



Д.И.ИВАНОВСКИЙ

ВОПРОСЫ ВИРУСОЛОГИИ

PROBLEMS OF VIROLOGY

4

Том 68 • 2023

Volume 68 • Issue 4 • 2023

Издатель:
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
www.crie.ru

Журнал «Вопросы вирусологии» знакомит читателей с достижениями российской и мировой вирусологии, помещает статьи, посвящённые изучению вирусов и вирусных болезней человека, животных и растений. Видное место в издании отводится публикации результатов экспериментальных работ по различным вопросам общей и частной вирусологии. В журнале печатаются материалы, способствующие внедрению в практику достижений вирусологической науки по ликвидации и снижению распространённости инфекционных заболеваний, а также их диагностике, профилактике и лечению.

В обзорных статьях обобщаются последние достижения в области вирусологии. Читатель найдет в журнале описание новых методов исследований, методических приёмов, новой аппаратуры и приспособлений.

Журнал рассчитан на вирусологов, эпидемиологов, паразитологов, фармакологов, биохимиков и других специалистов.

The Journal «Problems of virology» is focused on current advances in virology in Russia and the rest of the world. It covers research in virology and viral diseases of humans, animals, and plants. Emphasis is given to the original experimental studies on various aspects of general and special virology. The reviews of recent and historic developments in virology are regularly published.

The journal promotes the implementation of advances in virology aimed at treatment, reduction of the incidence and elimination of infectious diseases and enhancement of diagnostics, prevention, and treatment practices as well. The target audience of the journal are virologists (including medical and veterinary virologists, scientists and practitioners), epidemiologists, parasitologists, pharmacologists, biochemists and specialists in related medical disciplines.

Журнал входит в базу данных SCOPUS и рекомендованный ВАК «Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук» по специальностям:

1.5.10 Вирусология (медицинские и биологические науки)

3.2.2 Эпидемиология (медицинские и биологические науки)

3.1.22 Инфекционные болезни (медицинские и биологические науки)

3.3.6 Фармакология, клиническая фармакология (медицинские и биологические науки)

В соответствии с рекомендациями ВАК (письмо ВАК от 06.12.2022 № 02-1198), Журнал относится к категории K1, как издание, входящее в базы данных SCOPUS и RSCI.

The journal is indexed in the SCOPUS database and is included in the «List of peer-reviewed scientific journals in which the main scientific results of dissertations for the PhD degree and for the degree of Doctor of Science should be published» recommended by the Higher Attestation Commission for the following specialities:

1.5.10 Virology (medical and biological sciences)

3.2.2 Epidemiology (medical and biological sciences)

3.1.22 Infectious diseases (medical and biological sciences)

3.3.6 Pharmacology, clinical pharmacology (medical and biological sciences)

In accordance with the recommendations of the Higher Attestation Commission (letter of the Higher Attestation Commission dated December 06, 2022 No. 02-1198), the Journal belongs to the K1 category, as a journal included in the SCOPUS and RSCI databases.

Свидетельство о регистрации
ПИ № ФС77-77676 от 29 января 2020 г.
ISSN 0507-4088 (Print)
ISSN 2411-2097 (Online)
DOI prefix: 10.36233

Журнал представлен в международных базах данных и информационно-справочных системах: Russian Science Citation Index, Abstract Journals, AIDS & Cancer Research, Biocontrol News and Information, Biological Sciences, Chemical Abstracts, CrossRef, DOAJ, EBSCOhost Biological Abstracts, EBSCOhost Wildlife & Ecology Studies Worldwide, Elsevier BV Scopus, Elsevier BV EMBASE, Index Medicus, Excerpta Medica, Index Veterinarius, MEDLINE, National Library of Medicine PubMed, Parasitology Database, Poultry Abstracts, Review of Medical and Veterinary Entomology, Thomson Reuters Biological Abstracts, Thomson Reuters BIOSIS Previews, Thomson Reuters Science Citation Index Expanded, Thomson Reuters Web of Science, Tropical Diseases Bulletin, Veterinary Science Database, Virology and AIDS Abstracts, ROAD, HYPERLINK, OPENALEX, FATCAT, ZEITSCHRIFTEN DATENBANK

Журнал открытого доступа,
не берущий плату за публикации.

Контент доступен под лицензией
Commons Attribution International
4.0 CC-BY.

Статьи иностранных авторов
и отдельные статьи, рекомендованные
Редакционной коллегией журнала,
публикуются на русском и английском
языках под единым DOI.

Полные тексты статей журнала
доступны на сайтах:

<https://www.virusjour.crie.ru;>
<https://www.elibrary.ru;>
<https://www.cyberleninka.ru;>
<https://www.rucont.ru;>
<https://www.ebsco.com;>
<https://www.doaj.org;>
<https://www.elsevier.com>

ИЗДАТЕЛЬ:

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора
111123, Москва,
ул. Новогиреевская, д. 3А.
Тел.: +7(925) 011-87-79
E-mail: publisher@crie.ru

РЕДАКЦИЯ:

Редакция расположена по адресу
Издателя

E-mail: vopr.virusol@crie.ru

Начальник редакционно-
издательского отдела:
Осокина Ольга Владимировна

Заведующая редакцией:
Неверова Анна Леонидовна

Редакция не несёт ответственности за
содержание рекламных материалов.

К публикации принимаются только
статьи, подготовленные в соответ-
ствии с правилами для авторов
(см. <https://www.virusjour.crie.ru>).

Направляя статью в редакцию,
авторы принимают условия договора
публичной оферты
(<https://www.virusjour.crie.ru>).

Подписано в печать 30.08.2023.
Формат 60×90^{1/8}.

Тираж 50 экз.

«Объединенный полиграфический
комплекс». 115114, Москва,
Дербеневская набережная, 7с2.
E-mail: info@opk.bz. www.opk.bz

16+

© ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора, 2023

Учредители: ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора,
Всероссийское научно-практическое общество
эпидемиологов, микробиологов и паразитологов

ВОПРОСЫ ВИРУСОЛОГИИ

(VOPROSY VIRUSOLOGII)

ДВУХМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Основан в 1956 г.

4

Том 68 · 2023

Редакционная коллегия

Главный редактор: **ЛЬВОВ Д.К.** (д.м.н., проф., акад. РАН)

Зам. главного редактора: **Гребенникова Т.В.** (д.б.н., проф.,
член-корр. РАН)

Ответственный секретарь: **Альховский С.В.** (д.б.н., член-корр. РАН)

Научный редактор: **Забережный А.Д.** (д.б.н., проф., член-корр. РАН)

Члены редколлегии:

Белоусова Р.В. (д.в.н., проф.)

Галегов Г.А. (д.б.н., проф.)

Гулюкин М.И. (д.в.н., проф., акад. РАН)

Гурцевич В.Э. (д.м.н., проф.)

Ершов Ф.И. (д.м.н., проф., акад. РАН)

Жирнов О.П. (д.б.н., проф., член-корр. РАН)

Зверев В.В. (д.б.н., проф., акад. РАН)

Зуев В.А. (д.м.н., проф.)

Иванова О.Е. (д.м.н., проф.)

Карганова Г.Г. (д.б.н., проф.)

Колобухина Л.В. (д.м.н., проф.)

Лобзин Ю.В. (д.м.н., проф., акад. РАН)

Малеев В.В. (д.м.н., проф., акад. РАН)

Онищенко Г.Г. (д.м.н., проф., акад. РАН)

Попова А.Ю. (д.м.н., проф.)

Урываев Л.В. (д.м.н., проф., член-корр. РАН)

Юминова Н.В. (д.б.н., проф.)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Акимкин В.Г. (д.м.н., проф., акад. РАН; Москва, Россия)

Алипер Т.И. (д.б.н., проф.; Москва, Россия)

Антонов В.А. (д.м.н., проф.; Волгоград, Россия)

Бовин Н.В. (д.х.н., проф.; Москва, Россия)

Борисевич С.В. (д.б.н., проф., акад. РАН; Сергиев Посад, Россия)

Брико Н.И. (д.м.н., проф., акад. РАН; Москва, Россия)

Васин А.В. (д.б.н.; Санкт-Петербург, Россия)

Глотов А.Г. (д.в.н., проф.; пос. Краснообск, Новосибирская обл., Россия)

Глулов В.В. (д.б.н., проф.; Новосибирск, Россия)

Заседателев А.С. (д.ф.-м.н., проф.; Москва, Россия)

Злобин В.И. (д.м.н., проф., акад. РАН; Иркутск, Россия)

Иванов А.И. (Хабаровск, Россия)

Кузин А.А. (д.м.н.; Санкт-Петербург, Россия)

Кутырев В.В. (д.м.н., проф., акад. РАН; Саратов, Россия)

Леонова Г.Н. (д.м.н., проф.; Владивосток, Россия)

Локтев В.Б. (д.б.н., проф.; Новосибирск, Россия)

Лукашев А.Н. (д.м.н., проф., член-корр. РАН; Москва, Россия)

Макаров В.В. (д.б.н., проф.; Москва, Россия)

Мальшев Н.А. (д.м.н., проф.; Москва, Россия)

Мананова Э.Р. (д.м.н.; Казань, Россия)

Михайлов М.И. (д.м.н., проф., член-корр. РАН; Москва, Россия)

Негёсов С.В. (д.б.н., проф., акад. РАН; Новосибирск, Россия)

Никифоров В.В. (д.м.н., проф.; Москва, Россия)

Панин А.Н. (д.в.н., проф., акад. РАН; Москва, Россия)

Покровский А.Г. (д.м.н., проф., член-корр. РАН; Новосибирск, Россия)

Резник В.И. (к.м.н.; Хабаровск, Россия)

Романенко В.В. (д.м.н.; Екатеринбург, Россия)

Савельев С.И. (д.м.н., проф.; Липецк, Россия)

Сметанина С.В. (к.м.н.; Москва, Россия)

Степанова Т.Ф. (д.м.н., проф.; Тюмень, Россия)

Тутельян А.В. (д.м.н., проф., член-корр. РАН; Москва, Россия)

Чвала И.А. (к.в.н.; Владимир, Россия)

Чумаков П.М. (д.б.н., проф., член-корр. РАН; Москва, Россия)

Чучалин А.Г. (д.м.н., проф., акад. РАН; Москва, Россия)

Шестопалов А.М. (д.б.н., проф.; Новосибирск, Россия)

Щелканов М.Ю. (д.б.н., проф.; Владивосток, Россия)

Яшкульов К.Б. (к.м.н., Элиста, Россия)

МЕЖДУНАРОДНЫЙ РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Becker J. (PhD, MD, Prof.; Jerusalem, Israel)

Compans R.W. (PhD, Prof.; Atlanta, USA)

Fouchier R.A.M. (PhD, Prof.; Rotterdam, Netherlands)

Goujgoulova G. (PhD; Sofia, Bulgaria)

Hoenen T. (PhD; Greifswald – Insel Riems, Germany)

Kawaoka Y. (PhD, Prof.; Tokyo, Japan)

Kuhn J.H. (MD, PhD, PhD, M.Sc.; Frederick, USA)

Liu W.J. (PhD, Prof.; Beijing, P.R. China)

Mackenzie J. (PhD, Prof.; Brisbane, Australia)

Nymadawa P. (PhD, MD, DSc, Prof.; Ulan Bator, Mongolia)

Oxford J. (DSc; London, UK)

Sakoda Y. (PhD, Assoc. Prof.; Sapporo, Japan)

Suarez D.L. (D.V.M., PhD, A.C.V.M.; Athens, USA)

Tashiro M. (PhD, MD; Tokyo, Japan)

Titov L.P. (MD, PhD, Dr. Sci., Prof., RAS Full Member Minsk, Republic of Belarus)

Turan K. (PhD, Prof.; Istanbul, Turkey)

Vaheri A. (PhD, MD, Prof.; Helsinki, Finland)

Webby R. (PhD; Memphis, USA)

Yuelong Shu (PhD; Beijing, P.R. China)

The journal is registered by the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology and Mass Media. Certificate of registration PI no. FS77-77676
ISSN 0507-4088 (Print)
ISSN 2411-2097 (Online)
DOI prefix: 10.36233

The Journal is indexed by the following abstracting and indexing services:

Russian Science Citation Index, Abstract Journals, AIDS & Cancer Research, Biocontrol News and Information, Biological Sciences, Chemical Abstracts, CrossRef, DOAJ, EBSCOhost Biological Abstracts, EBSCOhost Wildlife & Ecology Studies Worldwide, Elsevier BV Scopus, Elsevier BV EMBASE, Index Medicus, Excerpta Medica, Index Veterinarius, MEDLINE, National Library of Medicine PubMed, Parasitology Database, Poultry Abstracts, Review of Medical and Veterinary Entomology, Thomson Reuters Biological Abstracts, Thomson Reuters BIOSIS Previews, Thomson Reuters Science Citation Index Expanded, Thomson Reuters Web of Science, Tropical Diseases Bulletin, Veterinary Science Database, Virology and AIDS Abstracts, ROAD, HYPERLINK, OPENALEX, FATCAT, ZEITSCHRIFTEN DATENBANK

The journal is a Platinum Open Access peer-reviewed scholarly journal, which does not charge author fees.

The content is licensed under Commons Attribution International 4.0 CC-BY.

Articles by foreign authors, as well as Russian-language articles specially recommended by the Editorial Board, are published in Russian and English under the same DOI.

Full texts of issues of the journal are available on:

<https://www.virusjour.crie.ru/>;
<https://www.elibrary.ru/>;
<https://www.cyberleninka.ru/>;
<https://www.rucont.ru/>;
<https://www.ebsco.com>
<https://www.doaj.org/>;
<https://www.elsevier.com>

PUBLISHER:

Central Research Institute for Epidemiology,
111123, 3A, Novogireevskaya St.,
Moscow, Russian Federation.
Phone/fax: +7(925) 011-87-79.
E-mail: publisher@crie.ru

Head of the Editorial and Publishing Department: *Olga V. Osokina*

EDITORIAL OFFICE:

111123, 3A, Novogireevskaya St.,
Moscow, Russian Federation.
Phone/fax: +7(925) 011-87-79
E-mail: vopr.virusol@crie.ru

Head of Editorial Office:
Anna L. Neverova

The Editorial Board is not responsible for the advertising content.

The materials that do not meet the requirements of the journal (<https://www.virusjour.crie.ru/>) are rejected without further consideration.

When the author submits an article to the Editorial Board, he/she accepts the terms and conditions of the public offer agreement (<https://www.virusjour.crie.ru/>).

Signed to the press on August 30, 2023.
Print format 60 × 90^{1/8}.
Circulation 50 copies.

Produced at the «United Printing Complex», 115114, 7b2 Derbenevskaya embankment, Moscow, Russia.
E-mail: info@opk.bz. www.opk.bz

16+

© Central Research Institute for Epidemiology, 2023

Founders: Central Research Institute for Epidemiology,
Russian Scientific Society of Epidemiologists, Microbiologists and Parasitologists

PROBLEMS OF VIROLOGY

(VOPROSY VIRUSOLOGII)

SCIENTIFIC THEORETICAL JOURNAL ISSUED
ONCE IN TWO MONTHS

Published since 1956

4

Volume 68 • 2023

EDITORIAL BOARD

**Editor-in-Chief: LVOV D.K., RAS Full Member,
Professor, Dr. Sci. (Medicine)**

Assistant editor in chief: **Grebennikova T.V.**, RAS Corr. Member,
Professor, Dr. Sci. (Biology)

Executive secretary: **Alkhovskiy S.V.**, RAS Corr. Member, Dr. Sci. (Biology)

Scientific editor: **Zaberezhny A.D.**, RAS Corr. Member, Professor,
Dr. Sci. (Biology)

MEMBERS OF EDITORIAL BOARD

Belousova R.V. – Professor, Dr. Sci. (Veterinary)

Galegov G.A. – Professor, Dr. Sci. (Biology)

Gulyukin M.I. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Veterinary)

Gurtsevich V.E. – Professor, Dr. Sci. (Medicine)

Ershov F.I. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine)

Zhirnov O.P. – RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Biology)

Zverev V.V. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Biology)

Zuev V.A. – Professor, Dr. Sci. (Medicine)

Ivanova O.E. – Professor, Dr. Sci. (Medicine)

Karganova G.G. – Professor, Dr. Sci. (Biology)

Kolobukhina L.V. – Professor, Dr. Sci. (Medicine)

Lobzin Yu.V. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine)

Maleev V.V. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine)

Onishchenko G.G. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine)

Popova A.Yu. – Professor, Dr. Sci. (Medicine)

Uryvaev L.V. – RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine)

Yuminova N.V. – Professor, Dr. Sci. (Biology)

EDITORIAL COUNCIL

Akimkin V.G. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Moscow, Russia)

Aliper T.I. – Professor, Dr. Sci. (Biology) (Moscow, Russia)

Antonov V.A. – Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Volgograd, Russia)

Bovin N.V. – Professor, Dr. Sci. (Chemistry) (Moscow, Russia)

Borisevich S.V. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Biology) (Sergiev Posad, Russia)

Briko N.I. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Moscow, Russia)

Vasin A.V. – Dr. Sci. (Biology), (St. Petersburg, Russia)

Glotov A.G. – Professor, Dr. Sci. (Veterinary) (Krasnoobsk, Russia)

Glupov V.V. – Professor, Dr. Sci. (Biology) (Novosibirsk, Russia)

Zasedatelev A.S. – Professor, Dr. Sci. (Physics and Mathematics) (Moscow, Russia)

Zlobin V.I. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Irkutsk, Russia)

Ivanov L.I. – MD (Khabarovsk, Russia)

Kuzin A.A. – Dr. Sci. (Medicine) (St. Petersburg, Russia)

Kutyrev V.V. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Saratov, Russia)

Leonova G.N. – Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Vladivostok, Russia)

Loktev V.B. – Professor, Dr. Sci. (Biology) (Novosibirsk, Russia)

Lukashev A.N. – RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Moscow, Russia)

Makarov V.V. – Professor, Dr. Sci. (Biology) (Moscow, Russia)

Malyshev N.A. – Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Moscow, Russia)

Manapova E.R. – Dr. Sci. (Medicine) (Kazan', Russia)

Mikhailov M.I. – RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Moscow, Russia)

Netesov S.V. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Biology) (Novosibirsk, Russia)

Nikiforov V.V. – Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Moscow, Russia)

Panin A.N. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Veterinary) (Moscow, Russia)

Pokrovskiy A.G. – RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Novosibirsk, Russia)

Reznik V.I. – MD, PhD (Khabarovsk, Russia)

Romanenko V.V. – Dr. Sci. (Medicine) (Ekaterinburg, Russia)

Savel'ev S.I. – Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Lipetsk, Russia)

Smetanina S.V. – PhD (Moscow, Russia)

Stepanova T.F. – Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Tyumen', Russia)

Tutel'yan A.V. – RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Moscow, Russia)

Chvala I.A. – PhD (Vladimir, Russia)

Chumakov P.M. – RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Biology) (Moscow, Russia)

Chuchalin A.G. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Moscow, Russia)

Shestopalov A.M. – Professor, Dr. Sci. (Biology) (Novosibirsk, Russia)

Shchelkanov M.Yu. – Professor, Dr. Sci. (Biology) (Vladivostok, Russia)

Yashkulov K.B. – MD, PhD (Elista, Russia)

INTERNATIONAL EDITORIAL COUNCIL

Becker J. (PhD, MD, Prof.; Jerusalem, Israel)

Compans R.W. (PhD, Prof.; Atlanta, USA)

Fouchier R.A.M. (PhD, Prof.; Rotterdam, Netherlands)

Goujgoulova G. (PhD; Sofia, Bulgaria)

Hoenen T. (PhD; Greifswald – Insel Riems, Germany)

Kawaoka Y. (PhD, Prof.; Tokyo, Japan)

Kuhn J.H. (MD, PhD, M.Sc.; Frederick, USA)

Liu W.J. (PhD, Prof.; Beijing, P.R. China)

Mackenzie J. (PhD, Prof.; Brisbane, Australia)

Nymadawa P. (PhD, MD, DSc, Prof.; Ulan Bator, Mongolia)

Oxford J. (DSc; London, UK)

Sakoda Y. (PhD, Assoc. Prof.; Sapporo, Japan)

Suarez D.L. (D.V.M., PhD, A.C.V.M.; Athens, USA)

Tashiro M. (PhD, MD; Tokyo, Japan)

Titov L.P. (MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS; Minsk, Republic of Belarus)

Turan K. (PhD, Prof.; Istanbul, Turkey)

Vaheri A. (PhD, MD, Prof.; Helsinki, Finland)

Webby R. (PhD; Memphis, USA)

Yuelong Shu (PhD; Beijing, P.R. China)

СОДЕРЖАНИЕ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Теплякова Т.В., Кабанов А.С., Овчинникова А.С., Одношевский Д.А., Петровская И.Ф., Непомнящих Т.С., Пьянков О.В.**
Скрининг противовирусной активности образцов из чаги *Inonotus obliquus* и гуминовой кислоты из буроуголя на культуре клеток *Vero* в отношении вируса эктромелии (Poxviridae: *Orthopoxvirus*; ECTV) 277
- Блинова Е.А., Макенов М.Т., Морозкин Е.С., Холодилов И.С., Федорова М.В., Журенкова О.Б., Роев Г.В., Хафизов К.Ф., Карань Л.С.**
Генетические особенности вируса Пуумала (Hantaviridae: *Orthohantavirus*), обнаруженного в Московской области* 283
- Смирнова К.В., Лубенская А.К., Сенюта Н.Б., Душенькина Т.Е., Гурцевич В.Э.**
Вирус Эпштейна–Барр 1-го и 2-го типа (Herpesviridae: *Lymphocryptovirus*) и другие маркеры вируса у больных раком носоглотки в двух этнически и географически отличающихся регионах России 291
- Шотин А.Р., Чернышев Р.С., Морозова Е.О., Иголкин А.С., Груздев К.Н., Колбин И.С., Лаврентьев И.А., Мазлум А.**
Молекулярно-биологические свойства изолята вируса африканской чумы свиней (Asfarviridae: *Asfivirus*) ASF/Tatarstan 20/WB-12276. 302
- Леснова Е.И., Масалова О.В., Пермьякова К.Ю., Демидова Н.А., Валугев-Эллистон В.Т., Иванов А.В., Куц А.А.**
Адьювантное действие агониста NOD1 и NOD2 полимурамила различается при иммунизации мышей разных инбредных линий неструктурными белками вируса гепатита С (Flaviviridae: *Hepacivirus*) и синергетически усиливается в комбинации с агонистом TLR4 пирогеналом* 315
- Бинятова А.С., Юнасова Т.Н., Волкова Р.А., Бутырский А.Ю., Ильясова Т.Н., Саркисян К.А., Мовсесянц А.А.**
Опыт применения фармакопейного стандартного образца активности коревой вакцины 327
- Власова Н.Н., Черных О.Ю., Кривонос Р.А., Верховский О.А., Алипер Т.И., Аноятбекова А.М., Жукова Е.В., Кучерук О.Д., Южаков А.Г., Гулюкин М.И., Гулюкин А.М.**
Адаптация вируса африканской чумы свиней (Asfarviridae: *Asfivirus*) к росту в перевиваемой культуре клеток ППК-666 методом ускоренного пассирования 334
- ДИСКУССИЯ**
- Соломай Т.В., Семененко Т.А., Акимкин В.Г.**
Особенности саморегуляции эпидемического процесса инфекции, вызванной вирусом Эпштейна–Барр (Herpesviridae: *Lymphocryptovirus*, HHV-4)* 343

CONTENTS

ORIGINAL RESEARCHES

- Teplyakova T.V., Kabanov A.S., Ovchinnikova A.S., Odnoshevsky D.A., Petrovskaya I.F., Nepomnyashchikh T.S., Pyankov O.V.**
Screening of antiviral activity of samples from chaga *Inonotus obliquus* and humic acid from brown coal on Vero cell culture against ectromelia virus (Poxviridae: *Orthopoxvirus*; ECTV) 277
- Blinova E.A., Makenov M.T., Morozkin E.S., Kholodilov I.S., Fedorova M.V., Zhurenkova O.B., Roev G.V., Khafizov K.F., Karan L.S.**
Genetic features of the Puumala virus (Hantaviridae: *Orthohantavirus*) identified in the Moscow region* 283
- Smirnova K.V., Lubenskaya A.K., Senyuta N.B., Dushenkina T.E., Gurtsevitch V.E.**
Epstein–Barr virus (Herpesviridae: *Lymphocryptovirus*) types 1 and 2 and other viral markers in nasopharyngeal carcinoma patients in two geographically and ethnically different regions of Russia 291
- Shotin A.R., Chernyshev R.S., Morozova E.O., Igolkin A.S., Gruzdev K.N., Kolbin I.S., Lavrentiev I.A., Mazloum A.**
Molecular and biological properties of the African swine fever virus (Asfarviridae: *Asfivirus*) isolate ASF/Tatarstan 20/WB-12276 302
- Lesnova E.I., Masalova O.V., Permyakova K.Yu., Demidova N.A., Valuev-Elliston V.T., Ivanov A.V., Kushch A.A.**
The adjuvant effect of polymuramil, a NOD1 and NOD2 agonist, differs when immunizing mice of different inbred lines with nonstructural hepatitis C virus (Flaviviridae: *Hepacivirus*) proteins and is synergistically enhanced when administered in combination with pyrogenalum, a TLR4 agonist 315
- Binyatova A.S., Unasova T.N., Volkova R.A., Butyrsky A.Yu., Ilyasova T.N., Sarkisyan K.A., Movsesyants A.A.**
Experience with the use of a pharmacopoeial standard sample of measles vaccine activity 327
- Vlasova N.N., Chernykh O.Yu., Krivonos R.A., Verkhovsky O.A., Aliper T.I., Anoyatbekova A.M., Zhukova E.V., Kucheruk O.D., Yuzhakov A.G., Gulyukin M.I., Gulyukin A.M.**
Adaptation of african swine fever virus (Asfarviridae: *Asfivirus*) to growth in the continuous culture PPK-66b cells by the method of accelerated passaging 334
- DISCUSSION**
- Solomay T.V., Semenenko T.A., Akimkin V.G.**
Characteristics of self-regulation of the epidemic process of infection caused by the Epstein–Barr virus (Herpesviridae: *Lymphocryptovirus*, HHV-4)* 343

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ



ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-174>

© ТЕПЛЯКОВА Т.В., КАБАНОВ А.С., ОВЧИННИКОВА А.С., ОДНОШЕВСКИЙ Д.А., ПЕТРОВСКАЯ И.Ф., НЕПОМНЯЩИХ Т.С., ПЬЯНКОВ О.В., 2023

Скрининг противовирусной активности образцов из чаги *Inonotus obliquus* и гуминовой кислоты из бурого угля на культуре клеток *Vero* в отношении вируса эктромелии (Poxviridae: *Orthopoxvirus*; ECTV)

Теплякова Т.В., Кабанов А.С., Овчинникова А.С., Одношевский Д.А., Петровская И.Ф., Непомнящих Т.С., Пьянков О.В.

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

Введение. Специфичный для мыши ортопоксвирус – вирус эктромелии – является одной из лучших моделей, которую можно использовать для изучения основных вопросов патогенеза, профилактики и лечения оспы, а также разработки мер для повышения вирулентности, трансмиссивности или способности преодолевать вакцинный иммунитет.

Целью работы является скрининг противовирусной активности образцов из чаги *Inonotus obliquus* и гуминовой кислоты из бурого угля *in vitro* в отношении вируса эктромелии.

Материалы и методы. В работе использовали вирус эктромелии, штамм К-1 (рег. номер V-142), полученный из Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора; культуру клеток *Vero E6* (шифр коллекционный 70), полученную из Коллекции культур клеток ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Для 9 образцов из чаги *I. obliquus* и гуминовой кислоты из бурого угля была проведена оценка изменения инфекционности вируса эктромелии на культуре клеток при использовании двух схем внесения препаратов и вируса (профилактической и лечебной), а также определение их цитотоксичности и противовирусной активности.

Результаты. Для всех образцов были определены 50% цитотоксическая концентрация, 50% эффективные дозы и химиотерапевтические индексы образцов. Было показано, что исследуемые образцы не являются токсичными для монослоя культуры клеток *Vero E6* в разведении 300 мкг/мл и более, продемонстрировали высокую противовирусную активность в отношении штамма К-1 вируса эктромелии в двух схемах применения – профилактической и лечебной.

Заключение. Все образцы, проверенные в отношении вируса эктромелии *in vitro*, могут рассматриваться как перспективные для дальнейшей разработки препаратов против заболеваний, вызываемых ортопоксвирусами.

Ключевые слова: чага; *Inonotus obliquus*; меланин; гуминовая кислота; вирус эктромелии; *in vitro*; противовирусная активность

Для цитирования: Теплякова Т.В., Кабанов А.С., Овчинникова А.С., Одношевский Д.А., Петровская И.Ф., Непомнящих Т.С., Пьянков О.В. Скрининг противовирусной активности образцов из чаги *Inonotus obliquus* и гуминовой кислоты из бурого угля на культуре клеток *Vero* в отношении вируса эктромелии (Poxviridae: *Orthopoxvirus*; ECTV). *Вопросы вирусологии*. 2023; 68(3): 277-282. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-174> EDN: <https://elibrary.ru/scsivx>

Для корреспонденции: Теплякова Тамара Владимировна, д-р биол. наук, профессор, в.н.с. отдела биофизики и экологических исследований, ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия. E-mail: terlyakova@vector.nsc.ru

Участие авторов: Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Финансирование. Статья подготовлена в рамках выполнения государственного задания ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора.

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

Поступила 12.05.2023

Принята в печать 22.06.2023

Опубликована 30.06.2023

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-174>

Screening of antiviral activity of samples from chaga *Inonotus obliquus* and humic acid from brown coal on *Vero* cell culture against ectromelia virus (Poxviridae: *Orthopoxvirus*; ECTV)

Tamara V. Teplyakova, Aleksey S. Kabanov, Alena S. Ovchinnikova, Dmitry A. Odnoshevsky, Irina F. Petrovskaya, Tatiana S. Nepomnyashchikh, Oleg V. Pyankov

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector" of Rospotrebnadzor, 630559, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia

Introduction. The mouse-specific orthopoxvirus, ectromelia virus, is one of the best models that can be used to study key issues of pathogenesis, prevention, and treatment of smallpox, and to develop measures to increase virulence, transmissibility, or the ability to overcome vaccine immunity.

The aim of the work is to screen the antiviral activity of samples from *Inonotus obliquus* chaga and humic acid from brown coal *in vitro* against ectromelia virus.

Materials and methods. We used ectromelia virus, strain K-1 (reg. No V-142), obtained from the State Collection of Pathogens of Viral Infections and Rickettsioses of the State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector"; *Vero E6* cell culture (No 70) from the Collection of cell cultures of the State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector". Nine samples from chaga *I. obliquus* and humic acid from brown coal were used to evaluate the changes in the infectivity of the ectromelia virus on cell culture using 2 schemes of application of drugs and virus (preventive and therapeutic schemes), and to assess their cytotoxicity and antiviral activity.

Results. 50% cytotoxic concentration, 50% virus-inhibiting concentrations and selectivity index were determined for all samples. The studied samples were shown to be non-toxic to the monolayer of *Vero* cell culture in a dilution of 300 and more micrograms/ml, while demonstrated high antiviral activity against strain K-1 of ectromelia virus in two application schemes – preventive and curative.

Conclusion. All samples tested for ectromelia virus *in vitro* can be considered promising for further development of drugs against diseases caused by orthopoxviruses.

Keywords: chaga; *Inonotus obliquus*; melanin; humic acid; ectromelia virus; *in vitro*; antiviral activity

For citation: Teplyakova T.V., Kabanov A.S., Ovchinnikova A.S., Odnoshevsky D.A., Petrovskaya I.F., Nepomnyashchikh T.S., Pyankov O.V. Screening of antiviral activity of samples from chaga *Inonotus obliquus* and humic acid from brown coal on *Vero* cell culture against ectromelia virus (Poxviridae: *Orthopoxvirus*; ECTV). *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2023; 68(3): 277-282 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-174> EDN: <https://elibrary.ru/scsvix>

For correspondence: Tamara V. Teplyakova, Dr. Sci. (Biol.), Professor, Leading Researcher, Department of Biophysics and Ecological Research, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector" of Rospotrebnadzor, 630559, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia. E-mail: teplyakova@vector.nsc.ru

Information about the authors:

Teplyakova T.V., <https://orcid.org/0000-0002-0621-8698>

Kabanov A.S., <https://orcid.org/0000-0002-6287-0912>

Ovchinnikova A.S., <https://orcid.org/0000-0002-1745-7643>

Odnoshevsky D.A., <https://orcid.org/0000-0003-0616-7488>

Petrovskaya I.F., <https://orcid.org/0000-0002-9833-0555>

Nepomnyashchikh T.S., <https://orcid.org/0000-0003-0592-8273>

Pyankov O.V., <https://orcid.org/0000-0003-3340-8750>

Contribution: All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

Funding. The article was prepared as part of the state task of the State Research Center for Virology and Biotechnology "Vector", Rospotrebnadzor.

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

Received 12 May 2023
Accepted 22 June 2023
Published 30 June 2023

Введение

Натуральная оспа – высококонтагиозная вирусная инфекция, характеризующаяся тяжёлым течением, лихорадкой, сыпью на коже и слизистых оболочках, нередко оставляющая после себя рубцы. Вирус, вызывающий заболевание, относится к семейству *Poxviridae* подсемейства *Chordopoxvirinae* рода *Orthopoxvirus*. Семейство *Poxviridae* включает в себя большое количество вирусов, в том числе патогенных для человека: вирус натуральной оспы, вирус оспы обезьян, вирус оспы коров, вирус экстремелии (ВЭ) и др. После завершения беспрецедентной международной программы глобальной ликвидации оспы, проходившей под эгидой Всемирной организации здравоохранения, прошло более 40 лет. За это время по всему миру резко возросло количество людей, утративших специфический иммунитет против данного заболевания. Несмотря на искоренение оспы, угроза её возникновения существует и сегодня, поскольку невозможно исключить наличие нелегального хранения вируса натуральной оспы и преднамеренного использования данного патогена в целях биотерроризма. Не следует также забывать, что существует множество мест погребения умерших от неё людей, часть из которых находится на территории вечной мерзлоты, что не исключает возможности оттаивания данных регионов в условиях резко меняющегося климата и дальнейшего распространения вируса. При этом близкие по структуре к вирусу натуральной оспы зоонозные ортопоксвирусы также представляют опасность для человека.

ВЭ – это специфичный для мыши ортопоксвирус, который вызывает летальную инфекцию у некоторых линий мышей. ВЭ – возбудитель мышьяной оспы – впервые был описан в Англии в 1930 г. и вызвал смертельную болезнь у лабораторных мышей. Восприимчивость к ВЭ зависит от факторов хозяина, таких как линия мыши, возраст, пол и иммунный статус, а также от вирусных факторов [1].

Инфекция ВЭ у мышей была тщательно изучена, её патогенез с локализованной репликацией и системным распространением аналогичен патогенезу вируса натуральной оспы у людей [2]. ВЭ, возможно, является лучшей моделью для изучения оспы на мелких лабораторных животных. Эта модель может использоваться для изучения основных вопросов патогенеза, оценки профилактических и терапевтических методов лечения оспы, а также разработки контрмер против ортопоксвирусов, созданных с помощью биоинженерии, для повышения вирулентности, трансмиссивности или способности преодолевать вакцинный иммунитет [3].

Цель работы – скрининг противовирусной активности образцов из чаги *Inonotus obliquus* и гуминовой кислоты из бурого угля на культуре клеток *Vero* в отношении ВЭ с определением противовирусной эффективности препаратов при использовании двух схем внесения препаратов и ВЭ – профилактической и лечебной. Образцы, проверенные в отношении ВЭ *in vitro*, будут рассматриваться как перспективные для

разработки препаратов от ортопоксвирусов и в дальнейшем исследованы в отношении ВЭ *in vivo*.

Материалы и методы

Вирусы

В работе использовали ВЭ, штамм К-1 (рег. номер V-142), полученный из Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии (ГНЦ ВБ) «Вектор» Роспотребнадзора. Вирус нарабатывали в культуре клеток *Vero*, его концентрацию в культуральной жидкости определяли путём титрования методом бляшек на культуре клеток *Vero* (шифр коллекционный 70), рассчитывали и выражали в десятичных логарифмах бляшкообразующих единиц в миллилитрах (lg БОЕ/мл). Концентрация вируса, использованного в работе, составляла 6,4 lg БОЕ/мл. В предварительных экспериментах на культуре клеток *Vero* была подобрана минимальная доза ВЭ, вызывающая 100% цитопатическое действие в лунке. Такая доза составила 1000 БОЕ/лунка. Нароботанный и использованный в исследовании вирус с указанным титром хранили при –70 °С.

Клеточные культуры

В работе использовали клетки почки взрослой африканской зелёной мартышки (*Vero E6*), полученные из Коллекции культур клеток ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Монослой клеток *Vero* выращивали в среде Игла (ООО «БиолоТ», Россия) в присутствии 5% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (HyClone, США) с добавлением пенициллина (100 МЕ/мл) и стрептомицина (100 мкг/мл). В качестве поддерживающей при культивировании клеток с вирусом использовали ту же среду, но с добавлением 2% сыворотки [4].

Исследуемые образцы

Для исследования были использованы водные экстракты природной чаги, меланин из чаги, а также гуминовая кислота из бурого угля. Масса сухого вещества каждого из экстрактов составляла 2 мг/мл. В целом было исследовано 3 водных экстракта чаги, 3 образца меланина и 3 образца гуминовой кислоты. Подробное описание образцов, приведенных в **таблице**, представлено в патентах [5–7].

Определение 50% цитотоксических и 50% ингибирующих вирус экстремелии концентраций образцов *in vitro*

Противовирусная эффективность исследуемых препаратов оценивалась по изменению инфекционности ВЭ (титра) в монослое клеток *Vero E6* при использовании двух схем внесения препаратов и ВЭ – профилактической и лечебной [4].

Профилактическая схема. На монослой культуры клеток вносили по 0,1 мл соединений и помещали в термостат на 2 ч при температуре 37 °С. После двухчасовой обработки монослоя препаратами вносили

Таблица. Противовирусная активность образцов из чаги и гуминовой кислоты из бурого угля в отношении вируса экстремелии штамма К-1 в двух схемах применения**Table. The antiviral activity of samples from chaga and humic acid from brown coal against strain K-1 of ectromelia virus in 2 application schemes**

Код образца Sample code	Масса сухого вещества, мг/мл Dry matter weight, mg/mL	Вещество Substance	Схема применения, культура клеток Application scheme, Cell culture	ЦТД ₅₀ , мкг/мл CC ₅₀ , µg/mL	ЭД ₅₀ , мкг/мл IC ₅₀ , µg/mL	ХТИ SI
20-13	2,0	Экстракт чаги Chaga extract	Профилактическая, <i>Vero E6</i> , 6 сут. Preventive, <i>Vero E6</i> , 6 days	>300	2,84	105,6
			Лечебная, <i>Vero E6</i> , 6 сут. Therapeutic, <i>Vero E6</i> , 6 days	300	2,25	133,3
20-15	2,0	Экстракт чаги Chaga extract	Профилактическая, <i>Vero E6</i> , 6 сут. Preventive, <i>Vero E6</i> , 6 days	>300	2,08	144,2
			Лечебная, <i>Vero E6</i> , 6 сут. Therapeutic, <i>Vero E6</i> , 6 days	300	1,97	152,3
20-17	2,0	Экстракт чаги Chaga extract	Профилактическая, <i>Vero E6</i> , 6 сут. Preventive, <i>Vero E6</i> , 6 days	>300	2,91	103
			Лечебная, <i>Vero E6</i> , 6 сут. Therapeutic, <i>Vero E6</i> , 6 days	>300	2,89	103,8
20-24	2,0	Меланин Melanin	Профилактическая, <i>Vero E6</i> , 6 сут. Preventive, <i>Vero E6</i> , 6 days	>300	2,33	128,7
			Лечебная, <i>Vero E6</i> , 6 сут. Therapeutic, <i>Vero E6</i> , 6 days	>300	3,38	88,7
20-29	2,0	Меланин Melanin	Профилактическая, <i>Vero E6</i> , 6 сут. Preventive, <i>Vero E6</i> , 6 days	>300	3,41	88
			Лечебная, <i>Vero E6</i> , 6 сут. Therapeutic, <i>Vero E6</i> , 6 days	>300	3,58	83,8
20-30	2,0	Меланин Melanin	Профилактическая, <i>Vero E6</i> , 6 сут. Preventive, <i>Vero E6</i> , 6 days	>300	3,17	94,6
			Лечебная, <i>Vero E6</i> , 6 сут. Therapeutic, <i>Vero E6</i> , 6 days	>300	3,02	99,3
20-50	2,0	Гуминовая кислота Humic acid	Профилактическая, <i>Vero E6</i> , 6 сут. Preventive, <i>Vero E6</i> , 6 days	300	2,24	134
			Лечебная, <i>Vero E6</i> , 6 сут. Therapeutic, <i>Vero E6</i> , 6 days	>300	2,29	131
20-51	2,0	Гуминовая кислота Humic acid	Профилактическая, <i>Vero E6</i> , 6 сут. Preventive, <i>Vero E6</i> , 6 days	>300	2,88	104
			Лечебная, <i>Vero E6</i> , 6 сут. Therapeutic, <i>Vero E6</i> , 6 days	>300	3,14	95,5
20-55	2,0	Гуминовая кислота Humic acid	Профилактическая, <i>Vero E6</i> , 6 сут. Preventive, <i>Vero E6</i> , 6 days	>300	3,05	98,4
			Лечебная, <i>Vero E6</i> , 6 сут. Therapeutic, <i>Vero E6</i> , 6 days	>300	3,51	85,5

Примечание. ЦТД₅₀ – 50% цитотоксическая концентрация; ЭД₅₀ – 50% эффективные дозы; ХТИ – химиотерапевтический индекс.

Note. CC₅₀ – 50% cytotoxic concentration; IC₅₀ – 50% inhibitory (effective) concentration; SI – selectivity index.

по 0,1 мл вируса в дозе 1000 БОЕ/лунка. При профилактической схеме конечная концентрация препаратов в лунке была 300; 100; 33,33; 11,11 и 3,70 мкг/мл.

Лечебная схема. Заражение клеточного монослоя осуществляли тройным разведением ВЭ (1000 БОЕ/лунка) в объеме 0,1 мл. Планшет с внесенным вирусом помещали в термостат на 1 ч при 37 °С для адсорбции вируса на культуру клеток. После адсорбции в лунки вносили разведения препарата в объеме 0,1 мл. При лечебной схеме конечная концен-

трация препаратов в лунке была 300; 100; 33,33; 11,11 и 3,70 мкг/мл. Каждая схема применения препаратов *in vitro* была воспроизведена в 4 повторах.

Метод определения 50% цитотоксических и 50% ингибирующих вирус экстремелии концентраций образцов

Оценку противовирусной эффективности препаратов проводили по адаптированной и модифицированной нами методике [8]. В лунки 96-луночных

планшетов, содержащих монослой клеток *Vero*, сначала вносили по 100 мкл серийных разведений исследуемых соединений и по 100 мкл разведения штамма ВЭ в дозе 1000 БОЕ/лунка в соответствии со схемой внесения. Токсическая активность соединений определялась по гибели клеток под воздействием препарата в лунках планшета, в которые вирус не вносили. В качестве контроля использовали монослой клеток в лунках планшета, в которые вносили вирус без соединений (контроль вируса) и монослой клеток в лунках, в которые не вносили ни вирус, ни соединения (контроль культуры клеток). После инкубирования в течение 6 суток монослой клеток прокрашивали витальным красителем (нейтральным красным) в течение 2 ч. После удаления красителя и отмывки лунок от его несвязавшейся фракции добавляли лизирующий буфер. Количество красителя, адсорбированное живыми клетками монослоя, оценивали по оптической плотности, которая является показателем количества неразрушенных под влиянием вируса клеток в монослое. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре Emax (Molecular Devices, США) при длине волны 490 нм. Учёт результатов проводили с использованием планшетного спектрофотометра Emax и компьютерной программы SoftMaxPro 4.0, результаты оптической плотности представляли в полулогарифмической системе координат. На основании полученных данных рассчитывали 50% цитотоксическую концентрацию (ЦТД₅₀) и 50% эффективные дозы (ЭД₅₀) для исследуемых препаратов, где ЦТД₅₀ – величина концентрации определённого образца препарата в лунке планшета, под воздействием которого разрушается 50% клеточного монослоя; ЭД₅₀ – величина концентрации определённого образца препарата в лунке планшета, под воздействием которого сохраняется 50% жизнеспособного клеточного монослоя. Полученные данные дают возможность рассчитать химиотерапевтический индекс препарата (ХТИ) по формуле: $ХТИ = ЦТД_{50} / ЭД_{50}$. Активными считаются соединения с $ХТИ \geq 8$ [9].

Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку и сравнение результатов осуществляли стандартными методами [10]. В случаях, когда при титровании на монослое клеток ВЭ не выявлялся из-за существующего порога чувствительности метода, использовали значение минимального титра ВЭ, выявляемого при данном методе титрования (10 БОЕ/мл, т.е. 1 Ig БОЕ/мл). Сравнение показателей средних титров ВЭ в монослое клеток *Vero* проводили с применением непараметрического U-критерия Манна–Уитни [10]. Различия считали достоверным при 95% уровне надежности ($p \leq 0,05$). Результаты представлены в таблице.

Результаты и обсуждение

Как видно из таблицы, исследуемые образцы не являются токсичными для монослоя культуры клеток *Vero E6* в разведении 300 мкг/мл и более. Все образцы

показали высокую противовирусную активность в отношении ВЭ штамма К-1 в двух схемах применения – профилактической и лечебной.

В 4 из 9 исследованных экстрактов ХТИ в двух схемах применения был выше 100, это образцы 20-13, 20-15, 20-17 и 20-50. Водный экстракт чаги под номером 20-15 проявил выраженное противовирусное действие. В лечебной схеме применения при концентрации соединения всего 1,97 мкг/мл он вызывал 50% ингибирующее действие. Следует отметить, что ХТИ у этого соединения был самым высоким и составил в профилактической схеме применения 144,2, а в лечебной – 152,3. Образец меланина из чаги 20-24 и образец гуминовой кислоты из бурого угля 20-51 также показали противовирусное действие с высоким ХТИ при профилактической схеме применения. Остальные три соединения под номерами 20-29, 20-30 и 20-55 показали сравнительно высокую противовирусную активность в двух схемах применения. Данные эксперименты проводились в четырёх повторениях с интервалом в 1 неделю. Все результаты были сопоставимы.

Заключение

Все образцы, проверенные в отношении ВЭ *in vitro*, могут рассматриваться как перспективные для разработки препаратов от ортопоксвирусов. Ранее мы имели возможность провести исследования по оценке водных экстрактов грибов и некоторых гуминовых соединений на вирус натуральной оспы и осповакцины [11]. Нами было отмечено, что чага содержит широкий спектр различных биологически активных веществ. Основным компонентом является хромоген-полифенолоксикарбоновый комплекс, близкий по физико-химическим характеристикам к гуминовой кислоте. Водные экстракты чаги и меланин проявляли противовирусный эффект ко всем исследуемым нами вирусам, в том числе ко многим штаммам вируса гриппа и коронавирусу SARS-CoV-2, вызвавшему эпидемию COVID-19 [12].

Безусловно, необходимо дальнейшее изучение гриба чаги и некоторых его компонентов с целью разработки на их основе лекарственных и профилактических препаратов против заболеваний, вызываемых ортопоксвирусами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Fenner F., Buller R.M. Mousepox. In: Nathanson R.A.N., Gonzalez-Scarano F., Griffin D.E., Holmes K.V., Murphy F.A., Robinson H.L., eds. *Viral Pathogenesis*. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven; 1997: 535–53.
2. Jordan R., Hruby D. Smallpox antiviral drug development: satisfying the animal efficacy rule. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 2006; 4(2): 277–89. <https://doi.org/10.1586/14787210.4.2.277>
3. Buller R.M. Mousepox: a small animal model for biodefense research. *Appl. Biosaf.* 2004; 9(1): 10–9.
4. Кабанов А.С., Сергеев Ал.А., Булычев Л.Е., Бормотов Н.И., Шишкина Л.Н., Сергеев Ар.А. и др. Изучение противовирусной активности химически синтезированных соединений в отношении ортопоксвирусов в экспериментах *in vitro*. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2013; (2): 54–9. <https://elibrary.ru/qbzekx>
5. Теплякова Т.В., Пьянков О.В., Скарнович М.О., Бормотов Н.И., Косогова Т.А., Овчинникова А.С. и др. Ингибитор репликации

- коронавируса SARS-CoV-2 на основе водного экстракта гриба *Inonotus obliquus*. Патент РФ № 2741714; 2021.
6. Теплякова Т.В., Пьянков О.В., Скарнович М.О., Бормотов Н.И., Потешкина А.Л., Овчинникова А.С. и др. Ингибитор репликации коронавируса SARS-CoV-2 на основе меланина из гриба *Inonotus obliquus*. Патент РФ № 2747018; 2021.
 7. Теплякова Т.В., Пьянков О.В., Скарнович М.О., Бормотов Н.И., Потешкина А.Л., Овчинникова А.С. и др. Ингибитор репликации коронавируса SARS-CoV-2 на основе гуминовых веществ. Патент РФ № 2752872; 2021.
 8. Baker R.O., Bray M., Huggins J.W. Potential antiviral therapeutics for smallpox, monkeypox and other orthopoxvirus infections. *Antiviral Res.* 2003; 57(1-2): 13–23. [https://doi.org/10.1016/s0166-3542\(02\)00196-1](https://doi.org/10.1016/s0166-3542(02)00196-1)
 9. Хабриев Р.У., ред. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*. М.: Медицина; 2005.
 10. Закс Л. *Статистическое оценивание*. Пер. с нем. М.: Статистика; 1976.
 11. Теплякова Т.В., Булычев Л.Е., Косогова Т.А., Ибрагимова Ж.Б., Юрганова И.А., Кабанов А.С. и др. Противовирусная активность экстрактов из базидиальных грибов в отношении ортопоксвирусов. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2012; (3): 99–101. <https://elibrary.ru/pekrceb>
 12. Teplyakova T.V., Pyankov O.V., Safatov A.S., Ovchinnikova A.S., Kosogova T.A., Skarnovich M.O., et al. Water extract of the Chaga medicinal mushroom, *Inonotus obliquus* (Agaricomycetes), inhibits SARS-CoV-2 replication in vero E6 and vero cell culture experiments. *Int. J. Med. Mushrooms*. 2022; 24(2): 23–30. <https://doi.org/10.1615/intjmedmushrooms.2021042012>
 3. Buller R.M. Mousepox: a small animal model for biodefense research. *Appl. Biosaf.* 2004; 9(1): 10–9.
 4. Kabanov A.S., Sergeev A.I.A., Bulychev L.E., Bormotov N.I., Shishkina L.N., Sergeev Ar.A., et al. Studies of anti-viral activity of chemically synthesized compounds against orthopoxviruses *in vitro*. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2013; (2): 54–9. <https://elibrary.ru/qbzekx> (in Russian)
 5. Teplyakova T.V., P'yankov O.V., Skarnovich M.O., Bormotov N.I., Kosogova T.A., Ovchinnikova A.S., et al. Inhibitor of SARS-CoV-2 coronavirus replication based on an aqueous extract of *Inonotus obliquus* fungus. Patent RF № 2741714; 2021. (in Russian)
 6. Teplyakova T.V., P'yankov O.V., Skarnovich M.O., Bormotov N.I., Poteshkina A.L., Ovchinnikova A.S., et al. A melanin-based inhibitor of SARS-CoV-2 coronavirus replication from the fungus *Inonotus obliquus*. Patent RF № 2747018; 2021. (in Russian)
 7. Teplyakova T.V., P'yankov O.V., Skarnovich M.O., Bormotov N.I., Poteshkina A.L., Ovchinnikova A.S., et al. Inhibitor of SARS-CoV coronavirus replication-2 based on humic substances. Patent RF № 2752872; 2021. (in Russian)
 8. Baker R.O., Bray M., Huggins J.W. Potential antiviral therapeutics for smallpox, monkeypox and other orthopoxvirus infections. *Antiviral Res.* 2003; 57(1-2): 13–23. [https://doi.org/10.1016/s0166-3542\(02\)00196-1](https://doi.org/10.1016/s0166-3542(02)00196-1)
 9. Khabriev R.U., ed. *Guidelines for the Experimental (Preclinical) Study of New Pharmacological Substances [Rukovodstvo po eksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novykh farmakologicheskikh veshchestv]*. Moscow: Meditsina; 2005. (in Russian)
 10. Sachs L. *Statistische auswertungsmethoden*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag; 1972.
 11. Teplyakova T.V., Bulychev L.E., Kosogova T.A., Ibragimova Zh.B., Yurganova I.A., Kabanov A.S., et al. Antiviral activity of extracts from basidiomycetes for orthopoxviruses. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2012; (3): 99–101. <https://elibrary.ru/pekrceb> (in Russian)
 12. Teplyakova T.V., Pyankov O.V., Safatov A.S., Ovchinnikova A.S., Kosogova T.A., Skarnovich M.O., et al. Water extract of the Chaga medicinal mushroom, *Inonotus obliquus* (Agaricomycetes), inhibits SARS-CoV-2 replication in vero E6 and vero cell culture experiments. *Int. J. Med. Mushrooms*. 2022; 24(2): 23–30. <https://doi.org/10.1615/intjmedmushrooms.2021042012>

REFERENCES

1. Fenner F., Buller R.M. Mousepox. In: Nathanson R.A.N., Gonzalez-Scarano F., Griffin D.E., Holmes K.V., Murphy F.A., Robinson H.L., eds. *Viral Pathogenesis*. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven; 1997: 535–53.
2. Jordan R., Hruba D. Smallpox antiviral drug development: satisfying the animal efficacy rule. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 2006; 4(2): 277–89. <https://doi.org/10.1586/14787210.4.2.277>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-177>

© БЛИНОВА Е.А., МАКЕНОВ М.Т., МОРОЗКИН Е.С., ХОЛОДИЛОВ И.С., ФЕДОРОВА М.В., ЖУРЕНКОВА О.Б., РОЕВ Г.В., ХАФИЗОВ К.Ф., КАРАНЬ Л.С., 2023



Генетические особенности вируса Пуумала (*Hantaviridae*: *Orthohantavirus*), обнаруженного в Московской области

Блинова Е.А.^{1,2}, Макенов М.Т.¹, Морозкин Е.С.¹, Холодильов И.С.², Федорова М.В.¹, Журенкова О.Б.¹, Роев Г.В.^{1,3}, Хафизов К.Ф.¹, Карань Л.С.¹

¹ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, 111123, г. Москва, Россия;

²ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), 108819, г. Москва, Россия;

³Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), 141701, г. Москва, Россия

Введение. Вирус Пуумала (семейство *Hantaviridae*, род *Orthohantavirus*) распространен в большинстве регионов Европейской части России. Однако сведения о его генетических вариантах, циркулирующих на территории Центрального федерального округа, крайне скудны.

