6610-1774

**Голицына Людмила Николаевна –** канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии вирусных инфекций Нижегородского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия. E-mail: lyudmila_galitzina@mail.ru; https://orcid.org/0000-0002-8064-4476

**Лапин Владислав Александрович –** младший научный сотрудник лаборатории иммунохимии Нижегородского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия. E-mail: fridens.95@yandex.ru; https://orcid.org/0000-0002-5905-5722

**Цыганова Мария Игоревна –** канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунохимии Нижегородского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия. E-mail: maria_che@mail.ru; https://orcid.org/0000-0002-2811-6844

**Зайцев Дмитрий Евгеньевич –** старший лаборант лаборатории иммунохимии Нижегородского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия. E-mail: mitya.zaitseff@yandex.ru; https://orcid.org/0000-0002-7663-6924

**Новиков Виктор Владимирович –** д-р биол. наук, профессор, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией иммунохимии Нижегородского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия. E-mail: mbre@mail.ru; https://orcid.org/0000-0002-2449-7213

**Участие авторов:** Мелентьев Д.А., Новиков Д.В. – планирование и проведение экспериментальных работ, написание текста; Мохонова Е.В. – проведение экспериментальных работ; Новикова Н.А. – проведение экспериментальных работ, написание текста; Кашников А.Ю., Селиванова С.Г., Голицына Л.Н., Лапин В.А., Цыганова М.И., Зайцев Д.Е. – проведение экспериментальных работ; Новиков В.В. – проведение экспериментальных работ, написание текста.

Поступила 14.03.2025
Принята в печать 24.04.2025
Опубликована 30.04.2025

**Information about the authors:**

**Dmitry A. Melentev✉ –** Junior Researcher, laboratory of immunochemistry I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia. E-mail: dim-melente@yandex.ru; https://orcid.org/0000-0002-2441-6874

**Dmitry V. Novikov –** PhD, Leading Researcher, laboratory of immunochemistry I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia. E-mail: novikov.dv75@mail.ru; https://orcid.org/0000-0001-7049-6935

**Ekaterina V. Mokhonova –** researcher, laboratory of immunochemistry I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia. E-mail: ekaterinamohonova@yandex.ru; https://orcid.org/0000-0002-9742-7646

**Nadezhda A. Novikova –** Dr. Sci., Professor, Leading Researcher, Head of the laboratory of molecular epidemiology of viral infections I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia. E-mail: novikova_na@mail.ru; https://orcid.org/0000-0002-3710-6648

**Alexander Yu. Kashnikov –** Researcher, laboratory of molecular epidemiology of viral infections I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia. E-mail: mevirfc@mail.ru; https://orcid.org/0000-0003-1033-7347

**Svetlana G. Selivanova –** PhD, Senior researcher, laboratory of molecular epidemiology of viral infections I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia. E-mail: svetafor22@mail.ru; https://orcid.org/0000-0002-6610-1774

**Lyudmila N. Golitsyna –** PhD, Leading Researcher, laboratory of molecular epidemiology of viral infections I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia. E-mail: lyudmila_galitzina@mail.ru; https://orcid.org/0000-0002-8064-4476

**Vladislav A. Lapin –** Junior Researcher, laboratory of immunochemistry I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia. E-mail: fridens.95@yandex.ru; https://orcid.org/0000-0002-5905-5722

**Maria I. Tsyganova –** PhD, Leading Researcher, laboratory of immunochemistry I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia. E-mail: e-mail: maria_che@mail.ru; https://orcid.org/0000-0002-2811-6844

**Dmitry E. Zaitsev –** Senior Lab Assistant, laboratory of immunochemistry I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia. E-mail: mitya.zaitseff@yandex.ru; https://orcid.org/0000-0002-7663-6924

**Viktor V. Novikov –** Dr. Sci., Professor, Leading Researcher, Head of the laboratory of immunochemistry I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia. E-mail: mbre@mail.ru; https://orcid.org/0000-0002-2449-7213

**Contribution:** Melentev D.A., Novikov D.V. – performing experiments, writing the text; Mokhonova V.V. – performing experiments; Novikova N.A. – performing experiments, writing the text; Kashnikov A.Yu., Selivanova S.G., Golitsyna L.N., Lapin V.A., Tsyganova M.I., Zaitsev D.E. – performing experiments; Novikov V.V. – performing experiments, writing the text.

Received 14 March 2025
Accepted 24 April 2025
Published 30 April 2025