Цель работы – изучение генетических вариантов вируса Пуумала, циркулирующих в грызунах на территории Волоколамского района Московской области.

Материалы и методы. Ткани грызунов исследовали методом ПЦР на наличие РНК хантавирусов. Амплифицированные фрагменты сегмента L секвенировали методом Сэнгера. Для двух образцов были получены последовательности всех трех сегментов методом NGS. Филогенетические деревья строили в программе MEGA X.

Результаты. В 6 исследуемых образцах был обнаружен вирус Пуумала. Филогенетический анализ, основанный на последовательностях трех сегментов, показал, что обнаруженные генетические варианты принадлежат к сублинии, обозначенной ранее как W-RUS.

Заключение. На территории Волоколамского района Московской области циркулирует генетический вариант вируса Пуумала, относящийся к сублинии W-RUS.

Ключевые слова: ортохантавирус Пуумала; сублиния W-RUS; рыжая полевка; филогеография

Для цитирования: Блинова Е.А., Макенов М.Т., Морозкин Е.С., Холодильов И.С., Федорова М.В., Журенкова О.Б., Роев Г.В., Хафизов К.Ф., Карань Л.С. Генетические особенности вируса Пуумала (*Hantaviridae*: *Orthohantavirus*), обнаруженного в Московской области. *Вопросы вирусологии*. 2023; 68(4): 283–290. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-177> EDN: <https://elibrary.ru/nuunok>

Для корреспонденции: Блинова Екатерина Алексеевна, младший научный сотрудник ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, 111123, г. Москва, Россия. E-mail: blinova.e@cmd.su

Участие авторов: Блинова Е.А. – концепция исследования, проведение экспериментов, интерпретация данных, подготовка текста; Макенов М.Т. – сбор материала, подготовка текста; Морозкин Е.С. – проведение экспериментов, подготовка текста; Холодильов И.С. – сбор материала, подготовка текста; Федорова М.В. – сбор материала; Журенкова О.Б. – проведение экспериментов; Роев Г.В. и Хафизов К.Ф. – анализ данных секвенирования; Карань Л.С. – концепция исследования, подготовка текста статьи для публикации.

Финансирование. Исследование выполнено за счет государственного бюджета.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus author guidelines for animal use (IAVES 23 July 2010). Протокол исследования одобрен Локальным этическим комитетом (Протокол № 92 от 20 мая 2019 г.).

Поступила 07.06.2023

Принята в печать 03.08.2023

Опубликована 31.08.2023

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-177>

Genetic features of the Puumala virus (Hantaviridae: *Orthohantavirus*) identified in the Moscow region

Ekaterina A. Blinova^{1,2}, Marat T. Makenov¹, Evgeny S. Morozkin¹, Ivan S. Kholodilov², Marina V. Fedorova¹, Olga B. Zhurenkova¹, German V. Roev^{1,3}, Kamil F. Khafizov¹, Ludmila S. Karan¹

¹Central Research Institute for Epidemiology of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 111123, Moscow, Russia;

²Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of poliomyelitis), 108819, Moscow, Russia;

³Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), 141701, Moscow, Russia

Introduction. Puumala virus (family *Hantaviridae*, genus *Orthohantavirus*) is distributed in most regions of the European part of Russia. However, information about its genetic variants circulating on the territory of the Central Federal District is extremely scarce.

Materials and methods. Rodents' tissue samples were tested after reverse transcription by PCR for the presence of hantaviral RNA. The amplified fragments of the L segment were sequenced by the Sanger method. For two samples, sequences of all three segments were obtained using the NGS method. Phylogenetic trees were built in the MEGA-X software.

Results. Puumala virus was found in six samples. Based on the phylogenetic analysis of sequences of three segments, the obtained genetic variants belong to the sublineage previously designated as W-RUS.

Conclusion. A genetic variant of the Puumala virus, belonging to the subline W-RUS, circulates on the territory of the Volokolamsk district of Moscow region.

Keywords: *Puumala orthohantavirus*; sublineage W-RUS; bank vole; phylogeography

For citation: Blinova E.A., Makenov M.T., Morozkin E.S., Kholodilov I.S., Fedorova M.V., Zhurenkova O.B., Roev G.V., Khafizov K.F., Karan L.S. Genetic features of the Puumala virus (Hantaviridae: *Orthohantavirus*) identified in the Moscow region *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2023; 68(4): 283–290. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-177> EDN: <https://elibrary.ru/nuunok>

For correspondence: Ekaterina A. Blinova, Researcher of the Federal Budget Institution of Science «Central Research Institute for Epidemiology» of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 111123, Moscow, Russia. E-mail: blinova.e@cmd.su

Information about the authors:

Ekaterina A. Blinova, <https://orcid.org/0000-0002-0735-5627>

Marat T. Makenov <https://orcid.org/0000-0002-6835-4572>

Evgeny S. Morozkin <https://orcid.org/0000-0001-8407-2623>

Ivan S. Kholodilov, <https://orcid.org/0000-0002-3764-7081>

Marina V. Fedorova <https://orcid.org/0000-0002-1232-1624>

Olga B. Zhurenkova, <https://orcid.org/0000-0003-1571-4826>

German V. Roev, <https://orcid.org/0000-0002-2353-5222>

Kamil F. Khafizov, <https://orcid.org/0000-0001-5524-0296>

Ludmila S. Karan, <https://orcid.org/0000-0002-5927-460X>

Contribution: Ekaterina A. Blinova. – the study concept, conducting of the experiments, interpretation of the data, preparing of the text; Marat T. Makenov – collection of the material; Evgeny S. Morozkin – conducting of the experiments; Ivan S. Kholodilov – collection of the material; Marina V. Fedorova – collection of the material; Olga B. Zhurenkova – conducting of the experiments; German V. Roev and Kamil F. Khafizov – analysis of sequencing data; Ludmila S. Karan – the study concept, final approval of the article for publication.

Funding. The research was funded by the State budget.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

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 Local Ethics Committee (Protocol No. 92 dated 20 May 2019).

Received 07 June 2023

Accepted 03 August 2023

Published 31 August 2023

Введение

Представители рода *Orthohantavirus* являются одними из важнейших вирусных зоонозов. Они были обнаружены на всех континентах, кроме Антарктиды.

В большинстве случаев каждый вид хантавируса ассоциирован с одним видом мелких млекопитающих, являющихся их природным резервуаром [1]. Патогенные для человека хантавирусы переносятся грызуна-

ми [2], в популяциях которых они циркулируют в виде бессимптомной инфекции. Заражение происходит при вдыхании пылевых аэрозолей, образующихся из выделений зараженных животных, а также при укусах [3]. У человека они могут вызвать геморрагическую лихорадку с почечным синдромом (ГЛПС) либо хантавирусный пульмональный синдром (ХПС) [2, 4].

В России обнаружены несколько патогенных хантавирусов: вирусы Пуумала, Хантаан, Сеул и Доброва-Белград (варианты Куркино и Сочи) [5]. Наиболее важным возбудителем является вирус Пуумала, на его долю приходится до 98% от всей заболеваемости ГЛПС в России [5]. Он вызывает ГЛПС с низкой летальностью (менее 1%), в Европе более известную как эпидемическая нефропатия. Природным резервуаром вируса Пуумала является рыжая полевка *Myodes glareolus* [6].

Жизнедеятельность популяций грызунов-носителей хантавирусов зависит от климатических условий, влияющих на урожай семян и возможность подснежного размножения, в связи с чем заболеваемость ГЛПС варьируется год от года [7]. Максимальная численность популяции рыжей полевки приходится на широколиственные и хвойно-широколиственные смешанные леса, поэтому наиболее эпидемиологически активные очаги ГЛПС-Пуумала в России расположены на Урале и Среднем Поволжье [5, 7].

Вирионы вируса Пуумала покрыты оболочкой и содержат три геномных сегмента одноцепочечной РНК отрицательной полярности: малый (S), средний (M) и большой (L), их длина составляет приблизительно 1828, 3650 и 6550 нуклеотидов соответственно [8].

Вирус Пуумала разделяют на 8 генетических линий: Центральноевропейская (CE), Альпийско-Адриатическая (ALAD), Датская (DAN), Южно-Скандинавская (S-SCAN), Северо-Скандинавская (N-SCAN), Финская (FIN), Русская (RUS) и Латвийская (LAT) [9, 10]. Генетические линии RUS, FIN и LAT имеют общего предка и происходят из одной рефугии [10]. В России был обнаружен вирус Пуумала, относящийся к линиям RUS и FIN [11, 12], также на территории Курской области был найден вирус, относящийся к ветви, получившей название W-RUS [13].

Заболеваемость ГЛПС регистрируется в 52 регионах Европейской территории России [5]. При этом основная ее часть сконцентрирована в Приволжском федеральном округе (ПФО) [14–18]. На Центральный федеральный округ (ЦФО) приходится около 13% всей заболеваемости ГЛПС в России. Количество случаев ГЛПС в ЦФО, большая часть которых вызвана вирусом Пуумала, увеличилась примерно на 1/3 по сравнению с предыдущим десятилетием [19]. Несмотря на относительно высокие показатели заболеваемости, данные о нуклеотидных последовательностях хантавирусов, циркулирующих на этой территории, весьма скудны. В частности, нам не удалось найти в базе данных GenBank (NCBI) полных кодирующих последовательностей S-сегмента, изолированных на территории ЦФО, помимо результатов, полученных в нашем

предыдущем исследовании [13]. В настоящей работе мы исследовали вирусы, которые были выделены от рыжих полевок, отловленных на территории Волоколамского района Московской области.

Материалы и методы

Сбор биологического материала

Отлов грызунов проводили в Волоколамском районе Московской области в 2019–2020 гг. с использованием ловушек Щипанова [20]. Сбор проводился в три этапа: 17–18.06.2019 было поймано 42 особи (окрестности с. Новопавловское, 55,935984° с.ш., 36,169937° в.д., 200 ловушко-суток), 18–19.09.2019 – 26 особей (окрестности с. Новопавловское, 90 ловушко-суток) и 28.07–04.08.2020 – 41 особь (окрестности с. Суворово, 56,127875° с.ш., 35,871444° в.д. и с. Алферьево, 450 ловушко-суток). Видовую принадлежность мелких млекопитающих определяли морфологически. Затем животных умерщвляли и от них стерильно забирали участки тканей печени, селезенки, почек и легких. В настоящей работе следовали стандартным методам безопасного обращения и отбора проб от мелких млекопитающих, которые потенциально заражены инфекционными патогенами [21]. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus author guidelines for animal use (IAVES 23 July 2010). Протокол исследования одобрен Локальным этическим комитетом (Протокол № 92 от 20 мая 2019 г.).

Экстракция РНК

Экстракцию РНК проводили из 10% суспензии тканей легких, приготовленной на PBS-буфере, с использованием набора реагентов «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва) согласно инструкции производителя.

Аmplификация и секвенирование

Для получения кДНК использовали набор «Реверта L» производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора согласно инструкции производителя. Далее все образцы были протестированы с помощью «вложенной» полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием родоспецифичных праймеров, амплифицирующих участок L-сегмента [22]. Полученные ампликоны были секвенированы методом Сэнгера с внутренними праймеров «вложенной» ПЦР.

Для получения протяженных последовательностей трех сегментов с помощью праймеров, информация о которых опубликована ранее [13], были получены ампликоны размером около 1200 нуклеотидов с перекрывающимися областями около 500 нуклеотидов.

Полученные ампликоны для каждой из проб были смешаны в эквимолярном соотношении. Для получения индексированных библиотек использовали набор Nextera XT Library Prep Kit (Illumina, США) согласно инструкции производителя. Выделение фрагментов ДНК

в диапазоне от 200 до 400 п.н. проводили с использованием магнитных частиц Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, США). Диапазон длин фрагментов оценивали с использованием набора Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent Technologies, Германия) на биоанализаторе Agilent 2100. Измерение концентрации полученных библиотек проводили при помощи количественной ПЦР (NEBNext Library Quant Kit for Illumina, New England Biolabs, Великобритания). Нормализованные библиотеки секвенировали с помощью прибора MiSeq с использованием MiSeq Reagent Kit v3.

Сборка первичных данных

Для предварительной обработки fastq файлов использовали программы Trimmomatic v0.39 [23] и cutadapt v3.4 [24]. Выравнивание ридов на референсы проводили в программе bowtie2 v2.4.4 [25], в качестве референсов использовали последовательности вируса Пуумала NC_005224.1, NC_005223.1, NC_005225.1 для S, M и L-сегментов соответственно. Сборку консенсусов проводили последовательно 2 раза. Сначала – с помощью Lofreq v2.1.5 [26] и bcftools consensus v1.13 [27], после чего полученные консенсусы использовали повторно в качестве референсов в bowtie2. Вторую сборку консенсусов осуществляли с использованием GATK HaplotypeCaller v4.2.0.0 [28] и bcftools consensus.

Филогенетический анализ

Для построения филогенетических деревьев и расчета генетических дистанций использовали программу MEGA X [29]. Конструирование филогенетических деревьев проводили методом Maximum Likelihood с применением модели General Time Reversible (G+I). Полученные последовательности были дополнены другими последовательностями вируса Пуумала из базы данных GenBank.

Результаты

В ходе полевых работ было отловлено 109 грызунов (табл. 1). В сообществе мелких млекопитающих сме-

шанного леса в отловах преобладали рыжие полевки *M. glareolus*, а на лугу и в кустарниковых зарослях вдоль ручья – малая лесная мышь (*A. uralensis*) и желтогорлая мышь (*A. flavicollis*).

В результате ПЦР-анализа среди отловленных животных в образцах *M. glareolus* было выявлено 6 образцов, содержащих РНК хантавирусов. Три положительные особи были отловлены вблизи села Новопавловское, две – рядом с Суворово, одна – в Алферьево. Доля инфицированных рыжих полевок составила 7,3%.

Положительные образцы были секвенированы с праймерами, фланкирующими фрагмент L-гена, длиной 347 п.н. В таблице 2 указаны идентификаторы полученных последовательностей в базе данных GenBank. Все последовательности относились к вирусу Пуумала.

Для образцов № 57 и 79 из окрестностей с. Новопавловское и с. Суворово удалось получить протяженные последовательности всех сегментов (табл. 2). Для построения дендрограмм полученные последовательности были дополнены представителями вируса Пуумала, принадлежащими к генетической линии RUS. Представители других линий были взяты в качестве внешней группы. Филогенетические деревья были построены на основании выравниваний S-сегмента (рисунок а), M-сегмента (рисунок б) и L-сегмента (рисунок в). Для каждой последовательности указан регион изоляции и принадлежность к генетической линии.

Филогенетические деревья демонстрируют, что генетические варианты из Волоколамского района по всем трем сегментам группируются с последовательностями из Курской области, представленными ранее как сублиния W-RUS [13].

Нуклеотидные различия между последовательностями из Волоколамского района составляют менее 4% для каждого из сегментов. А их различие с генетическими вариантами из Курской области составило менее 10%. В таблице 3 указаны генетические дистанции между полученными в этом исследовании последовательностями и генетическими вариантами

Таблица 1. Результаты отлова грызунов и исследования образцов на наличие РНК хантавирусов

Table 1. Results of trapping of rodents and researching samples for the presence of hantaviral RNA

Локация Location	Биотоп Biotope	Ловушко- суток Trap-days	Количество ПЦР-положительных особей/пойманных особей PCR-positive specimens/Trapped specimens						
			всего all	<i>Myodes glareolus</i>	<i>Microtus oconomus</i>	<i>Microtus</i> sp.	<i>Apodemus flavicollis</i>	<i>Apodemus uralensis</i>	<i>Apodemus agrarius</i>
Новопавловское Novopavlovskoe	Смешанный лес Mixed forest	290	3/68	3/59	0/1	–	0/6	0/2	–
Суворово Suvorovo	Смешанный лес Mixed forest	200	2/21	2/16	–	–	0/2	0/2	0/1
Алферьево Alferevo	Луг, кустарники Meadow, shrubs	250	1/20	1/7	–	0/2	0/1	0/6	0/4
Всего All		740	6/109	6/82	0/1	0/2	0/9	0/10	0/5

Примечание. «←» – отсутствовали в отловах.

Note. «←» – were absent in the trapping.

Таблица 2. Данные о результатах секвенирования вируса Пуумала
Table 2. Data on the Puumala virus sequencing results

Зоологический номер ID	Место изоляции Isolation point	Название изолята Isolate name	Сегмент Segment	Длина, п.н. Length, bp	GenBank ID
45	Новопавловское Novopavlovskoye	Volokolamsk/Mg45	L	347	OQ503846
57	Новопавловское Novopavlovskoye	Volokolamsk/Mg57	L	5972	OQ606916
			M	3058	OQ606917
			S	1779	OQ606918
59	Новопавловское Novopavlovskoye	Volokolamsk/Mg59	L	347	OQ503847
			S	1779	OQ606918
79	Суворово Suvorovo	Volokolamsk/Mg79	L	6052	OQ606919
			M	3543	OQ606920
			S	1763	OQ606921
93	Суворово Suvorovo	Volokolamsk/Mg93	L	347	OQ503849
123	Алферьево Alferevo	Volokolamsk/Mg123	L	347	OQ503850

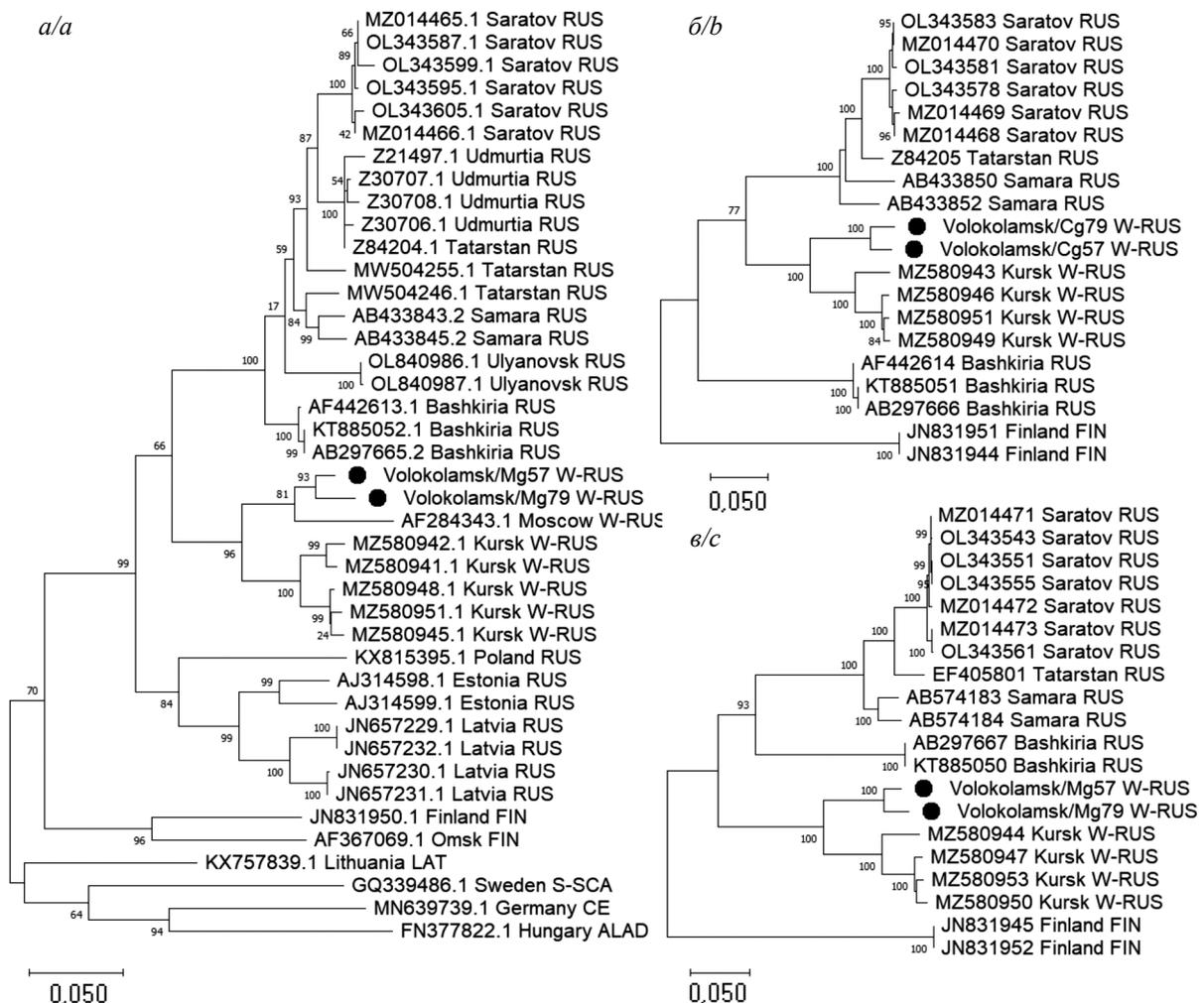


Рисунок. Филогенетические деревья, построенные на основании выравниваний: *a* – 1302 нуклеотидов S-сегмента, соответствующие полной рамке считывания белка нуклеокапсида; *b* – 3050 нуклеотидов M-сегмента (частичная открытая рамка считывания, OPC); *c* – 5960 нуклеотидов L-сегмента (частичная OPC). Последовательности, полученные в этом исследовании, выделены маркером. Конструирования филогенетических деревьев проводили методом Maximum Likelihood с применением модели General Time Reversible (G+I) с помощью программы MEGA X [29].

Figure. Phylogenetic trees constructed on the basis of alignments: *a* – 1302 nucleotides of the S segment corresponding to the complete reading frame of the nucleocapsid protein; *b* – 3050 nucleotides of the M segment (partial open reading frame, ORF); *c* – 5960 nucleotides of the L segment (partial ORF). The sequences obtained in this study are marked. Phylogenetic trees were constructed using the Maximum Likelihood method using the General Time Reversible (G+I) model using the MEGA X program [29].

Таблица 3. Генетическая дистанция между нуклеотидными/аминокислотными последовательностями из Волоколамского района и последовательностями из других локаций (%)**Table 3. P-distance between nucleotide/amino acid sequences from Volokolamsk region and sequences from other locations (%)**

Параметр	Волоколамский район Volokolamsk region		
	S-сегмент, 1302 п.н. S segment, 1302 bp	M-сегмент, 3050 п.н. M segment, 3050 bp	L-сегмент, 5960 п.н. L segment, 5960 bp
Волоколамский район Volokolamsk region	3,31 0,69	3,49 1,19	3,26 0,45
Курская область Kursk region	8,3–9,38 1,15–1,62	9,04–9,54 1,28–1,58	9,47–9,66 1,41–1,61
Другие представители генетической линии RUS Other RUS lineage representatives	10,91–13,91 1,62–3,93	12,69–13,94 1,87–3,46	13,01–14,14 1,06–1,56

Примечание. Расчет осуществляли по полной ОРС для S-сегмента и по частичным ОРС для M- и L-сегментов.

Note. The calculation was performed according to the complete ORF for the S segment, and partial ORF for the M and L segments.

вируса Пуумала из других локаций. Изолят AF284343 не был включен в расчет из-за недостаточной длины.

Обсуждение

Согласно статистическим данным Роспотребнадзора, на территории ЦФО ежегодно наблюдается заболеваемость ГЛПС. Наибольшее количество случаев регистрируется в Ярославской, Рязанской, Костромской, а также Тульской областях. Большая часть случаев приходится на вирус Пуумала, еще 3–5% – на вирус Добрава-Белград [19]. Несмотря на это, генетические варианты, циркулирующие на территории ЦФО, крайне мало изучены: помимо последовательностей из Курской области, полученных в нашей предыдущей работе [13], на момент работы над статьей в базе данных GenBank имелось лишь две последовательности: AF284343 [30] и EU652421 [31].

Последовательность AF284343 была получена от рыжей полевки, отловленной на территории Егорьевского района Московской области во время вспышки ГЛПС-Пуумала в 1995 г. В соответствующей публикации изолят описан как новый генотип вируса Пуумала [30]. Это фрагмент S-сегмента длиной около 700 нуклеотидов, на дендрограмме (рисунок а) он кластеризуется с последовательностями из Курской области и Волоколамского района. Таким образом, по всей видимости, этот изолят также может быть отнесен к сублинии W-RUS.

EU652421 – это короткий (менее 300 нуклеотидов) фрагмент M-сегмента вирусной РНК, которая была выделена от рыжей полевки на территории Липецкой области. Его длина недостаточна для построения дендрограммы с надежной поддержкой, в связи с чем невозможно определить его принадлежность к сублинии W-RUS.

В настоящем исследовании была подтверждена циркуляция вируса Пуумала на территории Московской области [30]. Новые последовательности из Волоколамска кластеризуются с генетическими вариантами из Курской области, обозначенными ранее как ветвь W-RUS [30], по каждому из трех сегментов генома, что демонстрирует их принадлежность к этой же ветви и подтверждается тем, что генетические различия

между последовательностями из Волоколамского района и Курской области меньше, чем таковые между последовательностями из Волоколамского района и другими представителями линии RUS (табл. 3).

Работы, посвященные систематизации разнообразия вируса Пуумала, базировались именно на последовательностях S-сегмента [11], по-видимому, из-за большей представленности в GenBank, а также из-за большей консервативности.

В статье T. Sironen и соавт. (2001) [12] упоминается, что генетическая линия RUS состоит из двух сублиний, сформированных штаммами из Прибалтики и Европейской части России. В настоящем исследовании на филогенетическом дереве по S-сегменту генетическая линия RUS разделяется на три монофилетические группы. Третья ветвь, W-RUS, была описана в нашем предыдущем исследовании и дополнена в настоящей работе последовательностями из Волоколамского района.

Вариабельность внутри генетической линии RUS велика по сравнению с другими генетическими линиями [8]. В недавней работе были описаны систематизация и разделение наиболее представленной в GenBank части генетической линии RUS, относящейся к ПФО, на несколько сублиний [15]. Ветвь W-RUS является внешней группой по отношению ко всем описанным кладам вируса в ПФО, согласно филогенетическому исследованию, основанному на S- и L-сегментах (рисунок а, в).

Интересно, что топология ветвей в дендрограмме по M-сегменту значительно отличается от таковых по S- и L-сегментам. Это характерно для разных видов хантавирусов и обусловлено тем, что M-сегмент генома является наиболее вариабельным и наиболее часто участвует в реассортации [8, 9, 32, 33]. Это подтверждает вывод предыдущего исследования [13] о том, что обмен M-сегментами происходил и в эволюционной истории линии RUS.

Таким образом, представители ветви W-RUS были обнаружены в двух регионах: Курской и Московской областях. На основании этого можно предположить, что они также распространены на прилегающих территориях: в Орловской, Брянской, Калужской и Туль-

ской областях. Для получения полной картины генетического разнообразия вируса Пуумала, циркулирующего на территории Европейской части России, необходимы дополнительные исследования с расширением не только географии работ, но и объемов выборки полевого и клинического материала для оценки всего генетического пейзажа вируса Пуумала, встречающегося на данной территории.

Заключение

На территории Волоколамского района Московской области в грызунах обнаружена РНК вируса Пуумала сублинии W-RUS.

ЛИТЕРАТУРА

- Бернштейн А.Д., Гавриловская И.Н., Апекина Н.С., Дзагурова Т.К., Ткаченко Е.А. Особенности природной очаговости хантавирусных зоонозов. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2010; (2): 5–13. <https://elibrary.ru/micwyl>
- Kuhn J.H., Schmaljohn C.S. A brief history of bunyaviral family hantaviridae. *Diseases*. 2023; 11(1): 38. <https://doi.org/10.3390/diseases11010038>
- Lee G.Y., Kim W.K., Park K., Lee S.H., Hwang J., No J.S., et al. Phylogeographic diversity and hybrid zone of Hantaan orthohantavirus collected in Gangwon Province, Republic of Korea. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2020; 14(10): e0008714. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008714>
- Vetter P., L'Huillier A.G., Montalbano M.F., Pigny F., Eckerle I., Torriani G., et al. Puumala virus infection in family, Switzerland. *Emerg. Infect. Dis.* 2021; 27(2): 658–60. <https://doi.org/10.3201/eid2702.203770>
- Tkachenko E.A., Ishmukhametov A.A., Dzagurova T.K., Bernshtein A.D., Morozov V.G., Siniugina A.A., et al. Hemorrhagic fever with renal syndrome, Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 2019; 25(12): 2325–8. <https://doi.org/10.3201/eid2512.181649>
- Szabó R., Radosa L., Ličková M., Sláviková M., Heroldová M., Stanko M., et al. Phylogenetic analysis of Puumala virus strains from Central Europe highlights the need for a full-genome perspective on hantavirus evolution. *Virus Genes*. 2017; 53(6): 913–7. <https://doi.org/10.1007/s11262-017-1484-5>
- Garanina S.B., Platonov A.E., Zhuravlev V.I., Murashkina A.N., Yakimenko V.V., Korneev A.G., et al. Genetic diversity and geographic distribution of hantaviruses in Russia. *Zoonoses Public Health*. 2009; 56(6-7): 297–309. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2008.01210.x>
- Kabwe E., Davidyuk Y., Shamsutdinov A., Garanina E., Martynova E., Kitaeva K., et al. Orthohantaviruses, emerging zoonotic pathogens. *Pathogens*. 2020; 9(9): 775. <https://doi.org/10.3390/pathogens9090775>
- Klempa B. Reassortment events in the evolution of hantaviruses. *Virus Genes*. 2018; 54(5): 638–46. <https://doi.org/10.1007/s11262-018-1590-z>
- Castel G., Chevenet F., Razzauti M., Murri S., Marianneau P., Cosson J.F., et al. Phylogeography of Puumala orthohantavirus in Europe. *Viruses*. 2019; 11(8): 679. <https://doi.org/10.3390/v11080679>
- Dekonenko A., Yakimenko V., Ivanov A., Morozov V., Nikitin P., Khasanova S., et al. Genetic similarity of Puumala viruses found in Finland and western Siberia and of the mitochondrial DNA of their rodent hosts suggests a common evolutionary origin. *Infect. Genet. Evol.* 2003; 3(4): 245–57. [https://doi.org/10.1016/s1567-1348\(03\)00088-1](https://doi.org/10.1016/s1567-1348(03)00088-1)
- Sironen T., Vaheri A., Plyusnin A. Molecular evolution of Puumala hantavirus. *J. Virol.* 2001; 75(23): 11803–10. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.23.11803-11810.2001>
- Blinova E., Deviatkin A., Kurashova S., Balovneva M., Volgina I., Valdokhina A., et al. A fatal case of haemorrhagic fever with renal syndrome in Kursk Region, Russia, caused by a novel Puumala virus clade. *Infect. Genet. Evol.* 2022; 102: 105295. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2022.105295>
- Яшина Л.Н., Трегубчик Т.В., Малышев Б.С., Сметанникова Н.А., Грищенко И.В., Дольский А.А. и др. Возбудитель вспышки ГЛПС в Саратовской области, 2019 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; (4): 150–6. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2021-4-150-156> <https://elibrary.ru/dxxsey>
- Kabwe E., Al Sheikh W., Shamsutdinov A.F., Ismagilova R.K., Martynova E.V., Ohlopko O.V., et al. Analysis of Puumala orthohantavirus genome variants identified in the territories of Volga federal district. *Trop. Med. Infect. Dis.* 2022; 7(3): 46. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed7030046>
- Davidyuk Y., Shamsutdinov A., Kabwe E., Ismagilova R., Martynova E., Belyaev A., et al. Prevalence of the Puumala orthohantavirus strains in the Pre-Kama area of the Republic of Tatarstan, Russia. *Pathogens*. 2020; 9(7): 540. <https://doi.org/10.3390/pathogens9070540>
- Davidyuk Y.N., Kabwe E., Shamsutdinov A.F., Knyazeva A.V., Martynova E.V., Ismagilova R.K., et al. The Distribution of Puumala orthohantavirus genome variants correlates with the regional landscapes in the Trans-Kama area of the Republic of Tatarstan. *Pathogens*. 2021; 10(9): 1169. <https://doi.org/10.3390/pathogens10091169>
- Martynova E., Davidyuk Y., Kabwe E., Garanina E.E., Shakirova V., Pavelkina V., et al. Cytokine, chemokine, and metalloprotease activation in the serum of patients with nephropathia epidemic from the Republic of Tatarstan and the Republic of Mordovia, Russia. *Pathogens*. 2021; 10(5): 527. <https://doi.org/10.3390/pathogens10050527>
- Савицкая Т.А., Иванова А.В., Исаева Г.Ш., Решетникова И.Д., Трифионов В.А., Зиятдинов В.Б. и др. Оценка эпидемиологической ситуации по геморрагической лихорадке с почечным синдромом, прогноз на 2020 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; (2): 62–70. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-2-62-70> <https://elibrary.ru/oqmbzo>
- Щипанов Н.А. Универсальная живоловка для мелких млекопитающих. *Зоологический журнал*. 1987; 66(5): 759–61.
- Mills J., Childs J., Ksiazek T., Peters C., Velleca W. Methods for trapping and sampling small mammals for virologic testing; 1995. Available at: <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/11507>
- Klempa B., Fichet-Calvet E., Lecompte E., Auste B., Aniskin V., Meisel H., et al. Hantavirus in African wood mouse, Guinea. *Emerg. Infect. Dis.* 2006; 12(5): 838–40. <https://doi.org/10.3201/eid1205.051487>
- Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014; 30(15): 2114–20. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet journal*. 2011; 17(1): 10. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>
- Langmead B., Salzberg S.L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods*. 2012; 9(4): 357–9. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
- Wilm A., Aw P.P., Bertrand D., Yeo G.H., Ong S.H., Wong C.H., et al. LoFreq: a sequence-quality aware, ultra-sensitive variant caller for uncovering cell-population heterogeneity from high-throughput sequencing datasets. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40(22): 11189–201. <https://doi.org/10.1093/nar/gks918>
- Danecek P., Bonfield J.K., Liddle J., Marshall J., Ohan V., Pollard M.O., et al. Twelve years of SAMtools and BCFtools. *Gigascience*. 2021; 10(2): giab008. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giab008>
- Van der Auwera G.A., O'Connor B.D. *Genomics in the Cloud: Using Docker, GATK, and WDL in Terra*. O'Reilly Media; 2020.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018; 35(6): 1547–9. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Иванов А.П., Деконенко А.Е., Дзагурова Т.К., Малкин А.Е., Шерварли И.В., Барановский П.М. и др. Анализ вспышки геморрагической лихорадки с почечным синдромом в Егорьевском районе Московской области. *Вопросы вирусологии*. 2000; 45(4): 33–6.
- Garanina S.B., Platonov A.E., Zhuravlev V.I., Murashkina A.N., Yakimenko V.V., Korneev A.G., et al. Genetic diversity and geographic distribution of hantaviruses in Russia. *Zoonoses Public Health*. 2009; 56(6-7): 297–309. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2008.01210.x>
- Razzauti M., Plyusnina A., Niemimaa J., Henttonen H., Plyusnin A. Co-circulation of two Puumala hantavirus lineages

- in Latvia: a Russian lineage described previously and a novel Latvian lineage. *J. Med. Virol.* 2012; 84(2): 314–8. <https://doi.org/10.1002/jmv.22263>
33. Kabwe E., Shamsutdinov A.F., Suleimanova S., Martynova E.V., Ismagilova R.K., Shakirova V.G., et al. Puumala orthohantavirus reassortant genome variants likely emerging in the watershed forests. *Int. J. Mol. Sci.* 2023; 24(2): 1018. <https://doi.org/10.3390/ijms24021018>
- ### REFERENCES
1. Bernshteyn A.D., Gavrilovskaya I.N., Apekina N.S., Dzagurova T.K., Tkachenko E.A. Features of the natural focality of hantavirus zoonoses. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika.* 2010; (2): 5–13. <https://www.elibrary.ru/micwyl> (in Russian)
 2. Kuhn J.H., Schmaljohn C.S. A brief history of bunyaviral family hantaviridae. *Diseases.* 2023; 11(1): 38. <https://doi.org/10.3390/diseases11010038>
 3. Lee G.Y., Kim W.K., Park K., Lee S.H., Hwang J., No J.S., et al. Phylogeographic diversity and hybrid zone of Hantaan orthohantavirus collected in Gangwon Province, Republic of Korea. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2020; 14(10): e0008714. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008714>
 4. Vetter P., L'Huillier A.G., Montalbano M.F., Pigny F., Eckerle I., Torriani G., et al. Puumala virus infection in family, Switzerland. *Emerg. Infect. Dis.* 2021; 27(2): 658–60. <https://doi.org/10.3201/eid2702.203770>
 5. Tkachenko E.A., Ishmukhametov A.A., Dzagurova T.K., Bernshteyn A.D., Morozov V.G., Siniugina A.A., et al. Hemorrhagic fever with renal syndrome, Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 2019; 25(12): 2325–8. <https://doi.org/10.3201/eid2512.181649>
 6. Szabó R., Radosa L., Ličková M., Sláviková M., Heroldová M., Stanko M., et al. Phylogenetic analysis of Puumala virus strains from Central Europe highlights the need for a full-genome perspective on hantavirus evolution. *Virus Genes.* 2017; 53(6): 913–7. <https://doi.org/10.1007/s11262-017-1484-5>
 7. Garanina S.B., Platonov A.E., Zhuravlev V.I., Murashkina A.N., Yakimenko V.V., Korneev A.G., et al. Genetic diversity and geographic distribution of hantaviruses in Russia. *Zoonoses Public Health.* 2009; 56(6-7): 297–309. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2008.01210.x>
 8. Kabwe E., Davidiyuk Y., Shamsutdinov A., Garanina E., Martynova E., Kitaeva K., et al. Orthohantaviruses, emerging zoonotic pathogens. *Pathogens.* 2020; 9(9): 775. <https://doi.org/10.3390/pathogens9090775>
 9. Klempa B. Reassortment events in the evolution of hantaviruses. *Virus Genes.* 2018; 54(5): 638–46. <https://doi.org/10.1007/s11262-018-1590-z>
 10. Castel G., Chevenet F., Razzauti M., Murri S., Marianneau P., Cosson J.F., et al. Phylogeography of Puumala orthohantavirus in Europe. *Viruses.* 2019; 11(8): 679. <https://doi.org/10.3390/v11080679>
 11. Dekonenko A., Yakimenko V., Ivanov A., Morozov V., Nikitin P., Khananova S., et al. Genetic similarity of Puumala viruses found in Finland and western Siberia and of the mitochondrial DNA of their rodent hosts suggests a common evolutionary origin. *Infect. Genet. Evol.* 2003; 3(4): 245–57. [https://doi.org/10.1016/s1567-1348\(03\)00088-1](https://doi.org/10.1016/s1567-1348(03)00088-1)
 12. Sironen T., Vaheri A., Plyusnin A. Molecular evolution of Puumala hantavirus. *J. Virol.* 2001; 75(23): 11803–10. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.23.11803-11810.2001>
 13. Blinova E., Deviatkin A., Kurashova S., Balovneva M., Volgina I., Valdokhina A., et al. A fatal case of haemorrhagic fever with renal syndrome in Kursk Region, Russia, caused by a novel Puumala virus clade. *Infect. Genet. Evol.* 2022; 102: 105295. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2022.105295>
 14. Yashina L.N., Tregubchak T.V., Malyshev B.S., Smetannikova N.A., Grishchenko I.V., Dol'skiy A.A., et al. Study of the exosomal microrna-126 and microrna-218 expression profiles in patients with hemorrhagic fever with renal syndrome (hfrs). *Problemy osobo opasnykh infektsiy.* 2021; (4): 150–6. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2021-4-150-156> <https://elibrary.ru/dxxsey> (in Russian)
 15. Kabwe E., Al Sheikh W., Shamsutdinov A.F., Ismagilova R.K., Martynova E.V., Ohlopokova O.V., et al. Analysis of Puumala orthohantavirus genome variants identified in the territories of Volga federal district. *Trop. Med. Infect. Dis.* 2022; 7(3): 46. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed7030046>
 16. Davidiyuk Y., Shamsutdinov A., Kabwe E., Ismagilova R., Martynova E., Belyaev A., et al. Prevalence of the Puumala orthohantavirus strains in the Pre-Kama area of the Republic of Tatarstan, Russia. *Pathogens.* 2020; 9(7): 540. <https://doi.org/10.3390/pathogens9070540>
 17. Davidiyuk Y.N., Kabwe E., Shamsutdinov A.F., Knyazeva A.V., Martynova E.V., Ismagilova R.K., et al. The Distribution of Puumala orthohantavirus genome variants correlates with the regional landscapes in the Trans-Kama area of the Republic of Tatarstan. *Pathogens.* 2021; 10(9): 1169. <https://doi.org/10.3390/pathogens10091169>
 18. Martynova E., Davidiyuk Y., Kabwe E., Garanina E.E., Shakirova V., Pavelkina V., et al. Cytokine, chemokine, and metalloprotease activation in the serum of patients with nephropathia epidemica from the Republic of Tatarstan and the Republic of Mordovia, Russia. *Pathogens.* 2021; 10(5): 527. <https://doi.org/10.3390/pathogens10050527>
 19. Savitskaya T.A., Ivanova A.V., Isaeva G.Sh., Reshetnikova I.D., Trifonov V.A., Ziatdinov V.B., et al. Assessment of epidemiological situation on hemorrhagic fever with renal syndrome around the world and in Russia, forecast for 2020. *Problemy osobo opasnykh infektsiy.* 2020; (2): 62–70. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-2-62-70> <https://elibrary.ru/oqmbzo> (in Russian)
 20. Shchipanov N.A. Universal live-trap for small mammals. *Zoologicheskii zhurnal.* 1987; 66(5): 759–61. (in Russian)
 21. Mills J., Childs J., Ksiazek T., Peters C., Velleca W. Methods for trapping and sampling small mammals for virologic testing; 1995. Available at: <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/11507>
 22. Klempa B., Fichet-Calvet E., Lecompte E., Auste B., Aniskin V., Meisel H., et al. Hantavirus in African wood mouse, Guinea. *Emerg. Infect. Dis.* 2006; 12(5): 838–40. <https://doi.org/10.3201/eid1205.051487>
 23. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 2014; 30(15): 2114–20. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
 24. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet journal.* 2011; 17(1): 10. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>
 25. Langmead B., Salzberg S.L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods.* 2012; 9(4): 357–9. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
 26. Wilm A., Aw P.P., Bertrand D., Yeo G.H., Ong S.H., Wong C.H., et al. LoFreq: a sequence-quality aware, ultra-sensitive variant caller for uncovering cell-population heterogeneity from high-throughput sequencing datasets. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40(22): 11189–201. <https://doi.org/10.1093/nar/gks918>
 27. Danecek P., Bonfield J.K., Liddle J., Marshall J., Ohan V., Pollard M.O., et al. Twelve years of SAMtools and BCFtools. *Gigascience.* 2021; 10(2): giab008. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giab008>
 28. Van der Auwera G.A., O'Connor B.D. *Genomics in the Cloud: Using Docker, GATK, and WDL in Terra.* O'Reilly Media; 2020.
 29. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018; 35(6): 1547–9. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
 30. Ivanov A.P., Dekonenko A.E., Dzagurova T.K., Malkin A.E., Shervarli I.V., Baranovskiy P.M., et al. Analysis of an outbreak of hemorrhagic fever with the renal syndrome in the Egoryevsk district of the Moscow region. *Voprosy virusologii.* 2000; 45(4): 33–6. (in Russian)
 31. Garanina S.B., Platonov A.E., Zhuravlev V.I., Murashkina A.N., Yakimenko V.V., Korneev A.G., et al. Genetic diversity and geographic distribution of hantaviruses in Russia. *Zoonoses Public Health.* 2009; 56(6-7): 297–309. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2008.01210.x>
 32. Razzauti M., Plyusnina A., Niemimaa J., Henttonen H., Plyusnin A. Co-circulation of two Puumala hantavirus lineages in Latvia: a Russian lineage described previously and a novel Latvian lineage. *J. Med. Virol.* 2012; 84(2): 314–8. <https://doi.org/10.1002/jmv.22263>
 33. Kabwe E., Shamsutdinov A.F., Suleimanova S., Martynova E.V., Ismagilova R.K., Shakirova V.G., et al. Puumala orthohantavirus reassortant genome variants likely emerging in the watershed forests. *Int. J. Mol. Sci.* 2023; 24(2): 1018. <https://doi.org/10.3390/ijms24021018>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-181>

© СМЕРНОВА К.В., ЛУБЕНСКАЯ А.К., СЕНЫЮТА Н.Б., ДУШЕНЬКИНА Т.Е., ГУРЦЕВИЧ В.Э., 2023



Вирус Эпштейна–Барр 1-го и 2-го типа (Herpesviridae: *Lymphocryptovirus*) и другие маркеры вируса у больных раком носоглотки в двух этнически и географически отличающихся регионах России

Смирнова К.В.^{1–3}, Лубенская А.К.¹, Сеныюта Н.Б.¹, Душенькина Т.Е.¹, Гурцевич В.Э.¹¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478, г. Москва, Россия;²ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы, 117198, г. Москва, Россия;³ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, 117997, г. Москва, Россия

Введение. Открытие двух молекулярных типов вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ): ВЭБ-1 и ВЭБ-2, обладающих разными биологическими свойствами, стимулировало поиски новообразований, ассоциированных с каждым типом вируса.

Цель работы – изучить у больных раком носоглотки (РНГ), представителей двух популяций из географически и климатически отличающихся регионов России, характер ассоциации с ВЭБ-1 и ВЭБ-2, серологическую активность к каждому типу вируса, а также концентрацию ДНК ВЭБ в плазме крови двух гендерных, возрастных и этнических групп больных.

Материалы и методы. В плазме крови больных РНГ и другими, не ассоциированными с ВЭБ опухолями полости рта (ДОПР^{ВЭБ-}) больных из Северо-Кавказского и Центрального федеральных округов России определяли типы ВЭБ и концентрацию вирусной ДНК с помощью «гнездной» ПЦР и ПЦР в режиме реального времени соответственно. Титры IgG- и IgA-антител к вирусному капсидному антигену определяли методом непрямой иммунофлуоресценции.

Результаты. Тестирование собранных образцов плазмы крови показало, что больные РНГ и ДОПР^{ВЭБ-} инфицированы обоими типами ВЭБ примерно в одинаковых соотношениях. У двух групп больных РНГ, инфицированных только одним из типов вируса, соответственно ВЭБ-1 или ВЭБ-2, не обнаружено статистически значимых различий между среднегеометрическими значениями титров IgG- и IgA-антител к ВЭБ и концентрациями вирусной ДНК в плазме крови. На распространенность типов ВЭБ не влияли ни пол, ни этногеографическая принадлежность больных РНГ. Различия выявлено только в возрастных группах: у больных РНГ до 60 лет преобладал ВЭБ-2, а старше 60 лет – ВЭБ-1.

Заключение. Отсутствие преобладания одного из типов ВЭБ у больных РНГ, представителей разных этносов из географически и климатически отличающихся регионов, позволяет предположить, что ни один из этих факторов не играет важной роли в канцерогенезе РНГ, но каждый тип ВЭБ (ВЭБ-1 или ВЭБ-2) при возникновении необходимых условий способен проявить свой онкогенный потенциал и инициировать развитие опухоли.

Ключевые слова: вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ); типы ВЭБ (ВЭБ-1 и ВЭБ-2); рак носоглотки (РНГ); другие опухоли полости рта, не ассоциированные с ВЭБ (ДОПР^{ВЭБ-}); «гнездная» ПЦР; ПЦР в режиме реального времени; медиана копий ДНК ВЭБ в плазме/мл; IgG- и IgA-антитела к вирусному (ВЭБ) капсидному антигену (ВКА)

Для цитирования: Смирнова К.В., Лубенская А.К., Сеныюта Н.Б., Душенькина Т.Е., Гурцевич В.Э. Вирус Эпштейна–Барр 1-го и 2-го типа (Herpesviridae: *Lymphocryptovirus*) и другие маркеры вируса у больных раком носоглотки в двух этнически и географически отличающихся регионах России. *Вопросы вирусологии*. 2023; 68(4): 291–301. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-181> EDN: <https://elibrary.ru/mszoip>

Для корреспонденции: Смирнова Ксения Валерьевна, заведующая лабораторией вирусного канцерогенеза НИИ канцерогенеза «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Тел.: +7 (919) 760-82-57; E-mail: skv.lab@yandex.ru

Участие авторов: Смирнова К.В. – организация исследования, анализ полученных результатов, редактирование рукописи; Лубенская А.К. – детекция типов ВЭБ, определение концентрации ДНК ВЭБ в плазме; Сеныюта Н.Б. – систематизация результатов исследования, анализ гуморального ответа к ВЭБ; Душенькина Т.Е. – сбор и обработка биологического материала; постановка реакции иммунофлуоресценции; Гурцевич В.Э. – идея исследования, написание рукописи, оформление рисунков.

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 23-25-00435). **Благодарность.** Авторы выражают глубокую признательность и искреннюю благодарность профессорам: Евгению Григорьевичу Матякину, Михаилу Алексеевичу Кропоту и Али Мурадовичу Мудуну, заведующим в разные годы отделением опухолей головы и шеи в НИИ клинической онкологии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, а также к.м.н., врачу-онкологу этого же отделения Анастасии Валерьевне Игнатовой за данные клинического сопровождения больных и обеспечение клиническим материалом.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФГБУ «НМИЦО им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Протокол № 532 от 14.04.2022).

Поступила 17.06.2023

Принята в печать 08.08.2023

Опубликована 31.08.2023

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-181>

Epstein–Barr virus (Herpesviridae: *Lymphocryptovirus*) types 1 and 2 and other viral markers in patients with nasopharyngeal carcinoma in two geographically and ethnically distinct regions of Russia

Ksenia V. Smirnova^{1–3}, Aleksandra K. Lubenskaya¹, Natalya B. Senyuta¹, Tatyana E. Dushenkina¹, Vladimir E. Gurtsevitch¹

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, 115478, Moscow, Russia;

²Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba, 117998, Moscow, Russia;

³N.I. Pirogov National Research Medical University, 117997, Moscow, Russia

Introduction. The discovery of two types of Epstein–Barr virus (EBV) (EBV-1 and EBV-2) that have different biological properties stimulated the search for neoplasms associated with each type of the virus.

The aim of the work is to study the nature of the association of nasopharyngeal cancer (NPC) with EBV-1 and EBV-2, serological activity for each viral type and the concentration of EBV DNA in the blood plasma of two gender, age and ethnic groups of NPC patients that represent geographically and climatically different regions of Russia.

Materials and methods. In the blood plasma of patients with NPC and other non-EBV associated tumors of oral cavity (OTOC^{EBV-}) from the North Caucasian (NCFD) and Central (CFD) Federal Districts of Russia, the types of EBV and the concentration of viral DNA were determined using respectively «nested» and real time PCR; titers of IgG and IgA antibodies to viral capsid antigen (VCA) were measured in indirect immunofluorescence assay.

Results. The blood plasma samples testing showed that NPC and OTOC^{EBV-} patients were infected with both types of EBV in approximately equal proportions. In two groups of NPC patients infected with one of the virus types only, EBV-1 or EBV-2, respectively, no statistically significant differences were found between the geometric mean values of IgG and IgA anti-EBV antibody titers and viral DNA concentrations in blood plasma. The distribution of virus types was not affected by either patient gender or ethnogeographic origin. The difference was found only between age groups: EBV-2 dominated in NPC patients up to 60 years, and EBV-1 was prevalent in patients over 60 years.

Conclusion. The lack of the predominance of one of EBV types in NPC patients that are the representatives of different ethnic groups from geographically and climatically different regions, suggests that none of these factors play an important role in the NPC carcinogenesis. Evidently, each type of EBV, EBV-1 or EBV-2, if the necessary conditions arise, are able to exhibit its oncogenic potential to initiate tumor development.

Keywords: Epstein–Barr virus (EBV); EBV types (EBV-1 and EBV-2); nasopharyngeal carcinoma (NPC); other tumors of the oral cavity not associated with EBV (OTOC^{EBV-}); «nested» PCR; real-time PCR; EBV DNA concentration in plasma; immunofluorescence reaction; IgG and IgA antibodies to the virus (EBV) capsid antigen (VCA)

For citation: Smirnova K.V., Lubenskaya A.K., Senyuta N.B., Dushenkina T.E., Gurtsevitch V.E. Epstein–Barr virus (Herpesviridae: *Lymphocryptovirus*) types 1 and 2 and other viral markers in nasopharyngeal carcinoma patients in two geographically and ethnically different regions of Russia. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2023; 68(4): 291–301 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-181> EDN: <https://elibrary.ru/mszoip>

For correspondence: Smirnova Ksenia Valerievna, Head, laboratory of viral carcinogenesis, Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology. E-mail: skv.lab@yandex.ru

Information about the authors:

Smirnova K.V., <https://orcid.org/0000-0001-6209-977X>

Lubenskaya A.K., <https://orcid.org/0000-0003-3953-7449>

Senyuta N.B., <https://orcid.org/0000-0001-8915-8274>

Dushenkina T.E., <https://orcid.org/0000-0001-8279-514X>

Gurtsevitch E.V., <https://orcid.org/0000-0003-1840-4364>

Contribution: Smirnova K.V. – organization of the study, analysis of the results obtained, editing of the manuscript; Lubenskaya A.K. – detection of EBV types, determination of EBV DNA concentration in plasma; Senyuta N.B. – system-

atization of the study results, analysis of the serological response to EBV; Dushenkina T.E. – collection and processing of biological material; setting up an immunofluorescence reaction; Gurtsevitch V.E. – the idea and design of the study, writing the manuscript, the design of figures.

Funding. The research was funded by the Grant of Russian Scientific Foundation (project No. 23-25-00435).

Acknowledgement. The authors express their deep gratitude and sincere gratitude to the professors Eugenii G. Matyakin, Mikhail A. Kropotov and Ali M. Mudunov, who in different years headed the department of head and neck tumors at the Research Institute of Clinical Oncology of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, as well as to oncologist of the same department PhD in Medicine Anastasia V. Ignatova for the data of clinical support of patients and provision of clinical material.

Conflict of interest. Authors declare no potential conflicts of interest.

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology (Protocol No. 532 dated 14.04.2022).

Received 17 June 2023

Accepted 08 August 2023

Published 31 August 2023

Введение

Известно, что вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ) пожизненно инфицирует более 95% взрослого населения планеты. Заражение ВЭБ в большинстве случаев протекает бессимптомно, и у инфицированных лиц вирус, как правило, сохраняется в латентном состоянии в В-клетках памяти [1]. В то же время существуют неоспоримые доказательства того, что вирус причастен к возникновению злокачественных новообразований лимфоидного и эпителиального происхождения, на основании чего Международное агентство по изучению рака включило ВЭБ в группу канцерогенов № 1, обладающих прямым канцерогенным действием на человека [2].

Среди опухолей эпителиального происхождения, ассоциированных с ВЭБ, особое место занимает рак носоглотки (РНГ), являющийся одним из наиболее распространенных раков в южных провинциях Китая и странах Юго-Восточной Азии (25–30 случаев на 100 тыс. человек в год). Менее часто РНГ встречается среди арабов Северной Африки, коренных народов Гренландии, Аляски и достаточно редко – в большинстве европейских стран и США [3]. В России частота РНГ составляет 0,1–0,2% в общей структуре онкологической заболеваемости: 0,55 и 0,29 на 100 тыс. населения для мужчин и женщин соответственно [3]. Установленными для РНГ факторами риска, кроме массивного инфицирования в раннем детском возрасте, являются генотип хозяина, мужской пол и семейный анамнез РНГ. К факторам риска относятся и высокое потребление консервированных продуктов (например, соленой рыбы в Китае), а также наличие у инфицированного лица определенных аллелей лейкоцитарного антигена (HLA) класса I [4, 5]. Важно также отметить, что ассоциированным с ВЭБ является преимущественно неороговевающий недифференцированный гистологический вариант опухоли.

Механизм канцерогенеза при ВЭБ-ассоциированном РНГ во многом определяется функциональными особенностями и самого вируса, требующими дальнейшего изучения. Показано, что ВЭБ обладает двойной тропностью, проявляющейся в способности инфицировать как В-лимфоциты, так и эпителиальные клетки. Инфекция обоих типов клеток в миндалинах

глотки является важным этапом, обеспечивающим персистенцию вируса в организме [6, 7]. Латентная фаза инфекции в клетках эпителия способствует размножению и распространению потомства вируса, а латентная инфекция этих же клеток позволяет избежать обнаружения и уничтожения вируса иммунной системой хозяина и может стать событием, предвещающим возникновение опухоли. При этом экспрессия латентных генов ВЭБ возможна только в immortalized эпителиальных клетках с измененной активностью ряда клеточных генов (циклина-D, p16), способствующих преодолению ареста клеточного цикла. Экспрессия латентных генов вируса также происходит при возникновении локального воспаления в присутствии воспалительного цитокина – трансформирующего фактора роста (TGF-1) [8, 9]. Эти данные позволяют предположить, что для злокачественной трансформации эпителия, инфицированного ВЭБ, необходимы не только определенный генотип хозяина, но и приобретаемые эпителиальными клетками геномные/эпигенетические изменения.

Возникшие опухолевые клетки эпителиального происхождения в результате реактивации в них вируса часто подвергаются лизису с высвобождением вирусного потомства [10]. Об этом свидетельствуют высокие концентрации ДНК ВЭБ в плазме крови и повышенные уровни IgG- и IgA-антител к антигенам вируса [11]. Процесс реактивации ВЭБ в опухолевых клетках также вносит свой вклад в прогрессирование РНГ. Это происходит за счет высвобождающихся вирусных белков, вызывающих нестабильность клеточного генома [12], в результате интеграции вируса в областях клеточного генома, расположенных вблизи опухоли-супрессорных и связанных с воспалением генов [13], а также за счет активированной продукции фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) [14] и т.д. Таким образом, в то время как латентные гены вируса обеспечивают выживание опухолевым клеткам РНГ, литическая фаза инфекции способствует прогрессированию опухоли за счет нестабильности генома и ангиогенеза.

Важную роль в ВЭБ-ассоциированном канцерогенезе играет кодируемый вирусом ядерный белок EBNA1. Недавно обнаружено, что в клетках, латент-

но инфицированных ВЭБ, EBNA1 связывает ВЭБ-подобные последовательности на хрупком участке 11-й хромосомы человека и при увеличении количества EBNA1 на этой хромосоме происходит ее разрушение. Последствие этого события стало понятным после полногеномного секвенирования 2439 злокачественных новообразований, относящихся к 38 нозологическим формам. Оказалось, что опухоли, ассоциированные с ВЭБ, демонстрируют более высокие уровни аномалий 11-й хромосомы, а у больных РНГ эти аномалии встречаются в 100% случаев [15].

Открытие двух типов ВЭБ (ВЭБ-1 и ВЭБ-2, или типов А и В) на основании генетических различий в генах, кодирующих ядерные белки EBNA-2, EBNA-3а и EBNA-3с [16–19], стимулировало проведение серии исследований, направленных на выяснение биологических свойств этих типов вируса. В частности, было показано, что ВЭБ-1, в отличие от ВЭБ-2, обладает способностью трансформировать В-лимфоциты *in vitro* [20], а ВЭБ-2 характеризуется уникальным клеточным тропизмом к Т-клеткам. Оказалось также, что ВЭБ-2 легко инфицирует зрелые CD3-Т-клетки человека *in vitro*, оставаясь в этих клетках в латентном состоянии [21]. Более того, закономерное обнаружение ВЭБ-2 в Т-клетках больных лимфомой Беркитта в Кении и Новой Гвинее, а также инфицированность им более 20% здоровых кенийских младенцев свидетельствует о том, что заражение Т-клеток ВЭБ-2 является естественной частью жизненного цикла этого типа вируса, предпосылкой реализации его онкогенного потенциала [22]. Эти наблюдения позволили предположить, что каждый из вирусных типов (ВЭБ-1 и ВЭБ-2) в ситуации *in vivo* использует альтернативные подходы для установления своей латентности – этапа, предваряющего развитие злокачественных новообразований. В пользу такого предположения свидетельствует тот факт, что заражение ВЭБ-2 гуманизированных мышей, предварительно привитых стволовыми CD34-клетками пуповинной крови человека, привело к возникновению у большинства из них В-клеточной лимфомы, напоминающей диффузную крупноклеточную лимфому человека [23]. Описанные выше результаты наблюдений и другие данные послужили основой для исследований, направленных на изучение связи каждого из 2 типов вируса с конкретным ВЭБ-ассоциированным новообразованием и определением более агрессивного злокачественного фенотипа у одного из них [24].

Согласно данным литературы, ВЭБ-1 был ассоциирован с большинством ВЭБ-положительных лимфом Беркитта в Бразилии, доминировал у больных РНГ в Китае, пациентов с назальной и периферической Т-клеточной лимфомой в Тайване, а также преобладал среди ВЭБ-положительных случаев лимфомы Ходжкина в Англии [25–27] и т.д. В то же время ВЭБ-2 чаще обнаруживали у больных с иммуносупрессией различного генеза [28]. Несмотря на имеющиеся сообщения о преимущественной персистенции одного из типов ВЭБ при той или иной патологии, вклад каждого из них в процесс канцерогенеза остается практически неизученным.

В России также проведены исследования, посвященные изучению персистенции ВЭБ-1 и ВЭБ-2 в разных группах населения. В частности показано, что в группе этнических калмыков из Республики Калмыкия обнаружено примерно одинаковое соотношение лиц, инфицированных обоими типами ВЭБ (51 и 49% соответственно), в то время как в группе татар (83%), представителей Республики Татарстан, и в группе славян (81%), представителей Московской области, доминировал 1-й тип вируса. В группе адыгейцев, представителей Республики Адыгея, была обнаружена высокая (81%) инфицированность вирусом 2-го типа [29–31].

Поскольку инфицированность типами ВЭБ, как и заболеваемость РНГ, характеризуются географической и этнической вариабельностью [32], выяснение вклада каждого из типов вируса в развитие РНГ в генетически отличающихся популяциях из разных географических регионов представляется актуальной задачей.

Исходя из сказанного, **цель** настоящей работы заключалась в изучении характера ассоциации ВЭБ-1 и ВЭБ-2 с РНГ у больных, представителей Центрального (ЦФО) и Северо-Кавказского (СКФО) федеральных округов России, расположенных в географически и климатически отличающихся регионах страны с разным этническим составом населения. При этом у больных РНГ было важным выяснить гендерные и возрастные особенности ассоциации с типами вируса, серологический ответ на них больных и концентрацию вирусной ДНК в плазме крови.

Материалы и методы

Объекты исследования

Исследуемый материал

Объектом исследования стали образцы плазмы крови больных РНГ с ассоциированным с ВЭБ неороговевающим недифференцированным гистологическим вариантом опухоли из СКФО и ЦФО страны (21 и 30 случаев соответственно). В качестве контроля исследовали образцы плазмы крови больных с опухолями полости рта, не ассоциированными с ВЭБ (ДОПР^{ВЭБ-}). В их число вошли новообразования слизистой оболочки полости рта, языка, неба, подъязычной миндалины и случаи РНГ с ороговевающим дифференцированным гистологическим вариантом опухоли (не ассоциированные с ВЭБ) из тех же федеральных округов (27 и 23 случая соответственно). Принадлежность к конкретному этносу определяли на основании наличия у больного кровных родственников в третьем поколении, относящихся к тому же этносу, и продолжительности проживания больного в соответствующем регионе не менее 15 лет. Все участники исследования являлись пациентами ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Исследование проводили при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования был одобрен Комитетом по этике при ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Протокол № 532 от 14.04.2022).

Генотипирование EBNA-2 методом «гнездовой» полимеразной цепной реакции

Для получения препаратов тотальной ДНК использовали набор ExtractDNA Blood & Cells («Евроген», Россия), предназначенный для выделения высококачественной суммарной ДНК из цельной крови с использованием микроцентрифужных колонок. В качестве стандартной реакционной смеси при постановке полимеразной цепной реакции (ПЦР) применяли набор qPCRmix-HS («Евроген», Россия), в состав которого помимо смеси дезокси-нуклеозидтрифосфатов, Mg^{2+} и реакционного буфера входит HS Taq ДНК-полимераза, представляющая собой смесь рекомбинантного фермента Taq ДНК-полимеразы и моноклональных антител, что позволяет использовать режим «горячего старта» для повышения чувствительности и специфичности реакции.

Генотипирование гена EBNA-2 на ВЭБ-1 и ВЭБ-2 в образцах плазмы крови больных проводили с помощью «гнездовой» ПЦР, следуя описанному ранее методу [33], с незначительными модификациями. Используемые праймеры продемонстрировали высокую специфичность тестирования и отсутствие перекрестной реактивности с геномом человека и другими вирусами или микроорганизмами [34].

Количественное измерение вирусной ДНК

Число копий ДНК ВЭБ в образцах плазмы крови больных РНГ и ДОПР^{ВЭБ-} определяли с помощью ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ), используя подходы, опубликованные ранее [35].

Серологический тест на антитела к ВЭБ

Титры IgG- и IgA-антител к капсидному антигену ВЭБ (ВКА) определяли в плазме крови больных методом непрямой иммунофлуоресценции (т.н. «золотым» стандартом); его описание и учет получаемых результатов были нами описаны ранее [36]. Титры антител представлены в виде их среднегеометрических значений (СГЗ).

Статистический анализ

Число копий ДНК ВЭБ в исследуемых образцах плазмы крови больных РНГ и ДОПР^{ВЭБ-} оценивали с помощью *U*-критерия Манна–Уитни. Результаты представлены в виде медиан с межквартильными интервалами (25 и 75 процентилями). С помощью точного теста Фишера (Fisher's exact test) рассчитывали значение *p* при сравнении значений медиан копий ДНК ВЭБ в 1 мл плазмы крови для изучаемых групп больных; различия между значениями медиан считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$. Вычисления проводили с помощью статистических пакетов Statistica for Windows 10.0.

Результаты

С целью определения характера ассоциации РНГ в России с типами ВЭБ, образцы плазмы крови больных РНГ и ДОПР^{ВЭБ-} из СКФО и ЦФО тестирова-

ли на наличие генетических последовательностей ВЭБ-1 и ВЭБ-2. В плазме крови больных РНГ и ДОПР^{ВЭБ-} дополнительно определяли титры IgG- и IgA-антител к ВКА ВЭБ и концентрацию вирусной ДНК, представленную в виде медианы копий ДНК ВЭБ/мл плазмы крови. Как следует из полученных данных (рис. 1), инфицированность ВЭБ-1 была выше у больных ДОПР^{ВЭБ-}: 54% (27/51) против 41% (21/51) у больных РНГ. Напротив, у больных РНГ доминировал ВЭБ-2: 60% (30/50) против 46% (23/50) у больных ДОПР^{ВЭБ-}. Однако различия между процентными соотношениями ВЭБ-1 и ВЭБ-2 у больных РНГ и ДОПР^{ВЭБ-} оказались статистически недостоверными ($p = 0,12$). Из рисунка 1 также следует, что СГЗ титров IgG- и IgA-антител к ВКА, как и медиана копий вирусной ДНК/мл плазмы, у больных РНГ были существенно и статистически достоверно выше, чем у больных ДОПР^{ВЭБ-} ($p < 0,0001$, $p < 0,0001$ и $p < 0,008$ соответственно). Полученные данные свидетельствуют об отсутствии у больных РНГ предпочтительной связи с одним из типов вируса, подтверждая в тоже время выраженную ассоциацию РНГ с ВЭБ.

Для анализа биологической активности каждого типа ВЭБ серологический ответ, а также концентрацию вирусной ДНК/мл плазмы, изучали в 2 группах больных РНГ, инфицированных соответственно одним из типов вируса: ВЭБ-1 или ВЭБ-2. Из данных, представленных на рис. 2, видно, что более высокие СГЗ титров IgG- и IgA-антител к ВКА и концентрация вирусной ДНК/мл плазмы (медиана) были обнаружены у больных РНГ, инфицированных 2-м типом вируса (383, 102 и 933 против 312, 80 и 322 у больных, инфицированных 1-м типом вируса). Различия между соответствующими значениями в сравниваемых группах больных РНГ были статистически недостоверными, хотя некоторую тенденцию к большей, по сравнению с ВЭБ-1, активностью демонстрировал ВЭБ-2. Изучение дополнительных свойств у ВЭБ-1 и ВЭБ-2 с использованием достаточно большой выборки, возможно более точно определит биологическую активность каждого из этих типов вируса.

Учитывая отличающиеся физиологические и обменные метаболические процессы у мужчин и женщин, представлялось важным выяснить, не существует ли у представителей двух гендеров больных РНГ предпочтительной ассоциации с одним из типов ВЭБ. Представленные на рис. 3 данные свидетельствуют о том, что мужчины несколько чаще инфицированы 1-м типом вируса (47% против 38% у женщин), в то время как женщины – 2-м типом (62% против 53% у мужчин). Однако различия между процентным содержанием ВЭБ-1 и ВЭБ-2 в группах мужчин и женщин были статистически недостоверными ($p = 0,24$). Несмотря на более высокие СГЗ титров IgG- и IgA-антител к ВКА и медианы копий вирусной ДНК в группе женщин (453, 108 и 1240 против 283, 77 и 1098 у мужчин), различия между сравниваемыми показателями также оказались статистически недостоверными ($p = 0,054$, $0,560$, $0,980$ соответственно).

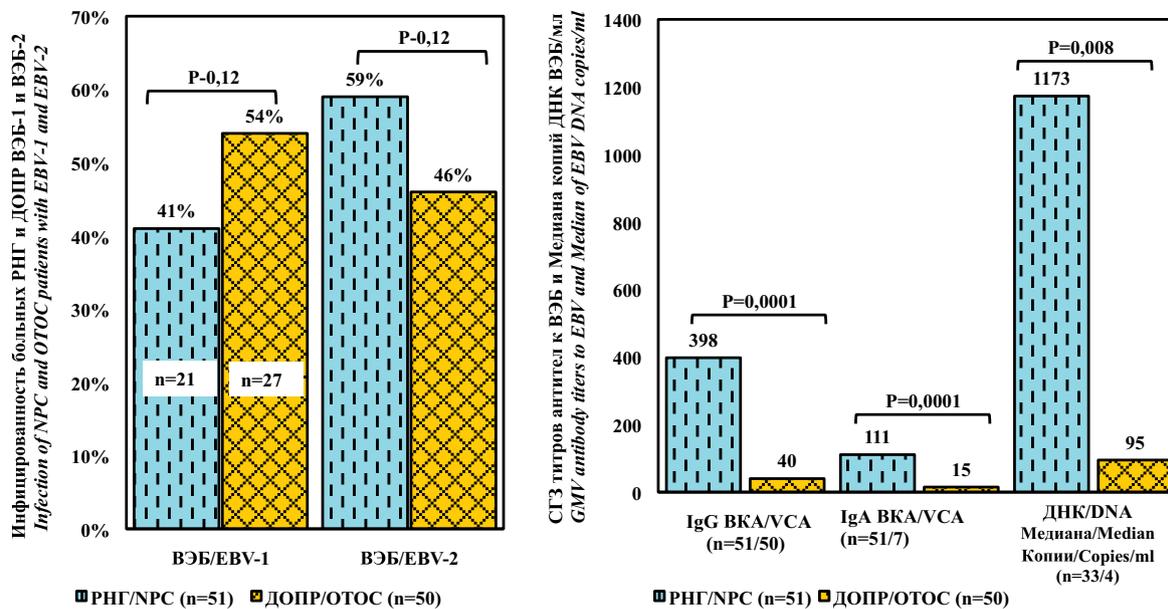


Рис. 1. Типы ВЭБ и другие маркеры вируса у больных РНГ и ДОПР^{ВЭБ-}.
 Fig. 1. EBV types and other viral markers in NPC and OTOC^{EBV-} patients.

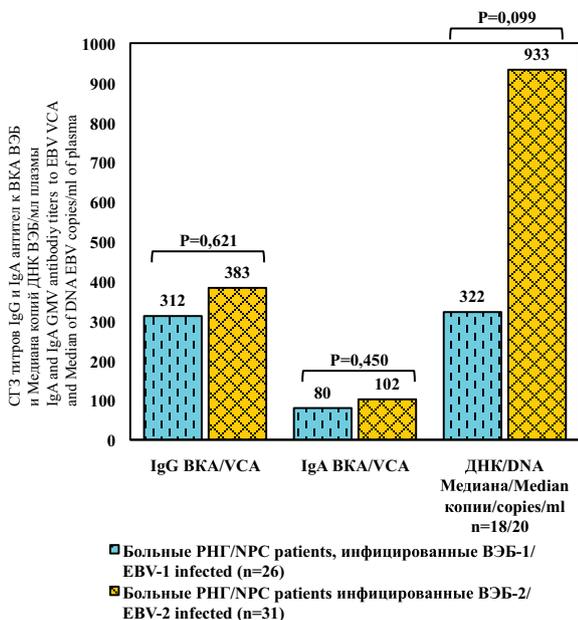


Рис. 2. Маркеры ВЭБ в двух группах больных РНГ, инфицированных ВЭБ-1 и ВЭБ-2.

Fig. 2. EBV markers in two NPC groups of patients infected with EBV-1 and EBV-2.

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что гендерные различия не влияют на инфицированность больных РНГ типами вируса.

Влияние генетических факторов и триггеров окружающей среды на характер инфицированности ВЭБ-1 и ВЭБ-2 было изучено у больных РНГ, этнических представителей ЦФО и СКФО России. Как было указано выше, федеральные округа расположены в разных климатических и географических регионах страны и населены генетически отличающимися

популяциями – преимущественно представителями славянских народов и многочисленными кавказскими народами соответственно. Проведенный анализ показал (рис. 4), что инфицированность больных РНГ из обоих федеральных округов была выше 2-м, чем 1-м типом вируса (55 и 54% против 45 и 46% соответственно), хотя различия между степенью распространенности ВЭБ-1 и ВЭБ-2 у представителей двух этносов были статистически недостоверными ($p = 0,39$). Показатели СГЗ титров IgG-и IgA-антител к ВКА ВЭБ у больных РНГ из СКФО и ЦФО также оказались статистически незначимыми ($p = 0,406$ и $p = 0,110$ соответственно). Однако медиана копий ДНК/мл плазмы у больных РНГ из СКФО статистически достоверно превышала соответствующее значение у больных из ЦФО (1328 против 112 соответственно; $p = 0,002$). Полученные данные свидетельствуют о том, что генетические особенности больных РНГ и факторы окружающей среды, не оказывая у больных РНГ существенного влияния на распределение типов вируса и серологический к ним ответ, воздействуют на уровень репликации вируса и, как следствие, на его концентрацию в организме хозяина.

Известно, что иммунная система человека максимально функционирует с 16–18 до 55–60 лет и в последующие годы ее активность постепенно снижается, что может, в частности, сопровождаться активизацией репликации ВЭБ – фактором риска для возникновения ВЭБ-ассоциированных новообразований, таких как саркома Капоши, болезнь Кастрлемана, ряд лимфом, включая лимфому Ходжкина и РНГ. Для того чтобы выяснить, коррелирует ли серологическая активность типов ВЭБ и их репликация в организме хозяина в зависимости от возраста, были изучены две группы больных РНГ в возрасте до 60 лет (11 пациентов; средний возраст 44,1 года) и старше 60 лет (31 паци-

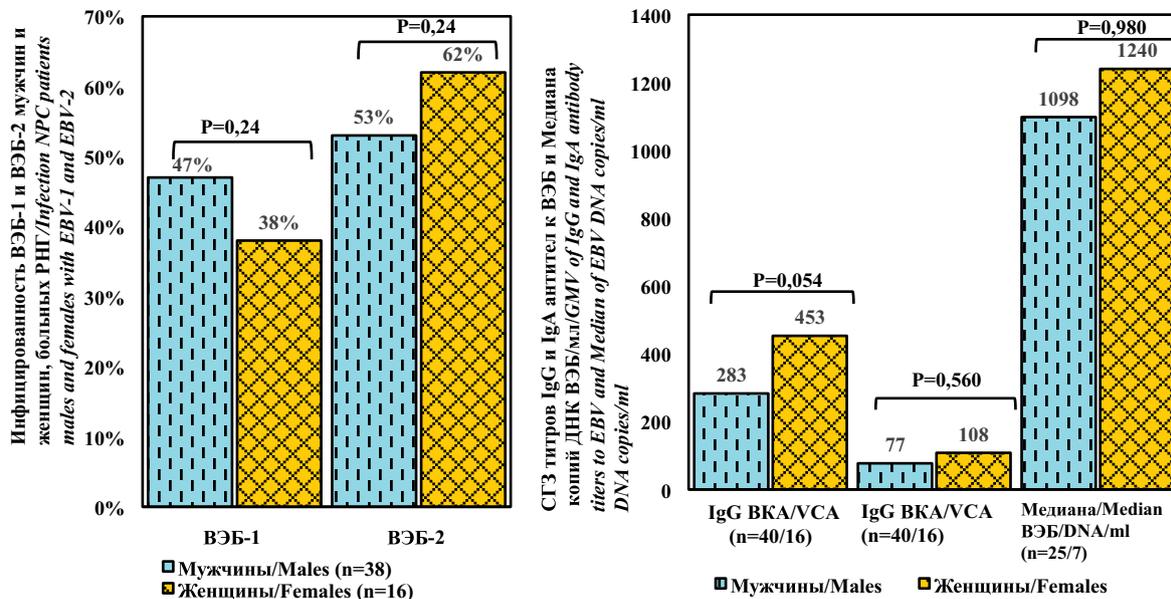


Рис. 3. Типы ВЭБ и другие маркеры вируса у мужчин и женщин, больных РНГ.

Fig. 3. EBV types and other viral markers in NPC male and female patients.

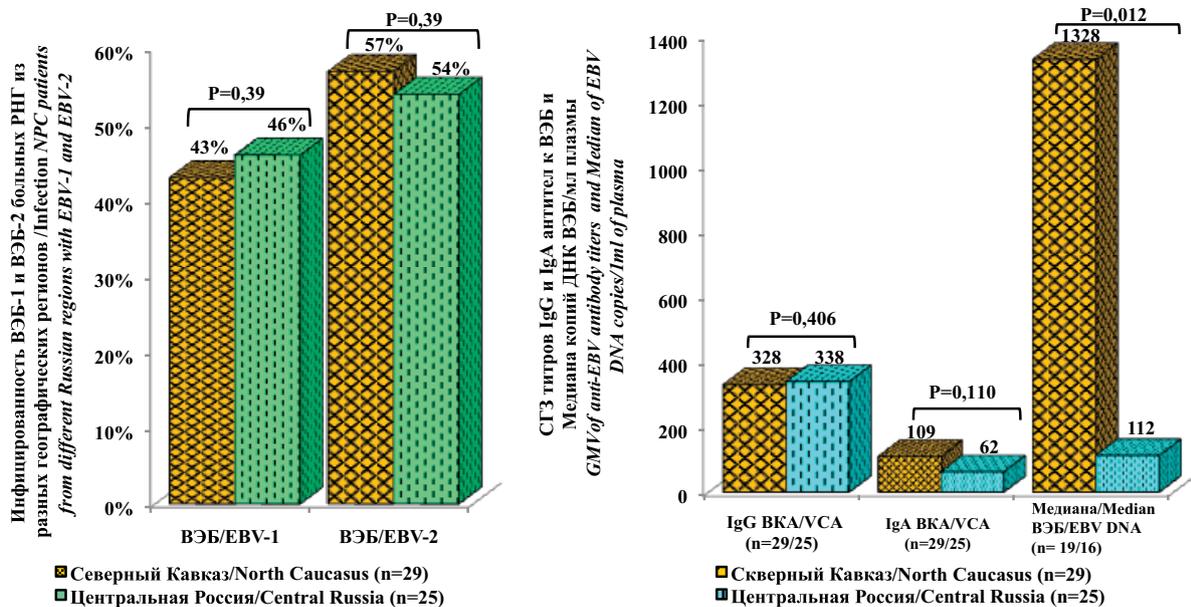


Рис. 4. Типы ВЭБ и другие маркеры вируса у больных РНГ, представителей 2 этносов из разных климатогеографических регионов России.

Fig. 4. EBV types and other markers of the virus in NPC patients that are the representatives of two ethnic groups from different climatic and geographical regions of Russia.

ент; средний возраст 71,5 года). Проведенный анализ показал (рис. 5), что больные старше 60 лет статистически достоверно чаще инфицированы 1-м типом вируса (55% против 48% 2-м типом; $p = 0,01$), в то время как 2-м типом вируса достоверно чаще инфицированы больные до 60 лет (52% против 45% 1-м типом; $p = 0,01$). Выявлено также, что СГЗ титров IgG- и IgA-антител к ВКА, хотя и были более высокими в группе больных до 60 лет (320 и 99 против 265 и 58 соответственно), различия между этими показателями

оказались статистически недостоверными ($p = 0,310$ и $p = 0,242$ соответственно). И несмотря на то, что медиана копий вирусной ДНК/мл плазмы крови у больных до 60 лет оказалась в 3 раза выше, чем у больных старше 60 лет (959 и 319 соответственно), различие между значениями медиан было статистически недостоверным ($p = 0,39$). Последнее, вероятно, объясняется небольшим числом наблюдений в группе больных старше 60 лет (6 случаев) и разбросом копий ДНК/мл плазмы для отдельных случаев в этой группе.

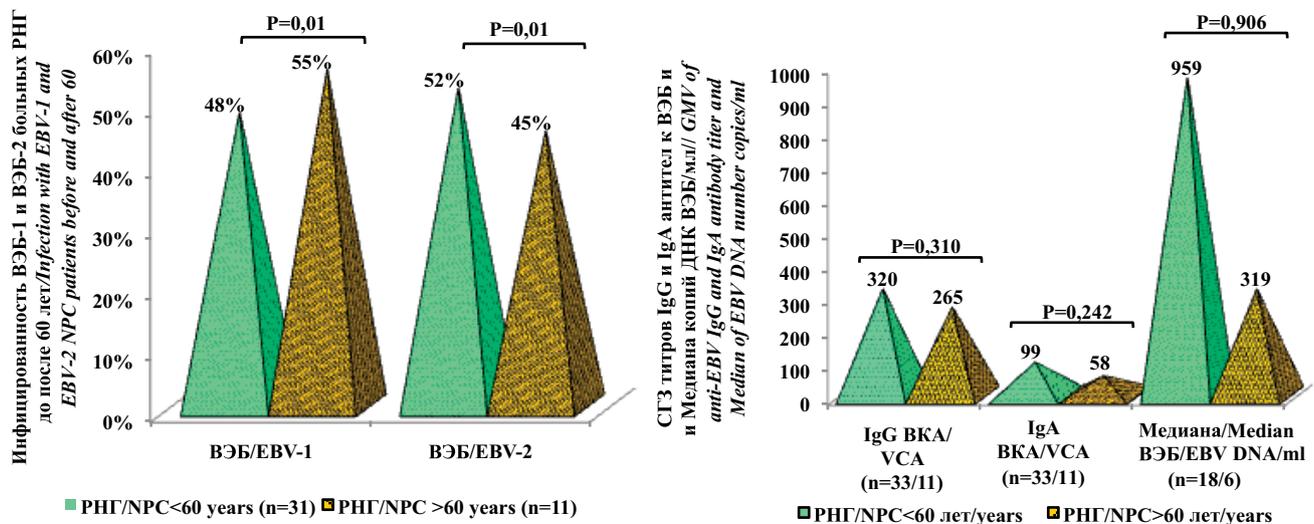


Рис. 5. Типы ВЭБ и другие маркеры вируса у больных РНГ в возрастных группах моложе и старше 60 лет.

Fig. 5. EBV types and other viral markers in NPC patients under and over 60 years.

Обсуждение

Проведенные исследования показали практически не отличающийся характер инфицированности ВЭБ-1 и ВЭБ-2 у больных РНГ и ДОПР^{ВЭБ}, а также у больных РНГ, этнических представителей двух генетически отличающихся популяций из разных географических и климатических регионов России. У больных РНГ не было обнаружено гендерных различий в распределении типов вируса. Кроме того, примерно одинаковая серологическая активность вируса к ВКА ВЭБ была выявлена в группах больных РНГ, инфицированных только ВЭБ-1 или ВЭБ-2. Не было также обнаружено доминирования ни одного из типов вируса у больных РНГ с разными размерами первичной опухоли, величиной измененных опухолевых процессом лимфатических узлов и стадиями болезни (данные не представлены). Различалась лишь инфицированность типами вируса в разных возрастных группах в сторону преобладания ВЭБ-1 у больных РНГ старше 60 лет и ВЭБ-2 у больных до 60 лет. Это наблюдение, по-видимому, нуждается, в дальнейшем изучении.

Полученные данные позволяют в целом сделать вывод об отсутствии доминирующей роли какого-либо типа ВЭБ в развитии РНГ в России. Различия в последовательностях генов *EBNA-2*, *EBNA-3A* и *EBNA-3C*, обеспечившие 1-му и 2-му типам вируса некоторые функциональные особенности, не сопровождаются приобретением ни одним из них РНГ-специфических свойств, как и утратой каждым из них онкогенного потенциала, способного реализоваться при возникновении соответствующих условий. Обнаруженное же некоторыми авторами преимущественного инфицирования 1-м типом вируса большинства больных ВЭБ-положительными лимфомами Беркитта в Бразилии, лимфомами Ходжкина в Англии и РНГ в Китае [25–27], как и закономерное обнаружение ВЭБ-2 в Т-клетках лимфом Беркитта в Кении и Новой Гви-

неи [22], по-видимому, не связано с опухоль-специфическими свойствами местных типов вируса. Вероятно, это результат доминирующей персистенции одного из типов вируса в соответствующих популяциях конкретных географических регионов. Результаты тестирования здоровых представителей в указанных регионах на ВЭБ-1 и ВЭБ-2 могли бы внести ясность в этот вопрос.

Попытки обнаружить существование вариантов ВЭБ, специфически ассоциированных с конкретными опухолями человека, предпринимались многими исследователями, но до сих пор терпели неудачу. Однако полностью исключать существование штаммов ВЭБ, этиологически причастных к возникновению определенных новообразований, нельзя. Примером тому может служить недавно изолированный от китайского больного РНГ штамм ВЭБ М-81, который характеризуется высокой склонностью к эпителиотропизму [37]. Такое свойство вируса способствует увеличению вероятности инфицирования им эпителия носоглотки и возникновению рака в этой анатомической области. В этой связи поиски вариантов ВЭБ, специфических для определенных типов опухолей в эндемичных регионах среди различных этносов, представляются оправданными. Сложность задачи, однако, заключается в том, что идентификация ВЭБ высокого риска, аналогичного вирусам папилломы человека (HPV-16, HPV-18), затруднена из-за гетерогенности его вирусных генов, совместное функционирование которых, вероятно, и приводит к приобретению вирусом онкогенного потенциала.

Заключение

Отличающаяся распространенность типов ВЭБ (ВЭБ-1 и ВЭБ-2) в мире обусловлена многими факторами, в том числе и генетическими особенностями популяций. При этом факторы, влияющие на отбор типов ВЭБ *in vivo*, включают в себя иммунный надзор

со стороны организма и тип главного комплекса гистосовместимости (Major Histocompatibility Complex, МНС). А поскольку преобладающие типы МНС различаются между этническими группами и популяциями из разных географических регионов, эти факторы могут иметь большое значение для определения структурных модификаций ВЭБ и его типов [38]. Ярким примером тому могут служить результаты исследований, проведенных в России, которые показали несовпадающий характер персистенции типов вируса у представителей разных этносов: примерно равное соотношение ВЭБ-1 и ВЭБ-2 у калмыков, доминирование ВЭБ-1 у татар и славян и ВЭБ-2 – у адыгейцев [29–31].

Отсутствие доминирования одного из типов ВЭБ у изучаемых нами больных РНГ позволяет сделать вывод, что в России тип вируса в развитии РНГ не играет принципиально важного значения. По-видимому, каждый из его типов (ВЭБ-1 или ВЭБ-2) при возникновении необходимых условий способен проявить свой онкогенный потенциал. Тем не менее поиски онкогенных опухоль-специфических вариантов ВЭБ в России представляется задачей актуальной, поскольку обнаружение вируса с конкретной органной онкотропностью способствовало бы созданию эффективной вакцины для успешной борьбы с соответствующими новообразованиями.

ЛИТЕРАТУРА

- Higgins C.D., Swerdlow A.J., Macsween K.F., Harrison N., Williams H., McAulay K., et al. A study of risk factors for acquisition of Epstein-Barr virus and its subtypes. *J. Infect. Dis.* 2007; 195(4): 474–82. <https://doi.org/10.1086/510854>
- Chen C.J., You S.L., Hsu W.L., Yang H.I., Lee M.H., Chen H.C., et al. Epidemiology of virus infection and human cancer. *Recent Results Cancer Res.* 2021; 217: 13–45. https://doi.org/10.1007/978-3-030-57362-1_2
- Yu M.C., Yuan J.M. Epidemiology of nasopharyngeal carcinoma. *Semin. Cancer Biol.* 2002; 12(6): 421–9. <https://doi.org/10.1016/s1044579x02000858>
- Lo K.W., To K.F., Huang D.P. Focus on nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Cell.* 2004; 5(5): 423–8. [https://doi.org/10.1016/s1535-6108\(04\)00119-9](https://doi.org/10.1016/s1535-6108(04)00119-9)
- Wei W.I., Kwong D.L. Current management strategy of nasopharyngeal carcinoma. *Clin. Exp. Otorhinolaryngol.* 2010; 3(1): 1–12. <https://doi.org/10.3342/ceo.2010.3.1.1>
- Borza C.M., Hutt-Fletcher L.M. Alternate replication in B cells and epithelial cells switches tropism of Epstein-Barr virus. *Nat. Med.* 2002; 8(6): 594–9. <https://doi.org/10.1038/nm0602-594>
- Hutt-Fletcher L.M. Epstein-Barr virus entry. *J. Virol.* 2007; 81(15): 7825–32. <https://doi.org/10.1128/JVI.00445-07>
- Tsang C.M., Zhang G., Seto E., Takada K., Deng W., Yip Y.L., et al. Epstein-Barr virus infection in immortalized nasopharyngeal epithelial cells: regulation of infection and phenotypic characterization. *Int. J. Cancer.* 2010; 127(7): 1570–83. <https://doi.org/10.1002/ijc.25173>
- Tsang C.M., Yip Y.L., Lo K.W., Deng W., To K.F., Hau P.M., et al. Cyclin D1 overexpression supports stable EBV infection in nasopharyngeal epithelial cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2012; 109(50): E3473–82. <https://doi.org/10.1073/pnas.1202637109>
- Yip Y.L., Lin W., Deng W., Jia L., Lo K.W., Busson P., et al. Establishment of a nasopharyngeal carcinoma cell line capable of undergoing lytic Epstein-Barr virus reactivation. *Lab. Invest.* 2018; 98(8): 1093–104. <https://doi.org/10.1038/s41374-018-0034-7>
- Twu C.W., Wang W.Y., Liang W.M., Jan J.S., Jiang R.S., Chao J., et al. Comparison of the prognostic impact of serum anti-EBV antibody and plasma EBV DNA assays in nasopharyngeal carcinoma. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2007; 67(1): 130–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2006.07.012>
- Chiu S.H., Wu C.C., Fang C.Y., Yu S.L., Hsu H.Y., Chow Y.H., et al. Epstein-Barr virus BALF3 mediates genomic instability and progressive malignancy in nasopharyngeal carcinoma. *Oncotarget.* 2014; 5(18): 8583–601. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2323>
- Xu M., Zhang W.L., Zhu Q., Zhang S., Yao Y.Y., Xiang T., et al. Genome-wide profiling of Epstein-Barr virus integration by targeted sequencing in Epstein-Barr virus associated malignancies. *Theranostics.* 2019; 9(4): 1115–24. <https://doi.org/10.7150/thno.29622>
- Hong G.K., Kumar P., Wang L., Damania B., Gulley M.L., Delecluse H.J., et al. Epstein-Barr virus lytic infection is required for efficient production of the angiogenesis factor vascular endothelial growth factor in lymphoblastoid cell lines. *J. Virol.* 2005; 79(22): 13984–92. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.22.13984-13992.2005>
- Li J.S.Z., Abbasi A., Kim D.H., Lippman S.M., Alexandrov L.B., Cleveland D.W. Chromosomal fragile site breakage by EBV-encoded EBNA1 at clustered repeats. *Nature.* 2023; 616(7957): 504–9. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-05923-x>
- Rowe M., Young L.S., Cadwallader K., Petti L., Kieff E., Rickinson A.B. Distinction between Epstein-Barr virus type A (EBNA 2A) and type B (EBNA 2B) isolates extends to the EBNA 3 family of nuclear proteins. *J. Virol.* 1989; 63(3): 1031–9. <https://doi.org/10.1128/JVI.63.3.1031-1039.1989>
- Sample J., Young L., Martin B., Chatman T., Kieff E., Rickinson A., et al. Epstein-Barr virus types 1 and 2 differ in their EBNA-3A, EBNA-3B, and EBNA-3C genes. *J. Virol.* 1990; 64(9): 4084–92. <https://doi.org/10.1128/JVI.64.9.4084-4092.1990>
- Feederle R., Klinke O., Kutikhin A., Poirey R., Tsai M.H., Delecluse H.J. Epstein-Barr virus: from the detection of sequence polymorphisms to the recognition of viral types. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2015; 90(Pt. 1): 119–48. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22822-8_7
- Palser A.L., Grayson N.E., White R.E., Corton C., Correia S., Ba Abdullah M.M., et al. Genome diversity of Epstein-Barr virus from multiple tumor types and normal infection. *J. Virol.* 2015; 89(10): 5222–37. <https://doi.org/10.1128/JVI.03614-14>
- Rickinson A.B., Young L.S., Rowe M. Influence of the Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA 2 on the growth phenotype of virus-transformed B cells. *J. Virol.* 1987; 61(5): 1310–7. doi: 10.1128/JVI.61.5.1310-1317.1987
- Coleman C.B., Wohlford E.M., Smith N.A., King C.A., Ritchie J.A., Baresel P.C., et al. Epstein-Barr virus type 2 latently infects T cells, inducing an atypical activation characterized by expression of lymphotactic cytokines. *J. Virol.* 2015; 89(4): 2301–12. <https://doi.org/10.1128/JVI.03001-14>
- Young L.S., Yao Q.Y., Rooney C.M., Sculley T.B., Moss D.J., Rupani H., et al. New type B isolates of Epstein-Barr virus from Burkitt's lymphoma and from normal individuals in endemic areas. *J. Gen. Virol.* 1987; 68(Pt. 11): 2853–62. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-68-11-2853>
- Coleman C.B., Lang J., Sweet L.A., Smith N.A., Freed B.M., Pan Z., et al. Epstein-Barr virus type 2 infects T cells and induces B cell lymphomagenesis in humanized mice. *J. Virol.* 2018; 92(21): e00813-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.00813-18>
- Neves M., Marinho-Dias J., Ribeiro J., Sousa H. Epstein-Barr virus strains and variations: Geographic or disease-specific variants? *J. Med. Virol.* 2017; 89(3): 373–87. <https://doi.org/10.1002/jmv.24633>
- Klumb C.E., Hassan R., De Oliveira D.E., De Resende L.M., Carriço M.K., de Almeida Dobbin J., et al. Geographic variation in Epstein-Barr virus-associated Burkitt's lymphoma in children from Brazil. *Int. J. Cancer.* 2004; 108(1): 66–70. <https://doi.org/10.1002/ijc.11443>
- Wu S.J., Lay J.D., Chen C.L., Chen J.Y., Liu M.Y., Su I.J. Genomic analysis of Epstein-Barr virus in nasal and peripheral T-cell lymphoma: a comparison with nasopharyngeal carcinoma in an endemic area. *J. Med. Virol.* 1996; 50(4): 314–21. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9071\(199612\)50:4<314::AID-JMV6>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9071(199612)50:4<314::AID-JMV6>3.0.CO;2-B)
- Gledhill S., Gallagher A., Jones D.B., Krajewski A.S., Alexander F.E., Klee E., et al. Viral involvement in Hodgkin's disease: detection of clonal type A Epstein-Barr virus genomes in tumour samples. *Br. J. Cancer.* 1991; 64(2): 227–32. <https://doi.org/10.1038/bjc.1991.281>

28. Boyle M.J., Sewell W.A., Sculley T.B., Apolloni A., Turner J.J., Swanson C.E., et al. Subtypes of Epstein-Barr virus in human immunodeficiency virus-associated non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 1991; 78(11): 3004–11.
29. Смирнова К.В., Сеньюта Н.Б., Ботезату И.В., Душенькина Т.Е., Лубенская А.К., Фроловская А.А. и др. Вирус Эпштейна–Барр у этнических татар: инфицированность и сиквенсные варианты онкогена LMP1. *Успехи молекулярной онкологии*. 2018; 5(3): 65–74. <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2018-5-3-65-74> <https://elibrary.ru/vloxpu>
30. Гурцевич В.Э., Лубенская А.К., Сеньюта Н.Б., Душенькина Т.Е., Смирнова К.В. Вирус Эпштейна–Барр (Herpesviridae: Gammaherpesvirinae: Lymphocryptovirus: Human gammaherpesvirus 4) у калмыков и славян, проживающих на территории России: типы вируса, варианты онкогена LMP1 и злокачественные опухоли. *Вопросы вирусологии*. 2022; 67(3): 246–57. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-120> <https://elibrary.ru/rhfij>
31. Смирнова К.В., Сеньюта Н.Б., Лубенская А.К., Ботезату И.В., Душенькина Т.Е., Лихтенштейн А.В. и др. Вирус Эпштейна–Барр у адыгейцев и славян в России: типы вируса, варианты LMP1 и злокачественные новообразования. *Успехи молекулярной онкологии*. 2022; 9(3): 49–59. <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2022-9-3-49-59> <https://elibrary.ru/cqausz>
32. Chang C.M., Yu K.J., Mbulaiteye S.M., Hildesheim A., Bhatia K. The extent of genetic diversity of Epstein-Barr virus and its geographic and disease patterns: a need for reappraisal. *Virus Res*. 2009; 143(2): 209–21. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.07.005>
33. Hassan R., White L.R., Stefanoff C.G., de Oliveira D.E., Felisbino F.E., Klumb C.E., et al. Epstein-Barr virus (EBV) detection and typing by PCR: a contribution to diagnostic screening of EBV-positive Burkitt's lymphoma. *Diagn. Pathol*. 2006; 1: 17. <https://doi.org/10.1186/1746-1596-1-17>
34. Salahuddin S., Khan J., Azhar J., Whitehurst B., Qadri I., Shackelford J., et al. Prevalence of Epstein-Barr virus genotypes in Pakistani lymphoma patients. *Asian Pac. J. Cancer Prev*. 2018; 19(11): 3153–9. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2018.19.11.3153>
35. Gurtsevitch V.E., Senyuta N.B., Ignatova A.V., Lomaya M.V., Kondratova V.N., Pavlovskaya A.I., et al. Epstein-Barr virus biomarkers for nasopharyngeal carcinoma in non-endemic regions. *J. Gen. Virol*. 2017; 98(8): 2118–27. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000889>
36. Gurtsevitch V., Ruiz R., Stepina V., Plachov I., Le Riverend E., Glazkova T., et al. Epstein-Barr viral serology in nasopharyngeal carcinoma patients in the USSR and Cuba, and its value for differential diagnosis of the disease. *Int. J. Cancer*. 1986; 37(3): 375–81. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910370308>
37. Tsai M.H., Raykova A., Klinke O., Bernhardt K., Gartner K., Leung C.S., et al. Spontaneous lytic replication and epitheliotropism define an Epstein-Barr virus strain found in carcinomas. *Cell Rep*. 2013; 5(2): 458–70. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.09.012>
38. Burrows J.M., Bromham L., Woolfit M., Piganeau G., Tellam J., Connolly G., et al. Selection pressure-driven evolution of the Epstein-Barr virus-encoded oncogene LMP1 in virus isolates from Southeast Asia. *J. Virol*. 2004; 78(13): 7131–7. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.13.7131-7137.2004>
6. Borza C.M., Hutt-Fletcher L.M. Alternate replication in B cells and epithelial cells switches tropism of Epstein-Barr virus. *Nat. Med*. 2002; 8(6): 594–9. <https://doi.org/10.1038/nm0602-594>
7. Hutt-Fletcher L.M. Epstein-Barr virus entry. *J. Virol*. 2007; 81(15): 7825–32. <https://doi.org/10.1128/JVI.00445-07>
8. Tsang C.M., Zhang G., Seto E., Takada K., Deng W., Yip Y.L., et al. Epstein-Barr virus infection in immortalized nasopharyngeal epithelial cells: regulation of infection and phenotypic characterization. *Int. J. Cancer*. 2010; 127(7): 1570–83. <https://doi.org/10.1002/ijc.25173>
9. Tsang C.M., Yip Y.L., Lo K.W., Deng W., To K.F., Hau P.M., et al. Cyclin D1 overexpression supports stable EBV infection in nasopharyngeal epithelial cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2012; 109(50): E3473–82. <https://doi.org/10.1073/pnas.1202637109>
10. Yip Y.L., Lin W., Deng W., Jia L., Lo K.W., Busson P., et al. Establishment of a nasopharyngeal carcinoma cell line capable of undergoing lytic Epstein-Barr virus reactivation. *Lab. Invest*. 2018; 98(8): 1093–104. <https://doi.org/10.1038/s41374-018-0034-7>
11. Twu C.W., Wang W.Y., Liang W.M., Jan J.S., Jiang R.S., Chao J., et al. Comparison of the prognostic impact of serum anti-EBV antibody and plasma EBV DNA assays in nasopharyngeal carcinoma. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys*. 2007; 67(1): 130–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2006.07.012>
12. Chiu S.H., Wu C.C., Fang C.Y., Yu S.L., Hsu H.Y., Chow Y.H., et al. Epstein-Barr virus BALF3 mediates genomic instability and progressive malignancy in nasopharyngeal carcinoma. *Oncotarget*. 2014; 5(18): 8583–601. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2323>
13. Xu M., Zhang W.L., Zhu Q., Zhang S., Yao Y.Y., Xiang T., et al. Genome-wide profiling of Epstein-Barr virus integration by targeted sequencing in Epstein-Barr virus associated malignancies. *Theranostics*. 2019; 9(4): 1115–24. <https://doi.org/10.7150/thno.29622>
14. Hong G.K., Kumar P., Wang L., Damania B., Gulley M.L., Delecluse H.J., et al. Epstein-Barr virus lytic infection is required for efficient production of the angiogenesis factor vascular endothelial growth factor in lymphoblastoid cell lines. *J. Virol*. 2005; 79(22): 13984–92. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.22.13984-13992.2005>
15. Li J.S.Z., Abbasi A., Kim D.H., Lippman S.M., Alexandrov L.B., Cleveland D.W. Chromosomal fragile site breakage by EBV-encoded EBNA1 at clustered repeats. *Nature*. 2023; 616(7957): 504–9. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-05923-x>
16. Rowe M., Young L.S., Cadwallader K., Petti L., Kieff E., Rickinson A.B. Distinction between Epstein-Barr virus type A (EBNA 2A) and type B (EBNA 2B) isolates extends to the EBNA 3 family of nuclear proteins. *J. Virol*. 1989; 63(3): 1031–9. <https://doi.org/10.1128/JVI.63.3.1031-1039.1989>
17. Sample J., Young L., Martin B., Chatman T., Kieff E., Rickinson A., et al. Epstein-Barr virus types 1 and 2 differ in their EBNA-3A, EBNA-3B, and EBNA-3C genes. *J. Virol*. 1990; 64(9): 4084–92. <https://doi.org/10.1128/JVI.64.9.4084-4092.1990>
18. Feederle R., Klinke O., Kutikhin A., Poirey R., Tsai M.H., Delecluse H.J. Epstein-Barr virus: from the detection of sequence polymorphisms to the recognition of viral types. *Curr. Top. Microbiol. Immunol*. 2015; 90(Pt. 1): 119–48. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22822-8_7
19. Palser A.L., Grayson N.E., White R.E., Corton C., Correia S., Ba Abdullah M.M., et al. Genome diversity of Epstein-Barr virus from multiple tumor types and normal infection. *J. Virol*. 2015; 89(10): 5222–37. <https://doi.org/10.1128/JVI.03614-14>
20. Rickinson A.B., Young L.S., Rowe M. Influence of the Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA 2 on the growth phenotype of virus-transformed B cells. *J. Virol*. 1987; 61(5): 1310–7. doi: 10.1128/JVI.61.5.1310-1317.1987
21. Coleman C.B., Wohlford E.M., Smith N.A., King C.A., Ritchie J.A., Baresel P.C., et al. Epstein-Barr virus type 2 latently infects T cells, inducing an atypical activation characterized by expression of lymphotactic cytokines. *J. Virol*. 2015; 89(4): 2301–12. <https://doi.org/10.1128/JVI.03001-14>
22. Young L.S., Yao Q.Y., Rooney C.M., Sculley T.B., Moss D.J., Rupani H., et al. New type B isolates of Epstein-Barr virus from Burkitt's lymphoma and from normal individuals in endemic areas. *J. Gen. Virol*. 1987; 68(Pt. 11): 2853–62. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-68-11-2853>
23. Coleman C.B., Lang J., Sweet L.A., Smith N.A., Freed B.M., Pan Z., et al. Epstein-Barr virus type 2 infects T cells and induces B cell lymphomagenesis in humanized mice. *J. Virol*. 2018; 92(21): e00813-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.00813-18>

REFERENCES

1. Higgins C.D., Swerdlow A.J., Macsween K.F., Harrison N., Williams H., McAulay K., et al. A study of risk factors for acquisition of Epstein-Barr virus and its subtypes. *J. Infect. Dis*. 2007; 195(4): 474–82. <https://doi.org/10.1086/510854>
2. Chen C.J., You S.L., Hsu W.L., Yang H.I., Lee M.H., Chen H.C., et al. Epidemiology of virus infection and human cancer. *Recent Results Cancer Res*. 2021; 217: 13–45. https://doi.org/10.1007/978-3-030-57362-1_2
3. Yu M.C., Yuan J.M. Epidemiology of nasopharyngeal carcinoma. *Semin. Cancer Biol*. 2002; 12(6): 421–9. <https://doi.org/10.1016/s1044579x02000858>
4. Lo K.W., To K.F., Huang D.P. Focus on nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Cell*. 2004; 5(5): 423–8. [https://doi.org/10.1016/s1535-6108\(04\)00119-9](https://doi.org/10.1016/s1535-6108(04)00119-9)
5. Wei W.I., Kwong D.L. Current management strategy of nasopharyngeal carcinoma. *Clin. Exp. Otorhinolaryngol*. 2010; 3(1): 1–12. <https://doi.org/10.3342/ceo.2010.3.1.1>

24. Neves M., Marinho-Dias J., Ribeiro J., Sousa H. Epstein-Barr virus strains and variations: Geographic or disease-specific variants? *J. Med. Virol.* 2017; 89(3): 373–87. <https://doi.org/10.1002/jmv.24633>
25. Klumb C.E., Hassan R., De Oliveira D.E., De Resende L.M., Carriço M.K., de Almeida Dobbin J., et al. Geographic variation in Epstein-Barr virus-associated Burkitt's lymphoma in children from Brazil. *Int. J. Cancer.* 2004; 108(1): 66–70. <https://doi.org/10.1002/ijc.11443>
26. Wu S.J., Lay J.D., Chen C.L., Chen J.Y., Liu M.Y., Su I.J. Genomic analysis of Epstein-Barr virus in nasal and peripheral T-cell lymphoma: a comparison with nasopharyngeal carcinoma in an endemic area. *J. Med. Virol.* 1996; 50(4): 314–21. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9071\(199612\)50:4<314::AID-JMV6>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9071(199612)50:4<314::AID-JMV6>3.0.CO;2-B)
27. Gledhill S., Gallagher A., Jones D.B., Krajewski A.S., Alexander F.E., Klee E., et al. Viral involvement in Hodgkin's disease: detection of clonal type A Epstein-Barr virus genomes in tumour samples. *Br. J. Cancer.* 1991; 64(2): 227–32. <https://doi.org/10.1038/bjc.1991.281>
28. Boyle M.J., Sewell W.A., Sculley T.B., Apolloni A., Turner J.J., Swanson C.E., et al. Subtypes of Epstein-Barr virus in human immunodeficiency virus-associated non-Hodgkin lymphoma. *Blood.* 1991; 78(11): 3004–11.
29. Smirnova K.V., Senyuta N.B., Botezatu I.V., Dushen'kina T.E., Lubenskaya A.K., Frolovskaya A.A., et al. Epstein-Barr virus in the ethnic Tatars population: the infection and sequence variants of LMP1 oncogene. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii.* 2018; 5(3): 65–74. <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2018-5-3-65-74> <https://elibrary.ru/vloxpu> (in Russian)
30. Gurtsevich V.E., Lubenskaya A.K., Senyuta N.B., Dushen'kina T.E., Smirnova K.V. Epstein-Barr virus (Herpesviridae: Gammaherpesvirinae: Lymphocryptovirus: Human gammaherpesvirus 4) in Kalmyks and Slavs living in Russia: virus types, LMP1 oncogene variants, and malignancies. *Voprosy virusologii.* 2022; 67(3): 246–57. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-120> <https://elibrary.ru/rhfijj> (in Russian)
31. Smirnova K.V., Senyuta N.B., Lubenskaya A.K., Botezatu I.V., Dushen'kina T.E., Likhtenshteyn A.V., et al. Epstein-Barr virus in Adygeans and Slavs in Russia: virus types, LMP1 variants, and malignant tumors. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii.* 2022; 9(3): 49–59. <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2022-9-3-49-59> <https://elibrary.ru/cqausz> (in Russian)
32. Chang C.M., Yu K.J., Mbulaiteye S.M., Hildesheim A., Bhatia K. The extent of genetic diversity of Epstein-Barr virus and its geographic and disease patterns: a need for reappraisal. *Virus Res.* 2009; 143(2): 209–21. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.07.005>
33. Hassan R., White L.R., Stefanoff C.G., de Oliveira D.E., Felisbino F.E., Klumb C.E., et al. Epstein-Barr virus (EBV) detection and typing by PCR: a contribution to diagnostic screening of EBV-positive Burkitt's lymphoma. *Diagn. Pathol.* 2006; 1: 17. <https://doi.org/10.1186/1746-1596-1-17>
34. Salahuddin S., Khan J., Azhar J., Whitehurst B., Qadri I., Shackelford J., et al. Prevalence of Epstein-Barr virus genotypes in Pakistani lymphoma patients. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2018; 19(11): 3153–9. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2018.19.11.3153>
35. Gurtsevitch V.E., Senyuta N.B., Ignatova A.V., Lomaya M.V., Kondratova V.N., Pavlovskaya A.I., et al. Epstein-Barr virus biomarkers for nasopharyngeal carcinoma in non-endemic regions. *J. Gen. Virol.* 2017; 98(8): 2118–27. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000889>
36. Gurtsevitch V., Ruiz R., Stepina V., Plachov I., Le Riverend E., Glazkova T., et al. Epstein-Barr viral serology in nasopharyngeal carcinoma patients in the USSR and Cuba, and its value for differential diagnosis of the disease. *Int. J. Cancer.* 1986; 37(3): 375–81. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910370308>
37. Tsai M.H., Raykova A., Klinke O., Bernhardt K., Gartner K., Leung C.S., et al. Spontaneous lytic replication and epitheliotropism define an Epstein-Barr virus strain found in carcinomas. *Cell Rep.* 2013; 5(2): 458–70. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.09.012>
38. Burrows J.M., Bromham L., Woolfit M., Piganeau G., Tellam J., Connolly G., et al. Selection pressure-driven evolution of the Epstein-Barr virus-encoded oncogene LMP1 in virus isolates from Southeast Asia. *J. Virol.* 2004; 78(13): 7131–7. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.13.7131-7137.2004>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-182>

© ШОТИН А.Р., ЧЕРНЫШЕВ Р.С., МОРОЗОВА Е.О., ИГОЛКИН А.С., ГРУЗДЕВ К.Н., КОЛБИН И.С., ЛАВРЕНТЬЕВ И.А., МАЗЛУМ А., 2023



Молекулярно-биологические свойства изолята вируса африканской чумы свиней (*Asfarviridae: Asfivirus*) ASF/Tatarstan 20/WB-12276

Шотин А.Р., Чернышев Р.С., Морозова Е.О., Иголкин А.С., Груздев К.Н., Колбин И.С., Лаврентьев И.А., Мазлум А.

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», 600901, г. Владимир, Россия

Введение. Успех искоренения африканской чумы свиней (АЧС) в неблагополучной стране в целом или конкретном регионе в частности зависит от многих факторов, включая наличие актуальных данных о циркулирующих изолятах возбудителя.

Цель работы – охарактеризовать молекулярно-биологические свойства изолята вируса АЧС ASF/Tatarstan 20/WB-12276 и провести его сравнительный анализ с изолятами из Европы и Азии.

Материалы и методы. При проведении биологической пробы использовали 8 голов свиней крупной белой породы массой 15–20 кг/гол. Исследования на наличие специфических антител к вирусу АЧС в образцах сыворотки крови проводили иммуноферментным и иммунопероксидазным методами, генома возбудителя – методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. Выделение изолята вируса АЧС ASF/Tatarstan 20/WB-12276 и определение титра вируса осуществляли в культуре клеток селезенки свиней. Секвенирование маркерных областей генома изолята выполняли по методу Сэнгера.

Результаты. В ходе работы вирус был охарактеризован как высоковирулентный, способный вызывать АЧС от острой до подострой формы. Выявленные при проведении филогенетического анализа (по маркерам IGR/I73R-I329L и I267L) замены в геноме изолята ASF/Tatarstan 20/WB-12276 позволили объединить изучаемый вариант с изолятами, распространенными на большей части Европы и Азии.

Заключение. Впервые изучены молекулярно-биологические свойства изолята вируса АЧС ASF/Tatarstan 20/WB-12276, выделенного из селезенки от отстрелянного дикого кабана на территории Республики Татарстан.

Ключевые слова: африканская чума свиней; Республика Татарстан; биологическая проба; биологические свойства; молекулярно-генетический анализ; филогенетический анализ; дендрограмма

Для цитирования: Шотин А.Р., Чернышев Р.С., Морозова Е.О., Иголкин А.С., Груздев К.Н., Колбин И.С., Лаврентьев И.А., Мазлум А. Молекулярно-биологические свойства изолята вируса африканской чумы свиней (*Asfarviridae: Asfivirus*) ASF/Tatarstan 20/WB-12276. *Вопросы вирусологии.* 2023; 68(4): 302–314. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-182> EDN: <https://elibrary.ru/naxnli>

Для корреспонденции: Шотин Андрей Романович, н.с. референтной лаборатории по африканской чуме свиней ФГБУ «ВНИИЗЖ», 600901, г. Владимир, Россия. E-mail: shotin@arriah.ru

Участие авторов: Шотин А.Р., Иголкин А.С. – концепция и дизайн исследования; Шотин А.Р., Мазлум А., Морозова Е.О., Чернышев Р.С., Колбин И.С. – лабораторное исследование; Шотин А.Р., Мазлум А., Иголкин А.С., Чернышев Р.С., Груздев К.Н. – сбор и обработка материала; Шотин А.Р., Чернышев Р.С., Мазлум А., Иголкин А.С., Морозова Е.О. – написание текста; Иголкин А.С., Мазлум А., Лаврентьев И.А., Груздев К.Н. – редактирование.

Финансирование: Исследование выполнено за счет средств гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации на реализацию отдельных мероприятий Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на 2019–2027 гг. (Соглашение № 075-15-2021-1054).

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus Author Guidelines for Animal Use (IAVES, July 23, 2010). Протокол исследования одобрен Комиссией по биоэтике ФГБУ «ВНИИЗЖ» (протокол № Б-3/2021 от 24.05.2021).

Поступила 27.06.2023

Принята в печать 14.08.2023

Опубликована 31.08.2023

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-182>

Molecular and biological properties of the African swine fever virus (Asfarviridae: Asfivirus) isolate ASF/Tatarstan 20/WB-12276

Andrey R. Shotin, Roman S. Chernyshev, Elizaveta O. Morozova, Alexey S. Igolkin, Konstantin N. Gruzdev, Ivan S. Kolbin, Ivan A. Lavrentiev, Ali Mazloum

Federal Center for Animal Health (ARRIAH), 600901, Vladimir, Russia

Introduction. Up-to-date data and full characterization of circulating ASFV isolates play a crucial role in virus eradication and control in endemic regions and countries.

The aim of the study was to evaluate and characterize the molecular and biological properties of the ASFV isolate ASF/Tatarstan 20/WB-12276, conduct phylogenetic analysis, and compare the results with isolates circulating in Europe and Asia.

Materials and methods. For bioassay, eight heads of the Large White pigs weighing 15–20 kg/head were used. Detection of specific anti-ASFV antibodies by ELISA and immunoperoxidase method. Detection of ASFV genome was performed by qPCR. Isolation of ASF/Tatarstan 20/WB-12276 and determination of titer were performed in pig spleen cell culture. Sequencing was carried out by the Sanger method.

Results. The virus was characterized as highly virulent and capable of causing acute to subacute forms of ASF. Phylogenetic analysis revealed substitutions in the genome of the ASF/Tatarstan 20/WB-12276 isolate (IGR/I73R-I329L and I267L markers) that supported the clustering of the studied variant with isolates prevalent in most of Europe and Asia.

Conclusion. For the first time, the molecular and biological properties of the ASF/Tatarstan 20/WB-12276 virus isolate taken from a wild boar shot on the territory of the Republic of Tatarstan were studied and analyzed.

Keywords: African swine fever; Republic of Tatarstan; biological sample; biological properties; molecular genetic analysis; phylogenetic analysis; dendrogram

For citation: Shotin A.R., Chernyshev R.S., Morozova E.O., Igolkin A.S., Gruzdev K.N., Kolbin I.S., Lavrentiev I.A., Mazloum A. Molecular and biological properties of the African swine fever virus (Asfarviridae: Asfivirus) isolate ASF/Tatarstan 20/WB-12276. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2023; 68(4): 302–314 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-182> EDN: <https://elibrary.ru/naxnli>

For correspondence: Andrey Romanovich Shotin, Researcher of the Reference Laboratory for African Swine Fever of the Federal State Budgetary Institution «ARRIAH», 600901, Vladimir, Russia. E-mail: shotin@arriah.ru

Information about the authors:

Shotin A.R., <https://orcid.org/0000-0001-9884-1841>

Chernyshev R.S., <https://orcid.org/0000-0003-3604-7161>

Morozova E.O., <https://orcid.org/0000-0002-0955-9586>

Igolkin A.S., <https://orcid.org/0000-0002-5438-8026>

Gruzdev K.N., <https://orcid.org/0000-0003-3159-1969>

Kolbin I.S., <https://orcid.org/0000-0003-4692-1297>

Lavrentiev I.A., <https://orcid.org/0009-0003-0552-3812>

Mazloum A., <https://orcid.org/0000-0002-5982-8393>

Contribution: Shotin A.R., Igolkin A.S. – research concept and design; Shotin A.R., Mazloum A., Morozova E.O., Chernyshev R.S., Kolbin I.S. – performing of the laboratory research; Shotin A.R., Mazloum A., Igolkin A.S., Chernyshev R.S., Gruzdev K.N. – collection and processing of the material; Shotin A.R., Chernyshev R.S., Mazloum A., Igolkin A.S., Morozova E.O. – writing of the text; Igolkin A.S., Mazloum A., Lavrentiev I.A., Gruzdev K.N. – editing of the article.

Funding: The study was carried out at the expense of the grant from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation for the implementation of certain activities of the Federal Scientific and Technical Program for the Development of Genetic Technologies for 2019–2027 (Agreement No. 075-15-2021-1054).

Conflict of interest: The authors declare that there is no conflict of interest.

Ethics approval. The authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with the Consensus Author Guidelines for Animal Use (IAVES, July 23, 2010). The study protocol was approved by the Bioethics Commission of the Federal State Budgetary Institution «ARRIAH» (protocol b/n of 30.04.2020).

Received 27 June 2023

Accepted 14 August 2023

Published 31 August 2023

Введение

Африканская чума свиней (АЧС) – болезнь вирусной этиологии, поражающая домашних и диких свиней всех возрастов, характеризующаяся геморрагической лихорадкой и высокой летальностью (до 100%) [1–3].

За период эпизоотии АЧС с 2007–2020 гг. ответственными учеными были изучены биологические свойства большого числа изолятов вируса, полученных из разных регионов Российской Федерации (РФ) от домашних и диких свиней. Посредством проведения серий лабораторных экспериментов были определены различия в некоторых молекулярно-биологических свойствах изученных изолятов этого возбудителя, часть из которых охарактеризовали как высоковирулентные, а другие – как обладающие сниженной вирулентностью и вызывающие в том числе бессимптомную форму течения болезни [3–11].

В ходе современной эпизоотии болезнь распространилась на территории 34 стран Европы и Азии, принимая панзоотический характер и нанося серьезный экономический ущерб свиноводческому и смежным секторам [1, 2, 12, 13]. В России на момент 2020 г. прогноз развития эпизоотической ситуации по АЧС характеризовался как неблагоприятный, с тенденцией вовлечения как благополучных (за последние 3 года и более) территорий, так и повторной регистрации новых вспышек болезни на ранее оздоровленных территориях [14, 15].

Так, спустя 4 года после последнего зарегистрированного случая АЧС на территории Республики Татарстан (28.09.2016, у домашних свиней, находящихся в ЛПХ с. Сосновка Нурлатского района) и проведения всех ликвидационных и профилактических мероприятий, новый очаг инфекции был зарегистрирован 12.12.2020 (павшие дикие кабаны, ФГБУ «Национальный парк «Нижняя Кама» Елабужского района). Затем в короткий срок (12.12.2020–09.02.2021) АЧС была нотифицирована на территории двух новых районов: Новошешминском и Заинском [12]. При этом только на территории последнего вирус АЧС был выделен из биологического материала от отстрелянных диких кабанов (4 головы), что может являться следствием циркуляции изолятов с пониженной вирулентностью в пределах одной географической области и требует их всестороннего изучения.

Результаты изучения молекулярно-биологических свойств современных изолятов вируса АЧС могут быть использованы при построении эффективных программ надзора и контроля за болезнью, а также для поиска перспективных генетических маркеров изменчивости для создания профилактических препаратов (вакцин), применимых в рамках стратегии по дифференциации инфицированных животных от вакцинированных (DIVA) и молекулярно-эпизоотологической кластеризации изолятов. Отсутствие единого геномного маркера, позволяющего эффективно разделять существующие изоляты вируса, требует использования при анализе нескольких участков. Так, возможно применение как основных (С-концевой участок гена *B646L*, CVR гена *B602L*, межгенная область IGR I *I73R/I329L*), так

и дополнительных (*O174L*, *K145R*, *EP402R*, *I267L*, *MGF 505-5R*) генетических маркеров [16].

На основании анализа С-концевой области гена *B646L*, кодирующего капсидный мажорный белок вируса АЧС *vp72*, проводится типирование вируса на 24 генотипа [16, 17].

CVR гена *B602L* является одним из ведущих маркеров для субгенотипирования и дифференциации изолятов вируса АЧС [17–23]. Так, в работе А. Vilem и соавт. на основании последовательностей CVR были обнаружены две генетические группы (GII-CVR2 и GII-CVR1/SNP1) изолятов вируса АЧС II генотипа, в которые вошли вирусы, циркулирующие в Эстонии в 2015–2016 гг. [17]. В работе А. Mazloun и соавт. (2022) на основании нуклеотидных последовательностей CVR изоляты вируса АЧС, выделенные в 2007–2017 гг. на территории Российской Федерации, Европы и Азии, были разделены уже на 6 генетических групп [24].

IGR *I73R/I329L* является вторым по значимости маркером в дифференциации изолятов одного генотипа. В зависимости от числа (от 2 до 5) тандемных повторов (TRS) из 10 нуклеотидов (GGAATATATA), изоляты вируса АЧС II генотипа разделяют на 4 группы [16, 25, 26].

Изоляты, циркулирующие на территориях Польши и Германии, имеют TRS из 14 п.н. (TCACTACTGAAAAA) в положении 50–63 гена *O174L*, кодирующего фактор вирулентности ДНК-полимеразу X, способную к точечной репарации генома [27].

Ген-маркер *K145R* является основополагающим в кластеризации изолятов вируса АЧС в странах восточной Европы. Ко второй группе относятся изоляты, выделенные на территории Калининградской области, Польши и Германии, для которых уникальна замена «С» на «А» в положении 173 данного гена [25]. В исследовании А. Mazloun и соавт. (2023) обнаружена замена «С» на «Т» в положении 30 гена *K145R*, характерная исключительно для изолятов, циркулирующих на территории Калининградской области РФ, что свидетельствует о формировании 3-го генетического кластера [28].

Несмотря на высокую консервативность гена *I267L*, он также может использоваться для молекулярной кластеризации изолятов вируса АЧС [29, 30]. В зависимости от наличия замены «Т» на «А» в положении 76 данного гена, изоляты возможно разделить на две независимые группы. Впервые такая замена обнаружена у изолята вируса АЧС, выделенного в Польше в 2016 г. С тех пор преобладающее число изолятов, циркулирующих на территории Европы, России и Китая, относятся ко второму кластеру по маркеру *I267L*. Закономерности в персистенции изолятов вируса АЧС по данному маркеру в пределах ограниченного географического региона не наблюдается, поскольку на территории одного государства могут циркулировать обе группы изолятов [29].

Следующим геномным маркером, используемым в молекулярной и географической дифференциации изолятов вируса АЧС, является *MGF 505-5R*, позволяющий выделить 2 кластера [25]. «А» в положе-

нии 84 гена *MGF 505-5R* имеют изоляты, циркулирующие на территории восточной Европы (Польша, Германия, Украины) и Калининградской области [28]. Другие изоляты, выделенные на территории европейских (Бельгия, Венгрия, Чехия, Литва и др.), азиатских (Китай, Вьетнам, Индия) стран и Российской Федерации имеют «G» в вышеназванном положении гена и относятся к первой, более многочисленной группе.

Таким образом можно заключить, что успех искоренения АЧС зависит от всестороннего изучения возбудителя, в частности его изолятов, особенностей репродукции и характера течения болезни.

Целью работы являлось изучение биологических свойств на восприимчивых животных (домашних свиньях), проведение молекулярно-генетического и филогенетического анализов изолята ASF/Tatarstan 20/WB-12276 вируса АЧС, выделенного из селезенки от отстрелянного на территории Республики Татарстан дикого кабана.

Материалы и методы

Вирус. Изолят вируса АЧС ASF/Tatarstan 20/WB-12276 был выделен специалистами ФГБУ «ВНИИЗЖ» в рамках проведения референтных исследований на АЧС из селезенки от отстрелянного 17.12.2020 дикого кабана на территории Республики Татарстан (Зайнский район, Квартал № 110, Зайнское лесничество, Кармалинское охотхозяйство).

Вирусовыделение. Выделение изолята вируса АЧС ASF/Tatarstan 20/WB-12276 методом трех последовательных пассажей на первичной культуре клеток селезенки свиньи (СС) с учетом репродукции возбудителя в реакции гемадсорбции (РГАд) и определение титра виремии (IgГАдE₅₀/мл) проводили в соответствии с методическими рекомендациями по выделению и титрованию вируса АЧС в культуре клеток СС, разработанными в ФГБУ «ВНИИЗЖ»¹.

Биопроба. Биологические свойства изолята ASF/Tatarstan 20/WB-12276 определяли путем постановки биологической пробы на домашних свиньях. Животные были завезены из благополучного по основным инфекционным болезням свиней хозяйства Московской области; содержались в условиях виварного комплекса ФГБУ «ВНИИЗЖ» в боксе соответствующего уровня биологической защиты (BSL-3). Постановку биопробы, оценку клинических признаков и патологоанатомических изменений проводили соглас-

но методическим указаниям (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)^{2,3} в соответствии с межгосударственными стандартами по содержанию и уходу за лабораторными животными, принятыми Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации, а также согласно требованиям Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22.09.2010 по охране животных, используемых в научных целях. В экспериментах были соблюдены институциональные и национальные стандарты по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus Author Guidelines for Animal Use (IAVES, July 23, 2010). Протокол исследования одобрен Комиссией по биоэтике ФГБУ «ВНИИЗЖ» (протокол №Б-3/2021 от 24.05.2021).

В опыте использовали 8 голов свиней крупной белой породы массой 15–20 кг/гол., из них: 6 голов (№№ 1–6) заражали культуральной суспензией, содержащей изолят ASF/Tatarstan 20/WB-12276, внутримышечно в дозе 10 ГАдE₅₀/гол. (1-я группа), а 2 головы (№№ 7, 8) содержали совместно с инфицированными животными в качестве контактных (индикаторных) для изучения контагиозности изучаемого изолята (2-я группа).

Всех животных перед началом эксперимента карантинировали в течение 7 суток и исследовали на наличие специфических антител к вирусу АЧС и его генома с целью подтверждения их негативного инфекционного статуса. За животными ежедневно проводили визуальный контроль проявления клинических признаков и термометрию каждой особи. Отбор проб крови осуществляли в вакуумные пробирки с активатором свертывания на 5, 8, 12, 16 и 19-е дни после заражения (д.п.з.). Полученные образцы разделяли на пробы сгустка и сыворотки для параллельного исследования лабораторными методами вирусовыделения, полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени (ПЦР-РВ), твердофазного иммуноферментного анализа (ТФ-ИФА) и иммунопероксидазным методом (ИПМ). Каждый образец исследовали однократно в трех повторностях ($n = 3$), при анализе результатов использовали полученные средние значения (M) и стандартное отклонение ($\pm SD$).

Серологические исследования. Обнаружение специфических антител к вирусу АЧС проводили с использованием тест-систем для постановки ТФ-ИФА: INgezim PPA Compac (Ingenasa, Испания)⁴ и ID Screen, African Swine Fever Indirect, Screening Test (IDvet, Франция)⁵ в соответствии с инструкциями произво-

¹Методические рекомендации по выделению и титрованию вируса африканской чумы свиней в культуре клеток селезенки свиней / Али Мазлум, Д.В. Шарыпова, В.Л. Гаврилова, О.С. Пузанкова, И.Ю. Жуков [и др.]; ФГБУ «ВНИИЗЖ». – Владимир, 2019. – 24 с.

²Методические рекомендации по постановке биопробы с заражением свиней вирусом африканской чумы свиней / И.В. Шевченко, И.Ю. Жуков А.С., Першин [и др.]; ФГБУ «ВНИИЗЖ». – Владимир, 2017. – 11 с.

³Методические указания по оценке клинических признаков и патологоанатомических изменений при экспериментальном заражении вирусом африканской чумы свиней / ФГБУ «ВНИИЗЖ». – Владимир, 2017. – 21 с.

⁴Blocking Immunoenzymatic assay for detection of antibodies to African Swine Fever virus (ASFV) in porcine serum. Ingezim PPA COMPAC. Prod Ref: 11.PPA.K3. Last revision: 18-12-18. Ingenasa, Madrid, Spain

⁵Тест-система для выявления антител к вирусу африканской чумы свиней (АЧС) в сыворотке и плазме крови, мясном соке и образцах крови, нанесенных на бумажные фильтры, непрямой иммуноферментным методом ELISA. ID Screen, African Swine Fever Indirect, Screening Test. ASFS версия0115 RU. IDvet, Франция. 4 стр.

дителей, а также с помощью ИПМ, реализованного в соответствии с методическими рекомендациями, разработанными в ФГБУ «ВНИИЗЖ»⁶.

ПЦР. Обнаружение генома вируса АЧС проводили методом ПЦР-РВ с использованием тест-системы «АЧС» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) согласно инструкции производителя⁷.

Секвенирование. Амплификацию участков генома вируса (маркеров EP402R, I267L, O174L, K145R, межгенной области IGR I I73R/I329L, центральной вариабельной области (CVR) гена B602L и MGF 505-5R) проводили с помощью ПЦР с использованием специфических праймеров для каждого фрагмента, как это описано в работе A. Mazloum и соавт. (2023) [16]. ПЦР-фрагменты оценивали с электрофоретической детекцией в 1%-ном агаровом геле. Экстракцию фрагментов из геля проводили с использованием набора Wizard SV Gel and RCR Clean-up System (Promega, США). После чего выполняли секвенирование по методу Сэнгера с парами праймеров, которые использовали при проведении ПЦР.

Анализ нуклеотидных последовательностей и филогенетический анализ. Нуклеотидные последовательности выравняли и сравнивали с соответствующими последовательностями референс-штамма Georgia 2007/1 (номер доступа в Genbank FR682468.2) и других изолятов, импортированных из базы данных Genbank (**приложение**), с помощью программы Bioedit v7.2.5. Филогенетическое родство изолятов устанавливали методом Bootstrap (максимального подобия) с 1000 итерациями начальной загрузки по модели общего обратимого времени (GTR, G + I = 4) в компьютерной программе Mega X [31].

Статистика. Обработку данных и построение графиков проводили с использованием программных пакетов Statistica (<http://statsoft.ru>), GraphPad Prism 8.0. (<https://www.graphpad.com>) и Microsoft Excel (<https://www.microsoft.com/ru-ru>). Для показателей рассчитывали среднее (M) и стандартное отклонение (\pm SD).

Результаты

Изучение культуральных свойств

Инфицирование культуры клеток СС изучаемым изолятом ASF/Tatarstan 20/WB-12276 вируса АЧС привело к появлению «плотной» гемадсорбции (адсорбция 40–80 эритроцитов на поверхности клетки), а титр накопления вируса к 3-му пассажу в этой культуре клеток не превышал значений $7,34 \pm 0,16$ lgГАдЕ₅₀/мл \pm SD на 4–5-е сутки после заражения.

Проведение биологической пробы

Схема эксперимента представлена в разделе «Материалы и методы».

⁶Методические рекомендации по выявлению антител к вирусу африканской чумы свиней иммунопероксидазным методом / А.С. Першин, Т.Н. Комова, А.Р. Шотин [и др.] ФГБУ «ВНИИЗЖ». – Владимир, 2020. – 12 с.

⁷Инструкция по применению тест-системы «АЧС» для выявления вируса африканской чумы свиней методом полимеразной цепной реакции (обновление от 19.05.2021)

Результаты термометрии и параллельных исследований проб крови от животных методами ПЦР-РВ, ТФ-ИФА, ИПМ представлены на **рисунках 1–3**.

Как видно из рисунков 1–3, ректальную температуру тела выше 40,0 °С у зараженных свиней детектировали начиная с 4–13 д.п.з. и с 12 – у контактных.

Начало виремии у всех животных выявляли начиная с 5-го д.п.з. методом вирусовыделения. При этом у 83% (5 голов) зараженных животных положительные результаты на геном вируса АЧС методом ПЦР-РВ получали при исследовании проб крови начиная с 5-го д.п.з. У зараженной свиньи № 5 и контактных животных положительные результаты при использовании данного метода получены, начиная с 12 суток после начала эксперимента. Максимальный титр виремии в 1-й группе достигал 8,8 lgГАдЕ₅₀/мл, во 2-й группе – 6,3 lgГАдЕ₅₀/мл (**табл. 1**).

Специфические антитела к вирусу АЧС, при использовании набора INgezim PPA Compac обнаруживали в пробах сыворотки крови от зараженного (свинья № 5) и контактного (№ 7) животных на 19-й д.п.з. (за 1–2 дня до гибели), а сомнительный результат был получен в пробе от свиньи № 4 на 12-й д.п.з. При использовании набора ID Screen, African Swine Fever Indirect, Screening Test антитела к вирусу АЧС не детектировали; сомнительный результат был получен при исследовании сыворотки от животного № 7, отобранной на 19-й д.п.з. (положительная в наборе INgezim PPA Compac).

В то же время при использовании ИПМ антитела к вирусу АЧС выявили у животных №№ 4, 5, 7 и 8, начиная с 12–16-го дня после начала эксперимента.

Смерть всех свиней отмечали в течение 10 суток с момента регистрации первых клинических признаков АЧС (**табл. 2**).

Из таблицы 2 видно, что длительность течения болезни (с момента проявления первых клинических признаков) у свиньи № 8 составила 9 суток, у остальных животных – от 6 до 7 суток, что характерно для острой и подострой форм течения болезни [4–7, 9, 32]. У 100% животных отмечали повышение температуры более 41,3 °С, гипорексию, переходящую в анорексию (от незначительного до выраженного истощения). У 7 из 8 (87,5%) свиней наблюдали признаки поражения нервной системы (от апатии до паралича задних конечностей), умеренную гиперемию конъюнктивы и диарею (без признаков развития дегидратации и до водянистой с признаками выраженной дегидратации). У 6 из 8 животных были выявлены цианотичные зоны, занимающие от 1 до 15% поверхности кожи. У контактного и зараженного животных № 8 и № 5 соответственно регистрировали незначительную одышку, а у свиней №№ 1 и 3 единичную рвоту за период наблюдения. Общая сумма набранных баллов при оценке клинических признаков у свиней составила от 10 (свинья № 2) до 19 (свинья № 8).

После регистрации падежа проводили аутопсию каждого животного с отбором проб органов и тканей для их исследования методами ПЦР-РВ и вирусовыделения. Степень патологоанатомических признаков выражали в баллах (**табл. 3**).

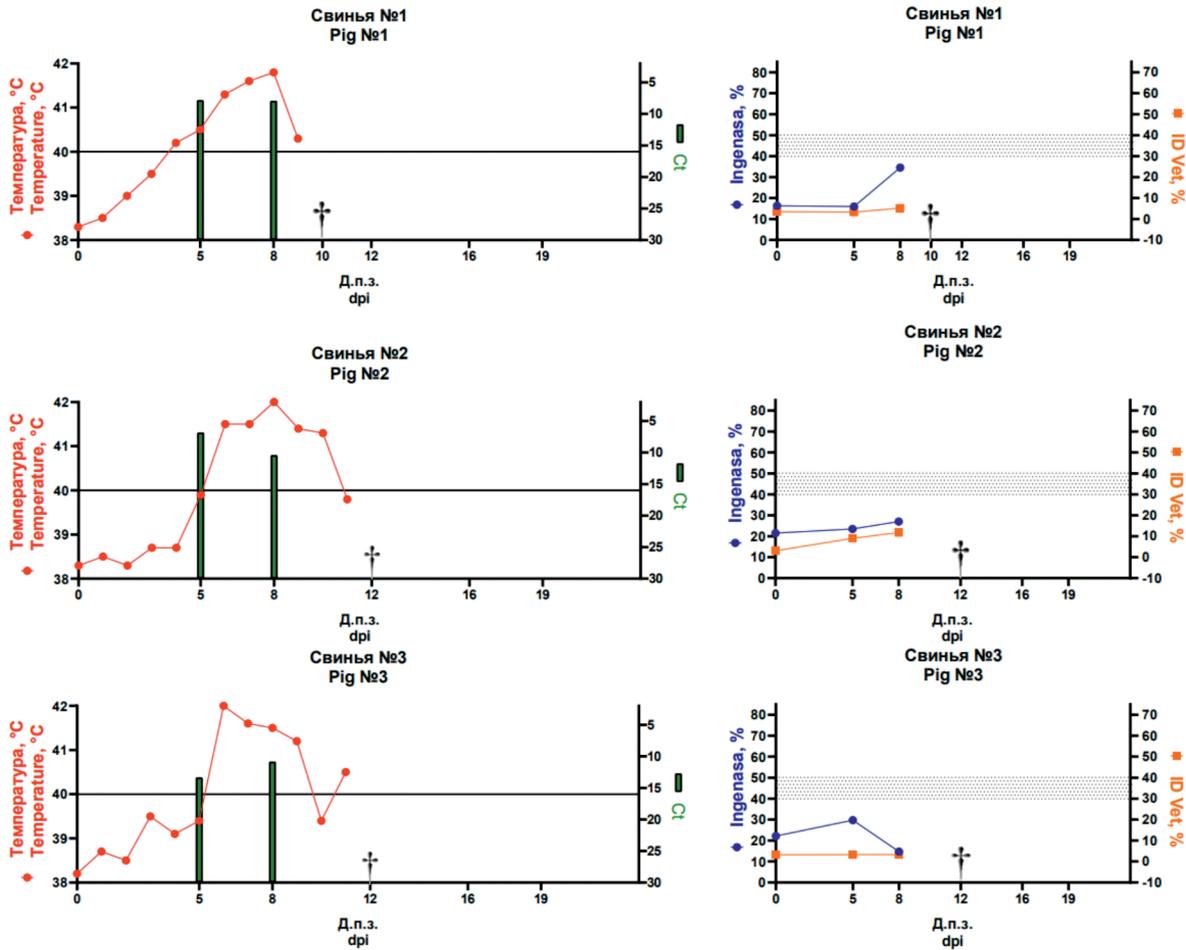


Рис. 1. Показатели термометрии и результаты исследования проб крови зараженных свиней (№№ 1–3) методами ПЦР-РВ и ТФ-ИФА ($n = 3$).

† – даты падежа; горизонтальной линией по оси ординат отмечена граница физиологической нормы температуры (40,0 °C); столбцы показывают значение Ct при постановке ПЦР-РВ.

Fig. 1. Results of body temperature measurements and testing of blood samples from infected pigs (№№ 1–3) by real-time PCR (qPCR) and ELISA ($n = 3$).

Note: † – death date; the horizontal line across the temperature axis marks the limit of the physiological normal body temperature (40.0 °C); the green bars correspond for the qPCR Ct values.

Таблица 1. Результаты исследования проб крови методами ПЦР-РВ и вирусыведения
Table 1. qPCR and virus isolation (VI) results in blood samples

№ свиньи Pig #	5 д.п.з. 5 dpi		8 д.п.з. 8 dpi		12 д.п.з. 12 dpi		16 д.п.з. 16 dpi		19 д.п.з. 19 dpi	
	Ct	T	Ct	T	Ct	T	Ct	T	Ct	T
1	7,8	7,7	7,9	7,7	–	–	–	–	–	–
2	6,9	8,3	10,4	6,4	–	–	–	–	–	–
3	13,3	5,4	10,8	6,3	–	–	–	–	–	–
4	16,7	4,4	12,8	5,5	10,2	6,6	–	–	–	–
5	24,5	2,7	24,3	2,7	18,5	3,9	11,7	5,9	6,1	8,8
6	12,4	5,7	10,5	6,4	–	–	–	–	–	–
7	26,5	2,3	26,3	2,4	15,3	4,8	12,8	5,5	–	–
8	27,1	2,2	отр. neg.	0	19,2	3,8	10,7	6,3	11,6	6

Примечание. Ct – пороговый цикл амплификации; T – титр (IgГАдE₅₀/мл); отр. – отрицательный результат; «–» – не исследовались. Ct ≤ 20 – положительный результат; 20 < Ct ≤ 30 – сомнительный результат; Ct отсутствует – отрицательный результат (геном не обнаружен).

Note. Ct – cycle threshold; T, titer (IgHAD₅₀/ml); neg. – negative result; «–» – not studied. Ct ≤ 20 – positive result; 20 < Ct ≤ 30 – doubtful result; Ct absent – negative result (genome not detected).

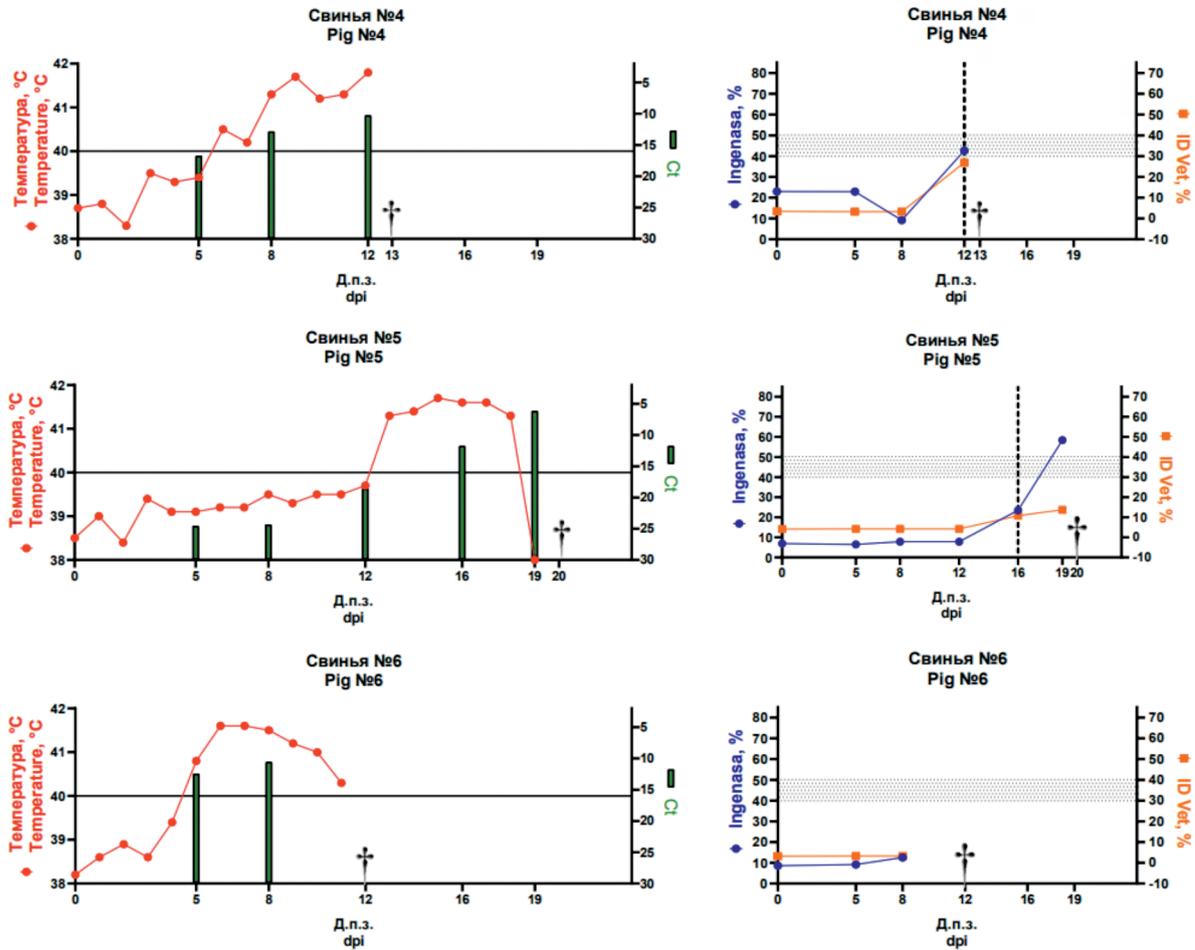


Рис. 2. Показатели термометрии и результаты исследования проб крови зараженных свиней (№№ 4–6) методами ПЦР-РВ, ТФ-ИФА и ИПМ ($n = 3$).
 † – даты падежа; горизонтальной линией по оси ординат отмечена граница физиологической нормы температуры (40,0 °С); столбцы показывают значение Ct при постановке ПЦР-РВ; вертикальными пунктирными линиями отмечены даты первого положительного результата в ИПМ.

Fig. 2. Results of body temperature measurements and testing of blood samples from infected pigs (№№ 4–6) by qPCR, ELISA, and IPM ($n = 3$).
 † – death date; the horizontal line across the temperature axis marks the limit of the physiological normal body temperature (40.0 °С); the bars correspond to the qPCR Ct values; the vertical dotted line across the dates shows the first positive IPM result.

Таблица 2. Оценка клинических признаков
Table 2. Assessment of clinical signs

Группа Group	№ свиной Pig#	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Зараженные Infected	№ 1	4	.	.	.	4	4	6	6	8	16	†											
	№ 2	4	7	6	9	10	12	10	†									
	№ 3	4	7	6	6	8	10	17	†									
	№ 4	4	4	4	6	7	10	13	14	†								
	№ 5	4	5	8	9	9	12	12	14	†	
	№ 6	4	5	6	6	8	10	13	13	†								
Контактные Contact	№ 7	6	7	14	15	15	16	†			
	№ 8	5	6	15	17	18	18	19	19	19	†

Примечание. † – дата падежа; 4 – дата заражения.

Note. † – death date; 4 – infection date.

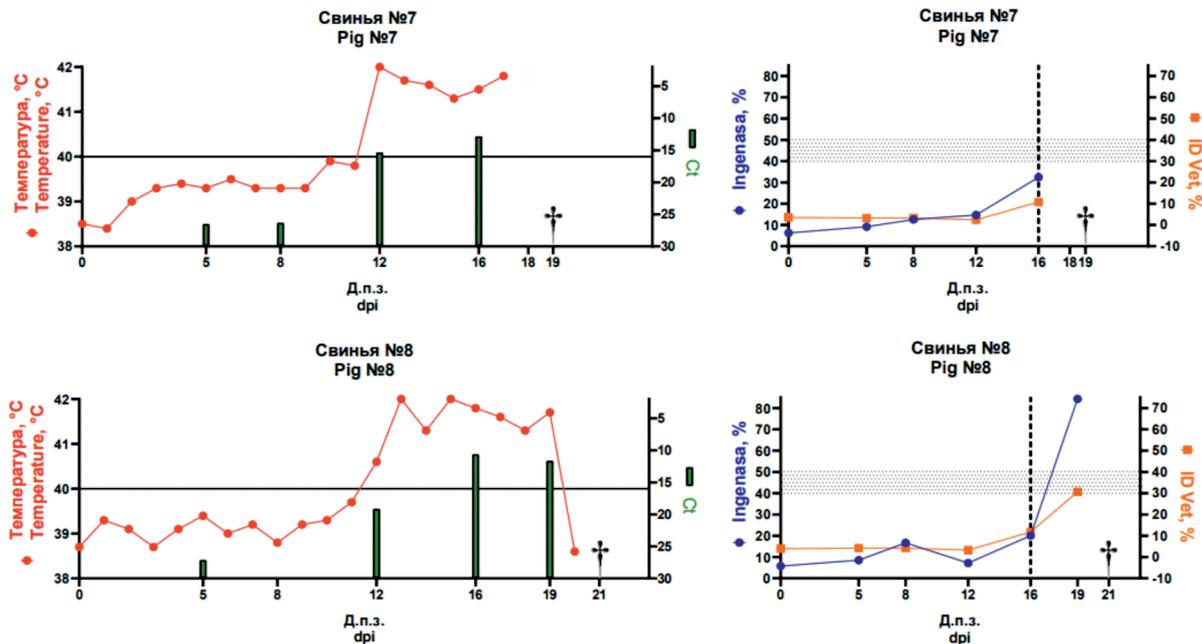


Рис. 3. Показатели термометрии и результаты исследования проб крови контактных свиней (№№ 7, 8) методами ПЦР-РВ, ТФ-ИФА и ИПМ ($n = 3$).

† – даты падежа; горизонтальной линией по оси ординат отмечена граница физиологической нормы температуры (40,0 °C); столбцы показывают значение Ct при постановке ПЦР-РВ; вертикальными пунктирными линиями отмечены даты первого положительного результата в ИПМ.

Fig. 3. Results of body temperature measurements and testing of blood samples from infected pigs (№№ 7, 8) by qPCR, ELISA, and IPM ($n = 3$)

† – death date; the horizontal line across the temperature axis marks the limit of the physiological normal body temperature (40.0 °C); the bars correspond for the qPCR Ct values; the vertical dotted line across the dates shows the first positive IPM result.

Из данных таблицы 3 видно, что сумма баллов, полученная при оценке тяжести проявления патолого-анатомических изменений, составляла в диапазоне от 23 до 42 баллов. Наиболее характерные изменения регистрировали в селезенке (кровенаполнение от умеренного до выраженного, от незначительной до выраженной гиперплазия), лимфатических узлах (до значительной гиперплазии, сопровождающейся геморрагическим лимфаденитом) и почках (развитие обширного геморрагического диатеза).

Помимо вышеназванных патологоанатомических изменений, отмечали отек легких, пневмонию разной степени тяжести, кровоизлияния под плеврой и в слизистой оболочке желчного пузыря, зернистую дистрофию печени, кровоизлияния в слизистой оболочке мочевого пузыря, а также признаки плеврита и перитонита.

Значения Ct и титра вируса в пробах органов и тканей от каждого из животных, полученные с помощью методов ПЦР-РВ и вирусовыделения, представлены в **таблице 4**.

Как видно из данных таблицы 4, вирус АЧС и его геном обнаружены при исследовании всех проб органов. Среднее значение титра вируса в образцах органов и тканей в среднем составило $5,8 \pm 1,27 \text{ lgГАдE}_{50}/\text{мл}$ ($n = 64$) ($5,95 \pm 1,33$ для зараженных и $5,2 \pm 0,88$ для контактных). Самые высокие средние значения

титра получены при исследовании проб селезенки ($7,4 \pm 0,69 \text{ ГАдE}_{50}/\text{мл}$), а самые низкие – при исследовании проб печени ($5,0 \pm 1,18 \text{ ГАдE}_{50}/\text{мл}$) и тканей колена ($5,01 \pm 0,87 \text{ ГАдE}_{50}/\text{мл}$).

Секвенирование маркерных областей генома

Изменения нуклеотидных последовательностей в изучаемом и импортированных из системы GenBank изолятах, а также их сводная группировка представлены в приложении.

Как и ожидалось, анализ последовательности С-концевого участка гена *B646L* изолята ASF/Tatarstan 20/WB-12276 позволил установить его 100%-ную гомологию с референтным штаммом Georgia 2007/1 (FR682468.2), в связи с чем изучаемый изолят был отнесен ко II генотипу.

На основе нуклеотидной последовательности участка CVR гена *B602L* (100%-ная идентичность с референт-штаммом Georgia 2007/1) исследуемый изолят был отнесен к самой многочисленной I субгруппе, включающей изоляты выделенные на территории Московской, Калининградской и Амурской областей, Забайкальского и Приморского краев, республик Кабардино-Балкария и Адыгея Российской Федерации, а также в Польше, Литве, Молдове, Бельгии, Украине, Германии, Венгрии, Чехии, Китае, Вьетнаме и Индии.

Таблица 3. Оценка степени патологоанатомических изменений

Table 3. Scoring of post-mortem lesions

№ свиный Pig #	Легкие Lungs			Сердце Heart		Селезенка Spleen		Лимфоузлы Lymph nodes			Печень Liver			Почки Kidneys			Мочевой пузырь Bladder		Транссудат Transudate		Сумма: Total:
	Отеки Edema	Пневмония Pneumonia	Кровоизлияния под плеврой Hemorrhages under the pleura	Геморрагический диатез, дистрофия Hemorrhagic diathesis, dystrophy	Транссудат в перикардиальной полости Transudate in the pericardial cavity	Кровенаполнение Blood filling	Спленомегалия Splenomegaly	Подчелюстные Submandibular	Брыжеечные Mesenteric	Паховые Inguinal	Гепатопатия Hepatopathy	Желчевыводящие пути Biliary tract	Геморрагический диатез в корковом и мозговом веществе Hemorrhagic diathesis in the cortical and cerebral substance	Субкапсулярные геморрагии Subcapsular hemorrhages	Кровоизлияния в почечной лоханке Hemorrhages in the renal pelvis	Геморрагический диатез в слизистой оболочке Hemorrhagic diathesis in the mucous membrane	Грудная полость Chest cavity	Брюшная полость Abdominal cavity			
№1	2	3	1	3	1	3	2	3	3	2	3	1	3	3	2	2	2	1	40		
№2	1	1	1	1	1	3	3	3	3	2	1	0	2	1	2	1	0	0	26		
№3	2	2	1	1	3	3	3	2	3	1	0	1	3	3	3	1	3	3	38		
№4	1	1	1	2	2	2	1	2	2	1	1	1	3	3	3	2	2	1	31		
№5	2	2	1	3	1	3	3	3	3	2	2	1	3	3	2	1	2	2	39		
№6	1	1	1	2	2	2	2	3	3	2	0	1	3	3	3	1	1	1	32		
№7	2	3	1	3	3	3	3	3	3	2	1	1	3	3	2	1	3	2	42		
№8	1	2	1	1	1	2	2	2	2	1	1	0	2	2	2	1	0	0	23		
Сумма: Total:	12	15	8	16	14	21	19	21	22	13	19	6	22	21	19	10	13	10	271		

Примечание. Баллами отмечена тяжесть патологоанатомических изменений, где 0 – их отсутствие, а 3 – самая тяжелая степень. 0 баллов отмечены зеленым цветом, 1 балл – желтым, 2 балла – оранжевым, 3 балла – красным.

Note. Scoring scale from 0 to 3 is used to indicate the severity of pathological changes, where 0 indicates absence of any pathological changes and 3 indicates the highest degree. 0 is marked green, 1 – yellow, 2 – orange, 3 – red.

Таблица 4. Результаты исследования проб органов и тканей методами ПЦР-РВ и вирусовыделения (n = 3)

Table 4. qPCR and virus isolation (VI) results of samples after necropsy (n = 3)

Образец Sample	Показатель Parameter	№ свиный Pig #							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Почка Kidney	Ct	18,27	12,24	8,66	13,36	12,28	14,46	12,1	16,62
	T	4	5,7	7,3	5,4	5,7	5	5,8	4,4
Печень Liver	Ct	13,43	13,07	9,59	21,93	12,39	18,19	12,46	18,18
	T	5,3	5,4	6,8	3,2	5,7	4	5,7	4
Л/у брыжеечные Mesenteric lymph nodes	Ct	18,47	11,53	6,53	18,2	9,28	14,02	14	17,36
	T	3,9	6	8,5	4	7	5,1	5,1	4,2
Легкое Lungs	Ct	12,55	13,15	7,47	17,56	10,06	10,96	11,3	13,1
	T	5,6	5,4	7,9	4,1	6,6	6,2	6,1	5,4
Селезенка Spleen	Ct	7,89	6,38	7,8	9,86	7,69	8,77	9,32	10,36
	T	7,7	8,6	7,7	6,7	7,8	7,2	6,9	6,5
Ткани колена Knee fabrics	Ct	16,46	12,79	11,32	15,46	18,41	11,44	18,04	13,34
	T	4,4	5,5	6,1	4,7	3,9	6	4	5,4
Л/у подчелюстные Submandibular lymph nodes	Ct	10,77	8,29	9,61	15,26	9,23	12,51	12	15,75
	T	6,3	7,4	6,8	4,8	7	5,6	5,8	4,6
Л/у паховые Inguinal lymph nodes	Ct	10,64	7,64	9,4	15,93	10,38	12,56	13,99	15,8
	T	6,4	7,8	6,9	4,6	6,5	5,6	5,1	4,6

Примечание. Ct – пороговый цикл амплификации; T – титр вирусии (lgГАдE₅₀/мл).

Note. Ct – cycle threshold; T – titer of viremia (lgHAU₅₀/ml).

Проведенный анализ IGR I73R/I329L позволил обнаружить дополнительный TRS из 10 нуклеотидов (GGAATATATA) к существующим 2 копиям TRS, которые встречаются в геноме вируса АЧС Georgia 2007/1, таким образом изучаемый изолят относится к группе IGR-2.

При анализе нуклеотидных последовательностей 5 альтернативных генетических маркеров (O174L, K145R, EP402R, I267L и MGF 505-5R), которые также используются в качестве мишеней для дифференциации изолятов вируса АЧС внутри одного генотипа, установили:

1. На основании гена *O174L* изолят ASF/Tatarstan 20/WB-12276, как и референтный штамм Georgia 2007/1, отнесены к 1-й группе.

2. Секвенирование гена *K145R* у исследуемого изолята позволило классифицировать его к первому кластеру совместно со штаммом Georgia 2007/1.

3. Последовательность гена *EP402R* оказалась идентичной для всех изолятов, в том числе исследуемого.

4. Изолят ASF/Tatarstan 20/WB-12276 имеет замену «Т» на «А» в положении 76 гена *I267L*, по отношению к референтной последовательности штамма Georgia 2007/1, что соответствует второму кластеру;

5. Исследуемый изолят не имеет изменений в гене *MGF 505-5R* в сравнении с Georgia 2007/1 и относится к I субгруппе по данному признаку.

Обсуждение

Наблюдаемая при экспериментальном заражении домашних свиней клиническая и патологоанатомическая картины болезни позволяют охарактеризовать изолят вируса АЧС ASF/Tatarstan 20/WB-12276 как высоковирулентный, способный вызывать АЧС у свиней с острым и подострым течением и гибелью до 100% зараженных внутримышечно и контактным путем животных, что сходно с клинической картиной, характерной для изученных изолятов вируса АЧС, выделенных на территории России в 2007–2018 гг., обладавших 100% летальностью для свиней [4–11].

В работе В.М. Балышева и соавт. представлены данные об изоляте вируса АЧС «Татарстан-Сосновка/2016», выделенного из биологического материала от домашней свиньи в Республике Татарстан в 2016 г., который был охарактеризован как вирулентный и способный вызывать гибель животных с признаками острого и сверхострого течения АЧС [4]. Данный изолят вызывал гибель внутримышечно и контактно инфицированных свиней на 4–6-й и 10–13-й д.п.з. соответственно.

Исходя из вышеизложенного, можно сделать предположение о некотором снижении вирулентных свойств изолята ASF/Tatarstan 20/WB-12276 при его сравнении с предыдущим (в частности, увеличение инкубационного периода и длительности течения болезни). Однако различие в полученных результатах также может быть обосновано разными способами заражения экспериментальных животных. Так, В.М. Балышев и соавт. для заражения использовали 10%-ную суспензию, приготовленную из органо-тканевого материала, в то время как в нашей работе была исполь-

зована суспензия культурального материала с дозой заражения 10 ГАД₅₀/гол. [4].

С помощью ПЦР-РВ было выявлено 100% инфицированных изолятом ASF/Tatarstan 20/WB-12276 животных, а первые положительные результаты при исследовании проб данным методом были получены начиная с 5-го и 12-го д.п.з. в группах зараженных и контактных свиней соответственно.

Использование ИПМ позволило выявить специфические антитела к вирусу АЧС начиная с 12-го и 16-го д.п.з. Аналогичные данные получены А. Pershin и соавт. при изучении биологических свойств изолятов вируса АЧС, происходящих из разных регионов РФ в 2013–2018 гг., где доля обнаружения специфических антител была выше при исследовании проб сыворотки крови от контактных животных, чем от инфицированных внутримышечно, и составила 100% (2 из 2 голов) и 33% (2 из 6 голов) соответственно [8].

При использовании ТФ-ИФА положительные результаты были получены при исследовании только двух образцов сыворотки (по одной от зараженного и контактного животных), что может быть связано с преимущественно быстрой гибелью зараженных свиней (до 13 д.п.з.) и меньшей чувствительностью данного метода диагностики, по сравнению с ИПМ [33–36].

Исследование методом ПЦР-РВ рекомендованных Всемирной организацией здоровья животных (селезенка, легкие, почки, лимфатические узлы) и альтернативных образцов (ткани колена) позволило выявить 100% инфицированных животных [37]. Однако при исследовании пробы печени от одного животного был получен сомнительный результат, что было связано с низкой вирусной нагрузкой в ткани данного органа (титр вируса составил 3,2 ГАД₅₀/мл).

Секвенирование генома исследуемого изолята по наиболее значимым (С-концевой участок гена *B646L*, CVR гена *B602L*, межгенная область IGR I I73R/I329L) и альтернативным (*O174L*, *K145R*, *EP402R*, *I267L*, *MGF 505-5R*) геномным маркерам показало, что ASF/Tatarstan 20/WB-12276 имеет сходную характеристику с референс-штаммом Georgia 2007/1 и другими изолятами, выделенными на территории РФ, за исключением вариантов, циркулирующих в Калининградской области.

Использование последовательностей гена *EP402R*, С-концевого участка гена *B646L* и CVR гена *B602L* обладало низкой разрешающей способностью. Так, все изоляты (за исключением вируса из Ульяновской области РФ) обладали 100%-ной гомологией с референтным штаммом Georgia 2007/1.

В зависимости от числа TRS из 10 нуклеотидов (GGAATATATA) в IGR I73R/I329L, используемые изоляты вируса АЧС II генотипа разделяются на 4 группы:

1-я группа – изоляты, содержащие 2 TRS (напр. Georgia 2007/1);

2-я группа – 3 TRS, характерные для подавляющего числа Европейских и Азиатских изолятов, в том числе и ASF/Tatarstan 20/WB-12276;

3-я группа – представлена изолятом из КНР (China/Guangxi/2019), содержащим 4 TRS;

4-я группа – изоляты из Польши, содержащие 5 TRS [25, 26].

Наличие «А» в положении 76 гена *I267L* у изолята ASF/Tatarstan 20/WB-12276 позволило отнести его ко 2-й, преобладающей группе.

Изменения в генах *O174L*, *K145R* и *MGF 505-5R* были зафиксированы у некоторых вирусов из Германии, Польши, Украины и Калининградской области РФ, в то время как у большинства остальных изолятов, в том числе изучаемого, изменения отсутствовали.

TRS из 14 п.н. (TCACTACTGAAAAA) в положении 50–63 гена *O174L* обнаружена у изолятов, циркулирующих на территории Польши (2017–2019 гг.) и Германии (2020 г.).

Замены «С» на «А» в положении 173 гена *K145R* и «G» на «А» в положении 84 гена *MGF 505-5R* обнаружены для изолятов из Польши (2016–2019 гг.), Украины (2016 г.), Германии (2020 г.) и Калининградской области РФ (2017–2019 гг.). Замена «С» на «Т» в положении 30 гена *K145R* – только для изолятов из Калининградской области РФ (2017–2019 гг.).

Таким образом, анализ по выбранным маркерам показал генетическое родство изучаемого изолята ASF/Tatarstan 20/WB-12276 с большинством изолятов из Европы и Азии, выделенными за период с 2017 по 2020 г.

Выводы

Впервые изучены молекулярно-биологические свойства изолята вируса АЧС ASF/Tatarstan 20/WB-12276, выделенного из селезенки от отстрелянного дикого кабана на территории Республики Татарстан. Изолят охарактеризован как высоковирулентный, способный вызывать острую и подострую форму течения инфекции. Летальность у зараженных животных составила 100%.

Подтверждена первостепенная важность проведения пассивного эпизоотологического надзора с регулярным отбором и исследованием строго рекомендованных проб от всех животных с признаками болезни с исследованием образцов прямыми методами диагностики (обнаружение вируса, его генома, антигена) [38].

Однако, в случаях, когда вирус АЧС циркулирует в восприимчивой популяции длительное время (например, более полугодом), прямые методы исследований рационально дополнять косвенными (на обнаружение антител), в первую очередь при исследовании проб от отловленных и отстрелянных диких кабанов.

На основе анализа нуклеотидных последовательностей IGR I73R/I329L изолятов вируса АЧС, вариант ASF/Tatarstan 20/WB-12276 отнесли к группе IGR-2. Дифференциальный анализ по генетическому маркеру в гене *I267L* (замена тимина на аденин в положении 76 настоящего гена, относительно последовательности референтного штамма Georgia 2007/1), позволил отнести изучаемый изолят к группе I267L-2. При анализе 7 остальных генетических маркеров (в генах *EP402R*, *O174L*, *K145R*, *MGF 505-5R*, *C* – конце гена *B646L* и *CVR*) изменения обнаружены не были [28].

Таким образом, с целью дифференциации и изучения дальнейшей динамики молекулярной эволюции циркулирующих на территории РФ, в том числе Республики Татарстан, изолятов вируса АЧС, необходимо направлять образцы, оказавшиеся положительными или сомнительными при их исследовании в региональных лабораториях, в референтную лабораторию по АЧС ФГБУ «ВНИИЗЖ» для подтверждения диагноза и проведения научно-исследовательских работ методом секвенирования наиболее значимых и альтернативных в молекулярно-эпизоотологическом отношении генов с проведением последующего филогенетического анализа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Иголкин А.С., Караулов А.К., Груздев К.Н. Африканская чума свиней, 2020 г. В кн.: *Труды Всероссийского НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.П. Коваленко. Том 82. М.*; 2021: 58–64. <https://doi.org/10.31016/view-2021-18-8>
2. Шотин А.Р., Жуков И.Ю., Першин А.С., Мазлум А., Шевченко И.В., Иголкин А.С. и др. Влияние условий хранения сыровоток крови свиней на выявление антител к вирусу АЧС методом ИФА. *Ветеринария сегодня*. 2021; (3): 216–23. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2021-3-38-216-223> <https://elibrary.ru/sfvomt>
3. Шотин А.Р., Иголкин А.С., Мазлум А., Шевченко И.В., Бардина Н.С., Морозова Е.О. и др. Африканская чума свиней в Приморском крае: эпизоотическая ситуация и молекулярно-биологические свойства изолята, выделенного из трубчатой кости от дикого кабана. *Ветеринария сегодня*. 2022; 11(4): 347–58. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2022-11-4-347-358> <https://elibrary.ru/uhggjy>
4. Балышев В.М., Власов М.Е., Имамдинов А.Р., Титов И.А., Моргунов С.Ю., Малооголовкин А.С. Биологические свойства и молекулярно-генетическая характеристика вируса африканской чумы свиней, выделенного в 2016–2017 гг. в различных регионах Российской Федерации. *Российская сельскохозяйственная наука*. 2018; (4): 54–7. <https://doi.org/10.31857/S250026270000536-4> <https://elibrary.ru/yamjtn>
5. Болгова М.В., Моргунов Ю.П., Васильев А.П., Балышев В.М. Биологические свойства изолятов вируса африканской чумы свиней, выделенных в Российской Федерации в 2012 г. *Актуальные вопросы ветеринарной биологии*. 2013; (4): 26–30. <https://elibrary.ru/trpxxf>
6. Власов М.Е., Сибгатуллова А.К., Балышев В.М. Особенности течения африканской чумы у свиней, инфицированных изолятами вируса АЧС, выделенными в Российской Федерации. *Ветеринария*. 2019; (4): 15–9. <https://doi.org/10.30896/0042-4846.2019.22.4.15-19> <https://elibrary.ru/eohxkh>
7. Власов М.Е. Клинические проявления болезни и патологоанатомические изменения у свиней, инфицированных изолятами вируса АЧС, выделенными от кабанов. *Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета*. 2017; (134): 1055–65. <https://doi.org/10.21515/1990-4665-134-086> <https://elibrary.ru/ynwynm>
8. Pershin A., Shevchenko I., Igolkin A., Zhukov I., Mazloun A., Aronova E., et al. A long-term study of the biological properties of ASF virus isolates originating from various regions of the Russian Federation in 2013–2018. *Vet. Sci*. 2019; 6(4): 99. <https://doi.org/10.3390/vetsci6040099> <https://elibrary.ru/eybfvu>
9. Ремыга С.Г., Першин А.С., Шевченко И.В., Иголкин А.С., Шевцов А.А. Клинические и патологоанатомические изменения у диких европейских кабанов и домашних свиней при заражении вирусом африканской чумы свиней. *Ветеринария сегодня*. 2016; (3): 46–51. <https://elibrary.ru/wrllmf>
10. Жуков И.Ю. *Биологические свойства изолятов вируса африканской чумы свиней и особенности течения болезни при экспериментальном заражении*: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Владимир; 2018.
11. Шевченко И.В. *Биологические свойства и анализ полных геномов российских изолятов вируса африканской чумы свиней, выделенных в 2013–2014 гг.*: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук.

- Владимир; 2017.
- Events management / WAHIS / <https://wahis.woah.org/#/event-management> (дата обращения: 06.02.2022).
 - Desmecht D., Gerbier G., Gortázar Schmidt C., Grigaliuniene V., Helyes G., Kantere M., et al. Epidemiological analysis of African swine fever in the European Union (September 2019 to August 2020). *EFSJ J.* 2021; 19(5): e06572. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6572>
 - Караулов А.К., Шевцов А.А., Петрова О.Н., Коренной Ф.И., Гуленкин В.М. Эпизоотия АЧС на территории Российской Федерации: прогноз развития ситуации на 2021 год и рекомендации по мерам ее сдерживания. *БИО.* 2021; (2): 14–21. <https://elibrary.ru/jqnqdk>
 - Петрова О.Н., Коренной Ф.И., Караулов А.К. Эпизоотия африканской чумы свиней на территории Российской Федерации: оценка ущерба на основании обобщенных данных об эпизоотической ситуации за 2007–2020 гг. *БИО.* 2021; (3): 18–22. <https://elibrary.ru/afppww>
 - Mazloun A., van Schalkwyk A., Chernyshev R., Igolkin A., Heath L., Sprygin A. A guide to molecular characterization of genotype II African swine fever virus: essential and alternative genome markers. *Microorganisms.* 2023; 11(3): 642. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030642>
 - Vilem A., Nurmoja I., Niine T., Riit T., Nieto R., Viltrop A., et al. Molecular characterization of African swine fever virus isolates in Estonia in 2014–2019. *Pathogens.* 2020; 9(7): 582. <https://doi.org/10.3390/pathogens9070582>
 - Phologane S.B., Bastos A.D., Penrith M.L. Intra- and inter-genotypic size variation in the central variable region of the 9RL open reading frame of diverse African swine fever viruses. *Virus Genes.* 2005; 31(3): 357–60. <https://doi.org/10.1007/s11262-005-3254-z>
 - Nix R.J., Gallardo C., Hutchings G., Blanco E., Dixon L.K. Molecular epidemiology of African swine fever virus studied by analysis of four variable genome regions. *Arch. Virol.* 2006; 151(12): 2475–94. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0794-z>
 - Rowlands R.J., Michaud V., Heath L., Hutchings G., Oura C., Vosloo W., et al. African swine fever virus isolate, Georgia, 2007. *Emerg. Infect. Dis.* 2008; 14(12): 1870–4. <https://doi.org/10.3201/eid1412.080591>
 - Gallardo C., Mwaengo D.M., Macharia J.M., Arias M., Taracha E.A., Soler A., et al. Enhanced discrimination of African swine fever virus isolates through nucleotide sequencing of the p54, p72, and pB602L (CVR) genes. *Virus Genes.* 2009; 38(1): 85–95. <https://doi.org/10.1007/s11262-008-0293-2>
 - Lubisi B.A., Bastos A.D., Dwarka R.M., Vosloo W. Intra-genotypic resolution of African swine fever viruses from an East African domestic pig cycle: a combined p72-CVR approach. *Virus Genes.* 2007; 35(3): 729–35. <https://doi.org/10.1007/s11262-007-0148-2>
 - Sidi M., Zerbo H.L., Ouoba B.L., Settypalli T.B.K., Bazimo G., Ouandaogo H.S., et al. Molecular characterization of African swine fever viruses from Burkina Faso, 2018. *BMC Vet. Res.* 2022; 18(1): 69. <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03166-y>
 - Mazloun A., Van Schalkwyk A., Chernyshev R., Shotin A., Korennoy F.I., Igolkin A., et al. Genetic characterization of the central variable region in African swine fever virus isolates in the Russian Federation from 2013 to 2017. *Pathogens.* 2022; 11(8): 919. <https://doi.org/10.3390/pathogens11080919> <https://elibrary.ru/ojluot>
 - Mazur-Panasiuk N., Walczak M., Juskiewicz M., Woźniakowski G. The spillover of African swine fever in western Poland revealed its estimated origin on the basis of O174L, K145R, MGF 505-5R and IGR I73R/I329L genomic sequences. *Viruses.* 2020; 12(10): 1094. <https://doi.org/10.3390/v12101094>
 - Shi K., Liu H., Yin Y., Si H., Long F., Feng S. Molecular characterization of African swine fever virus from 2019–2020 outbreaks in Guangxi province, Southern China. *Front. Vet. Sci.* 2022; 9: 912224. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.912224>
 - Mazur-Panasiuk N., Woźniakowski G. The unique genetic variation within the O174L gene of Polish strains of African swine fever virus facilitates tracking virus origin. *Arch. Virol.* 2019; 164(6): 1667–72. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04224-x>
 - Mazloun A., van Schalkwyk A., Shotin A., Zinyakov N., Igolkin A., Chernyshev R., et al. Whole-genome sequencing of African swine fever virus from wild boars in the Kaliningrad region reveals unique and distinguishing genomic mutations. *Front. Vet. Sci.* 2023; 9: 1019808. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.1019808>
 - Mazloun A., van Schalkwyk A., Shotin A., Igolkin A., Shevchenko I., Gruzdev K.N., et al. Comparative analysis of full genome sequences of African swine fever virus isolates taken from wild boars in Russia in 2019. *Pathogens.* 2021; 10(5): 521. <https://doi.org/10.3390/pathogens10050521> <https://elibrary.ru/mwsggz>
 - Zhang Y., Ke J., Zhang J., Yue H., Chen T., Li Q., et al. I267L is neither the virulence- nor the replication-related gene of African swine fever virus and its deletant is an ideal fluorescent-tagged virulence strain. *Viruses.* 2021; 14(1): 53. <https://doi.org/10.3390/v14010053>
 - Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018; 35(6): 1547–9. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
 - Бальшев В.М., Куриннов В.В., Цыбанов С.Ж., Калантаенко Ю.Ф., Колбасов Д.В., Пронин В.В. и др. Биологические свойства вируса африканской чумы свиней, выделенного в Российской Федерации. *Ветеринария.* 2010; (7): 25–7. <https://elibrary.ru/msrezn>
 - Gallardo M.C., Reoyo A.T., Fernández-Pinero J., Iglesias I., Muñoz M.J., Arias M.L. African swine fever: a global view of the current challenge. *Porcine Health Manag.* 2015; 1: 21. <https://doi.org/10.1186/s40813-015-0013-y>
 - Gallardo C., Fernández-Pinero J., Arias M. African swine fever (ASF) diagnosis, an essential tool in the epidemiological investigation. *Virus Res.* 2019; 271: 197676. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.197676>
 - Gap Analysis Report. Global African Swine Fever; 2018. Available at: <https://www.ars.usda.gov/ARUserFiles/npl03/Symposium-WorkshopsMeetings/GARA%20Gap%20Analysis%20Report%202018%2011-11-18.pdf>
 - Mur L., Igolkin A., Varentsova A., Pershin A., Remyga S., Shevchenko I., et al. Detection of African swine fever antibodies in experimental and field samples from the Russian Federation: implications for control. *Transbound. Emerg. Dis.* 2016; 63(5): e436–40. <https://doi.org/10.1111/tbed.12304> <https://elibrary.ru/xslmnr>
 - OIE Terrestrial Manual. Chapter 3.8. 1. African swine fever (infection with African swine fever virus). OIE; 2019.
 - Gervasi V., Marcon A., Bellini S., Guberti V. Evaluation of the efficiency of active and passive surveillance in the detection of African swine fever in wild boar. *Vet. Sci.* 2019; 7(1): 5. <https://doi.org/10.3390/vetsci70100055>

REFERENCES

- Igolkin A.S., Karaulov A.K., Gruzdev K.N. African swine fever, 2020 In: *Proceedings of the All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after Y.R. Kovalenko. Volume 82 [Trudy Vserossiyskogo NII eksperimental'noy veterinarii im. Ya.R. Kovalenko. Tom 82]*. Moscow; 2021: 58–64. <https://doi.org/10.31016/viev-2021-18-8> (in Russian)
- Shotin A.R., Zhukov I.Yu., Pershin A.S., Mazloun A., Shevchenko I.V., Igolkin A.S., et al. Effect of pig serum storage conditions on detection of anti-ASFV antibodies by ELISA. *Veterinariya segodnya.* 2021; (3): 216–23. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2021-3-38-216-223> <https://elibrary.ru/sfvomt> (in Russian)
- Shotin A.R., Igolkin A.S., Mazloun A., Shevchenko I.V., Bardina N.S., Morozova E.O., et al. African swine fever in the Primorsky Krai: disease situation and molecular and biological properties of the isolate recovered from a wild boar long bone. *Veterinariya segodnya.* 2022; 11(4): 347–58. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2022-11-4-347-358> <https://elibrary.ru/uhggjy> (in Russian)
- Balyshev V.M., Vlasov M.E., Imatdinov A.R., Titov I.A., Morgunov S.Yu., Malogolovkin A.S. Biological properties and molecular genetic characteristics of the African swine fever virus, isolated in 2016–2017 in various regions of the Russian Federation. *Rossiyskaya sel'skokhozyaystvennaya nauka.* 2018; (4): 54–7. <https://doi.org/10.31857/S250026270000536-4> <https://elibrary.ru/yamjtn> (in Russian)
- Bolgova M.V., Morgunov Yu.P., Vasil'ev A.P., Balyshev V.M. Biological characteristics of African swine fever virus isolates detected in the Russian Federation in 2012. *Aktual'nye voprosy veterinarnoy biologii.* 2013; (4): 26–30. <https://elibrary.ru/rppyx> (in Russian)

6. Vlasov M.E., Sibgatullova A.K., Balyshv V.M. The course of disease in pigs infected with ASF virus isolates, obtained in different regions of the Russian Federation. *Veterinariya*. 2019; (4): 15–9. <https://doi.org/10.30896/0042-4846.2019.22.4.15-19> <https://elibrary.ru/eohxkh> (in Russian)
7. Vlasov M.E. Clinical manifestations and disease pathological changes in pigs infected with ASF virus isolates from wild boars. *Politematicheskiy setevoy elektronnyy nauchnyy zhurnal Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*. 2017; (134): 1055–65. <https://doi.org/10.21515/1990-4665-134-086> <https://elibrary.ru/ynwynm> (in Russian)
8. Pershin A., Shevchenko I., Igolkin A., Zhukov I., Mazloum A., Aronova E., et al. A long-term study of the biological properties of ASF virus isolates originating from various regions of the Russian Federation in 2013–2018. *Vet. Sci.* 2019; 6(4): 99. <https://doi.org/10.3390/vetsci6040099> <https://elibrary.ru/eybfvu>
9. Remyga S.G., Pershin A.S., Shevchenko I.V., Igolkin A.S., Shevtsov A.A. Clinical and post-mortem signs in European wild boars and domestic pigs infected with African swine fever virus. *Veterinariya segodnya*. 2016; (3): 46–51. <https://elibrary.ru/wwrlmf> (in Russian)
10. Zhukov I.Yu. *Biological properties of African swine fever virus isolates and features of the course of the disease during experimental infection*: Diss. Vladimir; 2018. (in Russian)
11. Shevchenko I.V. *Biological properties and analysis of complete genomes of Russian isolates of African swine fever virus isolated in 2013-2014*: Diss. Vladimir; 2017. (in Russian)
12. Events management / WAHIS / <https://wahis.woah.org/#/event-management> (дата обращения: 06.02.2022)
13. Desmecht D., Gerbier G., Gortázar Schmidt C., Grigaliuniene V., Heleyes G., Kantere M., et al. Epidemiological analysis of African swine fever in the European Union (September 2019 to August 2020). *EFSA J.* 2021; 19(5): e06572. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6572>
14. Karaulov A.K., Shevtsov A.A., Petrova O.N., Korennoy F.I., Gulenkin V.M. ASF epizootics on the territory of the Russian Federation: forecast of the situation for 2021 and recommendations on measures to contain it. *BIO*. 2021; (2): 14–21. <https://elibrary.ru/jnqndk> (in Russian)
15. Petrova O.N., Korennoy F.I., Karaulov A.K. Epizootics of African swine fever in the territory of the Russian Federation: damage assessment based on generalized data on the epizootic situation for 2007–2020. *BIO*. 2021; (3): 18–22. <https://elibrary.ru/afppww> (in Russian)
16. Mazloum A., van Schalkwyk A., Chernyshev R., Igolkin A., Heath L., Sprygin A. A guide to molecular characterization of genotype II African swine fever virus: essential and alternative genome markers. *Microorganisms*. 2023; 11(3): 642. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030642>
17. Vilem A., Nurmoja I., Niine T., Riit T., Nieto R., Viltrop A., et al. Molecular characterization of African swine fever virus isolates in Estonia in 2014–2019. *Pathogens*. 2020; 9(7): 582. <https://doi.org/10.3390/pathogens9070582>
18. Phologane S.B., Bastos A.D., Penrith M.L. Intra- and inter-genotypic size variation in the central variable region of the 9RL open reading frame of diverse African swine fever viruses. *Virus Genes*. 2005; 31(3): 357–60. <https://doi.org/10.1007/s11262-005-3254-z>
19. Nix R.J., Gallardo C., Hutchings G., Blanco E., Dixon L.K. Molecular epidemiology of African swine fever virus studied by analysis of four variable genome regions. *Arch. Virol.* 2006; 151(12): 2475–94. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0794-z>
20. Rowlands R.J., Michaud V., Heath L., Hutchings G., Oura C., Vosloo W., et al. African swine fever virus isolate, Georgia, 2007. *Emerg. Infect. Dis.* 2008; 14(12): 1870–4. <https://doi.org/10.3201/eid1412.080591>
21. Gallardo C., Mwaengo D.M., Macharia J.M., Arias M., Taracha E.A., Soler A., et al. Enhanced discrimination of African swine fever virus isolates through nucleotide sequencing of the p54, p72, and pB602L (CVR) genes. *Virus Genes*. 2009; 38(1): 85–95. <https://doi.org/10.1007/s11262-008-0293-2>
22. Lubisi B.A., Bastos A.D., Dwarka R.M., Vosloo W. Intra-genotypic resolution of African swine fever viruses from an East African domestic pig cycle: a combined p72-CVR approach. *Virus Genes*. 2007; 35(3): 729–35. <https://doi.org/10.1007/s11262-007-0148-2>
23. Sidi M., Zerbo H.L., Ouoba B.L., Settypalli T.B.K., Bazimo G., Ouandaogo H.S., et al. Molecular characterization of African swine fever viruses from Burkina Faso, 2018. *BMC Vet. Res.* 2022; 18(1): 69. <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03166-y>
24. Mazloum A., Van Schalkwyk A., Chernyshev R., Shotin A., Korennoy F.I., Igolkin A., et al. Genetic characterization of the central variable region in African swine fever virus isolates in the Russian Federation from 2013 to 2017. *Pathogens*. 2022; 11(8): 919. <https://doi.org/10.3390/pathogens11080919> <https://elibrary.ru/ojluot>
25. Mazur-Panasiuk N., Walczak M., Juskiewicz M., Woźniakowski G. The spillover of African swine fever in western Poland revealed its estimated origin on the basis of O174L, K145R, MGF 505-5R and IGR I73R/I329L genomic sequences. *Viruses*. 2020; 12(10): 1094. <https://doi.org/10.3390/v12101094>
26. Shi K., Liu H., Yin Y., Si H., Long F., Feng S. Molecular characterization of African swine fever virus from 2019–2020 outbreaks in Guangxi province, Southern China. *Front. Vet. Sci.* 2022; 9: 912224. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.912224>
27. Mazur-Panasiuk N., Woźniakowski G. The unique genetic variation within the O174L gene of Polish strains of African swine fever virus facilitates tracking virus origin. *Arch. Virol.* 2019; 164(6): 1667–72. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04224-x>
28. Mazloum A., van Schalkwyk A., Shotin A., Zinyakov N., Igolkin A., Chernyshev R., et al. Whole-genome sequencing of African swine fever virus from wild boars in the Kaliningrad region reveals unique and distinguishing genomic mutations. *Front. Vet. Sci.* 2023; 9: 1019808. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.1019808>
29. Mazloum A., van Schalkwyk A., Shotin A., Igolkin A., Shevchenko I., Gruzdev K.N., et al. Comparative analysis of full genome sequences of African swine fever virus isolates taken from wild boars in Russia in 2019. *Pathogens*. 2021; 10(5): 521. <https://doi.org/10.3390/pathogens10050521> <https://elibrary.ru/mwsggz>
30. Zhang Y., Ke J., Zhang J., Yue H., Chen T., Li Q., et al. I267L is neither the virulence- nor the replication-related gene of African swine fever virus and its deletant is an ideal fluorescent-tagged virulence strain. *Viruses*. 2021; 14(1): 53. <https://doi.org/10.3390/v14010053>
31. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018; 35(6): 1547–9. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
32. Balyshv V.M., Kurinnov V.V., Tsybanov S.Zh., Kalantaenko Yu.F., Kolbasov D.V., Pronin V.V., et al. Biological characteristics of the African swine fever virus isolated in the Russian Federation. *Veterinariya*. 2010; (7): 25–7. <https://elibrary.ru/msrezn> (in Russian)
33. Gallardo M.C., Reoyo A.T., Fernández-Pinero J., Iglesias I., Muñoz M.J., Arias M.L. African swine fever: a global view of the current challenge. *Porcine Health Manag.* 2015; 1: 21. <https://doi.org/10.1186/s40813-015-0013-y>
34. Gallardo C., Fernández-Pinero J., Arias M. African swine fever (ASF) diagnosis, an essential tool in the epidemiological investigation. *Virus Res.* 2019; 271: 197676. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.197676>
35. Gap Analysis Report. Global African Swine Fever; 2018. Available at: <https://www.ars.usda.gov/ARSUserFiles/np103/Symposium-WorkshopsMeetings/GARA%20Gap%20Analysis%20Report%202018%2011-11-18.pdf>
36. Mur L., Igolkin A., Varentsova A., Pershin A., Remyga S., Shevchenko I., et al. Detection of African swine fever antibodies in experimental and field samples from the Russian Federation: implications for control. *Transbound. Emerg. Dis.* 2016; 63(5): e436–40. <https://doi.org/10.1111/tbed.12304> <https://elibrary.ru/xslmnr>
37. OIE Terrestrial Manual. Chapter 3.8. 1. African swine fever (infection with African swine fever virus). OIE; 2019.
38. Gervasi V., Marcon A., Bellini S., Guberti V. Evaluation of the efficiency of active and passive surveillance in the detection of African swine fever in wild boar. *Vet. Sci.* 2019; 7(1): 5. <https://doi.org/10.3390/vetsci70100055>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-183>

© ЛЕСНОВА Е.И., МАСАЛОВА О.В., ПЕРМЯКОВА К.Ю., ДЕМИДОВА Н.А., ВАЛУЕВ-ЭЛЛИСТОН В.Т., ИВАНОВ А.В., КУЩ А.А., 2023



Адьювантное действие агониста NOD1 и NOD2 полимурамила различается при иммунизации мышей разных инбредных линий неструктурными белками вируса гепатита С (Flaviviridae: *Нерасивирис*) и синергетически усиливается в комбинации с агонистом TLR4 пирогеналом

Леснова Е.И.¹, Масалова О.В.¹, Пермякова К.Ю.^{1,2}, Демидова Н.А.¹, Валуйев-Эллистон В.Т.³, Иванов А.В.³, Кущ А.А.¹

¹ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, Россия;

²ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина» Министерства сельского хозяйства Российской Федерации, 109472, г. Москва, Россия;

³ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, 119991, г. Москва, Россия

Введение. Гепатит С – заболевание печени с высокой хронизацией, являющееся причиной цирроза и гепатокарциномы. Главное препятствие для контроля за гепатитом С – отсутствие вакцин.

Цель работы – сравнение иммуногенной активности неструктурных рекомбинантных белков NS3, NS4 и NS5B вируса гепатита С (ВГС) как компонентов субъединичной кандидатной вакцины и анализ адьювантных свойств двух отечественных коммерческих препаратов: полимурамила и пирогенала.

Материалы и методы. Мышей линий BALB/c, DBA/2J и C57BL/6 иммунизировали трижды с интервалом 2 недели белками NS3, NS4 и NS5B без адьювантов или с полимурамилом (агонист рецепторов иммунного ответа NOD1 и NOD2) и пирогеналом (липополисахарид, агонист TLR-4). Гуморальный ответ определяли по активности антител в ИФА, клеточный – по индексу стимуляции пролиферации лимфоцитов и способности продуцировать IFN- γ при антигенспецифической стимуляции *in vitro*.

Результаты. Рекомбинантные белки проявляли различную иммуногенность. NS4 индуцировал антитела эффективнее, чем NS3 и NS5B. Значительные различия обнаружены в иммунном ответе мышей трех инбредных линий: уровень секреции IFN- γ у мышей BALB/c и DBA/2J на белок NS5B был в 30 раз выше, чем у мышей C57BL/6. Индукция антител, напротив, у мышей BALB/c была ниже, чем у C57BL/6 и у DBA/2J. Полимурамил не увеличивал гуморальный ответ на NS5B и усиливал клеточный ответ только у мышей C57BL/6. Сочетанное применение полимурамила с пирогеналом значительно увеличивало как гуморальный, так и клеточный ответ мышей на все рекомбинантные белки ВГС.

Выводы. Различные иммуногенные свойства и разные функции неструктурных белков ВГС в репликации вируса свидетельствуют о целесообразности их сочетанного включения в состав субъединичных вакцин. Впервые установлено, что иммунизация белками ВГС с комплексным адьювантом (полимурамил + пирогенал) оказывает синергетический эффект, значительно превышая действие каждого из них по отдельности.

Ключевые слова: гепатит С; вирус гепатита С; неструктурные белки вируса гепатита С; мыши BALB/c, DBA/2J и C57BL/6; гуморальный и клеточный иммунные ответы; полимурамил; пирогенал; синергетическое адьювантное действие

Для цитирования: Леснова Е.И., Масалова О.В., Пермякова К.Ю., Демидова Н.А., Валуйев-Эллистон В.Т., Иванов А.В., Кущ А.А. Адьювантное действие агониста NOD1 и NOD2 полимурамила различается при иммунизации мышей разных инбредных линий неструктурными белками вируса гепатита С (Flaviviridae: *Нерасивирис*) и синергетически усиливается в комбинации с агонистом TLR4 пирогеналом. *Вопросы вирусологии*. 2023; 68(4): 315–326. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-183> EDN: <https://elibrary.ru/pvluew>

Для корреспонденции: Леснова Екатерина Ивановна, научный сотрудник лаборатории клеточной инженерии ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, Россия. E-mail: wolf252006@yandex.ru

Участие авторов: Леснова Е.И. – проведение экспериментов, анализ и интерпретация данных, подготовка текста; Масалова О.В. – концепция и дизайн исследования, анализ и интерпретация данных, подготовка текста; Пермякова К.Ю. – проведение экспериментов; Демидова Н.А. – проведение экспериментов; Валуйев-Эллистон В.Т. – проведение экспериментов; Иванов А.В. – проведение экспериментов, редактирование статьи; Кущ А.А. – концепция и дизайн исследования, подготовка текста, редактирование статьи.

Финансирование. Исследование выполнено за счет государственного бюджета.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus Author Guidelines for Animal Use (IAVES, July

23, 2010). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (Протокол № 10 от 07.06.2021).

Поступила 28.06.2023
Принята в печать 16.08.2023
Опубликована 31.08.2023

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-183>

The adjuvant effect of polymuramil, a NOD1 and NOD2 agonist, differs when immunizing mice of different inbred lines with nonstructural hepatitis C virus (Flaviviridae: *Hepacivirus*) proteins and is synergistically enhanced in combination with pyrogenalum, a TLR4 agonist

Ekaterina I. Lesnova¹, Olga V. Masalova¹, Kristina Yu. Permyakova^{1,2}, Natalia A. Demidova¹, Vladimir T. Valuev-Elliston³, Alexander V. Ivanov³, Alla A. Kushch¹

¹Gamaleya NRC of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, 123098, Moscow, Russia;

²Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology – MVA by K.I. Skryabin, 109472, Moscow, Russia;

³Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, 119991, Moscow, Russia

Introduction. Hepatitis C is a liver disease with high chronicity, the cause of cirrhosis and hepatocarcinoma. The main obstacle to controlling hepatitis C is the lack of vaccines.

The aim of the work was to compare the immunogenic activity of nonstructural recombinant proteins NS3, NS4 and NS5B of hepatitis C virus (HCV) as components of a subunit candidate vaccine and to analyze the adjuvant properties of two available commercial drugs, polymuramil and pyrogenalum.

Materials and methods. BALB/c, DBA/2J and C57BL/6 mice were immunized with nonstructural proteins without adjuvants or with polymuramil (NOD1 and NOD2 agonist) and pyrogenalum (TLR-4 agonist). The activity of antibodies was determined in ELISA, the cellular response – by antigen-specific lymphocyte proliferation and by production of IFN- γ *in vitro*.

Results. Recombinant proteins showed different immunogenicity. NS4 induced antibodies more efficiently than NS3 and NS5B. Significant differences were found in the immune response of three inbred lines mice: the level of IFN- γ in BALB/c and DBA/2J mice induced by NS5B protein was 30 times higher than in C57BL/6 mice. In contrast, the induction of antibodies in BALB/c mice was lower than in C57BL/6 and DBA/2J. Polymuramil did not increase the humoral response to NS5B and enhanced the cellular response only in C57BL/6 mice. The combined use of polymuramil with pyrogenalum significantly increased both the humoral and cellular response of mice to all recombinant HCV proteins.

Conclusion. Different immunogenic properties and different functions of recombinant non-structural HCV proteins indicate the feasibility of their combined inclusion in subunit vaccines. It was established for the first time that immunization with HCV proteins with a complex adjuvant (polymuramil + pyrogenalum) has a synergistic effect, significantly exceeding the effect of each of them separately.

Keywords: hepatitis C; hepatitis C virus; non-structural hepatitis C virus proteins; BALB/c; DBA/2J and C57BL/6 mice; humoral and cellular immune responses; polymuramil; pyrogenalum; synergistic adjuvant effect

For citation: Lesnova E.I., Masalova O.V., Permyakova K.Yu., Demidova N.A., Valuev-Elliston V.T., Ivanov A.V., Kushch A.A. The adjuvant effect of polymuramil, a NOD1 and NOD2 agonist, differs when immunizing mice of different inbred lines with nonstructural hepatitis C virus (Flaviviridae: *Hepacivirus*) proteins and is synergistically enhanced when administered in combination with pyrogenalum, a TLR4 agonist. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2023; 68(4): 315–326. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-183> EDN: <https://elibrary.ru/pvluew>

For correspondence: Ekaterina I. Lesnova, Research associate of the Laboratory of Cell Engineering, Gamaleya NRC of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation; 123098, Moscow, Russia. E-mail: wolf252006@yandex.ru

Information about the authors:

Lesnova E.I., <https://orcid.org/0000-0002-2801-6843>

Masalova O.V., <https://orcid.org/0000-0001-5571-5669>

Permyakova K.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-3579-4416>

Demidova N.A., <https://orcid.org/0000-0003-1961-9789>

Valuev-Elliston V.T., <https://orcid.org/0000-0003-0365-570X>

Ivanov A.V., <https://orcid.org/0000-0002-5659-9679>

Kushch A.A., <https://orcid.org/0000-0002-3396-5533>

Contribution: Lesnova E.I. – conducting of the experiments, analysis and interpretation of the data, preparing of the text; Masalova O.V. – the study concept design, analysis and interpretation of the data, preparing of the text; Permyakova K.Yu. – conducting of the experiments; Demidova N.A. – conducting of the experiments; Valuev-Elliston V.T. – conducting of the experiments; Ivanov A.V. – conducting of the experiments, review and editing; Kushch A.A. – the study concept design, preparing of the text, review and editing.

Funding. The research was funded by the state budget.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

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, July 23, 2010). The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Gamaleya NRC of Epidemiology and Microbiology (Protocol No 10 dated June 7, 2021).

Received 28 June 2023
Accepted 16 August 2023
Published 31 August 2023

Введение

Гепатит С, вызываемый вирусом гепатита С (ВГС), признан одной из главных причин хронических заболеваний печени, включая терминальные стадии – цирроз и гепатокарциному. До 80% случаев острого гепатита С переходят в хроническую форму, вызывая хронический гепатит С [1, 2]. Около 10 лет назад были разработаны препараты прямого противовирусного действия (ПППД), блокирующие репликацию ВГС; их применение позволило добиться устойчивого исчезновения вируса из периферической крови более чем у 90% пациентов. Однако со временем появились факты, показывающие, что проблема гепатита С еще не решена. Так, ПППД крайне дороги, что делает лечение малодоступным. Недостаточно изучены отдаленные последствия, так как у ряда пациентов ВГС определяется в печени и в клетках крови после исчезновения вирусной РНК из плазмы периферической крови [3]. После лечения ПППД сохраняются изменения в эпигенетическом статусе и сигнальных путях, вызванные ВГС [4]. Отмечено появление резистентности к ПППД [5]. Уже известно о некоторых побочных эффектах лечения этими препаратами, таких как мутации ВГС, реактивация других вирусов [6]. В связи с этим исследования по созданию профилактических и терапевтических вакцин против гепатита С, начатые со времени открытия ВГС в 1989 г. и приостановленные после создания ПППД, в последние годы интенсифицировались. В настоящее время полагают, что отсутствие вакцин – главное препятствие для контроля за гепатитом С [7].

Для создания вакцин против гепатита С используют разные подходы, включающие разработку генно-инженерных вирусспецифических компонентов. Рекомбинантные вирусные белки как компоненты субъединичных вакцин более безопасны по сравнению с ослабленными или полностью инактивированными цельновирионными вакцинами, однако они характеризуются более слабой иммуногенностью и требуют усиления эффективности за счет адъювантов. Распространенные лицензированные адъюванты на основе солей алюминия или водно-масляных эмульсий в основном приводят к индукции иммунитета по Th2-типу, и в итоге иммунитет направлен преимущественно на усиление образования антител [8]. Однако при большинстве вирусных инфекций критичен не толь-

ко гуморальный, но и клеточный иммунный ответ. Для гепатита С показано, что эффективная вакцина, помимо нейтрализующих антител к поверхностным белкам E1 и E2, должна стимулировать мощный, мультиэпитопный и функциональный иммунный ответ Th1-направленности, основными мишенями для которого служат относительно консервативные неструктурные белки NS3, NS4A/B, NS5A и NS5B ВГС [9]. Антигенные и иммуногенные свойства индивидуальных неструктурных белков ВГС недостаточно изучены, в то же время такие данные необходимы для разработки специфических компонентов вакцины.

В активации иммунного ответа ключевую роль играют рецепторы распознавания образов (pattern-recognition receptors – PRRs), которые обнаруживают молекулярные структуры, ассоциированные с патогенами (PAMPs). К PRRs принадлежат семейства Toll-подобных рецепторов (TLR) и NOD-подобных рецепторов (NLR). В отличие от TLR – трансмембранных рецепторов, связанных с плазматическими мембранами, NLR являются внутриклеточными PRR, что позволяет обнаруживать нуклеиновые кислоты вирусов на разных стадиях их жизненного цикла [10]. TLR4 взаимодействует с липополисахаридами (ЛПС) клеточной стенки бактерий и индуцирует сильный иммунный ответ на введение антигенов различной природы [11]. В России разрешен для применения в качестве лекарственного препарата лиганд TLR4 Пирогенал (ПГ) производства филиала «Медгамал» ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России – ЛПС, выделенный из клеток *Salmonella typhi*. NLR распознают в цитоплазме инфицированной клетки пептидогликаны бактерий, а также вирусные РНК, в том числе геномную РНК ВГС [12]. Иммунологическая активность пептидогликанов определяется минимальной структурной единицей – мурамил дипептидом (МДП). Помимо МДП известны и другие агонисты NLR, в том числе различные синтетические и комплексные производные МДП, направленные на нуклеотидсвязывающий домен олигомеризации, содержащий либо белок 1 (NOD1), либо белок 2 (NOD2). Один из новых препаратов – Полимурамил (ПМ) производства ЗАО НПК «Комбиотех» (Россия), он содержит три фрагмента пептидогликана клеточной стенки бактерий *S. typhi*, что обеспечивает его преимущество перед другими агонистами NLR за счет взаимодействия с двумя

рецепторами – NOD1 и NOD2 [13]. На разных моделях *in vitro* и *in vivo* показано, что взаимодействие между рецепторами NOD1 и TLR4 или NOD2 и TLR4 способно вызвать синергетическую активацию иммунного ответа [14]. Накопленные данные позволяют рассматривать PRRs как потенциальные терапевтические мишени при вирусных инфекциях, а также в качестве адъювантов к вакцинам [15].

Действие комбинации агонистов рецепторов TLR4 и NOD1 + NOD2 на иммунизацию индивидуальными рекомбинантными неструктурными белками ВГС не изучено. В то же время перечисленные выше данные позволяют предположить, что взаимодействие рецепторов в индукции иммунных процессов может привести к усилению иммунного ответа на антигены ВГС *in vivo*.

Цель работы – определить способность доступных фармакологических препаратов ПМ и ПГ усиливать гуморальный и клеточный ответы индивидуально и при сочетанном применении для иммунизации мышей разных инбредных линий рекомбинантными белками NS3, NS4A/B и NS5B ВГС для оценки возможности их применения в качестве комплексного адъюванта к вакцине против гепатита С.

Материалы и методы

Рекомбинантные белки NS3 (1356–1459 а.о.), NS4 (1677–1754 а.о.) и NS5B (2420–2990 а.о.), генотип 1b ВГС, использовали как иммуногены для иммунизации мышей, как антигены для стимуляции Т-клеточных реакций *in vitro*, а также как сорбенты при иммуноферментном анализе (ИФА) для оценки продукции антител. Белки были очищены методом аффинной хроматографии, их свойства описаны ранее [16–18]. Концентрацию белка определяли с использованием реактива Брэдфорда (Merck Sigma-Aldrich, США).

Препараты. В качестве потенциальных адъювантов использовали 2 препарата со свойствами иммуномодуляторов: ПМ, представляющий собой высокоочищенную смесь трех активных компонентов, выделенных из пептидогликана клеточной стенки грамотрицательных бактерий *S. typhi* (200 мкг/0,5 мл, серия 011-0219); ПГ – ЛПС, выделенный из бактерий *S. typhi* (100 мкг/мл, серия 164). Препараты были приобретены в аптечной сети.

Мыши. Для экспериментов *in vivo* использовали самок инбредных мышей трех линий – BALB/c (H-2d), DBA/2J (H-2d) и C57BL/6 (H-2b) (возраст 6–8 недель, средняя масса 20±3 г), полученных из питомника лабораторных животных «Столбовая».

Иммунизация мышей. Проводили несколько серий экспериментов по испытанию иммуностимулирующей активности ПМ и ПГ на модели рекомбинантных неструктурных белков ВГС NS3, NS4 и NS5B. Белки в дозе 4 мкг/мышь вводили подкожно в корень хвоста трехкратно с интервалом 2 недели без адъювантов в физиологическом растворе (ф/р) или в смеси с ПМ и/или ПГ, как описано в разделе «Результаты». Контрольным группам мышей вводили ф/р в те же сроки. Оценка иммунного ответа проводили через 9–13 суток после последней иммунизации.

Оценка иммунного ответа. Гуморальный ответ. Активность взаимодействия антител к белкам ВГС в сыворотках крови мышей с антигенами ВГС определяли методом непрямого ИФА. 96-луночные планшеты сенсibilizировали рекомбинантными белками в фосфатно-солевом буфере в концентрации 1 мкг/мл. В качестве вторичных антител использовали антитела к иммуноглобулинам мыши изотипов IgG1 и IgG2a, конъюгированные с пероксидазой хрена (Jackson ImmunoResearch Laboratories, США), в качестве субстрата пероксидазы – тетраметилбензидин (Sigma, США); оптическую плотность измеряли при 450 нм. За титр сывороток в ИФА принимали предельное разведение сыворотки крови, при котором значение оптической плотности при A_{450} в 2 раза превышало значение для контрольного образца (сыворотка крови неиммунизированных мышей).

Т-клеточные реакции на специфический антиген *in vitro* оценивали в реакции бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) и по секреции ими цитокина IFN- γ . Для получения лимфоцитов селезенки диспергировали, клеточные суспензии процеживали через ситечки с размером пор 100 мкм (BD Falcon Cell strainers), дважды отмывали в среде RPMI-1640 («ПанЭко», Россия). Лимфоциты помещали в 96-луночные культуральные панели по 5×10^6 клеток в лунку в среде RPMI-1640, содержащей 20% эмбриональной телячьей сыворотки (Invitrogen, США), 2 мМ глутамин, 4,5 г/л глюкозы, 50 мкг/мл гентамицина, 0,2 ед/мл инсулина. К клеткам добавляли стимуляторы – соответствующие рекомбинантные белки NS3, NS4 или NS5B в конечных концентрациях 1 мкг/мл и культивировали при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ в течение 5 суток. В качестве отрицательных контролей использовали, во-первых, клетки селезенки неиммунных мышей, стимулированные теми же антигенами, во-вторых, нестимулированные клетки селезенки иммунизированных мышей. Результаты РБТЛ выражали в виде индекса стимуляции пролиферации (ИСП) – отношения среднего количества лимфобластов в присутствии стимуляторов к среднему количеству лимфобластов в отсутствие стимуляторов (лунки со средой).

Измерение концентрации цитокинов в культуральных жидкостях, полученных после стимуляции лимфоцитов, проводили методом ИФА с помощью наборов для определения IFN- γ (Mouse IFN- γ ELISA development kit (HRP), Mabtech, Швеция) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Концентрацию цитокинов определяли по калибровочным кривым стандартных образцов. Предел чувствительности для IFN- γ составлял 2 пг/мл.

Для статистической обработки результатов использовали программы Statistica 8 и GraphPad Prism 8. Данные представляли как среднее (или среднее геометрическое для титров антител) ± стандартное отклонение (SD). Для сравнения параметрических количественных данных использовали t-test (критерий Стьюдента), непараметрических – U-test (критерий Манна–Уитни). Различия показателей считали

статистически значимыми при $p < 0,05$. Для оценки сочетанного действия двух соединений на усиление иммунного ответа при введении животным рекомбинантных белков ВГС вычисляли индексы синергизма (ИС) по формуле:

$$\text{ИС} = \frac{\text{Параметр (ПМ, ПГ)}}{[\text{Параметр (ПМ)} + \text{Параметр (ПГ)}]}$$

где Параметр (ПМ, ПГ) – параметр иммунного ответа при иммунизации сочетанием ПМ и ПГ, Параметр (ПМ) и Параметр (ПГ) – параметры иммунного ответа при иммунизации ПМ и ПГ отдельно. Взаимодействие соединений ПМ и ПГ считали синергетическим при $\text{ИС} > 1$ с достоверностью $p < 0,05$ в t-тесте Стьюдента.

Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus Author Guidelines for Animal Use (IAVES, July 23, 2010). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (Протокол № 10 от 07.06.2021).

Результаты

1. Действие полимурамила на иммунный ответ мышей разных инбредных линий при иммунизации белком NS5B ВГС

Для оценки адъювантных свойств ПМ при иммунизации рекомбинантным белком NS5B использовали 3 линии мышей – BALB/c, DBA/2J и C57BL/6. Белок вводили мышам в ф/р и в смеси с ПМ в концентрации 20 мкг/мышь трехкратно с интервалом 2 недели. Оптимальная концентрация ПМ была определена в предварительных экспериментах путем сравнительного анализа иммунного ответа мышей на действия ПМ в концентрациях 4, 20 и 100 мкг/мышь. Через 9 суток после последней инъекции учитывали иммунный ответ индивидуально для каждой мыши

(8 животных в каждой группе). Результаты представлены в **таблице 1**.

Титры антител к белку NS5B изотипа IgG1 в группе мышей DBA/2J и C57BL/6, иммунизированных без адъювантов, достигали $1 : 10^4$ и не увеличивались при добавлении к антигену ПМ; у мышей BALB/c активность антител была в 50–100 раз меньше ($p < 0,05$, табл. 1) и также не изменялась при добавлении ПМ. Концентрация антител IgG2a была значительно ниже по сравнению с IgG1 (около $1 : 200$) у мышей всех исследованных линий и не изменялась при применении ПМ. Наиболее активная пролиферация лимфоцитов в ответ на стимуляцию NS5B показана у мышей линии BALB/c, однако статистически достоверных различий по сравнению с другими линиями не обнаружено. Иммунизация NS5B в смеси с ПМ пятикратно увеличивала ИСП у мышей линии C57BL/6 ($p < 0,05$), но не влияла на пролиферацию в других группах. Выработка IFN- γ в ответ на стимуляцию лимфоцитов NS5B была в 20–50 раз выше у мышей BALB/c и DBA/2J, иммунизированных белком без адъюванта, по сравнению с C57BL/6 ($p < 0,05$); использование ПМ в этой группе в 20 раз увеличивало секрецию цитокина. Таким образом, активность антител IgG1 в ответ на белок NS5B без адъюванта у мышей BALB/c была значительно ниже, тогда как секреция IFN- γ – значительно выше, чем у мышей C57BL/6. Адъювантные свойства ПМ проявлялись только у мышей C57BL/6, при этом значительно повышался только клеточный иммунный ответ. Дальнейшие эксперименты проводили с использованием мышей этой линии.

В контрольных группах мышей иммунный ответ на NS5B отсутствовал, все показатели были на уровне фоновых значений (результаты не показаны).

2. Влияние пирогенала на иммунный ответ мышей C57Bl/6 при иммунизации белком NS5B ВГС

Иммуностимулирующую способность ПГ анализировали при иммунизации мышей линии C57BL/6 бел-

Таблица 1. Иммунный ответ мышей разных линий на иммунизацию рекомбинантным белком NS5B ВГС с полимурамилом

Table 1. Immune response of mice of different lines to immunization with recombinant HCV NS5B protein with polymuramyl

Показатель Parameter		Мыши линии BALB/c BALB/c mice		Мыши линии DBA/2J DBA/2J mice		Мыши линии C57BL/6 C57BL/6 mice	
		ф/р saline	ПМ PM	ф/р saline	ПМ PM	ф/р saline	ПМ PM
Титр антител к NS5B Titer of antibodies to NS5B	IgG1	132 ± 80*	200 ± 66	10125 ± 3200*	9040 ± 2560	8226 ± 1850*	9979 ± 2340
	IgG2a	229 ± 78	174 ± 73	250 ± 100	720 ± 400	200 ± 56	150 ± 78
Пролиферация лимфоцитов (ИСП) Lymphocyte proliferation (SI)		3,0 ± 0,7	2,6 ± 0,5	1,8 ± 0,4	1,6 ± 0,3	2,0 ± 0,4**	10,1 ± 2,7**
Секреция IFN- γ (пг/мл) IFN- γ secretion (pg/mL)		1580 ± 223*	1700 ± 294	725 ± 120*	920 ± 185	34 ± 15*, **	781 ± 154**

Примечание. ф/р – иммунизация NS5B без адъюванта; ПМ – иммунизация NS5B в смеси с полимурамилом в дозе 20 мкг/мышь; ИСП – индекс стимуляции пролиферации; * $p < 0,05$ между линиями мышей; ** $p < 0,05$ между показателями в группах, иммунизированных с ф/р и с ПМ.

Note. Saline – immunization with NS5B without adjuvant; PM – immunization with NS5B in a mixture with polymuramyl at a dose of 20 $\mu\text{g}/\text{mouse}$; SI – stimulation index; * $p < 0.05$ between mouse lines; ** $p < 0.05$ between parameters in groups immunized with saline and with PM.

ком NS5B. Белок вводили либо без адъюванта (ф/р), либо с добавлением ПГ в концентрациях 1, 5 или 15 мкг/мышь (8 животных в каждой группе). Сравнивали титры антител к NS5B и продукцию IFN- γ в ответ на антигенспецифическую стимуляцию (рис. 1).

Установлено, что ПГ повышал выработку антител изотипа IgG1 к NS5B, максимальное увеличение антител было зарегистрировано при введении 15 мкг/мышь, титр антител увеличивался в 12 раз (рис. 1 а). Аналогичная картина наблюдалась при оценке результатов продукции IFN- γ спленоцитами: ПГ статистически значимо индуцировал секрецию IFN- γ при всех использованных дозах, максимальная концентрация цитокина наблюдалась при дозе 15 мкг/мышь – усиление в 150 раз (рис. 1 б).

На основании полученных данных для использования ПГ в качестве адъюванта при иммунизации животных рекомбинантными белками ВГС была выбрана доза 15 мкг/мышь, или 0,75 мг/кг массы тела.

3. Иммунный ответ мышей на рекомбинантные белки NS3 и NS4 ВГС при иммунизации с полимурамилом в сочетании с пирогеналом

Представлялось важным определить, обладают ли ПМ и ПГ иммуностимулирующими свойствами при введении мышам других рекомбинантных белков ВГС. Мышей C57BL/6 иммунизировали трехкратно подкожно белками NS3 и NS4 ВГС (4 мкг/мышь) в смеси с ПМ (20 мкг/мышь), ПГ (15 мкг/мышь) и их сочетанием. Результаты сравнивали с показателями в группе, которой белки вводили в ф/р.

При иммунизации мышей белком NS3 обращает на себя внимание, что он индуцирует в 20 раз большие титры антител изотипа IgG1 по сравнению с белком NS5B при иммунизации без адъювантов (около $1 : 1,6 \times 10^5$, $p < 0,05$, табл. 1 и рис. 2 а).

ПМ и в большей степени ПГ увеличивали активность антител IgG1 ($p < 0,05$). Антитела к NS3 изотипа IgG2a характеризовались меньшими титрами по сравнению с IgG1, применение ПГ их увеличивало ($p < 0,05$, рис. 2 б). На параметры клеточного ответа ни ПМ, ни ПГ не влияли (рис. 2 в, г). Сочетанное применение ПМ и ПГ статистически значимо повышало все исследованные показатели гуморального и клеточного иммунного ответа на белок NS3 ($p < 0,05$, рис. 2 а–г).

На модели белка NS4 показано, что титры антител изотипа IgG1 были в 3 раза выше по сравнению с NS3 и в 50 раз – с NS5B ($1 : 4,5 \times 10^5$, $p < 0,05$, табл. 1, рис. 2 а и рис. 3 а). ПМ не влиял на показатели иммунного ответа, ПГ повышал клеточный ответ (рис. 3 в, г). Иммунизация NS4 в смеси с ПМ и ПГ статистически значимо увеличивала титры антител изотипа IgG2a, пролиферацию лимфоцитов и секрецию ими IFN- γ в ответ на антигенспецифическую стимуляцию *in vitro* (рис. 3 б–г).

Для оценки сочетанного действия двух соединений на иммунный ответ при введении животным рекомбинантных белков ВГС вычисляли ИС. Анализ полученных данных, представленных в таблице 2, показывает, что усиление иммунного ответа на рекомбинантные белки ВГС в большинстве случаев является результатом синергизма ПМ и ПГ: эффект от их комбинированного действия значительно превышает эффект каждого из них по отдельности.

Обсуждение

В настоящей работе для изучения адъювантных свойств ПМ и ПГ в качестве антигенов использовали неструктурные белки ВГС NS3, NS4A/B и NS5B. Анализ роли этих белков в жизненном цикле ВГС показал, что неструктурные белки формируют репликативный

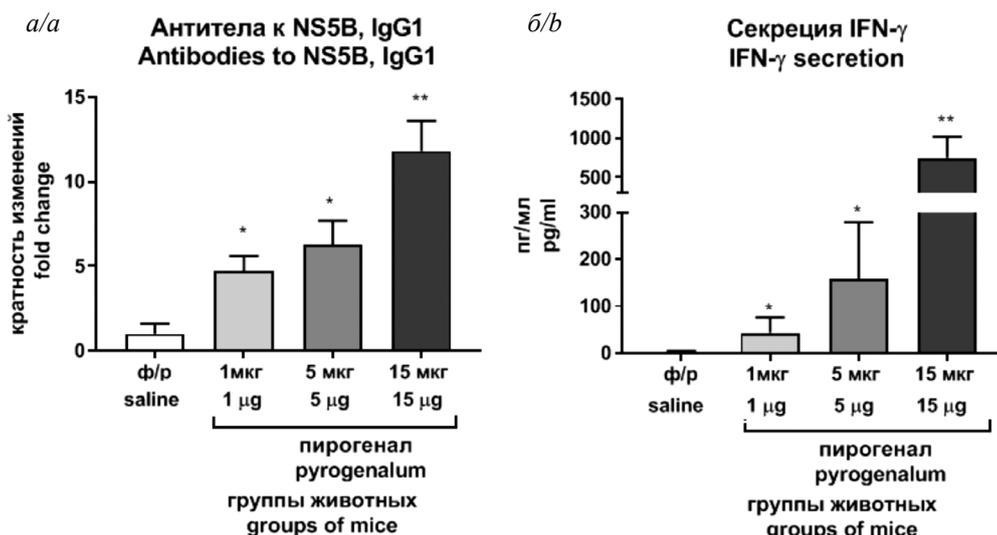


Рис. 1. Гуморальный (а) и клеточный (б) ответ мышей C57BL/6 на рекомбинантный белок NS5B ВГС, введенный с пирогеналом.

* $p < 0,05$ по сравнению с группой мышей, иммунизированных с ф/р; ** $p < 0,05$ по сравнению с остальными группами мышей.

Fig. 1. Humoral (a) and cellular (b) response of C57BL/6 mice to recombinant HCV NS5B protein injected with pyrogenal.

* $p < 0.05$ compared to the group to which NS5B was administered with saline solution (saline); ** $p < 0.05$ compared to other groups of mice.

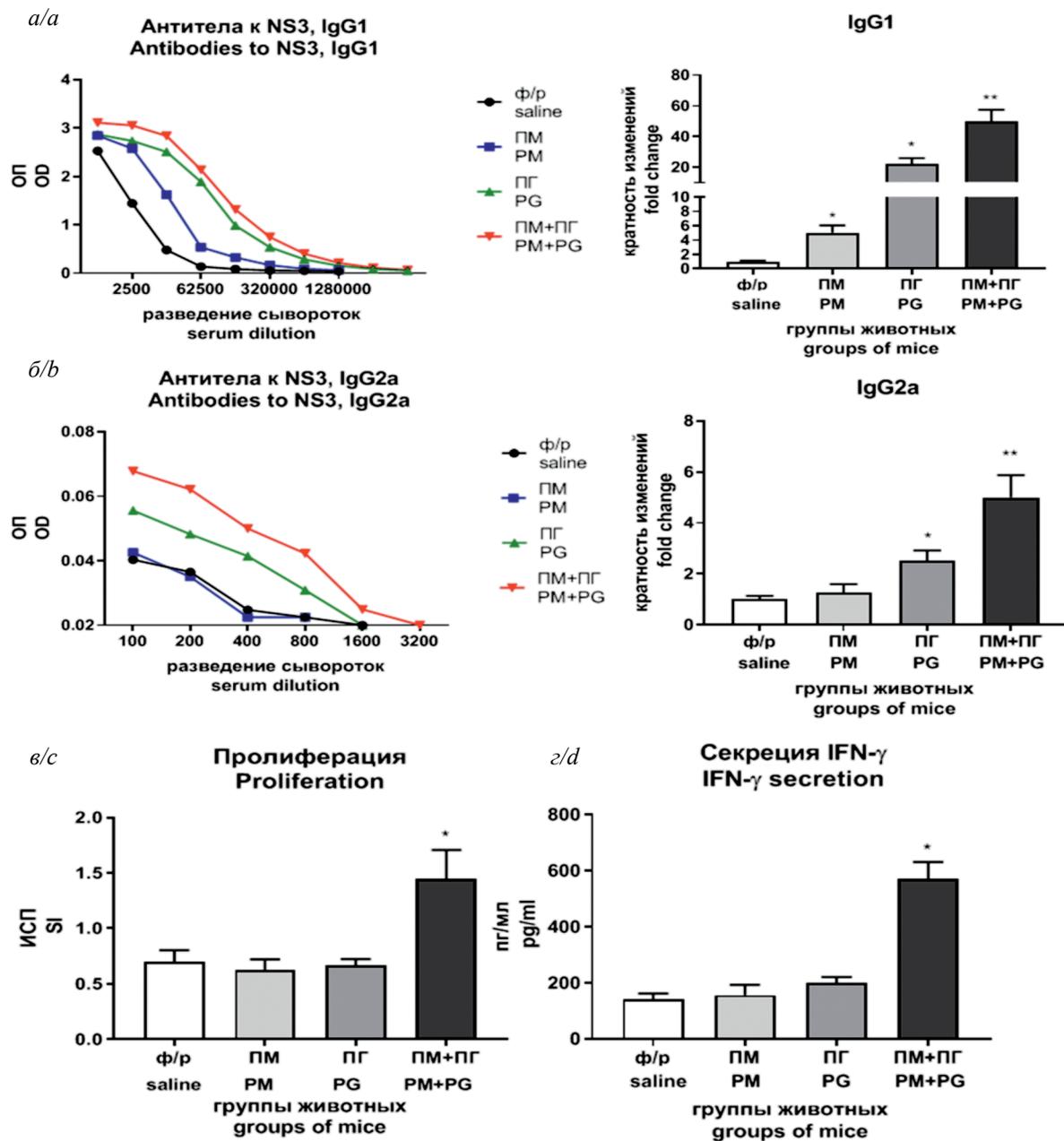


Рис. 2. Усиление гуморального (а, б) и клеточного (в, г) ответа мышей на рекомбинантный белок NS3 ВГС при сочетанном использовании полимурамила и пирогенала в качестве адъювантов.

ОП – оптическая плотность при 450 нм; ИСП – индекс стимуляции пролиферации. * $p < 0,05$ по сравнению с группой мышей, иммунизированных с ф/р; ** $p < 0,05$ по сравнению с остальными группами мышей.

Fig. 2. Enhancement of the humoral (a, b) and cellular (c, d) response of mice to the recombinant HCV NS3 protein with the combined use of polymuramyl and pyrogenalum as adjuvants.

OD – optical density at 450 nm; SI – stimulation index. * $p < 0.05$ compared to the group to which NS3 was administered with saline solution (saline). ** $p < 0.05$ compared to other groups of mice.

комплекс и необходимы для амплификации вирусного генома [19]. NS3 содержит протеазный и геликазный домены, обеспечивающие процессинг полипротеина ВГС и раскручивание вторичных структур РНК соответственно. NS4A – кофактор протеазы NS3, NS4B участвует в формировании везикул, которые служат органеллами репликации, NS5B выполняет функцию РНК-зависимой РНК-полимеразы. Известно, что не-

структурные белки ВГС являются привлекательными компонентами для разработки вакцин. В то же время антигенные и иммуногенные свойства неструктурных белков недостаточно изучены. Ранее мы установили, что иммунизация мышей C57Bl/6 рекомбинантным белком NS5B без адъюванта индуцирует слабый Т-клеточный и В-клеточный ответы [20]. Эти данные подтвердились при сравнительном анализе ответа

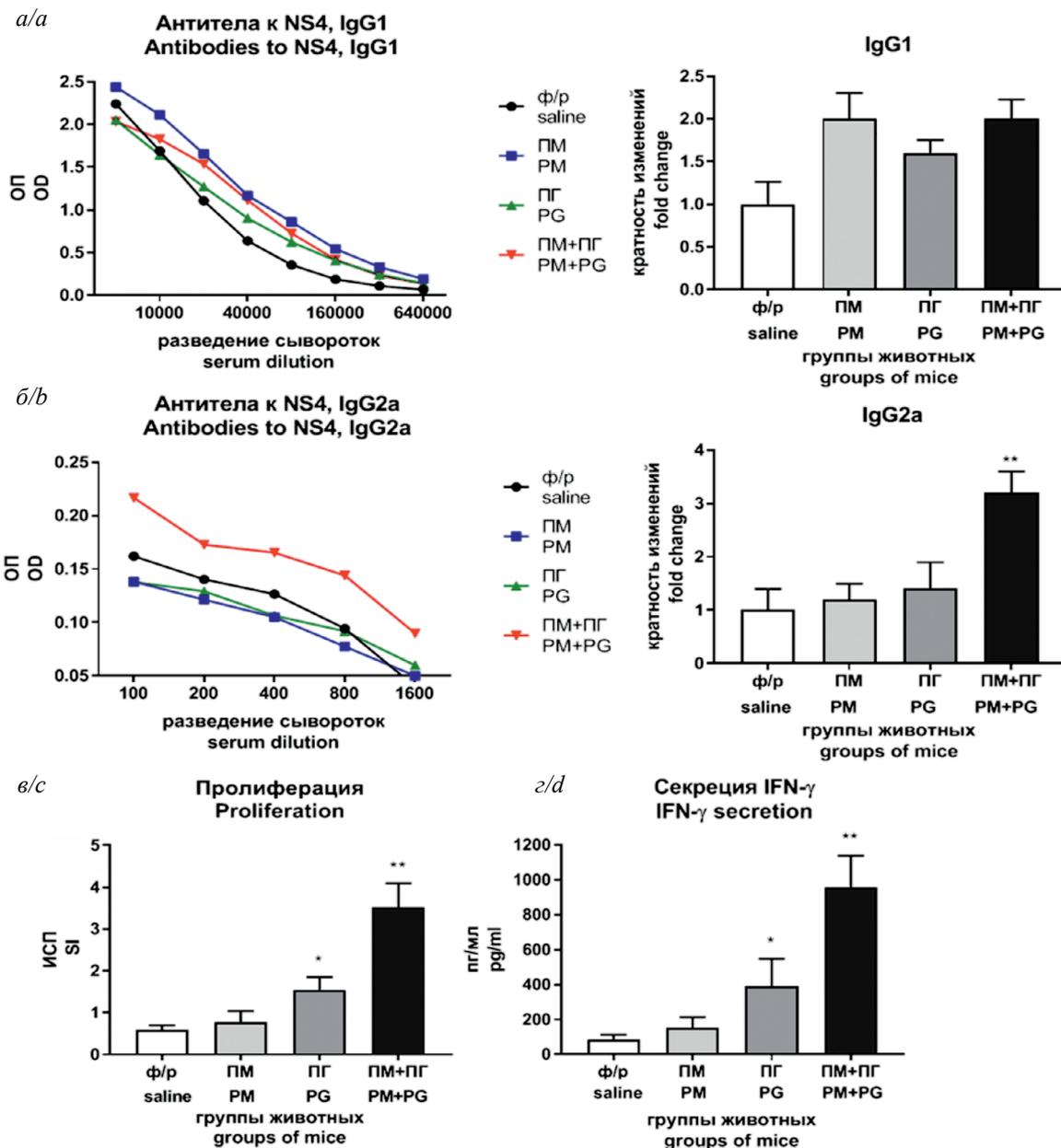


Рис. 3. Усиление гуморального (а, б) и клеточного (в, г) ответа мышей на рекомбинантный белок NS4 ВГС при сочетанном использовании полимурамила и пирогенала в качестве адъювантов.

ОП – оптическая плотность при 450 нм; ИСП – индекс стимуляции пролиферации. * $p < 0,05$ по сравнению с группой мышей, иммунизированных с ф/р; ** $p < 0,05$ по сравнению с остальными группами мышей.

Fig. 3. Enhancement of the humoral (a, b) and cellular (c, d) response of mice to the recombinant HCV NS4 protein with the combined use of polymuramyl and pyrogenalum as adjuvants.

OD – optical density at 450 nm; SI – stimulation index. * $p < 0.05$ compared to the group to which NS4 was administered with saline solution (saline); ** $p < 0.05$ compared to other groups of mice.

мышей C57Bl/6 на рекомбинантные белки NS3 и NS4. Представляло интерес определить влияние ПМ и ПГ на иммуногенные свойства этого белка – ключевого компонента репликативного комплекса. Показано, что этот белок способен активировать один из NLR – NOD1 [12]. В настоящей работе выявлено, что низкий уровень Т-клеточного ответа на NS5B без адъювантов под действием ПМ значительно повышается, однако уровень анти-NS5B антител не изменяется (табл. 1).

ПГ при иммунизации мышей C57Bl/6 повышал показатели обоих звеньев иммунитета: активность антител к NS5B в 12 раз и уровень секреции ИФН-γ более чем в 150 раз (рис. 1).

Иммунизация белком NS5B мышей двух других часто используемых линий BALB/c и DBA/2J показала, что ПМ не оказывал адъювантного действия ни на один из изученных показателей иммунитета этих мышей. Следует отметить, что ответ на рекомбинантный

Таблица 2. Синергетическое усиление иммунного ответа на рекомбинантные белки ВГС при сочетании действия полимурамила и пирогенала

Table 2. Synergistic enhancement of the immune response to recombinant HCV proteins with the combined action of polymuramyl and pyrogenalum

Белок ВГС для иммунизации мышей HCV protein for mice immunization	Параметры иммунного ответа Parameters of the immune response			
	пролиферация лимфоцитов lymphocyte proliferation	секреция IFN- γ IFN- γ secretion	титр антител изотипа IgG1 titer of antibodies, IgG1	титр антител изотипа IgG2a titer of antibodies, IgG2a
NS3	1,12 \pm 0,5 ^a	1,62 \pm 0,51*	1,85 \pm 0,69*	1,33 \pm 0,21*
NS4	1,38 \pm 0,28*	1,75 \pm 0,63*	0,60 \pm 0,41	1,39 \pm 0,27*

Примечание: ^a – индексы синергизма (M \pm SD); * – отличие от 1, $p < 0,05$ (объяснения см. в разделе «Материалы и методы»).

Note: ^a – values of the combination indices (M \pm SD); * – difference from 1, $p < 0.05$ (for explanations see Materials and methods).

белок NS5B без адьюванта значительно отличался у мышей разных линий. Так, уровень секреции IFN- γ у мышей BALB/c и DBA/2J был в среднем в 30 раз выше, чем у мышей C57Bl/6 (табл. 1). Индукция анти-NS5B антител IgG1, напротив, у мышей BALB/c (H-2d) была в 62 раза ниже по сравнению с мышами C57Bl/6 (H-2b) и в 77 раз ниже, чем у мышей DBA/2J, относящихся к тому же гаплотипу (H-2d).

Различие иммунного ответа мышей разных инбредных линий отмечено при воздействии различных бактериальных и вирусных инфекций. Во многих работах отмечено, что мыши BALB/c или DBA более восприимчивы к бактериальным инфекциям, чем C57Bl/6, например, при заражении *Listeria monocytogenes* [21] или *Mycoplasma pulmonis* [22]. Однако при заражении *S. enterica* Serovar *Typhimurium*, напротив, мыши C57Bl/6 оказались более чувствительны, а мыши BALB/c более устойчивы к бактериальному заражению [23]. Ответ на вирусные инфекции также различался у лабораторных мышей разных линий. Так, мыши DBA/2J были в 1000 раз более чувствительны к вирусу гриппа A/Puerto Rico/8/1934, чем мыши C57Bl/6J [24, 25]. Принципиально сходные данные получены при сравнении иммунного ответа мышей BALB/c и C57Bl/6J на респираторно-синцитиальный вирус [26], на инактивированный вирус Денге [27], на аденоассоциированный вирус AAV6, содержащий ген ACE2, кодирующий клеточный рецептор SARS-CoV-2 [28]. Интересно, что различия в иммунном ответе обнаружены также между мышами BALB/c и DBA/2J, относящимися к одному гаплотипу 2d. Например, при заражении *M. pneumoniae* клеточный ответ значительно повышался у мышей DBA/2 по сравнению с мышами BALB/c [29]. Клетки, выделенные из лимфоузлов мышей DBA/2, иммунизированных модельным антигеном моллюска KLH, продуцировали до 30 раз больше интерлейкинов (IL)-12, чем клетки мышей BALB/c, рестимулированные *in vitro* в тех же условиях [30].

Различия в иммунных ответах мышей разных линий объясняют направленностью Т-клеточных реакций у мышей BALB/c по Th2-типу, тогда как у мышей C57Bl/6 – по Th1-типу [31, 32]. В первом случае индуцируются преимущественно гены противовоспалительных цитокинов (IL-4, IL-10 и IL-13), во втором – гены провоспалительных цитокинов (TNF- α и IFN- γ).

Различные цитокиновые профили являются важными факторами, определяющими чувствительность или резистентность к инфекциям или вакцинам. Эффективность вакцины зависит также от субтипа антител, индуцируемых вакцинацией, поскольку подклассы IgG различаются по своей биологической функции. В то же время мыши разных линий могут продуцировать различные уровни и типы антител. К такому выводу пришли авторы, использовавшие 28 видов инбредных и нелинейных «диких» мышей для иммунизации бесклеточной коклюшной вакциной [33]. Генетические различия мышей вносили значительный вклад в величину и продолжительность активности антител субтипов IgG1, IgG2b и IgG3, индуцированных вакциной. Анализируя причины иммунной гетерогенности, можно констатировать, что точный генетический механизм, регулирующий иммунный ответ и восприимчивость к инфекциям у разных линий мышей, до конца не выяснен. Таким образом, данные, полученные нами и другими авторами, указывают на необходимость изучения вклада генетических факторов как для выбора оптимальной животной модели, так и для оценки эффективности вакцины с использованием различных инбредных или нелинейных мышей.

Параметры врожденного иммунного ответа при инфекциях в значительной степени определяются взаимодействиями PRR. В частности, хорошо известным синергетическим взаимодействием является взаимодействие между TLR и членами семейства NOD-подобных рецепторов (NOD1 и NOD2), которые распознают определенные фрагменты бактериального пептидогликана: NOD1 – γ -d-glutamyl-meso-diaminopimelic acid (iE-DAP), NOD2 – L-Ala-D-isoGln [34, 35]. Синергетические взаимодействия NODs и TLRs могут быть использованы в терапевтических целях для повышения устойчивости организма хозяина к патогенам. Например, комбинация агонистов NOD1 и TLR5 обеспечивала 80%-ную устойчивость к смертельной дозе *S. typhimurium*, тогда как каждый отдельный компонент не проявлял протективных свойств [36]. В другой работе этих авторов показано, что комбинированная стимуляция PRRs из разных семейств (NOD2 и TLR4) обуславливает более сильную активацию адаптивного иммунитета по сравнению с воздействием на каждый отдельный PRR. Иммунизация модельным антигеном овалбумином

с агонистом TLR4 (MPLA) и агонистом NOD2 (MDP) синергетически усиливала гуморальный и клеточный иммунные ответы [37]. Адьювантный эффект при иммунизации мышей антигеном вируса гриппа совместно с агонистами TLR4 и NOD2 обеспечивал усиление иммуногенности и защиту животных от летальной вирусной инфекции [38].

В то же время показано, что комбинированные действия агонистов семейств TLR и NOD могут приводить не только к синергетической, но также к аддитивной индукции иммунных реакций (например, в макрофагах *in vitro*), а при некоторых условиях даже подавлять иммунный ответ друг друга [14, 39]. В связи с этим очевидно, что изучение сочетанного действия кандидатных адьювантов необходимо при разработке вакцин к каждому конкретному патогену. Тем более, что механизмы синергетических взаимодействий NOD–TLR изучены недостаточно. Авторы обсуждают разные возможные механизмы синергии [40]. Одна из гипотез основана на изучении сигнальных путей PRR. Предполагают, что синергия между парами PRR возникает, если два рецептора сначала используют разные проксимальные адапторы, а затем совместно – дистальные части молекулярных путей [41]. Агонисты TLR4- и NOD1-рецепторов передают сигналы разными путями: Rip2 – для сигнального пути NOD1 и NOD2 [42], MyD88 и TRIF – для TLR4 [43]. Потенциально агонисты NOD1 и TLR4 в сочетании могут повышать экспрессию более широкого набора генов, которые взаимно усиливают передачу сигналов. В работе [14] детально анализировали стимуляцию клеток агонистами NOD1 и TLR4 в динамике на примере макрофагов. Изучение сигнальных путей показало сложность ответа макрофагов человека на комбинацию агонистов NOD1 и TLR4. Установили, что до поступления сигнала активации в ядро синергия между двумя рецепторами не возникает. Однако на выходе сигнала из ядра наблюдается синергетическая активация NOD1- и TLR4-индуцируемых генов. Анализ результатов приводит к заключению, что синергия агонистов рецепторов, относящихся к разным семействам, является результатом многих пока не до конца изученных процессов. Выяснение молекулярных путей и взаимодействия генов в регуляции синергии позволит создать высокоэффективные комплексные адьюванты и разработать субъединичные вакцины, не уступающие по силе иммунного ответа, но более безопасные по сравнению с аттенуированными или инактивированными цельновирионными вакцинами.

Выводы

1. Показаны различные антигенные и иммуногенные свойства рекомбинантных неструктурных белков NS3, NS4 и NS5B репликативного комплекса ВГС, что с учетом разных функций этих белков в репликации вируса свидетельствует о целесообразности их сочетанного использования в составе субъединичных вакцин.

2. Рекомбинантные неструктурные белки ВГС проявляют различную иммуногенность при введении мышам разных инбредных линий (DBA/2J, BALB/c, C57Bl/6) как различающихся по антигенам главного комплекса гистосовместимости (гаплотипы H-2b и H-2d), так и относящихся к одному гаплотипу. Это указывает на необходимость использования животных разных инбредных линий или нелинейных животных при анализе эффективности субъединичных вакцин.

3. Доступные отечественные препараты ПГ и ПМ оказывают синергетическое усиление В-клеточного и Т-клеточного иммунного ответа при иммунизации неструктурными белками ВГС и открывают перспективу создания на их основе комплексного адьюванта в составе кандидатной субъединичной вакцины против гепатита С.

ЛИТЕРАТУРА

1. Park S.H., Rehermann B. Immune responses to HCV and other hepatitis viruses. *Immunity*. 2014; 40(1): 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.12.010>
2. Dustin L.B. Innate and adaptive immune responses in chronic HCV infection. *Curr. Drug Targets*. 2017; 18(7): 826–43. <https://doi.org/10.2174/1389450116666150825110532>
3. Wang Y., Rao H., Chi X., Li B., Liu H., Wu L., et al. Detection of residual HCV-RNA in patients who have achieved sustained virological response is associated with persistent histological abnormality. *EBioMedicine*. 2019; 46: 227–35. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.07.043>
4. Polyak S.J., Crispe I.N., Baumert T.F. Liver abnormalities after elimination of HCV infection: persistent epigenetic and immunological perturbations post-cure. *Pathogens*. 2021; 10(1): 44. <https://doi.org/10.3390/pathogens10010044>
5. Sun D., Dai M., Shen S., Li C., Yan X. Analysis of naturally occurring resistance-associated variants to NS3/4A protein inhibitors, NS5A protein inhibitors, and NS5B polymerase inhibitors in patients with chronic hepatitis C. *Gene Expr*. 2018; 18(1): 63–9. <https://doi.org/10.3727/105221617X15100607143377>
6. Ghweil A.A., Helal M.M. Reactivation of herpesvirus in patients with hepatitis C treated with direct-acting antiviral agents. *Infect. Drug Resist*. 2019; 12: 759–62. <https://doi.org/10.2147/IDR.S184598>
7. Todryk S.M., Bassendine M.F., Bridge S.H. Revisiting the elusive hepatitis C vaccine. *Vaccines (Basel)*. 2021; 9(2): 114. <https://doi.org/10.3390/vaccines9020114>
8. Kozak M., Hu J. The integrated consideration of vaccine platforms, adjuvants, and delivery routes for successful vaccine development. *Vaccines (Basel)*. 2023; 11(3): 695. <https://doi.org/10.3390/vaccines11030695>
9. Bailey J.R., Barnes E., Cox A.L. Approaches, progress, and challenges to hepatitis C vaccine development. *Gastroenterology*. 2019; 156(2): 418–30. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.08.060>
10. Carty M., Guy C., Bowie A.G. Detection of viral infections by innate immunity. *Biochem. Pharmacol*. 2021; 183: 114316. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114316>
11. Caucheteux S.M., Hu-Li J., Mohammed R.N., Ager A., Paul W.E. Cytokine regulation of lung Th17 response to airway immunization using LPS adjuvant. *Mucosal Immunol*. 2017; 10(2): 361–72. <https://doi.org/10.1038/mi.2016.54>
12. Vegna S., Gregoire D., Moreau M., Lassus P., Durantel D., Assenat E., et al. NOD1 participates in the innate immune response triggered by hepatitis C virus polymerase. *J. Virol*. 2016; 90(13): 6022–35. <https://doi.org/10.1128/JVI.03230-15>
13. Guryanova S.V., Khaitov R.M. Strategies for using muramyl peptides – modulators of innate immunity of bacterial origin – in medicine. *Front. Immunol*. 2021; 12: 607178. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.607178>
14. Budikhina A.S., Murugina N.E., Maximchik P.V., Dagil Y.A., Nikolaeva A.M., Balyasova L.S., et al. Interplay between NOD1 and TLR4 receptors in macrophages: nonsynergistic activation of signaling pathways results in synergistic induction of proinflammatory gene expression. *J. Immunol*. 2021; 206(9): 2206–20. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2000692>

15. Hennessy C., McKernan D.P. Anti-viral pattern recognition receptors as therapeutic targets. *Cells*. 2021; 10(9): 2258. <https://doi.org/10.3390/cells10092258>
16. Абдулмеджидова А.Г., Масалова О.В., Атанадзе С.Н., Уланова Т.И., Бурков А.Н., Худяков Ю.Е. и др. Характеристика панели моноклональных антител к рекомбинантному белку NS3 вируса гепатита С. *Вопросы вирусологии*. 2002; 47(1): 21–5.
17. Ivanov A.V., Korovina A.N., Tumitskaya V.L., Kostyuk D.A., Rechinsky V.O., Kukhanova M.K., et al. Development of the system ensuring a high-level expression of hepatitis C virus nonstructural NS5B and NS5A proteins. *Protein Expr. Purif.* 2006; 48(1): 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2006.02.011>
18. Masalova O.V., Lakina E.I., Abdulmedzhidova A.G., Atanadze S.N., Semiletov Y.A., Shkurko T.V., et al. Characterization of monoclonal antibodies and epitope mapping of the NS4 protein of hepatitis C virus. *Immunol. Lett.* 2002; 83(3): 187–96. [https://doi.org/10.1016/s0165-2478\(02\)00081-0](https://doi.org/10.1016/s0165-2478(02)00081-0)
19. Li H.C., Yang C.H., Lo S.Y. Hepatitis C viral replication complex. *Viruses*. 2021; 13(3): 520. <https://doi.org/10.3390/v13030520>
20. Масалова О.В., Леснова Е.И., Андреев С.М., Шершакова Н.Н., Козлов В.В., Пермьякова К.Ю. и др. Адьювантное действие дисперсного фуллера C60 на иммунный ответ против конструкции, имитирующей аминокислотные и нуклеотидные последовательности неструктурного белка NS5B вируса гепатита С. *Вопросы вирусологии*. 2022; 67(6): 516–26. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-149> <https://elibrary.ru/laaczg>
21. Liu T., Matsuguchi T., Tsuboi N., Yajima T., Yoshikai Y. Differences in expression of toll-like receptors and their reactivities in dendritic cells in BALB/c and C57BL/6 mice. *Infect. Immun.* 2002; 70(12): 6638–45. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.12.6638-6645.2002>
22. Boonyarattanasoonthorn T., Elewa Y.H.A., Tag-El-Din-Hassan H.T., Morimatsu M., Agui T. Profiling of cellular immune responses to Mycoplasma pulmonis infection in C57BL/6 and DBA/2 mice. *Infect. Genet. Evol.* 2019; 73: 55–65. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.04.019>
23. Huang H., Even Z., Wang Z., Li L., Erickson A., Golovko M., et al. Proteomics profiling reveals regulation of immune response to Salmonella enterica serovar Typhimurium infection in mice. *Infect. Immun.* 2023; 91(1): e0049922. <https://doi.org/10.1128/iai.00499-22>
24. Casanova T., Van de Paar E., Desmecht D., Garigliany M.M. Hyporeactivity of alveolar macrophages and higher respiratory cell permissivity characterize DBA/2J mice infected by influenza A virus. *J. Interferon Cytokine Res.* 2015; 35(10): 808–20. <https://doi.org/10.1089/jir.2014.0237>
25. Srivastava B., Blazejewska P., Hessmann M., Bruder D., Geffers R., Mauel S., et al. Host genetic background strongly influences the response to influenza A virus infections. *PLoS One*. 2009; 4(3): e4857. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004857>
26. Marzec J., Cho H.Y., High M., McCaw Z.R., Polack F., Kleeberger S.R. Toll-like receptor 4-mediated respiratory syncytial virus disease and lung transcriptomics in differentially susceptible inbred mouse strains. *Physiol. Genomics*. 2019; 51(12): 630–43. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00101.2019>
27. Leclerc C., Dériaud E., Megret F., Briand J.P., Van Regenmortel M.H., Deubel V. Identification of helper T cell epitopes of dengue virus E-protein. *Mol. Immunol.* 1993; 30(7): 613–25. [https://doi.org/10.1016/0161-5890\(93\)90072-j](https://doi.org/10.1016/0161-5890(93)90072-j)
28. Tailor N., Warner B.M., Griffin B.D., Tierney K., Moffat E., Frost K., et al. Generation and characterization of a SARS-CoV-2-susceptible mouse model using adeno-associated virus (AAV6.2FF)-mediated respiratory delivery of the human ACE2 gene. *Viruses*. 2022; 15(1): 85. <https://doi.org/10.3390/v15010085>
29. Tamiya S., Yoshikawa E., Suzuki K., Yoshioka Y. Susceptibility analysis in several mouse strains reveals robust T-cell responses after mycoplasma pneumoniae infection in DBA/2 mice. *Front Cell Infect. Microbiol.* 2021; 10: 602453. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.602453>
30. Gieni R.S., Fang Y., Trinchieri G., Umetsu D.T., DeKruyff R.H. Differential production of IL-12 in BALB/c and DBA/2 mice controls IL-4 versus IFN-gamma synthesis in primed CD4 lymphocytes. *Int. Immunol.* 1996; 8(10): 1511–20. <https://doi.org/10.1093/intimm/8.10.1511>
31. Saha P., Xiao X., Li Y., Golonka R.M., Abokor A.A., Yeoh B.S., et al. Distinct iron homeostasis in C57BL/6 and Balb/c mouse strains. *Physiol. Rep.* 2020; 8(9): e14441. <https://doi.org/10.14814/phy2.14441>
32. Watanabe H., Numata K., Ito T., Takagi K., Matsukawa A. Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains. *Shock*. 2004; 22(5): 460–6. <https://doi.org/10.1097/01.shk.0000142249.08135.e9>
33. Mosley Y.C., Radder J.E., HogenEsch H. Genetic variation in the magnitude and longevity of the IgG subclass response to a diphtheria-tetanus-acellular pertussis (DTaP) vaccine in mice. *Vaccines (Basel)*. 2019; 7(4): 124. <https://doi.org/10.3390/vaccines7040124>
34. Girardin S.E., Boneca I.G., Viala J., Chamaillard M., Labigne A., Thomas G., et al. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J. Biol. Chem.* 2003; 278(11): 8869–72. <https://doi.org/10.1074/jbc.C200651200>
35. Girardin S.E., Boneca I.G., Carneiro L.A., Antignac A., Jéhanno M., Viala J., et al. Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science*. 2003; 300(5625): 1584–7. <https://doi.org/10.1126/science.1084677>
36. Tukhvatulina A.I., Gitlin I.I., Shchablyakov D.V., Artemicheva N.M., Burdelya L.G., Shmarov M.M., et al. Combined stimulation of Toll-like receptor 5 and NOD1 strongly potentiates activity of NF- κ B, resulting in enhanced innate immune reactions and resistance to Salmonella enterica serovar Typhimurium infection. *Infect. Immun.* 2013; 81(10): 3855–64. <https://doi.org/10.1128/IAI.00525-13>
37. Tukhvatulina A.I., Dzharullaeva A.S., Tukhvatulina N.M., Shchablyakov D.V., Shmarov M.M., Dolzhikova I.V., et al. Powerful complex immunoadjuvant based on synergistic effect of combined TLR4 and NOD2 activation significantly enhances magnitude of humoral and cellular adaptive immune responses. *PLoS One*. 2016; 11(5): e0155650. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155650>
38. Tukhvatulina A., Dzharullaeva A., Erokhova A., Zemskaya A., Balyasin M., Ozharovskaia T., et al. Adjuvantation of an influenza hemagglutinin antigen with TLR4 and NOD2 agonists encapsulated in poly(D,L-Lactide-Co-Glycolide) nanoparticles enhances immunogenicity and protection against lethal influenza virus infection in mice. *Vaccines (Basel)*. 2020; 8(3): 519. <https://doi.org/10.3390/vaccines8030519>
39. Hedl M., Li J., Cho J.H., Abraham C. Chronic stimulation of Nod2 mediates tolerance to bacterial products. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2007; 104(49): 19440–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706097104>
40. Pashenkov M.V., Murugina N.E., Budikhina A.S., Pinegin B.V. Synergistic interactions between NOD receptors and TLRs: Mechanisms and clinical implications. *J. Leukoc. Biol.* 2019; 105(4): 669–80. <https://doi.org/10.1002/JLB.2RU0718-290R>
41. Bagchi A., Herrup E.A., Warren H.S., Trigilio J., Shin H.S., Valentine C., et al. MyD88-dependent and MyD88-independent pathways in synergy, priming, and tolerance between TLR agonists. *J. Immunol.* 2007; 178(2): 1164–71. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.2.1164>
42. Magalhaes J.G., Lee J., Geddes K., Rubino S., Philpott D.J., Girardin S.E. Essential role of Rip2 in the modulation of innate and adaptive immunity triggered by Nod1 and Nod2 ligands. *Eur. J. Immunol.* 2011; 41(5): 1445–55. <https://doi.org/10.1002/eji.201040827>
43. Owen A.M., Luan L., Burelbach K.R., McBride M.A., Stothers C.L., Boykin O.A., et al. MyD88-dependent signaling drives toll-like receptor-induced trained immunity in macrophages. *Front. Immunol.* 2022; 13: 1044662. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1044662>

REFERENCES

1. Park S.H., Rehmann B. Immune responses to HCV and other hepatitis viruses. *Immunity*. 2014; 40(1): 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.12.010>
2. Dustin L.B. Innate and adaptive immune responses in chronic HCV infection. *Curr. Drug Targets*. 2017; 18(7): 826–43. <https://doi.org/10.2174/1389450116666150825110532>
3. Wang Y., Rao H., Chi X., Li B., Liu H., Wu L., et al. Detection of residual HCV-RNA in patients who have achieved sustained virological response is associated with persistent histological abnormality. *EBioMedicine*. 2019; 46: 227–35. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.07.043>
4. Polyak S.J., Crispe I.N., Baumert T.F. Liver abnormalities after elimination of HCV infection: persistent epigenetic and immunological perturbations post-cure. *Pathogens*. 2021; 10(1): 44. <https://doi.org/10.3390/pathogens10010044>
5. Sun D., Dai M., Shen S., Li C., Yan X. Analysis of naturally occurring resistance-associated variants to NS3/4A protein inhibitors, NS5A protein inhibitors, and NS5B polymerase inhibitors in patients with chronic hepatitis C. *Gene Expr.* 2018; 18(1): 63–9. <https://doi.org/10.37271/105221617X15100607143377>
6. Ghweil A.A., Helal M.M. Reactivation of herpesvirus in patients with hepatitis C treated with direct-acting antiviral agents. *Infect. Drug Resist.* 2019; 12: 759–62. <https://doi.org/10.2147/IDR.S184598>

7. Todryk S.M., Bassendine M.F., Bridge S.H. Revisiting the elusive hepatitis C vaccine. *Vaccines (Basel)*. 2021; 9(2): 114. <https://doi.org/10.3390/vaccines9020114>
8. Kozak M., Hu J. The integrated consideration of vaccine platforms, adjuvants, and delivery routes for successful vaccine development. *Vaccines (Basel)*. 2023; 11(3): 695. <https://doi.org/10.3390/vaccines11030695>
9. Bailey J.R., Barnes E., Cox A.L. Approaches, progress, and challenges to hepatitis C vaccine development. *Gastroenterology*. 2019; 156(2): 418–30. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.08.060>
10. Carty M., Guy C., Bowie A.G. Detection of viral infections by innate immunity. *Biochem. Pharmacol.* 2021; 183: 114316. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114316>
11. Caucheteux S.M., Hu-Li J., Mohammed R.N., Ager A., Paul W.E. Cytokine regulation of lung Th17 response to airway immunization using LPS adjuvant. *Mucosal Immunol.* 2017; 10(2): 361–72. <https://doi.org/10.1038/mi.2016.54>
12. Vegna S., Gregoire D., Moreau M., Lassus P., Durantel D., Assenat E., et al. NOD1 participates in the innate immune response triggered by hepatitis C virus polymerase. *J. Virol.* 2016; 90(13): 6022–35. <https://doi.org/10.1128/JVI.03230-15>
13. Guryanova S.V., Khaitov R.M. Strategies for using muramyl peptides – modulators of innate immunity of bacterial origin – in medicine. *Front. Immunol.* 2021; 12: 607178. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.607178>
14. Budikhina A.S., Murugina N.E., Maximchik P.V., Dagil Y.A., Nikolaeva A.M., Balyasova L.S., et al. Interplay between NOD1 and TLR4 receptors in macrophages: nonsynergistic activation of signaling pathways results in synergistic induction of proinflammatory gene expression. *J. Immunol.* 2021; 206(9): 2206–20. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2000692>
15. Hennessy C., McKernan D.P. Anti-viral pattern recognition receptors as therapeutic targets. *Cells*. 2021; 10(9): 2258. <https://doi.org/10.3390/cells10092258>
16. Абдулмеджидова А.Г., Масалова О.В., Атанадзе С.Н., Уланова Т.И., Бурков А.Н., Худяков Ю.Е. и др. Характеристика панели моноклональных антител к рекомбинантному белку NS3 вируса гепатита С. *Вопросы вирусологии*. 2002; 47(1): 21–5.
17. Ivanov A.V., Korovina A.N., Tunitskaya V.L., Kostyuk D.A., Rechinov V.O., Kukhanova M.K., et al. Development of the system ensuring a high-level expression of hepatitis C virus nonstructural NS5B and NS5A proteins. *Protein Expr. Purif.* 2006; 48(1): 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2006.02.011>
18. Masalova O.V., Lakina E.I., Abdulmedzhidova A.G., Atanadze S.N., Semiletov Y.A., Shkurko T.V., et al. Characterization of monoclonal antibodies and epitope mapping of the NS4 protein of hepatitis C virus. *Immunol. Lett.* 2002; 83(3): 187–96. [https://doi.org/10.1016/s0165-2478\(02\)00081-0](https://doi.org/10.1016/s0165-2478(02)00081-0)
19. Li H.C., Yang C.H., Lo S.Y. Hepatitis C viral replication complex. *Viruses*. 2021; 13(3): 520. <https://doi.org/10.3390/v13030520>
20. Masalova O.V., Lesnova E.I., Andreev S.M., Shershakova N.N., Kozlov V.V., Permyakova K.Yu., et al. Adjuvant effect of dispersed fullerene C60 on the immune response to constructs harboring amino acid and nucleotide sequences of hepatitis C virus nonstructural NS5B protein. *Voprosy virusologii*. 2022; 67(6): 516–26. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-149> <https://elibrary.ru/laaczg> (in Russian)
21. Liu T., Matsuguchi T., Tsuboi N., Yajima T., Yoshikai Y. Differences in expression of toll-like receptors and their reactivities in dendritic cells in BALB/c and C57BL/6 mice. *Infect. Immun.* 2002; 70(12): 6638–45. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.12.6638-6645.2002>
22. Boonyarattanasoonthorn T., Elewa Y.H.A., Tag-El-Din-Hassan H.T., Morimatsu M., Agui T. Profiling of cellular immune responses to Mycoplasma pulmonis infection in C57BL/6 and DBA/2 mice. *Infect. Genet. Evol.* 2019; 73: 55–65. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.04.019>
23. Huang H., Even Z., Wang Z., Li L., Erickson A., Golovko M., et al. Proteomics profiling reveals regulation of immune response to Salmonella enterica serovar Typhimurium infection in mice. *Infect. Immun.* 2023; 91(1): e0049922. <https://doi.org/10.1128/iai.00499-22>
24. Casanova T., Van de Paar E., Desmecht D., Garigliany M.M. Hyporeactivity of alveolar macrophages and higher respiratory cell permissivity characterize DBA/2J mice infected by influenza A virus. *J. Interferon Cytokine Res.* 2015; 35(10): 808–20. <https://doi.org/10.1089/jir.2014.0237>
25. Srivastava B., Blazejewska P., Hessmann M., Bruder D., Geffers R., Mauel S., et al. Host genetic background strongly influences the response to influenza A virus infections. *PLoS One*. 2009; 4(3): e4857. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004857>
26. Marzec J., Cho H.Y., High M., McCaw Z.R., Polack F., Kleeburger S.R. Toll-like receptor 4-mediated respiratory syncytial virus disease and lung transcriptomics in differentially susceptible inbred mouse strains. *Physiol. Genomics*. 2019; 51(12): 630–43. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00101.2019>
27. Leclerc C., Dériaud E., Megret F., Briand J.P., Van Regenmortel M.H., Deubel V. Identification of helper T cell epitopes of dengue virus E-protein. *Mol. Immunol.* 1993; 30(7): 613–25. [https://doi.org/10.1016/0161-5890\(93\)90072-j](https://doi.org/10.1016/0161-5890(93)90072-j)
28. Taylor N., Warner B.M., Griffin B.D., Tierney K., Moffat E., Frost K., et al. Generation and characterization of a SARS-CoV-2-susceptible mouse model using adeno-associated virus (AAV6.2FF)-mediated respiratory delivery of the human ACE2 gene. *Viruses*. 2022; 15(1): 85. <https://doi.org/10.3390/v15010085>
29. Tamiya S., Yoshikawa E., Suzuki K., Yoshioka Y. Susceptibility analysis in several mouse strains reveals robust T-cell responses after mycoplasma pneumoniae infection in DBA/2 mice. *Front Cell Infect. Microbiol.* 2021; 10: 602453. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.602453>
30. Gieni R.S., Fang Y., Trinchieri G., Umetsu D.T., DeKruyff R.H. Differential production of IL-12 in BALB/c and DBA/2 mice controls IL-4 versus IFN-gamma synthesis in primed CD4 lymphocytes. *Int. Immunol.* 1996; 8(10): 1511–20. <https://doi.org/10.1093/intimm/8.10.1511>
31. Saha P., Xiao X., Li Y., Golonka R.M., Abokor A.A., Yeoh B.S., et al. Distinct iron homeostasis in C57BL/6 and Balb/c mouse strains. *Physiol. Rep.* 2020; 8(9): e14441. <https://doi.org/10.14814/phy2.14441>
32. Watanabe H., Numata K., Ito T., Takagi K., Matsukawa A. Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains. *Shock*. 2004; 22(5): 460–6. <https://doi.org/10.1097/01.shk.0000142249.08135.e9>
33. Mosley Y.C., Radder J.E., HogenEsch H. Genetic variation in the magnitude and longevity of the IgG subclass response to a diphtheria-tetanus-acellular pertussis (DTaP) vaccine in mice. *Vaccines (Basel)*. 2019; 7(4): 124. <https://doi.org/10.3390/vaccines7040124>
34. Girardin S.E., Boneca I.G., Viala J., Chamaillard M., Labigne A., Thomas G., et al. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J. Biol. Chem.* 2003; 278(11): 8869–72. <https://doi.org/10.1074/jbc.C200651200>
35. Girardin S.E., Boneca I.G., Carneiro L.A., Antignac A., Jéhanon M., Viala J., et al. Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science*. 2003; 300(5625): 1584–7. <https://doi.org/10.1126/science.1084677>
36. Tikhvatulin A.I., Gitlin I.I., Shcheblyakov D.V., Artemicheva N.M., Burdelya L.G., Shmarov M.M., et al. Combined stimulation of Toll-like receptor 5 and NOD1 strongly potentiates activity of NF-κB, resulting in enhanced innate immune reactions and resistance to Salmonella enterica serovar Typhimurium infection. *Infect. Immun.* 2013; 81(10): 3855–64. <https://doi.org/10.1128/IAI.00525-13>
37. Tikhvatulin A.I., Dzharrullaeva A.S., Tikhvatulina N.M., Shcheblyakov D.V., Shmarov M.M., Dolzhikova I.V., et al. Powerful complex immunoadjuvant based on synergistic effect of combined TLR4 and NOD2 activation significantly enhances magnitude of humoral and cellular adaptive immune responses. *PLoS One*. 2016; 11(5): e0155650. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155650>
38. Tikhvatulin A., Dzharrullaeva A., Erokhova A., Zemskaia A., Balyasin M., Ozharovskaia T., et al. Adjuvantation of an influenza hemagglutinin antigen with TLR4 and NOD2 agonists encapsulated in poly(D,L-Lactide-Co-Glycolide) nanoparticles enhances immunogenicity and protection against lethal influenza virus infection in mice. *Vaccines (Basel)*. 2020; 8(3): 519. <https://doi.org/10.3390/vaccines8030519>
39. Hedl M., Li J., Cho J.H., Abraham C. Chronic stimulation of Nod2 mediates tolerance to bacterial products. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2007; 104(49): 19440–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706097104>
40. Pashenkov M.V., Murugina N.E., Budikhina A.S., Pinegin B.V. Synergistic interactions between NOD receptors and TLRs: Mechanisms and clinical implications. *J. Leukoc. Biol.* 2019; 105(4): 669–80. <https://doi.org/10.1002/JLB.2RU0718-290R>
41. Bagchi A., Herrup E.A., Warren H.S., Trigilio J., Shin H.S., Valentine C., et al. MyD88-dependent and MyD88-independent pathways in synergy, priming, and tolerance between TLR agonists. *J. Immunol.* 2007; 178(2): 1164–71. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.2.1164>
42. Magalhaes J.G., Lee J., Geddes K., Rubino S., Philpott D.J., Girardin S.E. Essential role of Rip2 in the modulation of innate and adaptive immunity triggered by Nod1 and Nod2 ligands. *Eur. J. Immunol.* 2011; 41(5): 1445–55. <https://doi.org/10.1002/eji.201040827>
43. Owen A.M., Luan L., Burelbach K.R., McBride M.A., Stothers C.L., Boykin O.A., et al. MyD88-dependent signaling drives toll-like receptor-induced trained immunity in macrophages. *Front. Immunol.* 2022; 13: 1044662. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1044662>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-185>

© БИНЯТОВА А.С., ЮНАСОВА Т.Н., ВОЛКОВА Р.А., БУТЫРСКИЙ А.Ю., ИЛЬЯСОВА Т.Н., САРКИСЯН К.А., МОВСЕСЯНЦ А.А., 2023



Опыт применения фармакопейного стандартного образца активности коревой вакцины

Бинятова А.С., Юнасова Т.Н., Волкова Р.А., Бутырский А.Ю., Ильяслова Т.Н., Саркисян К.А., Мовсесянц А.А.

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, 127051, г. Москва, Россия

Введение. В связи с возросшей заболеваемостью корью в России и в мире препараты для профилактики кори особенно востребованы. Обеспечение качества коревой вакцины для проведения эффективной профилактики заболевания входит в сферу задач государственной политики нашей страны.

Цель исследования. Оценка опыта применения фармакопейного стандартного образца активности коревой вакцины при определении специфической активности вируса кори в вакцинах с коревым компонентом, использующихся в РФ для профилактики кори.

Материалы и методы. Объектом исследования был фармакопейный стандартный образец (ФСО) активности живой коревой вакцины серии 10, анализ активности которого проводили при определении специфической активности коревой, паротитно-коревой и комбинированной вакцины для профилактики кори, краснухи и паротита, а также по материалам сводных протоколов производства указанных вакцин.

Результаты. Показано, что титр вируса кори в ФСО при каждом определении специфической активности вируса кори в вакцинах в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России в 2021–2022 гг., а также по данным сводных протоколов производства был в границах аттестованного значения ($4,63 \pm 0,5$) $\text{IgTЦД}_{50}/0,5$ мл, а результаты испытаний соответствовали критериям приемлемости согласно требованиям нормативной документации. За время наблюдения среднее значение титра ФСО ($4,61 \text{ IgTЦД}_{50}/0,5$ мл) практически не отличалось от среднего значения аттестованной характеристики ФСО, стандартное отклонение среднего значения титра вируса кори в ФСО не превышало $0,15 \text{ IgTЦД}_{50}$, что свидетельствовало о стабильности аналитической работы на предприятии и в Испытательном центре ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о стабильной активности ФСО, о правильности определения титра вируса кори в прививочной дозе препаратов и о валидности метода контроля специфической активности вируса кори в вакцинах.

Ключевые слова: фармакопейный стандартный образец; вакцины для профилактики кори; качество; контроль; критерии пригодности системы; критерии приемлемости результатов

Для цитирования: Бинятова А.С., Юнасова Т.Н., Волкова Р.А., Бутырский А.Ю., Ильяслова Т.Н., Саркисян К.А., Мовсесянц А.А. Опыт применения фармакопейного стандартного образца активности коревой вакцины. *Вопросы вирусологии.* 2023; 68(4): 327–333. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-185> EDN: <https://elibrary.ru/ohwjub>

Для корреспонденции: Бинятова Анна Станиславовна, ведущий эксперт лаборатории вирусных вакцин ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, 127051, г. Москва, Россия. E-mail: Binyatova@expmed.ru

Участие авторов: Бинятова А.С. – дизайн исследования, проведение исследований, анализ результатов, написание текста; Юнасова Т.Н. – дизайн исследования, анализ полученных результатов, критический пересмотр содержания текста; Волкова Р.А. – анализ и статистическая обработка результатов; Бутырский А.Ю. – анализ и статистическая обработка результатов; Ильяслова Т.Н. – проведение испытаний качества препарата; Саркисян К.А. – идея, концепция и дизайн исследования; Мовсесянц А.А. – консультативная помощь при анализе результатов, окончательное утверждение версии текста для публикации.

Финансирование. Исследование выполнено за счет государственного бюджета. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00052-23-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121022000147-4).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 07.06.2023
Принята в печать 08.08.2023
Опубликована 31.08.2023

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-185>

Experience with the use of pharmacopoeial reference material for the activity of measles vaccine

Anna S. Binyatova, Tatyana N. Unasova, Rauza A. Volkova, Alexey Yu. Butyrsky, Tatyana N. Ilyasova, Karine A. Sarkisyan, Artashes A. Movsesyants

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 127051, Moscow, Russia

Introduction. Due to the increased incidence of measles in Russia and in many other regions of the world, vaccines for the measles prevention are especially in demand. Ensuring the quality of the measles vaccine for effective disease prevention is within the scope of the tasks of the state policy of our country.

Objective. Evaluation of the experience of using a pharmacopoeial standard material of measles vaccine activity for measurement of the specific activity of the measles virus in vaccines with a measles component that are used in the Russian Federation for measles prevention.

Materials and methods. The object of the study was the Pharmacopoeia reference material (PRM) of the activity of the live measles vaccine of series 10. The activity of PRM was analyzed when determining the specific activity of the measles, mumps-measles and combined vaccines for the prevention of measles, rubella and mumps, as well as based on the materials of the summary protocols for the production of these vaccines.

Results. The titer of the measles virus in the PRM for each determination of the specific activity of the measles virus in vaccines in the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products in 2021–2022, as well as according to the summary production protocols, was within the boundaries of the certified value (4.63 ± 0.5) $\text{lgTCD}_{50}/0.5$ ml, and the test results met the acceptance criteria in accordance with the requirements of regulatory documentation. During the observation period, the average value of the PRM titer ($4.61 \text{ lgTCD}_{50}/0.5$ ml) practically did not differ compared to the average value of the certified characteristics of the PRM, the standard deviation of the mean value of the measles virus titer in the PRM did not exceed 0.15 lgTCD_{50} , which indicated the stability of the analytical work at the enterprise and in IC.

Conclusion. The data obtained indicate the stable activity of PRM, the correctness of the determination of the measles virus titer in the vaccination dose of the vaccine, and the validity of the method for monitoring the specific activity of the measles virus in vaccines.

Keywords: *pharmacopoeial reference material, measles vaccines, quality, control, system suitability criteria, results acceptance criteria.*

For citation: Binyatova A.S., Unasova T.N., Volkova R.A., Butyrsky A.Yu., Ilyasova T.N., Sarkisyan K.A., Movsesyants A.A. Experience with the use of a pharmacopoeial standard sample of measles vaccine activity. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2023; 68(4): 327–333 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-185> EDN: <https://elibrary.ru/ohwjub>

For correspondence: Binyatova Anna Stanislavovna, Leading Expert of the Viral Vaccine Laboratory of the Scientific Center for Expertise of Medicinal Products, 127051, Moscow, Binyatova@expmed.ru

Information about the authors:

Binyatova A.S., <https://orcid.org/0000-0003-3011-2030>

Unasova T.N., <https://orcid.org/0000-0002-1606-942X>

Volkova R.A. <https://orcid.org/0000-0001-8698-2890>

Sarkisyan K.A., <https://orcid.org/0000-0003-0445-7086>

Butirskiy A.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-0352-522X>

Ilyasova T.N., <https://orcid.org/0000-0002-0905-3630>

Movsesyants A.A., <https://orcid.org/0000-0003-2132-0962>

Contribution: Binyatova A.S. – design of the study, conducting studies, analyzing the results, writing the text of the manuscript; Unasova T.N. – study design, analysis of the results obtained, critical review of the content of the manuscript; Volkova R.A. – analysis and statistical processing of research results; Butyrsky A.Yu. – analysis and statistical processing of research results; Ilyasova T.N. – testing the quality of the drug; Sarkisyan K.A. – idea, concept and design of the study; Movsesyants A.A. – advisory assistance in the analysis of the results, the final approval of the version of the manuscript for publication.

Funding. The study was carried out at the expense of the State budget. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00052-23-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121022000147-4)

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 07 June 2023
Accepted 08 August 2023
Published 31 August 2023

Введение

Вакцинация против кори в нашей стране является обязательной и проводится в соответствии с Национальным календарем профилактических прививок, утвержденным Приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации (РФ)¹. Благодаря массовой и плановой вакцинопрофилактике кори, проводящейся в России с 1968 г., а также системе мероприятий по элиминации кори в РФ, проводящихся в рамках программ Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) и национальных программ², начиная с 2002 г. по настоящее время, достигнуты значительные успехи в борьбе с этой инфекцией. В соответствии с индикативными критериями элиминации Россия в 2010 г. вступила в стадию элиминации кори [1]. По данным федерального статистического наблюдения, охват вакцинацией против кори декретированных групп населения в нашей стране в течение ряда лет составляет 97–98%, что соответствует целевым показателям, определенным ВОЗ³. При этом вспышки кори периодически происходят в России.

Два подъема заболеваемости корью в России зарегистрированы в 2014 и 2018–2019 гг. В 2020 и 2021 гг. заболевания корью в России практически не было. В 2021 г. был зарегистрирован один случай заболевания корью; в 2022 г. – 102 случая, но за первые 4 месяца 2023 г. число заболевших корью в 44 регионах России приблизилось к 1000⁴. Причиной настоящего подъема заболеваемости корью в России эпидемиологи считают активные миграционные процессы и завоз инфекции из эпидемически неблагополучных стран, а также увеличение неиммунной прослойки населения в некоторых регионах нашей страны вследствие отказа от вакцинации вообще и от кори в частности⁵.

На фоне карантинных мероприятий по поводу пандемии COVID-19 в 2020–2021 гг. в ряде регионов мира наблюдался некоторый спад заболеваемости корью. Вместе с тем вследствие снижения охвата вакцинацией против кори, связанного с «ковидными» ограничениями, риск возникновения вспышек кори увеличился. В 2020 г. высокая заболеваемость корью

(от 600 до 3000 заболевших) уже регистрировалась в Индии, Узбекистане, Филиппинах, Казахстане, Турции, Румынии, Киргизии. В 2021 г. отмечены крупные вспышки кори в Конго, Нигерии, Афганистане, а также в Украине и Таджикистане. В 2023 г. выросла заболеваемость корью в Турции, в Великобритании, Франции и Польше. Особую тревогу вызывают вспышки кори в ближнем зарубежье – в Украине, Таджикистане и Казахстане⁶.

Профилактические и противоэпидемические мероприятия, своевременно проводящиеся органами здравоохранения в РФ в очагах, как правило, обеспечивают быстрое купирование очагов и снижение угрозы массовой заболеваемости. В соответствии с Постановлением Главного Государственного санитарного врача РФ с 3 апреля и до конца 2023 г. в России проводится подчищающая иммунизация населения и трудовых мигрантов против кори⁷. Вакцинация затрагивает тех, кто не был привит против кори раньше, не болел и не имеет сведений о прививках.

Подводя итоги вышесказанному, следует отметить, что в связи с возросшей заболеваемостью корью в России и в мире препараты для профилактики кори в нашей стране в настоящее время особенно востребованы. Обеспечение качества коревой вакцины для проведения эффективной иммунопрофилактики является предметом пристального внимания национальных уполномоченных органов и входит в сферу задач государственной политики нашей страны.

Для профилактики кори в России используется отечественная моновалентная коревая вакцина двух производителей – АО «НПО «Микроген» и ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, а также две комбинированные вакцины производства АО «НПО «Микроген»: для профилактики кори и паротита, для профилактики кори, краснухи и паротита. Эти препараты рекомендованы к применению Национальным календарем профилактических прививок, что накладывает на контролирующие органы особую ответственность за их качество, т.к. они являются препаратами массового применения и исполь-

¹Приказ Минздрава России №125н «Об утверждении национального календаря профилактических прививок и календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям». М.; 2014. Available at: https://10.rospotrebnadzor.ru/upload/medialibrary/0bc/prikaz-ministerstva-zdravookhraneniya-rf-ot-21.03.2014-_125n.pdf

²Роспотребнадзор. О Программе «Элиминации кори и краснухи в Российской Федерации (2016–2020 гг)». Available at: http://25.rospotrebnadzor.ru/rss_all/-/asset_publisher/Kq6J/content/id/336749

³Роспотребнадзор. Программа «Элиминации кори и краснухи в Российской Федерации» (2016–2020 гг). Available at: https://www.rospotrebnadzor.ru/upload/iblock/bcf/programma_elyuminatsii_kori_i_krasnukhi_v_rf_2016_2020_gg.pdf; Распоряжение Правительства РФ от 18.09.2020 № 2390-п. Available at: <http://static.government.ru/media/files/Zz7brckXMkAQZHTA6ixAx1Y4hYBEeM.pdf>

⁴Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации в 2022 году». Available at: https://www.rospotrebnadzor.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=25076; Коммерсантъ. Покорение кори. Available at: <https://www.kommersant.ru/doc/5967666>; Независимая газета. Корь вернулась в Европу и Россию. Available at: https://www.ng.ru/health/2023-0418/8_8709_measles.html?PREVIEW_SECRET_KEY=463dbf111c6725c53063ca9d1c5d252c

⁵Фарммедпром. В Россию возвращается корь – какие меры будут приняты? Available at: <https://pharmmedprom.ru/news/v-rossiyu-vozvrashaetsya-kor-kakie-meri-budut-prinyati/>

⁶Роспотребнадзор. Эпидемиологическая ситуация по заболеваемости корью в России и мире. Available at: https://12.rospotrebnadzor.ru/c/journal/view_article_content?groupId=10156&articleId=1025584&version=1.3

⁷Ведомости. В России растёт заболеваемость корью. Available at: <https://www.vedomosti.ru/society/articles/2023/04/11/970345-v-rossii-rastet-zabolevaemost-koryu>

зуются для профилактики кори у населения. Ранее нами было показано, что названные отечественные вакцины соответствуют международным требованиям и характеризуются стабильным качеством [2].

Специфическая активность является одним из важнейших показателей качества вакцин. Регламентированный уровень содержания вируса кори в вакцине гарантирует эффективность препарата. Таким образом, важность достоверного количественного определения специфической активности вируса в прививочной дозе не требует доказательств. При этом адекватность интерпретации получаемых результатов обеспечивается использованием фармакопейного стандартного образца (ФСО), предназначенного прежде всего для оценки пригодности системы. Кроме того, применение ФСО также позволяет проводить оценку стабильности результатов при определении специфической активности вируса кори в вакцинах⁸.

Цель исследования – оценка опыта применения ФСО активности коревой вакцины при определении специфической активности вируса кори в вакцинах с коревым компонентом, использующихся в РФ для профилактики кори.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Провести ретроспективный анализ результатов определения специфической активности ФСО по сводным протоколам производства вакцин, содержащих коревую компонент, за 2021–2022 гг.
2. Провести анализ результатов испытаний специфической активности ФСО в Испытательном центре (ИЦ) ФГБУ «НЦЭСМП»
3. Провести сравнительный анализ результатов определения специфической активности ФСО на предприятии и в ИЦ.

Как отмечено в Руководстве ВОЗ 2010 г. по независимому выпуску серий вакцин регуляторным органом, решающее значение для интерпретации результатов испытания специфической активности вакцин имеет использование стандартного образца. Отклонения значения титра вируса в стандартном образце позволят своевременно выявить проблемы анализа⁹.

В соответствии с рекомендациями ВОЗ, для адекватной оценки титра вируса кори в вакцине стандартный образец должен быть аналогичен вакцине

по технологии изготовления и составу. При контроле коммерческих серий вышеуказанных вакцин предприятием и внешней испытательной лабораторией важно использовать единый стандартный образец и единый метод определения активности. Испытания активности контролируемых серий вакцин и ФСО проводят с использованием калиброванного и поверенного оборудования¹⁰.

Использование ФСО активности коревой вакцины для подтверждения правильности определения количества вируса кори в прививочной дозе профилактических препаратов является требованием нормативной документации (НД) на вакцины¹¹.

Материалы и методы

Объектом исследования был ФСО активности живой коревой вакцины серии 10 (ранее – ОСО 42-28-347-2017, сер. 10).

ФСО был приготовлен на предприятии АО «НПО «Микроген» в соответствии с требованиями НД на вакцину коревую культуральную живую и представлял собой часть полуфабриката коммерческой серии с дополнительным количеством стабилизатора. ФСО аттестован в установленном порядке в ИЦ и включен в Реестр фармакопейных стандартных образцов Государственной фармакопеи Российской Федерации¹².

Аттестованной характеристикой ФСО активности коревой вакцины является специфическая активность. Все испытания по определению специфической активности вируса кори проводили на культуре клеток *Vero*. В качестве аттестованной характеристики ФСО серии 10 было принято среднее арифметическое значение титра ФСО (по результатам 90 определений), равное $(4,63 \pm 0,5) \text{ IgTЦД}_{50}/0,5 \text{ мл}$ при доверительной вероятности 0,95.

При каждом проведении контроля специфической активности вируса кори в вакцине, в соответствии с требованиями НД, трижды титровали одну ампулу ФСО. Для оценки приемлемости получаемых результатов проводили расчет доверительного интервала (ДИ) среднего значения титра ФСО, определенного при трехкратном титровании 1 ампулы. Критерии приемлемости результатов изложены в НД и соответствуют Европейской фармакопее 10-го издания (ЕФ 10)¹³:

– ДИ ($p = 0,95$) среднего значения титра ФСО, определенного при трехкратном титровании 1 ампулы, должен быть в пределах $\pm 0,3 \text{ IgTЦД}_{50}$;

⁸Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий (ISO/IEC 17025:2019, IDT). Available at: <https://dsm.consultant.ru/cgi/online.cgi?req=doc&ts=nbQwNiT0113ScIkB1&cacheid=2D3611B8C1FC0CFAD6B9A90262049B6B&mode=splus&nd=Nk9Btw&base=LAW&n=332887#mrVwNiTkzkmawFkY2>

⁹WHO. Guidelines for independent lot release of vaccines by regulatory authorities, Annex 2, TRS № 978; 2010. Available at: <https://www.who.int/publications/m/item/guidelines-for-independent-lot-release-of-vaccines-annex-2-trs-no-978>

¹⁰WHO. Recommendations for the preparation, characterization and establishment of international and other biological reference standards (revised 2004), Annex 2, 2006, TRS № 932. Available at: <https://www.who.int/publications/m/item/annex-2-trs-no-932>

¹¹Нормативная документация ЛС-002140-190320, изм. 1-4 на Вакцину коревую культуральную живую; 2011; Нормативная документация Р N000544/01-301219, изм. 1-4 на Вакцину паротитно-коревую культуральную живую; 2008; НД ЛП-005859-171019 «ВАКТРИ-ВИР Комбинированная вакцина против кори, краснухи и паротита культуральная живая»; 2019.

¹²Приказ Минздрава России № 202 «О метрологической службе Министерства здравоохранения российской федерации в сфере обращения лекарственных средств для медицинского применения»; 2020.

¹³Вакцина для профилактики кори, паротита и краснухи (живая). Европейская фармакопея; 2019: 1057.

Таблица. Активность вируса кори в ФСО серии 10 при проведении контроля препаратов с коревым компонентом по показателю «Специфическая активность» на предприятии и в ИЦ
Table. The activity of the measles virus in PRM series 10 during the control of preparations with the measles component in terms of «Specific activity» at the enterprise and in the evaluation center (EC)

Наименования вакцин, при испытании которых определяли активность ФСО Names of vaccines, during the testing of which the activity of PRM was determined	Активность вируса кори в ФСО серии 10 (аттестованное значение ФСО: $(4,63 \pm 0,5) \text{ lgTCD}_{50}/0,5 \text{ мл}$ Measles virus activity in PRM series 10 (certified PRM value: $(4.63 \pm 0.5) \text{ lgTCD}_{50}/0.5 \text{ ml}$)					
	АО «НПО «Микроген» АО «NPO «Mikrogen»			Испытательный центр Evaluation center		
	количество испытаний number of trials	$X \pm S^*$	ДИ в $\text{lgTCD}_{50}/0,5 \text{ мл}^{**}$ DI in $\text{lgTCD}_{50}/0.5 \text{ ml}^{**}$	количество испытаний number of trials	$X \pm S$	ДИ в $\text{lgTCD}_{50}/0,5 \text{ мл}^{**}$ DI in $\text{lgTCD}_{50}/0.5 \text{ ml}^{**}$
Живая коревая вакцина Live measles vaccine	25	$4,58 \pm 0,14$	$< 0,3$	15	$4,64 \pm 0,10$	0–0,2
Паротитно-коревая вакцина Mumps- measles vaccine	37	$4,65 \pm 0,15$	$< 0,3$	26	$4,57 \pm 0,11$	0–0,2
«Вактривир» VAKTRIVIR	68	$4,6 \pm 0,14$	$< 0,3$	26	$4,64 \pm 0,13$	0–0,2
Все указанные вакцины All above vaccines combined	130	$4,61 \pm 0,14$	$< 0,3$	67	$4,61 \pm 0,11$	0–0,2

Примечание: * $X \pm S$ – среднее значение титра \pm стандартное отклонение; **ДИ – доверительный интервал среднего значения титра ФСО, определенного при трехкратном титровании 1 ампулы.

Note: * $X \pm S$ – mean titer value \pm standard deviation; **DI – confidence interval of the average value of the PRM titer, determined by three-fold titration of one ampoule.



Рис. 1. Результаты определения специфической активности ФСО активности коревой вакцины на предприятии (контрольная карта).

По оси абсцисс – номер испытания в порядке проведения; по оси ординат – $\text{lgTCD}_{50}/0,5 \text{ мл}$.

Fig. 1. The results of determining the specific activity of the PRM activity of the measles vaccine at the enterprise (control chart).

On the X-axis – the number of tests in the order of execution; on the Y-axis – $\text{lgTCD}_{50}/0.5 \text{ ml}$.

– активность ФСО не должна отличаться более чем на $0,5 \text{ lgTCD}_{50}$ от аттестованного значения.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Stat Plus 7.

Результаты

Был проведен ретроспективный анализ результатов 67 испытаний в ИЦ по определению специфической активности вируса кори в ФСО при контроле ряда вакцин с коревым компонентом в 2021–2022 гг.: «Вакцины для профилактики кори», «Вакцины для профилактики кори и паротита», «Вакцины для профилактики кори, краснухи и паротита». Проанализировано также 130 сводных протоколов производства

и контроля указанных вакцин, произведенных в АО «НПО «Микроген» за тот же период.

При оценке приемлемости результатов испытаний коммерческих серий вакцин для профилактики кори по показателю «Специфическая активность» установлено, что ДИ при каждом анализе границ среднего значения титра ФСО был менее $0,3 \text{ lgTCD}_{50}$ и соответствовал критериям приемлемости результатов контроля, указанным в НД на вакцины. Результаты определения специфической активности ФСО серии 10, полученные при контроле каждой серии препарата трех наименований вакцин на предприятии и в ИЦ в 2021–2022 гг., представлены в **таблице**. По полученным результатам составлены контрольные карты (**рис. 1, 2**).

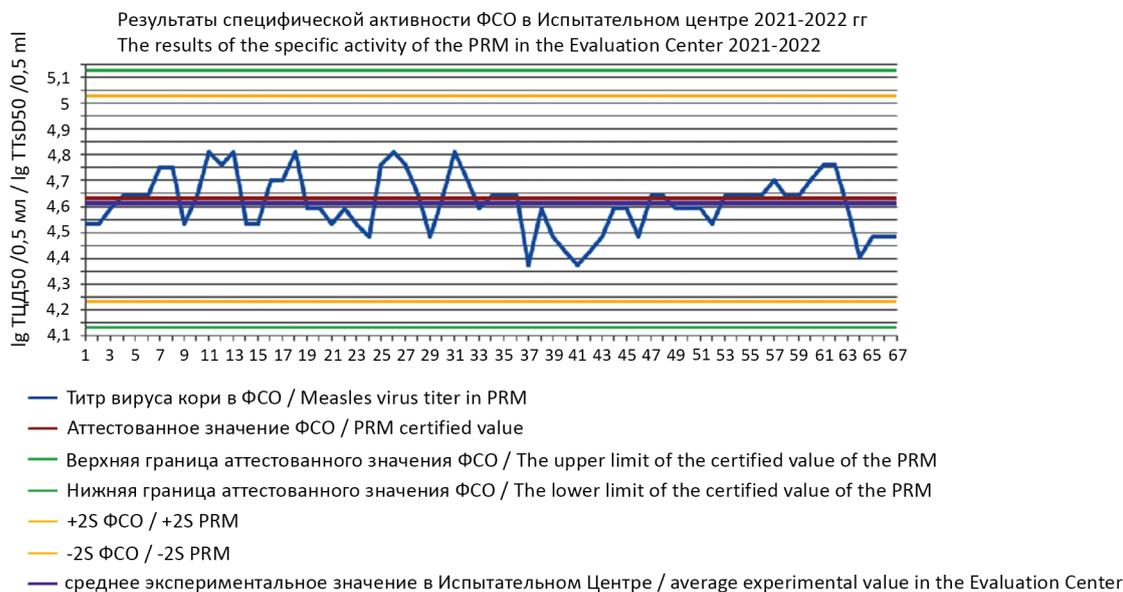


Рис. 2. Результаты определения специфической активности ФСО активности коревой вакцины в Испытательном центре (контрольная карта).

По оси абсцисс – номер испытания в порядке проведения; по оси ординат – $\lg TCD_{50}/0,5$ мл.

Fig. 2. The results of determining the specific activity of the PRM activity of the measles vaccine at the Evaluation Center (control chart).

On the X-axis – the number of tests in the order of execution; on the Y-axis – $\lg TCD_{50}/0.5$ ml.

Из таблицы видно, что при определении специфической активности соответствующих вакцин в 2021–2022 гг. среднее значение титра вируса кори в ФСО составило $(4,61 \pm 0,11) \lg TCD_{50}/0,5$ мл и находилось в границах аттестованного значения как в ИЦ, так и на предприятии; ДИ среднего значения активности ФСО при трехкратном титровании 1 ампулы не превышал 0,3 $\lg TCD_{50}$, что свидетельствовало о соответствии полученных данных критериям приемлемости результатов контроля активности испытуемых препаратов.

Из таблицы и рисунков 1 и 2 видно, что стандартное отклонение среднего значения активности ФСО за период наблюдения находилось в пределах от 0,10 до 0,15 $\lg TCD_{50}$ и в основном не превышало границы $\pm 2S$; только в двух испытаниях на предприятии полученные результаты были незначительно выше границы +2S, тем не менее подобные факты требуют внимания и анализа.

Таким образом, опыт применения ФСО при испытаниях вакцин для профилактики кори по показателю «Специфическая активность» свидетельствует о стабильности работы в лабораториях ИЦ и предприятия, проводящих эти испытания.

Обсуждение

Проведен ретроспективный анализ специфической активности ФСО активности коревой вакцины при контроле иммунобиологических препаратов с коревым компонентом на специфическую активность в ИЦ и на предприятии в 2021–2022 гг.

Необходимо подчеркнуть, что в течение анализируемого периода времени испытания активности ФСО

серии 10 при контроле активности коммерческих препаратов с коревым компонентом были проведены разными операторами в двух разных учреждениях с разным оборудованием, но по единой методике и с использованием образцов одного и того же ФСО. Анализ полученных результатов показал, что среднее значение активности вируса кори в ФСО серии 10 при испытаниях на предприятии и в ИЦ было близко к аттестованному значению, что позволило сделать заключение о правильности определения содержания вируса кори в испытуемых сериях препаратов.

Также важно отметить, что при испытаниях активности ФСО и серий вакцины, проводившихся на перевиваемой культуре клеток *Vero*, пассажные уровни культуры клеток на предприятии и в ИЦ менялись от 3-го до 14-го пассажа по объективным причинам, связанным со спецификой ведения культуры клеток. При этом разброс среднего значения активности ФСО находился в пределах от 0,10 до 0,15 $\lg TCD_{50}$. Эти данные показали, что меняющиеся уровни пассажа культуры клеток не влияют на результаты испытаний, что свидетельствует об устойчивости метода в указанном диапазоне пассажей. Полученные данные подтверждают валидность метода контроля специфической активности вируса кори и его соответствие критериям пригодности системы.

Таким образом, проведенные исследования показывают эффективность использования ФСО при испытаниях вакцин с коревым компонентом по показателю «Специфическая активность» как с целью подтверждения приемлемости получаемых результатов согласно критериям пригодности системы, так и с целью оценки стабильности аналитической работы при испытании вакцин по этому показателю.

Выводы

1. Ретроспективная оценка результатов определения активности вируса кори в образцах ФСО активности коревой вакцины по сводным протоколам производства и по результатам испытаний в ИЦ в 2021–2022 гг. показала, что активность ФСО серии 10 находилась в границах аттестованного значения.

2. Соответствие активности ФСО, определяемой при каждом испытании вышеназванных вакцин, критериям пригодности системы/приемлемости результатов позволяет учитывать результаты контроля активности испытуемых препаратов.

3. Среднее значение титра ФСО ($4,61 \text{ IgTЦД}_{50}/0,5$ мл) практически не отличалось от значения аттестованной характеристики ФСО ($4,63 \text{ IgTЦД}_{50}/0,5$ мл); стандартное отклонение среднего значения активности ФСО серии 10 на предприятии и в ИЦ при испытании вакцин находилось в диапазоне от 0,10 до 0,15 IgTЦД_{50} , т.е. не превышало $0,3 \text{ IgTЦД}_{50}$, что свидетельствует о стабильности аналитической работы в испытательном центре и на предприятии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Юнасова Т.Н., Горенков Д.В., Рукавишников А.В., Мовсесянц А.А., Меркулов В.А. Анализ заболеваемости корью в России и проблемы профилактики кори на этапе элиминации. *Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2019; 19(3): 154–60. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-3-154-160> <https://elibrary.ru/nimofh>
2. Бинятова А.С., Юнасова Т.Н., Саркисян К.А., Давыдов Д.С., Ильясова Е.Н., Мовсесянц А.А. Мониторинг качества отечественных вакцин для профилактики кори. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2021; 20(2): 58–67. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2021-20-2-58-67> <https://elibrary.ru/xfplqw>

REFERENCES

1. Yunasova T.N., Gorenkov D.V., Rukavishnikov A.V., Movsesyants A.A., Merkulov V.A. Analysis of measles incidence in Russia and problems of measles prevention at the elimination stage. *Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie*. 2019; 19(3): 154–60. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-3-154-160> <https://elibrary.ru/nimofh> (in Russian)
2. Binyatova A.S., Yunasova T.N., Sarkisyan K.A., Davydov D.S., Ilyasova E.N., Movsesyants A.A. Monitoring the quality of domestic measles prevention vaccines. *Epidemiologiya i vaksino-profilaktika*. 2021; 20(2): 58–67. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2021-20-2-58-67> <https://elibrary.ru/xfplqw> (in Russian)

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-186>

© ВЛАСОВА Н.Н., ЧЕРНЫХ О.Ю., КРИВОНОС Р.А., ВЕРХОВСКИЙ О.А., АЛИПЕР Т.И., АНОЯТБЕКОВА А.М., ЖУКОВА Е.В., КУЧЕРУК О.Д., ЮЖАКОВ А.Г., ГУЛЮКИН М.И., ГУЛЮКИН А.М., 2023

Адаптация вируса африканской чумы свиней (*Asfarviridae: Asfivirus*) к росту в перевиваемой культуре клеток ППК-666 методом ускоренного пассирования

Власова Н.Н.¹, Черных О.Ю.², Кривонос Р.А.², Верховский О.А.³, Алипер Т.И.¹, Аноятбекова А.М.¹, Жукова Е.В.¹, Кучерук О.Д.¹, Южаков А.Г.¹, Гулюкин М.И.¹, Гулюкин А.М.¹

¹ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук», 109428, г. Москва, Россия;

²Департамент ветеринарии Краснодарского края, 350051, Краснодарский край, г. Краснодар, Россия;

³АНО «Научно-исследовательский институт диагностики и профилактики болезней человека и животных», 123098, г. Москва, Россия

Введение. Вирус африканской чумы свиней (АЧС) представляет собой крупный оболочечный вирус с икосаэдрической морфологией капсида и двухцепочечным ДНК-геномом, размеры которого варьируют от 170 до 190 нм. Цикл репликации протекает в две фазы, причем длительность ранней фазы составляет 4–6 ч, а поздней – 8–20 ч после заражения. Адаптация вируса АЧС к росту в определенных клеточных линиях позволяет провести эффективный и достоверный генетический анализ и более четко интерпретировать его результаты.

Цель. Адаптация нового изолята вируса АЧС к росту в перевиваемой линии клеток методом коротких пассажей и предварительный генетический анализ полученного штамма.

Материалы и методы. Для вирусовыделения, пассирования вируса АЧС использовали первичную культуру клеток лейкоцитов свиньи (ЛС) и перевиваемые культуры клеток свиного происхождения (ПТП, ПС, ППК-666) с использованием питательных сред Игла МЭМ и ГЛА с 10% свиной или фетальной сыворотки.

Результаты. В статье представлены данные по выделению и анализу изменений репродуктивных свойств нового изолята вируса АЧС в процессе адаптации к росту в перевиваемой культуре клеток почки поросенка (ППК-666). Подробно описаны современное состояние проблемы культивирования вируса АЧС, особенности его репродукции и основы генетической дифференциации его изолятов. Понимание уникальности природы вируса АЧС определило подходы к процессам его культивирования и адаптации. В связи с этим приводятся результаты исследований культуральных свойств и анализа нуклеотидной последовательности 6 генов нового изолята, а также филогенетического анализа этих генов с уже известными штаммами и изолятами вируса АЧС.

Заключение. Полученный в процессе адаптации методом коротких пассажей новый штамм ASVF/Znaury/PPK-23 вируса АЧС за 72 ч достигает высокого уровня накопления с титром $7,07 \text{ IgAdE}_{50}/\text{cm}^3$. Первичный генетический анализ позволил установить основные филогенетические связи вновь выделенного изолята с ранее известными вариантами текущей панзоотии АЧС.

Ключевые слова: вирус африканской чумы свиней; структура генома; особенности репликации, перевиваемые линии клеток; вирус-опосредованная гемадсорбция, филогенетический анализ

Для цитирования: Власова Н.Н., Черных О.Ю., Кривонос Р.А., Верховский О.А., Алипер Т.И., Аноятбекова А.М., Жукова Е.В., Кучерук О.Д., Южаков А.Г., Гулюкин М.И., Гулюкин А.М. Адаптация вируса африканской чумы свиней (*Asfarviridae: Asfivirus*) к росту в перевиваемой культуре клеток ППК-666 методом ускоренного пассирования. *Вопросы вирусологии*. 2023; 68(4): 334–342. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-186> EDN: <https://elibrary.ru/mvcgom>

Для корреспонденции: Южаков Антон Геннадиевич, канд. биол. наук, заведующий лабораторией биохимии и молекулярной биологии ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук», 109428, г. Москва, Россия. E-mail: anton_oskol@mail.ru

Участие авторов: Власова Н.Н., Верховский О.А., Гулюкин А.М., Южаков А.Г., Кривонос Р.А., Черных О.Ю., Кучерук О.Д. – сбор и обработка материалов; Власова Н.Н., Южаков А.Г., Жукова Е.В., Аноятбекова А.М. – экспериментальные исследования; Власова Н.Н., Верховский О.А., Алипер Т.И., Черных О.Ю. – написание текста; Власова Н.Н., Верховский О.А., Алипер Т.И., Кучерук О.Д., Южаков А.Г., Гулюкин М.И., Гулюкин А.М. – резюме, заключение, общая редакция.

Финансирование. Работа выполнена в рамках темы ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН № FGUG-2022-18.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus Author Guidelines for Animal Use (IAVES, July 23, 2010). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФГБНУ «ФНЦ ВНИИ экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН (Протокол № 12-2021 от 21.12.2021).

Поступила 03.07.2023
Принята в печать 16.08.2023
Опубликована 31.08.2023

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-186>

Adaptation of african swine fever virus (Asfarviridae: *Asfivirus*) to growth in the continuous culture PPK-66b cells by the method of accelerated passaging

Natalia N. Vlasova¹, Oleg Yu. Chernykh², Roman A. Krivonos², Oleg A. Verkhovsky³, Taras I. Aliper¹, Afshona M. Anoyatbekova¹, Elena V. Zhukova¹, Oksana D. Kucheruk¹, Anton G. Yuzhakov¹, Mikhail I. Gulyukin¹, Aleksey M. Gulyukin¹

¹Federal Scientific Center – All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after V.I. K.I. Scriabin and Ya.R. Kovalenko of the Russian Academy of Sciences, 109428, Moscow, Russia;

²Department of Veterinary Medicine of the Krasnodar Territory, 350051, Krasnodar Territory, Krasnodar, Russia;

³Research Institute for Diagnosis and Prevention of Human and Animal Diseases, 123098, Moscow, Russia

Introduction. African swine fever virus (ASF) is a large, enveloped virus with an icosahedral capsid morphology and a double-stranded DNA genome ranging in size from 170 to 190 kb. The replication cycle proceeds in two phases, the early phase lasting 4–6 hours and the late 8–20 hours after infection. The adaptation of the ASF virus to growth in continuous cell lines makes efficient and reliable genetic analysis and more accurate interpretation of its results.

Objective. Adaptation of a new isolate of the ASF virus to growth in a continuous cell line by the method of accelerated passages and preliminary genetic analysis of the resulting strain.

Materials and methods. For virus isolation and passaging of the ASF virus, a porcine leukocyte cell culture (PL) and continuous cell cultures of porcine origin (ST, PK, PPK-66b) were used with Eagle MEM and HLA essential media with 10% porcine or fetal serum.

Results. The article presents data on the isolation and analysis of the changes in the reproductive properties of a new African swine fever (ASF) virus isolate in the process of adaptation to growth in a continuous piglet kidney cell culture clone b (PPK-66b). The current state of the problem of cultivation of the ASF virus, the features of its reproduction, and the basis of the genetic differentiation of its isolates are described in detail. Understanding the uniqueness of the nature of the ASF virus determined the approaches to the processes of its cultivation and adaptation. In this regard, the results of studies of cultural properties, and analysis of the nucleotide sequence of 6 genes of the new isolate, as well as phylogenetic analysis of these genes with already known strains and isolates of the ASF virus are presented.

Conclusion. A new strain obtained in the process of cell adaptation of ASVF/Znaury/PPK-23 ASF virus by the accelerated passaging method reaches a high level of reproduction in 72 hours with an accumulation titer of 7.07 lg HAdE50/cm³. Primary genetic analysis allowed to establish the main phylogenetic relationships of the newly isolated strain with previously known variants of the current ASF panzootic.

Keywords: African swine fever virus (ASFV); genome structure; features of replication, continuous cell lines; virus-mediated hemadsorption (HAD), phylogenetic analysis

For citation: Vlasova N.N., Chernykh O.Yu., Krivonos R.A., Verkhovsky O.A., Aliper T.I., Anoyatbekova A.M., Zhukova E.V., Kucheruk O.D., Yuzhakov A.G., Gulyukin M.I., Gulyukin A.M. Adaptation of african swine fever virus (Asfarviridae: *Asfivirus*) to growth in the continuous culture PPK-66b cells by the method of accelerated passaging. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2023; 68(4): 334–342 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-186> EDN: <https://elibrary.ru/mvcgom>

For correspondence: Yuzhakov Anton Gennadievich, Ph.D. biol. Sci., Head of the Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, Federal State Budget Scientific Institution “Federal Scientific Center – All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after V.I. K.I. Scriabin and Ya.R. Kovalenko of the Russian Academy of Sciences, 109428, Moscow, Russia. E-mail: anton_oskol@mail.ru

Information about the authors:

Vlasova N.N., <https://orcid.org/0000-0001-8707-7710>

Chernykh O.Yu., <https://orcid.org/0000-0001-8584-8251>

Krivonos R.A. <https://orcid.org/0009-0008-4580-6776>

Verkhovsky O.A., <https://orcid.org/0000-0003-0784-9341>

Aliper T.I., <https://orcid.org/0000-0003-2696-1363>

Anoyatbekova A.M., <https://orcid.org/0000-0002-6579-779X>

Zhukova E.V., <https://orcid.org/0000-0001-7423-6102>

Kucheruk O.D. <https://orcid.org/0000-0002-2161-9406>

Yuzhakov A.G., <https://orcid.org/0000-0002-0426-9678>

Gulyukin M.I., <https://orcid.org/0000-0002-7489-6175>

Gulyukin A.M., <https://orcid.org/0000-0003-2160-4770>

Contribution: Vlasova N.N., Verkhovsky O.A., Gulyukin A.M., Yuzhakov A.G., Krivonos R.A., Chernykh O.Yu., Kucheruk O.D. – collection and processing of materials; Vlasova N.N., Yuzhakov A.G., Zhukova E.V., Anoyatbekova A.M. – experimental studies; Vlasova N.N., Verkhovsky O.A., Aliper T.I., Chernykh O.Yu. – writing text; Vlasova N.N., Verkhovsky O.A., Aliper T.I., Kucheruk O.D., Yuzhakov A.G., Gulyukin A.M., Gulyukin M.I. – summary, conclusion, general edition.

Funding. The work was carried out within the framework of the theme No. FGUG-2022-18 (VIEV RAS).

Conflict of interest. The authors declare no conflicts of interest.

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, July 23, 2010). The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Federal Scientific Center – All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after V.I. K.I. Scriabin and Ya.R. Kovalenko of the Russian Academy of Sciences (Protocol No 12-2021 dated December 21, 2021).

Received 03 July 2023
Accepted 16 August 2023
Published 31 August 2023

Введение

Вирус африканской чумы свиней (АЧС) представляет собой крупный оболочечный вирус с икосаэдрической морфологией капсида и двухцепочечным ДНК-геномом, размеры которого варьируют от 170 до 190 т.п.о. На концах молекулы ДНК имеются концевые инвертированные повторы, заканчивающиеся петлями-шпильками [1]. Репликация вируса АЧС протекает в две фазы, причем ранняя фаза длится 4–6 ч, а поздняя – 8–20 ч после заражения, его цикл реализуется в основном в цитоплазме, но ранняя стадия затрагивает и ядро [2, 3]. По окончании цикла репликации вирионы приобретают внешнюю суперкапсидную оболочку при почковании через плазматическую мембрану [4]. Вирус АЧС размножается преимущественно в клетках моноцитарно-макрофагальной линии и некоторых ретикулярных, полиморфных и мегакариоцитарных клетках [5]; в меньшей степени его репликация наблюдается в эндотелиальных [6], почечных клетках [7], гепатоцитах [8] и нейтрофилах [9].

Анализ внеклеточного вируса АЧС идентифицировал 54 структурных белка с молекулярной массой от 10 000 до 150 000 кДа [10]. Его вирионы содержат транскрипционный аппарат для синтеза, кэпирования и полиаденилирования ранней РНК [1]. Ферменты: протеинкиназа, кодируемая геном *R298L*, две нуклеозидтрифосфатфосфогидролазы, кислая фосфатаза и дезоксирибонуклеаза, также были обнаружены в вирусных частицах [1, 11].

Одним из эффективных подходов в изучении функции генов вируса АЧС является генетический анализ искусственно модифицированного или длительно пассированного вируса в первичных или перевиваемых линиях. Однако его адаптация к росту в определенных клеточных линиях – процесс сложный и длительный, хотя и позволяет сделать достоверным и детальный процесс анализа. При этом в течение многократных пассажей обычно наблюдается снижение вирулентности адаптированного вируса [12, 13].

За более чем 50-летнюю историю интенсивного изучения вируса АЧС получено несколько лабораторно-и природно-аттенуированных штаммов [14, 15]. Тем не менее подробная информация о процессе адаптации, фенотипических изменениях и точных геномных модификациях вируса АЧС, выращенного/адаптиро-

ванного *in vitro*, остается до конца невыясненной, что затрудняет понимание геномных механизмов, приводящих к его фенотипическим модификациям и изменению вирулентности.

Установлено, что в процессе адаптации вируса АЧС к росту в непермиссивных клеточных культурах происходят значительные геномные перестройки [13]. Например, геномные изменения ASFV-G, возникающие в течение последовательных пассажей в клетках *Vero*, группируются по появлению точечных мутаций, приводящих к заменам нуклеотидов или сдвигу рамки считывания, а также по наличию возникших крупных делеций, затрагивающих группу генов в левой вариабельной области. К сожалению, оценка всех эффектов, вызванных точечными мутациями при адаптации ASFV-G к росту в клетках *Vero*, была значительно затруднена, поскольку они не несли ощутимых фенотипических изменений: например, геном ASFV-G/VP разных пассажей имел точечную мутацию в гене *CP530R*, а различий в цитопатическом действии (ЦПД) исходного и адаптированного вируса не было обнаружено [13].

Точечные мутации, наблюдаемые в генах *MGF505 10R* и *I177L*, также могут влиять на изменения ЦПД, отмеченные у ASFV-G/VP 60-го пассажа и ASFV-G/VP 80-го пассажа, а мутации в гене *MGF505 10R*, который является членом семейства генов, связанных с репликацией вируса АЧС в свинных макрофагах, вирулентностью вируса и блокированием продукции интерферона, приводят к снижению уровня репликации [12, 13, 16].

Как было установлено, вирулентность вируса АЧС – полигенное свойство, разные группы исследователей определили ряд генов, ответственных за его высокую патогенность: например, *CD2v* [17], *DP148R* [18] и др. [19]. Однако на настоящий момент эффективная и безопасная вакцинопрофилактика при АЧС не разработана, в связи с чем анализ особенностей репликации этого сложного вируса, структуры его генома и функции отдельных генов остается одним из самых актуальных направлений его изучения.

Вирус АЧС использует свои ферментативные и регуляторные компоненты для переключения клеточной синтетической активности на «вирусные фабрики». Он обладает практически полной независимостью от хозяйских клеточных ферментов в отношении вре-

менных факторов, которые контролируют экспрессию генов, и представляет собой идеальную модель для изучения особенностей вирусной репликации и вирусиндуцированных факторов модуляции иммунной системы хозяина.

С учетом этого, не подлежит сомнению тот факт, что в процессе адаптации происходит постепенная перестройка работы вирусной регуляторной и ферментативной системы, необходимая для успешной репликации вируса в новой клеточной системе. Процесс полноценной адаптации и получения нового штамма, как правило, занимает от 10 до 24 месяцев. Таким образом, сокращение сроков эффективной адаптации играет существенную роль в научных исследованиях. Поскольку у вируса АЧС инфекционностью обладают как внеклеточные, так и внутриклеточные вирионы, а конечным этапом вирусного цикла является почкование через клеточную мембрану, замена этой фазы репликации процессом замораживания/оттаивания позволяет сократить длительность цикла и достичь одновременного массивного выхода инфекционных частиц.

Цель исследования – адаптация вируса АЧС, изолята из Республики Южная Осетия, к росту в перевиваемой линии клеток ППК-666 методом коротких пассажей для дальнейшего анализа особенностей его репликации, изучения структуры генома и определения нуклеотидной последовательности некоторых генов.

Материалы и методы

Культивирование первичных и перевиваемых линий клеток. Первичную культуру лейкоцитов свиной (ЛС) получали от здоровых животных согласно ГОСТ 28573-90 «Свины. Методы лабораторной диагностики африканской чумы» и выращивали в пластиковых флаконах с рабочей поверхностью 25 см² (T25) в среде ГЛА на Хэнкса с добавлением 10% фетальной сыворотки. Перевиваемые культуры клеток ППК-666 (перевиваемые клетки почки поросенка, клон 666), ПТП (перевиваемые тестикулы поросенка), ПС (перевиваемые клетки почки свиной) были получены из «Специализированной коллекции перевиваемых, соматических клеточных культур сельскохозяйственных и промысловых животных РККК (П), (СХЖ РАСХН)» ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН (РП №2460-р от 06.09.2021). Клетки культивировали в пластиковых матрасах T25 в среде Игла MEM с добавлением 10% сыворотки крупного рогатого скота или свиной.

Вирусовыделение. Вирусовыделение проводили стандартным методом путем заражения культуры клеток ЛС. Для получения 10% суспензии при вирусовыделении сгусток крови гомогенизировали в фарфоровой ступке, далее к 1 см³ гомогената сгустка крови добавляли 9 см³ физраствора. Полученную суспензию осветляли центрифугированием при 1500 об/мин с последующим фильтрованием через нитроцеллюлозные мембраны с диаметром пор 0,45 мкм, после чего использовали ее для введения вируса в куль-

туральную среду в соотношении объемов 1 : 10. Длительность пассажа составляла 7 суток.

Адаптация вируса. Адаптацию проводили методом коротких пассажей. Поскольку репликативный цикл вируса АЧС длится около 20 ч, то для быстрой адаптации его к росту в перевиваемой культуре клеток использовали метод, основанный на получении максимального выхода вирусного потомства от варианта, способного к репликации в новой клеточной системе, т.е. клетках перевиваемых линий.

С этой целью инокулировали культуры клеток ПТП, ПС, ППК-666 с использованием 1 см³ вирусосодержащего материала изолята ASVF/Znaury/dp-22 с титром инфекционности 7,32 lgГАДЕ₅₀/см³, исходя из расчета, что доза заражения на клетку составила ≈ 100 ГАДЕ₅₀. После двухчасовой адсорбции остатки вирусосодержащей суспензии удаляли, трижды промывали монослой клеток питательной средой Игла МЭМ и вносили в каждый флакон по 7 мл питательной среды с 10% свиной сыворотки.

После инкубации при 37 °С в течение 96 ч из флаконов удаляли культуральную жидкость и собранные с рабочей поверхности флакона клетки подвергли трехкратному замораживанию/оттаиванию (–70 °С – +8 °С). Обломки клеток удаляли центрифугированием при 4000 об/мин в течение 20 мин, а надосадочную жидкость использовали для дальнейшей процедуры инокуляции свежего монослоя культуры клеток. Таким образом было проведено 5 последовательных пассажей, затем время пассирования сократили до 72 ч и провели еще 3 дополнительных пассажа. Последовательное пассирование (9–16-й пассажи) проводилось описанным ранее методом, причем длительность одного пассажа не превышала 72 ч.

ПЦР-анализ. Для обнаружения генома вируса АЧС в полевом материале и культурах клеток использовали диагностическую тест-систему для выявления вируса АЧС методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени (ПЦР-РВ) (ООО «Ветбиохим», Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

Амплификаты генов *CD2v*, *ORF9*, *B646L*, *KP205R* были получены с использованием праймеров, опубликованных в отечественной и зарубежной литературе, и отобраны для секвенирования с целью проведения филогенетического анализа. Исследованные области генома вируса АЧС обладают определенным уровнем изменчивости, а их анализ применяется для генотипирования и группирования новых изолятов [20].

Также в анализ включили исследование межгенных областей (IGR) MGF 505 9R/10R и I73R/I329L с помощью протоколов, описанных ранее [20, 21].

ПЦР-продукты амплификации генов или фрагментов генома разделяли с помощью электрофореза с использованием 1% агарозного геля. Очистку ПЦР-фрагментов из агарозного геля проводили с использованием набора GeneJET PCR Purification Kit (ThermoFisher Scientific, США).

Секвенирование по Сэнгеру. Секвенирование очищенных ПЦР-продуктов осуществляли с использованием

набора BigDye Terminator Cycle Sequencing kit и секвенатора ABIPrism 3100 (AppliedBiosystems, США).

Анализ результатов. Полученные нуклеотидные последовательности анализировали при помощи пакетов программ Lasergene 11.1.0 (DNASTAR, США). Выравнивание полученных последовательностей и последовательностей эталонного штамма Georgia 2007/1, а также изолятов из Европы, Азии и Африки, полный геном которых определен и опубликован в Genbank, проводили с использованием метода MUSCLE. Филогенетическая дендрограмма была построена с помощью метода максимального правдоподобия в программе MEGA 7.0. Топологию ветвей дендрограммы подтверждали методом бутстрэп-анализа (1000 шагов репликации). Для построения деревьев использовали модель General Time Reversible (GTR), гамма-распределение вариации частот между сайтами (G + I).

Результаты

Происхождение изолята вируса. В январе 2022 г. в с. Ног Знаурского района Республики Южная Осетия в частном секторе у леса, на удаленном расстоянии от соседей, произошла локальная вспышка АЧС. Свиньи (3 головы) были больны в течение 4 суток: наблюдалась гипертермия, отказ от корма, слабо-выраженная синюшность кожных покровов. После указанного срока начался падеж. У трупов отобрали патологический материал (кровь). По данным эпизоотологического расследования, одним из возможных путей заражения являлся контакт с дикими кабанами или инфицированными объектами в окружающей природе: животных выращивали на свободно выгульном содержании. После постановки диагноза в соответствии с ветеринарными правилами трупы павших животных были сожжены и введен карантин. Впоследствии у соседей, содержавших свиней, падежа не регистрировали.

В лабораторию биохимии и молекулярной биологии ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН материал поступил в рамках договора о научном сотрудничестве с Департаментом ветеринарии Краснодарского края от 22.08.2022.

Вирусовыделение нового изолята. Для изоляции вируса из крови, отобранной от павшей домашней свиньи в Знаурском районе, использовали ее образцы, имевшие в ПЦР-РВ положительный результат. Вирусовыделение проводили на обладающей высокой чувствительностью к репродукции вируса АЧС первичной культуре клеток ЛС, в которой он размножается без предварительной адаптации. В ходе вирусовыделения осуществляли ежедневное микроскопирование и учитывали время появления гемадсорбции и цитопатогенного эффекта на 75–80%. Всего выполнили 3 последовательных пассажа. После первого пассажа признаков накопления вируса не обнаружили, поэтому далее провели еще 2 пассажа, внося в новые матрасы с культурой клеток ЛС вирусосодержащую суспензию предыдущего пассажа также в соотношении 1 : 10. На 3-м пассаже была получена культуральная жидкость с титром инфекционности 7,15–7,32 IgГАдE₅₀/см³. Таким образом, вирус АЧС нового изолята ASVF/Znaury/dp-22 был выделен из патологического материала свиньи (кровь), павшей на территории Знаурского района Республики Южная Осетия в январе 2022 г., путем 3 последовательных пассажей на культуре клеток ЛС.

Изучение культуральных свойств нового изолята вируса АЧС. Для анализа культуральных свойств определяли уровень накопления вируса по скорости появления гемадсорбции и сохранности монослоя. На уровне 2-го и 3-го пассажей при температуре 37 °С полный цикл накопления вируса продолжался в течение 7 суток с проявлением его гемадсорбирующих свойств на 3–4-е сутки. Для материала 3-го пассажа был определен титр накопления в культуре ЛС, который не превышал значений 7,15–7,32 IgГАдE₅₀/см³. Наличие генома вируса АЧС в полученном материале подтверждали методом ПЦР-РВ, где показатель Ct имел значения не выше 8,34–9,21. Таким образом, принадлежность выделенного вируса к возбудителю АЧС была подтверждена в реакции гемадсорбции и ПЦР-РВ.

Следующим этапом выполняли подбор наиболее пригодной для адаптации перевиваемой культуры кле-

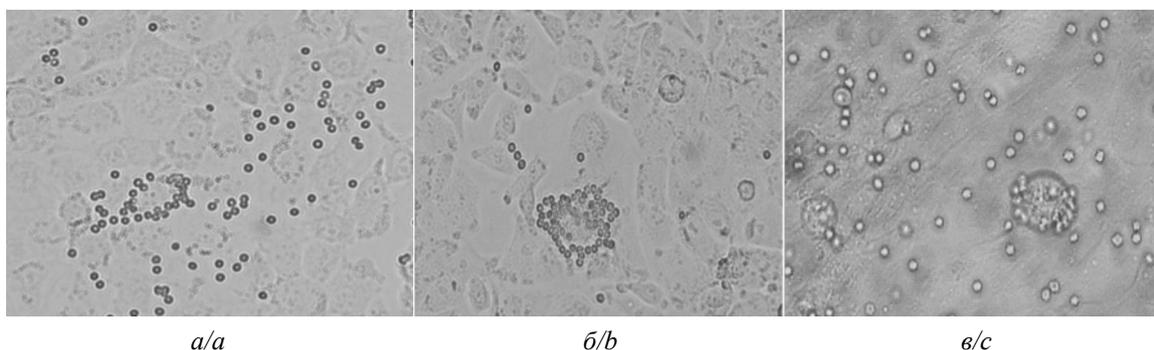


Рис. 1. Реакция гемадсорбции при заражении клеток перевиваемых линий свиного происхождения вирусом АЧС изолят ASVF/Znaury/dp-22.

a – ППК66б – 2-е сутки; *б* – ПТП – 4-е сутки; *в* – ПС – 6-е сутки; ув. 100.

Fig. 1. Hemadsorption upon the continuous cell lines of porcine origin infected by ASF virus isolate ASVF/Znaury/dp-22.

a – PPK66b – day 2; *b* – ST – day 4; *c* – PK – day 6; magnification ×100.

ток свиного происхождения. Для анализа были взяты 3 разные линии: ПТП, ПС и ППК-666. Для оценки наличия возможной репликации вируса использовали реакцию гемадсорбции. С этой целью в культуральную жидкость добавляли эритроциты свиньи до разведения 0,01%. Сроки появления и наличие гемадсорбции выявляли путем ежедневного микроскопирования в течение 7 суток. Результаты постановки реакции гемадсорбции представлены на **рисунке 1**.

Как видно из результатов реакции гемадсорбции наибольшей чувствительностью к репродукции вируса АЧС изначально обладали клетки линии ППК-666, поскольку вирусопосредованная гемадсорбция появилась на клетках этой линии на 2 суток раньше, чем в культуре ПТП, и на 4 суток раньше, чем в культуре ПС.

Адаптация вируса. Далее вирус изолята ASVF/Znaury/dp-22 адаптировали к росту в отобранной перевиваемой культуре клеток ППК-666, в которой было бы возможно его эффективное культивирование после адаптации. Адаптацию вируса проводили, как описано в разделе «Материалы и методы». После 8-го пассажа отбирали надосадочную жидкость с лизированной культуры клеток и определяли титр в культуре клеток ЛС. Его среднее значение варьировало от 4,83 до 5,47 $\text{lgAdE}_{50}/\text{cm}^3$. Титр вируса на уровне 16-го пассажа достиг значений $6,23 \pm 0,08 \text{ lgAdE}_{50}/\text{cm}^3$. Следовательно, вирус изолята ASVF/Znaury/dp-22 адаптировался к росту в перевиваемой культуре клеток ППК-666.

Начиная с 16-го пассажа дальнейшее культивирование вируса проводили без стадии адсорбции вируса, внося культуральную жидкость с вирусом 16-го и последующих пассажей в питательную среду новых флаконов, и инкубировали при 37 °С в течение не более 72 ч. Культивируя подобным образом вирус, осуществляли селекцию и отбор популяции быстро реплицирующегося вируса, который накапливался в минимально короткие сроки. Результаты адаптации вируса изолята ASVF/Znaury/dp-22 к росту в переви-

ваемой культуре клеток ППК-666 в течение 52 пассажей приведены в **таблице**.

Как видно из результатов, приведенных в таблице, титр адаптированного вируса в культуре клеток ППК-666 незначительно отличался от титра вируса, определенного для исходного изолята ASVF/Znaury/dp-22, накопленного в культуре клеток ЛС.

Генетический анализ. Для проверки наличия генетических различий изолята ASVF/Znaury/dp-22 и его адаптированного к росту в перевиваемой культуре клеток ППК-666 варианта, провели локусный анализ генетической структуры по шести маркерным областям генома вируса АЧС.

Исследованные области генома вируса АЧС обладают определенным уровнем изменчивости, однако, их анализ не позволил выявить наличие уникальных изменений, характерных для данного изолята. Тем не менее, определение последовательности гена B646L и межгенного региона I73R/I329L позволило провести предварительное группирование нового изолята ASVF/Znaury/dp-22 и определить его генотип.

В результате филогенетического анализа в отношении гена B646L было установлено, что выделенный изолят относится ко II генотипу (**рис. 2**) и по наличию 10-нуклеотидной встройки в межгенном регионе I73R/I329L можно отнести его к подгруппе IGR I (**рис. 3**).

Таким образом, использование перевиваемой культуры клеток свиного происхождения в сочетании с методом коротких пассажей в ППК-666 позволило за 5 месяцев получить из вирусного материала изолята ASVF/Znaury/dp-22 новый штамм ASVF/Znaury/PPK-23 с определенными культуральными свойствами и первичной генетической характеристикой.

Заключение

Настоящая работа является одной из первых по описанию вируса АЧС, циркулирующего в Республике Южная Осетия.

В представленной статье основное внимание уделялось изучению культуральных свойств при адаптации

Таблица. Значения титра вируса АЧС разных пассажных уровней ($n = 4$)

Table. The ASFV titer values at the different passages ($n = 4$)

Номер пассажа Passage number	Доза заражения (ГAdE_{50} на клетку)* Infection dose (HAdE_{50} per cell)*	Время репродукции (ч) Reproduction time (hours)	Титр вируса ($\text{lgAdE}_{50}/\text{cm}^3$)* Virus titer ($\text{lgHAdE}_{50}/\text{cm}^3$)*
1	≈ 100	96	$7,32 \pm 0,21$
5	$\approx 1-10$	96	$4,83 \pm 0,43$
8	≈ 1	72	$5,47 \pm 0,32$
12	≈ 10	72	$5,77 \pm 0,18$
16	≈ 10	72	$6,23 \pm 0,21$
26	≈ 10	72	$6,32 \pm 0,14$
36	≈ 10	72	$6,61 \pm 0,09$
46	≈ 10	72	$6,89 \pm 0,11$
52	≈ 10	72	$7,07 \pm 0,15$

Примечание. * – указан титр вируса, определенный в культуре клеток ЛС.

Note. * – indicates the virus titer determined in the porcine leucocytes cell culture (PL).

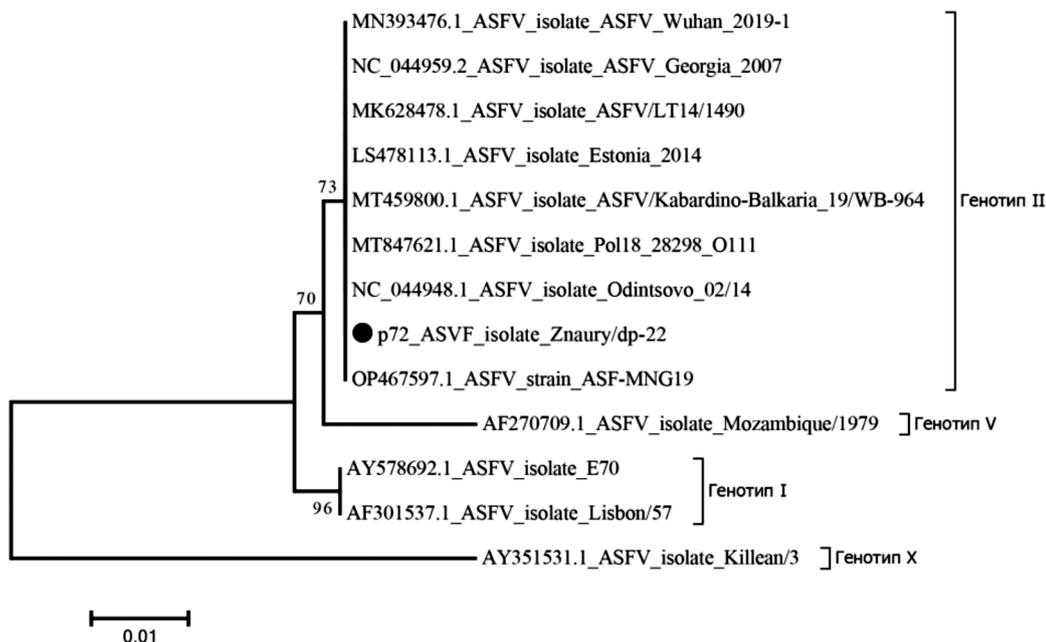


Рис. 2. Филогенетическое дерево на основе анализа нуклеотидных последовательностей гена *B646L* (*p72*) разных штаммов II генотипа и нового изолята из с. Ног Знаульского района Республики Южная Осетия.

Fig. 2. Phylogenetic tree based on the analysis of the nucleotide sequences of the *B646L* (*p72*) gene of various strains of genotype II and a new isolate from the v. Nog of the Znaury district of the Republic of South Ossetia.

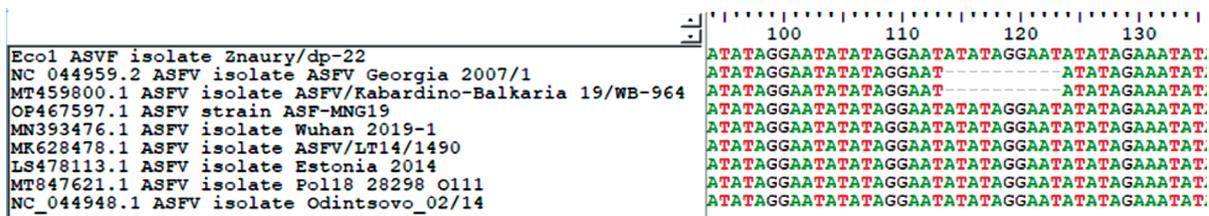


Рис. 3. Выравнивание нуклеотидной последовательности изолятов вируса АЧС II генотипа с 10-нуклеотидной встройкой в межгенном регионе I73R/I329L и без нее.

Fig. 3. Nucleotide sequence alignment of ASFV genotype II isolates with and without a 10-nucleotide insert in the I73R/I329L intergenic region.

к росту в перевиваемой культуре клеток ППК-666 методом коротких пассажей. Использование этого метода позволило сократить процесс получения адаптированного штамма практически в 2 раза: с 9–12 до 4–5 месяцев.

Для детального анализа скорости репродукции вируса и структуры его генома было необходимо четкое понимание механизмов его репликации и особенностей морфогенеза. Сходство между структурой генома вирусов АЧС и коровьей оспы позволило исследователям определить модель для репликации его ДНК [22]. Инициация репликации начинается с введения одноцепочечного разрыва в геном вблизи 5'- или 3'-концов, причем синтезируется интермедиат, в котором концы зарождающихся и матричных цепей являются инвертированными, образуя самосхлопывающуюся шпильку. Следовательно, наиболее вариабельные области ДНК вируса АЧС располагаются по концам генома, причем, гены вируса АЧС, находящиеся в вариабельных областях, как правило, несущественны для

репликации вируса *in vitro*, но выполняют функции, связанные с хозяйской специфичностью [22].

Исходя из вышеизложенного, для первичного генетического анализа были выбраны участки генома, характеризующие генотип вируса АЧС: участок гена *B646L* и центральный вариабельный регион (CVR) гена *B602L* [23, 24]. Впоследствии определяли наличие 10-нуклеотидной встройки в интергенном регионе I73R/I329L и полноценность гена, ответственного за гемадсорбцию вируса EP402R [25]. Для поиска возможных мутаций вариабельных регионов генома, произошедших в процессе адаптации, были проанализированы нуклеотидные последовательности генов в правой и левой концевых областях – MGF-505, 9R/10R и UK(DP69R). Первичный генетический анализ позволил установить основные филогенетические связи вновь выделенного изолята с ранее известными вариантами текущей панзоотии АЧС: изолят ASFV/Znaury/dp-22 относится ко II генотипу (рис. 2), подгруппе IGR II.

Очевидно, что дальнейший генетический анализ позволит выявить маркерные последовательности, уникальные для исходного изолята и штамма ASVF/Znaury/PPK-23, адаптированного к росту в ППК-666, и установить, влияет ли процесс ускоренного пассирования на структуру генома вируса АЧС аналогично стандартному процессу адаптации, как было ранее описано другими авторами [12, 13].

Кроме того, определение полногеномной последовательности ASVF/Znaury/dp-22 облегчит идентификацию молекулярных изменений в геноме ASVF/Znaury/PPK-23 по сравнению с его ближайшим родственником и тем самым будет способствовать детальному изучению структуры генома, анализу особенностей его репликации и выяснению функций некоторых генов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Salas M.L., Andrés G. African swine fever virus morphogenesis. *Virus Res.* 2013; 173(1): 29–41. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.09.016>
2. Rojo G., García-Beato R., Viñuela E., Salas M.L., Salas J. Replication of African swine fever virus DNA in infected cells. *Virology.* 1999; 257(2): 524–36. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9704>
3. García-Beato R., Salas M.L., Viñuela E., Salas J. Role of the host cell nucleus in the replication of African swine fever virus DNA. *Virology.* 1992; 188(2): 637–49. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(92\)90518-t](https://doi.org/10.1016/0042-6822(92)90518-t)
4. Breese S.S. Jr., DeBoer C.J. Electron microscope observations of African swine fever virus in tissue culture cells. *Virology.* 1966; 28(3): 420–8. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(66\)90054-7](https://doi.org/10.1016/0042-6822(66)90054-7)
5. Casal I., Enjuanes L., Viñuela E. Porcine leukocyte cellular subsets sensitive to African swine fever virus in vitro. *J. Virol.* 1984; 52(1): 37–46. <https://doi.org/10.1128/JVI.52.1.37-46.1984>
6. Wardley R.C., Wilkinson P.J. The growth of virulent African swine fever virus in pig monocytes and macrophages. *J. Gen. Virol.* 1978; 38(1): 183–6. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-38-1-183>
7. Gómez-Villamandos J.C., Hervás J., Méndez A., Carrasco L., Martín de las Mulas J., Villeda C.J., et al. Experimental African swine fever: apoptosis of lymphocytes and virus replication in other cells. *J. Gen. Virol.* 1995; 76 (Pt. 9): 2399–405. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-9-2399>
8. Sierra M.A., Bernabe A., Mozos E., Mendez A., Jover A. Ultrastructure of the liver in pigs with experimental African swine fever. *Vet. Pathol.* 1987; 24(5): 460–2. <https://doi.org/10.1177/030098588702400516>
9. Carrasco L., de Lara F.C., Martín de las Mulas J., Gómez-Villamandos J.C., Pérez J., Wilkinson P.J., et al. Apoptosis in lymph nodes in acute African swine fever. *J. Comp. Pathol.* 1996; 115(4): 415–28. [https://doi.org/10.1016/s0021-9975\(96\)80075-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9975(96)80075-2)
10. Esteves A., Marques M.I., Costa J.V. Two-dimensional analysis of African swine fever virus proteins and proteins induced in infected cells. *Virology.* 1986; 152(1): 192–206. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(86\)90384-3](https://doi.org/10.1016/0042-6822(86)90384-3)
11. Baylis S.A., Banham A.H., Vydellingum S., Dixon L.K., Smith G.L. African swine fever virus encodes a serine protein kinase which is packaged into virions. *J. Virol.* 1993; 67(8): 4549–56. <https://doi.org/10.1128/JVI.67.8.4549-4556.1993>
12. Krug P.W., Holinka L.G., O'Donnell V., Reese B., Sanford B., Fernandez-Sainz I., et al. The progressive adaptation of a Georgian isolate of African swine fever virus to vero cells leads to a gradual attenuation of virulence in swine corresponding to major modifications of the viral genome. *J. Virol.* 2015; 89(4): 2324–32. <https://doi.org/10.1128/JVI.03250-14>
13. Мазлум А.А., Иголкин А.С., Зиняков Н.Г., ван Шалквик А., Власова Н.Н. Геномные изменения вируса африканской чумы свиней (Asfarviridae: Asfivirus: African swine fever virus), связанные с адаптацией к размножению в перевиваемой культуре клеток. *Вопросы вирусологии.* 2021; 66(3): 211–6. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-50> <https://elibrary.ru/eqrwmo>

14. Прудникова Е.Ю., Балышев В.М., Юрков С.Г., Гальнбек Т.В., Блышева В.И. Адаптация вируса африканской чумы свиней к перевиваемым культурам клеток. *Научный журнал КубГАУ.* 2012; (80): 70–9. <https://elibrary.ru/pbuuyj>
15. Boinas F.S., Hutchings G.H., Dixon L.K., Wilkinson P.J. Characterization of pathogenic and non-pathogenic African swine fever virus isolates from *Ornithodoros erraticus* inhabiting pig premises in Portugal. *J. Gen. Virol.* 2004; 85(Pt 8): 2177–87. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80058-0>
16. Borca M.V., Rai A., Ramirez-Medina E., Silva E., Velazquez-Salinas L., Vuono E., et al. A Cell Culture-Adapted Vaccine Virus against the Current African Swine Fever Virus Pandemic Strain. *J. Virol.* 2021; 95(14): e0012321. <https://doi.org/10.1128/JVI.00123-21>
17. Monteagudo P.L., Lacasta A., López E., Bosch L., Collado J., Pina-Pedrero S., et al. BA71ΔCD2: a New Recombinant Live Attenuated African Swine Fever Virus with Cross-Protective Capabilities. *J. Virol.* 2017; 91(21): e01058–17. <https://doi.org/10.1128/JVI.01058-17>
18. Reis A.L., Goatley L.C., Jabbar T., Sanchez-Cordon P.J., Netherton C.L., Chapman D.A.G., et al. Deletion of the African Swine Fever Virus Gene DP148R Does Not Reduce Virus Replication in Culture but Reduces Virus Virulence in Pigs and Induces High Levels of Protection against Challenge. *J. Virol.* 2017; 91(24): e01428–17. <https://doi.org/10.1128/JVI.01428-17>
19. Neilan J.G., Zsak L., Lu Z., Kutish G.F., Afonso C.L., Rock D.L. Novel swine virulence determinant in the left variable region of the African swine fever virus genome. *J. Virol.* 2002; 76(7): 3095–104. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.7.3095-3104.2002>
20. Gallardo C., Mwaengo D.M., Macharia J.M., Arias M., Taracha E.A., Soler A., et al. Enhanced discrimination of African swine fever virus isolates through nucleotide sequencing of the p54, p72, and pB602L (CVR) genes. *Virus Genes.* 2009; 38(1): 85–95. <https://doi.org/10.1007/s11262-008-0293-2>
21. Elskova A.A., Shevchenko I.V., Varentsova A.A., Zinyakov N.G., Igolkin A.S., Vlasova N.N. Comparative analysis of molecular and biological properties of African swine fever virus isolates collected in 2013 from Russian Federation. *Abstracts 8th Annual EPIZONE Meeting "Primed for tomorrow"*. Frideriksberg, 2014.
22. Dixon L.K., Chapman D.A., Netherton C.L., Upton C. African swine fever virus replication and genomics. *Virus Res.* 2013; 173(1): 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.10.020>
23. Bastos A.D., Penrith M.L., Crucière C., Edrich J.L., Hutchings G., Roger F., et al. Genotyping field strains of African swine fever virus by partial p72 gene characterisation. *Arch. Virol.* 2003; 148(4): 693–706. <https://doi.org/10.1007/s00705-002-0946-8>
24. Gallardo C., Mwaengo D.M., Macharia J.M., Arias M., Taracha E.A., Soler A., et al. Enhanced discrimination of African swine fever virus isolates through nucleotide sequencing of the p54, p72, and pB602L (CVR) genes. *Virus Genes.* 2009; 38(1): 85–95. <https://doi.org/10.1007/s11262-008-0293-2>
25. Borca M.V., Kutish G.F., Afonso C.L., Irusta P., Carrillo C., Brun A., et al. An African swine fever virus gene with similarity to the T-lymphocyte surface antigen CD2 mediates hemadsorption. *Virology.* 1994; 199(2): 463–8. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1146>

REFERENCES

1. Salas M.L., Andrés G. African swine fever virus morphogenesis. *Virus Res.* 2013; 173(1): 29–41. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.09.016>
2. Rojo G., García-Beato R., Viñuela E., Salas M.L., Salas J. Replication of African swine fever virus DNA in infected cells. *Virology.* 1999; 257(2): 524–36. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9704>
3. García-Beato R., Salas M.L., Viñuela E., Salas J. Role of the host cell nucleus in the replication of African swine fever virus DNA. *Virology.* 1992; 188(2): 637–49. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(92\)90518-t](https://doi.org/10.1016/0042-6822(92)90518-t)
4. Breese S.S. Jr., DeBoer C.J. Electron microscope observations of African swine fever virus in tissue culture cells. *Virology.* 1966; 28(3): 420–8. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(66\)90054-7](https://doi.org/10.1016/0042-6822(66)90054-7)
5. Casal I., Enjuanes L., Viñuela E. Porcine leukocyte cellular subsets sensitive to African swine fever virus in vitro. *J. Virol.* 1984; 52(1): 37–46. <https://doi.org/10.1128/JVI.52.1.37-46.1984>

6. Wardley R.C., Wilkinson P.J. The growth of virulent African swine fever virus in pig monocytes and macrophages. *J. Gen. Virol.* 1978; 38(1): 183–6. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-38-1-183>
7. Gómez-Villamandos J.C., Hervás J., Méndez A., Carrasco L., Martín de las Mulas J., Villeda C.J., et al. Experimental African swine fever: apoptosis of lymphocytes and virus replication in other cells. *J. Gen. Virol. Pathol.* 1995; 76 (Pt 9): 2399–405. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-9-2399>
8. Sierra M.A., Bernabe A., Mozos E., Mendez A., Jover A. Ultrastructure of the liver in pigs with experimental African swine fever. *Vet. Pathol.* 1987; 24(5): 460–2. <https://doi.org/10.1177/030098588702400516>
9. Carrasco L., de Lara F.C., Martín de las Mulas J., Gómez-Villamandos J.C., Pérez J., Wilkinson P.J., et al. Apoptosis in lymph nodes in acute African swine fever. *J. Comp. Pathol.* 1996; 115(4): 415–28. [https://doi.org/10.1016/s0021-9975\(96\)80075-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9975(96)80075-2)
10. Esteves A., Marques M.L., Costa J.V. Two-dimensional analysis of African swine fever virus proteins and proteins induced in infected cells. *Virology.* 1986; 152(1): 192–206. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(86\)90384-3](https://doi.org/10.1016/0042-6822(86)90384-3)
11. Baylis S.A., Banham A.H., Vydelingum S., Dixon L.K., Smith G.L. African swine fever virus encodes a serine protein kinase which is packaged into virions. *J. Virol.* 1993; 67(8): 4549–56. <https://doi.org/10.1128/JVI.67.8.4549-4556.1993>
12. Krug P.W., Holinka L.G., O'Donnell V., Reese B., Sanford B., Fernandez-Sainz I., et al. The progressive adaptation of a georgian isolate of African swine fever virus to vero cells leads to a gradual attenuation of virulence in swine corresponding to major modifications of the viral genome. *J. Virol.* 2015; 89(4): 2324–32. <https://doi.org/10.1128/JVI.03250-14>
13. Mazloun A., Igolkin A.S., Zinyakov N.G., Van Schalkwyk A., Vlasova N.N. Changes in the genome of African swine fever virus (Asfarviridae: Asfivirus: African swine fever virus) associated with adaptation to reproduction in continuous cell culture. *Voprosy virusologii.* 2021; 66(3): 211–6. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-50> (in Russian)
14. Prudnikova E.Yu., Balyshv V.M., Yurkov S.G., Gal'nbek T.V., Blysheva V.I. Adaptation of African swine fever virus to continuous cell cultures. *Nauchnyy zhurnal KubGAU.* 2012; (80): 70–9. <https://elibrary.ru/pbuuyj> (in Russian)
15. Boinas F.S., Hutchings G.H., Dixon L.K., Wilkinson P.J. Characterization of pathogenic and non-pathogenic African swine fever virus isolates from *Ornithodoros erraticus* inhabiting pig premises in Portugal. *J. Gen. Virol.* 2004; 85(Pt. 8): 2177–87. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80058-0>
16. Borca M.V., Rai A., Ramirez-Medina E., Silva E., Velazquez-Salinas L., Vuono E., et al. A Cell culture-adapted vaccine virus against the current African swine fever virus pandemic strain. *J. Virol.* 2021; 95(14): e0012321. <https://doi.org/10.1128/JVI.00123-21>
17. Monteagudo P.L., Lacasta A., López E., Bosch L., Collado J., Pina-Pedrero S., et al. BA71ΔCD2: a new recombinant live attenuated African swine fever virus with cross-protective capabilities. *J. Virol.* 2017; 91(21): e01058–17. <https://doi.org/10.1128/JVI.01058-17>
18. Reis A.L., Goatley L.C., Jabbar T., Sanchez-Cordon P.J., Netherton C.L., Chapman D.A.G., et al. Deletion of the African swine fever virus gene DP148R does not reduce virus replication in culture but reduces virus virulence in pigs and induces high levels of protection against challenge. *J. Virol.* 2017; 91(24): e01428–17. <https://doi.org/10.1128/JVI.01428-17>
19. Neilan J.G., Zsak L., Lu Z., Kutish G.F., Afonso C.L., Rock D.L. Novel swine virulence determinant in the left variable region of the African swine fever virus genome. *J. Virol.* 2002; 76(7): 3095–104. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.7.3095-3104.2002>
20. Gallardo C., Mwaengo D.M., Macharia J.M., Arias M., Taracha E.A., Soler A., et al. Enhanced discrimination of African swine fever virus isolates through nucleotide sequencing of the p54, p72, and pB602L (CVR) genes. *Virus Genes.* 2009; 38(1): 85–95. <https://doi.org/10.1007/s11262-008-0293-2>
21. Elsukova A.A., Shevchenko I.V., Varentsova A.A., Zinyakov N.G., Igolkin A.S., Vlasova N.N. Comparative analysis of molecular and biological properties of African swine fever virus isolates collected in 2013 from Russian Federation. In: *Abstracts 8th Annual EPIZONE Meeting «Primed for Tomorrow».* Frideriksberg; 2014.
22. Dixon L.K., Chapman D.A., Netherton C.L., Upton C. African swine fever virus replication and genomics. *Virus Res.* 2013; 173(1): 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.10.020>
23. Bastos A.D., Penrith M.L., Crucière C., Edrich J.L., Hutchings G., Roger F., et al. Genotyping field strains of African swine fever virus by partial p72 gene characterisation. *Arch. Virol.* 2003; 148(4): 693–706. <https://doi.org/10.1007/s00705-002-0946-8>
24. Gallardo C., Mwaengo D.M., Macharia J.M., Arias M., Taracha E.A., Soler A., et al. Enhanced discrimination of African swine fever virus isolates through nucleotide sequencing of the p54, p72, and pB602L (CVR) genes. *Virus Genes.* 2009; 38(1): 85–95. <https://doi.org/10.1007/s11262-008-0293-2>
25. Borca M.V., Kutish G.F., Afonso C.L., Irusta P., Carrillo C., Brun A., et al. An African swine fever virus gene with similarity to the T-lymphocyte surface antigen CD2 mediates hemadsorption. *Virology.* 1994; 199(2): 463–8. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1146>

ДИСКУССИЯ

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-170>

© СОЛОМАЙ Т.В., СЕМЕНЕНКО Т.А., АКИМКИН В.Г., 2023



Особенности саморегуляции эпидемического процесса инфекции, вызванной вирусом Эпштейна–Барр (Herpesviridae: *Lymphocryptovirus*, HHV-4)

Соломай Т.В.^{1,2}, Семенов Т.А.^{3,4}, Акимкин В.Г.¹

¹ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, 111123, г. Москва, Россия;

²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова» Минобрнауки России, 105064, г. Москва, Россия;

³ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, Россия;

⁴ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), 119048, г. Москва, Россия

Введение. В доступной научной литературе отсутствуют работы, описывающие процессы саморегуляции в системе популяций «паразит–хозяин» для инфекций, имеющих хроническое течение, к которым в том числе относится инфекция, вызванная вирусом Эпштейна–Барр (ВЭБ-инфекция).

Цель работы – оценить проявления эпидемического процесса хронической ВЭБ-инфекции с позиции основных положений теории саморегуляции паразитарных систем.

Материалы и методы. Материалом для исследования послужили данные научных публикаций, поиск которых осуществляли по базам данных Scopus, Web of Science, The Cochrane Library, PubMed, CyberLeninka, РИНЦ и др. В перечень проанализированных работ вошли ранее опубликованные статьи авторов настоящего исследования, в том числе описывающие результаты ретроспективного эпидемиологического анализа заболеваемости инфекционным мононуклеозом в Российской Федерации в целом и Москве в частности и данные проведенных лабораторных исследований, отражающие частоту выявления специфических антител к белкам ВЭБ.

Результаты. Хроническое течение ВЭБ-инфекции способствует тесному длительному взаимодействию возбудителя и хозяина. Генетическая вариабельность патогена и особенности функционирования систем специфической и неспецифической иммунной защиты человека определяют взаимодействие двух гетерогенных популяций и лежат в основе их фазовой самоперестройки. Отдельные социальные и природные факторы (неблагоприятные химические, физические, биологические, климатические воздействия и др.) являются триггерами реактивации хронической ВЭБ-инфекции, что обеспечивает постоянное наличие в популяции хозяина дополнительных источников инфекции.

Заключение. Оценка проявлений хронической ВЭБ-инфекции с позиций теории саморегуляции паразитарных систем способствует пониманию причин неравномерности течения ее эпидемического процесса. Полученные данные могут быть аппроксимированы на другие инфекции со сходным механизмом передачи и аналогичным жизненным циклом возбудителя (в т.ч. иные герпетические заболевания), что позволит определить возможные направления контроля за эпидемическим процессом хронических инфекций с аэрозольным механизмом передачи возбудителя.

Ключевые слова: вирус Эпштейна–Барр; эпидемический процесс; теория саморегуляции; В.Д. Беляков; гетерогенность популяции паразита и хозяина; динамическая изменчивость; регулирующая роль условий

Для цитирования: Соломай Т.В., Семенов Т.А., Акимкин В.Г. Особенности саморегуляции эпидемического процесса инфекции, вызванной вирусом Эпштейна–Барр (Herpesviridae: *Lymphocryptovirus*, HHV-4). Вопросы вирусологии. 2023; 68(4): 343–354. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-170> EDN: <https://elibrary.ru/nnwnbs>

Для корреспонденции: Соломай Татьяна Валерьевна, канд. мед. наук, старший научный сотрудник лаборатории инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, 111123, г. Москва, Россия. E-mail: solomay@gambler.ru

Участие авторов: Соломай Т.В. – сбор, анализ и интерпретация данных, подготовка текста; Семенов Т.А. – концепция и дизайн исследования, редактирование текста; Акимкин В.Г. – концепция и дизайн исследования, одобрение окончательного варианта статьи для публикации.

Финансирование. Исследование выполнено за счет Государственного бюджета.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии потенциальных конфликтов интересов.

Поступила 21.05.2023
Принята в печать 19.07.2023
Опубликована 31.08.2023

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-170>

Characteristics of self-regulation of the epidemic process of infection caused by the Epstein–Barr virus (Herpesviridae: *Lymphocryptovirus*, HHV-4)

Tatiana V. Solomay^{1,2}, Tatiana A. Semenenko^{3,4}, Vasily G. Akimkin¹¹Central Research Institute of Epidemiology of Rospotrebnadzor, 111123, Moscow, Russia;²I.I. Mechnikov Scientific Research Institute of Vaccines and Serums, Ministry of Education and Science of Russia, 105064, Moscow, Russia;³National Research Center of Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamalei of the Ministry of Health of Russia, 123098, Moscow, Russia;⁴I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of Russia (Sechenov University), 119048, Moscow, Russia

Introduction. Among the available scientific literature, there are no publications addressing processes of self-regulation in the parasite-host population systems with reference to chronic infections, including the infection caused by the Epstein–Barr virus (EBV infection).

The aim of the study is to assess manifestations of the epidemic process of chronic EBV infection through the lens of the basic tenets of the theory of self-regulation of parasitic systems.

Materials and methods. The study was performed using data from scientific publications selected from such database sources as Scopus, Web of Science, Cochrane Library, PubMed, CyberLeninka, RSCI, etc. The list of analyzed publications included published articles of the authors of this study, reporting the results of the retrospective epidemiological analysis of the incidence of infectious mononucleosis in Russia in general and in Moscow in particular, as well as the results of the laboratory tests regarding the detection frequency of specific antibodies to EBV proteins.

Results. The chronic course of EBV infection promotes a close long-term interaction between the pathogen and the host. The genetic variability of the pathogen and the functions of specific and nonspecific human immune defense systems play a key role in the interaction between two heterogeneous populations and underlie their phasal self-transformation. A variety of social and natural factors (adverse chemical, physical, biological, climatic impacts, etc.) trigger the reactivation of chronic EBV infection, thus providing the continuous existence of additional sources of infection in the host population.

Conclusion. The analysis of the manifestations of chronic EBV infection in the context of the theory of self-regulation of parasitic systems promotes the understanding of the factors underlying the unevenness of its epidemic process. The obtained data can be adjusted for other infections having similar transmission mechanisms and virus life cycles (including other herpes infections) to map out strategies to control the epidemic process of chronic infections spread by aerosol transmission of the pathogen.

Keywords: *Epstein–Barr virus; epidemic process; theory of self-regulation; V. Belyakov; heterogeneity of parasite and host populations; dynamic variability; regulatory role of factors*

For citation: Solomay, T.V., Semenenko, T.A., Akimkin, V.G. Characteristics of self-regulation of the epidemic process of infection caused by the Epstein–Barr virus (Herpesviridae: *Lymphocryptovirus*, HHV-4). *Voprosy Virusologii*. 2023; 68(4): 343–354. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-170> EDN: <https://elibrary.ru/nnwbns>

For correspondence: Tatiana V. Solomay, Candidate of Medical Sciences, Senior Researcher at the Laboratory of Healthcare-Associated Infections, Central Research Institute of Epidemiology of Rospotrebnadzor, 111123, Moscow, Russia. E-mail: solomay@rambler.ru

Information about the authors:Solomay T.V., <https://orcid.org/0000-0002-7040-7653>Semenenko T.A., <https://orcid.org/0000-0002-6686-9011>Akimkin V.G., <https://orcid.org/0000-0001-8139-0247>

Contribution: Solomay T.V. – data collection, analysis and interpretation, text preparation; Semenenko T.A. – research concept and design, text editing; Akimkin V.G. – research concept and design, approval of the final version of the article for publication.

Funding. The research was funded by the State budget.

Conflict of interest. The authors have no conflicts of interest to declare.

Received 21.05.2023

Accepted 19.07.2023

Published 31.08.2023

Введение

Вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ) относится к семейству *Herpesviridae*, подсемейству *Gammaherpesvirinae*, его строение и жизненный цикл достаточно хорошо изучены. Заражение человека инфекцией, вызванной ВЭБ (ВЭБ-инфекцией), происходит, как правило, в детском возрасте. Основным механизмом передачи возбудителя – аэрозольный. Первичная инфекция может протекать бессимптомно, а также с выраженными клиническими проявлениями, характерными для инфекционного мононуклеоза [1]. В последующем вирус пожизненно сохраняется в организме человека, а инфекционный процесс приобретает хронический характер. При этом фазы латентного течения периодически сменяются фазами реактивации [2].

Несмотря на то что варианты клинического течения ВЭБ-инфекции подробно описаны в современной научной литературе, эффективные средства этиотропной терапии до настоящего времени не разработаны [3–5]. Свойство патогена уклоняться от иммунного ответа хозяина порождает объективные трудности в создании вакцин [6]. Отсутствие эффективных мер лечения и специфической профилактики способствует убиквитарному распространению ВЭБ в популяции человека. В настоящий момент до 90% населения всего мира инфицированы ВЭБ [7].

Большинство научных исследований, касающихся проблемы ВЭБ-инфекции, посвящены анализу клинических особенностей и иммунологических аспектов заболевания. Работы, отражающие вопросы эпидемиологии в Российской Федерации, ограничены оценкой заболеваемости инфекционным мононуклеозом в отдельных регионах [8, 9]. При этом этиологическая расшифровка диагноза при регистрации этой нозологической формы не предусмотрена, что приводит к искажению и некорректной трактовке данных [10].

За рубежом статистический учет заболеваний, вызванных ВЭБ, как правило, не осуществляется. Единичные статьи, посвященные эпидемиологическим особенностям ВЭБ-инфекции, основаны на анамнестических данных или результатах лабораторных исследований отдельных когорт населения. Так, анализ частоты выявления инфекционного мононуклеоза в разных возрастных группах в Дании был проведен на основе опроса доноров крови о наличии у них в анамнезе этого заболевания. Полученные результаты, свидетельствующие о более высокой частоте заражения детей младшего возраста и подростков, нельзя считать достоверными, поскольку для сбора информации не была использована медицинская документация, включающая данные лабораторных исследований [11].

Более детальный анализ был проведен в Великобритании, где изучали случаи госпитализации по поводу инфекционного мононуклеоза, частота которых в 2002–2013 гг. имела тенденцию к росту. Для оценки серологических маркеров инфицирования ВЭБ исследовали 2366 сывороток крови от лиц в возрасте от 1 года до 25 лет, среди которых в 85,3% случаев установлена хроническая латентная ВЭБ-инфекция.

Авторы сделали вывод о наличии прямой зависимости между частотой выявления маркеров инфицирования вирусом и возрастом обследованных [12].

Вышеизложенное определяет необходимость исследования основных характеристик эпидемического процесса ВЭБ-инфекции с позиции фундаментальных теоретических обобщений [13–15]. Пандемия новой коронавирусной инфекции (COVID-19) заставила мировое сообщество взглянуть на процессы, происходящие в двух взаимодействующих между собой популяциях паразита и хозяина, через призму теории саморегуляции паразитарных систем, предложенной в 80-х годах XX века отечественным эпидемиологом Виталием Дмитриевичем Беляковым. Эта теория рассматривает механизмы, лежащие в основе саморегуляции, а именно: гетерогенность взаимодействующих популяций по признакам отношения друг к другу; их динамическую изменчивость; фазность развития паразита; регулируемую роль социальных и природных факторов в фазовых изменениях паразитарных систем [13].

Состоятельность теории В.Д. Белякова неоднократно была проиллюстрирована на примере инфекций, течение которых носит острый характер, когда по завершении инфекционного процесса возбудитель покидает организм хозяина [14]. Теория саморегуляции эпидемического процесса была разработана на примере острых антропонозных воздушно-капельных инфекций, таких как ОРЗ, стрептококковая инфекция, дифтерия и др. [16, 17]. К настоящему времени с точки зрения теории саморегуляции паразитарных систем описан эпидемический процесс гриппа и других острых инфекций респираторного тракта [18, 19]. Особое внимание уделяется изучению характера взаимодействия возбудителя новой коронавирусной инфекции SARS-CoV-2 с организмом человека на популяционном уровне [20–23]. В то же время отсутствуют научные работы, описывающие с позиции теоретической эпидемиологии процессы взаимодействия в системе «паразит–хозяин» для инфекций с аэрозольным механизмом передачи, имеющих хроническое течение.

Цель работы – оценить проявления эпидемического процесса хронической ВЭБ-инфекции с позиции основных положений теории саморегуляции паразитарных систем.

Для достижения поставленной цели планировалось определить наличие или отсутствие фазовой перестройки с учетом изменчивости биологических свойств популяций хозяина и возбудителя при их взаимодействии, а также роль социальных и природных факторов, обуславливающих неравномерность и интенсивность развития эпидемического процесса и его саморегуляции.

Материалы и методы

Работа носила научно-теоретический характер. Объектом исследования являлся эпидемический процесс ВЭБ-инфекции, анализ которого проводили с позиции основных положений теории саморегуляции паразитарных систем В.Д. Белякова.

Материалом для исследования послужили данные научных публикаций, поиск которых осуществляли по базам данных Scopus, Web of Science, The Cochrane Library, PubMed, CyberLeninka, РИНЦ и др. Дополнительно проводили поиск в Researchgate и ручной поиск по спискам литературы обзорных статей. Были использованы следующие ключевые слова: вирус Эпштейна–Барр, ВЭБ, инфекционный мононуклеоз, саморегуляция эпидемического процесса, эпидемический процесс ВЭБ-инфекции. В результате поиска по ключевым словам было найдено 5562 работы, из них было отобрано 183 резюме. После независимой оценки резюме на соответствие цели исследования производили поиск полнотекстовых статей. Окончательный список полнотекстовых статей, включенных в исследование, составил 48 публикаций. Географию поиска не ограничивали каким-либо регионом. Глубина поиска составила 50 лет. Дата начала поиска – 07 апреля 2023 г. Последняя дата поиска – 21 июня 2023 г.

В перечень проанализированных работ вошли ранее опубликованные статьи авторов настоящего исследования, в том числе описывающие результаты ретроспективного эпидемиологического анализа заболеваемости инфекционным мононуклеозом в Российской Федерации в целом и Москве в частности и данные проведенных лабораторных исследований, отражающие частоту выявления специфических антител к белкам ВЭБ: иммуноглобулинов М к капсидному антигену (IgM VCA) и иммуноглобулинов G к раннему, капсидному и нуклеарному антигенам (IgG EA, IgG VCA и IgG EBNA). Использование вышеуказанных данных позволило обеспечить наглядную иллюстрацию положений теории саморегуляции на примере исследуемой инфекции и выдвинуть ряд предположений, касающихся фазовой изменчивости популяции хозяина при взаимодействии с ВЭБ.

Для обработки материала применяли метод формальной логики. Графические изображения оформляли с использованием электронных таблиц Excel для Windows. Все диаграммы являются цитируемыми из ранее опубликованных работ.

Результаты

Гетерогенность популяций ВЭБ и человека и их взаимодействие

ВЭБ – вирус герпеса человека 4-го типа, обладающий тропностью к различным лимфоидным и эпителиальным клеткам организма хозяина, вызывает хронический инфекционный процесс, в ходе которого фазы латентного течения сменяются фазами реактивациями.

Геном ВЭБ кодирует более 85 белков. Популяция вируса неоднородна: выделяют два типа по гену *EBNA2* и несколько вариантов по гену, кодирующему латентный мембранный белок (*LMP1*) [24]. Описана вариабельность других генов, в том числе гена, кодирующего поверхностный гликопротеин gp350,

участвующий в проникновении вируса в клетку [25]. В научной литературе приводятся данные о гетерогенности ВЭБ у одного хозяина, существенно повышающейся в периоды реактивации хронической инфекции и, напротив, снижающейся при переходе в фазу латенции [24]. Поскольку степень полиморфизма определяет устойчивость любой биологической системы, применительно к ВЭБ целесообразно рассматривать полиморфизм популяции возбудителя одновременно в двух аспектах – гетерогенность патогенов, циркулирующих среди населения, и их гетерогенность внутри одного индивидуума в зависимости от фазы развития инфекционного процесса. Пожизненное пребывание ВЭБ в организме хозяина в латентном состоянии невозможно. Для сохранения биологического вида необходимо периодическое воспроизводство вирусного потомства [13]. При этом отсутствие гетерогенности возбудителя в периоды реактивации привело бы к его оперативному распознаванию и уничтожению иммунной системой хозяина. Таким образом, гетерогенность ВЭБ является обязательным условием реактивации и, как следствие, эффективной циркуляции в популяции хозяина.

Полиморфизм популяции хозяина определяется функционированием систем, обеспечивающих специфическую и неспецифическую восприимчивость к ВЭБ. Исследования показали, что у пациентов с инфекционным мононуклеозом, вызванным ВЭБ, выявляется снижение индуцированной продукции ИНФ- α и - γ [26, 27]. На фоне первичной ВЭБ-инфекции и реактивации ее хронической формы происходят изменения в клеточном звене иммунитета – рост числа цитотоксических CD8⁺-Т-лимфоцитов, способных распознавать и уничтожать инфицированные вирусом клетки хозяина и выраженный дефицит В-лимфоцитов, являющихся основными мишенями ВЭБ. У пациентов с клиническими проявлениями инфекционного мононуклеоза, вне зависимости от возраста, число В-лимфоцитов с фенотипами «CD19⁺ CD21⁺ CD81⁺», «CD19⁺ CD21⁻ CD81⁺» и «CD19⁺ CD21⁺ CD81⁻» достоверно снижено по сравнению со здоровыми лицами [28, 29].

Гуморальный иммунный ответ заключается в выработке специфических иммуноглобулинов к белкам ВЭБ. В диагностике серологического статуса пациентов общепринятой считается качественная и количественная идентификация IgM VCA, IgG VCA, IgG EA и IgG EBNA. При этом обнаружение IgM VCA и IgG EA соотносится с разными фазами первичной или реактивацией хронической ВЭБ-инфекции, а наличие IgG VCA и IgG EBNA свидетельствует о хроническом латентном процессе [30]. В ходе ранее проведенного исследования установлена достоверная сильная обратная корреляционная связь между изменением уровня серопревалентности IgG VCA и IgG EBNA и внутригодичной динамикой заболеваемости инфекционным мононуклеозом. При этом в месяцы с высокой частотой выявления указанных маркеров заболеваемость не превышает верхнюю границу расчетного порогового уровня [31].

Динамическая изменчивость и фазы развития взаимодействующих популяций

Согласно теории саморегуляции, сформулированной В.Д. Беляковым, в основе взаимодействия популяций паразита и хозяина лежит их изменчивость, которая определяет неравномерность развития эпидемического процесса. К охарактеризованным фазам, которые претерпевает популяция возбудителя, относятся следующие: резервации, эпидемического преобразования, эпидемического распространения и резервационного преобразования [13]. Результирующим взаимодействием всех элементов системы является не только возникновение инфекционного процесса, но и развитие иммунитета населения. Таким образом, популяция хозяина также проходит несколько фаз, которые не получили ранее конкретных наименований и могут быть обозначены как фазы «высокого уровня популяционного иммунитета», «снижения уровня популяционного иммунитета», «низкого уровня популяционного иммунитета», «нарастания уровня популяционного иммунитета». При взаимодействии определенное состояние одной популяции будет соответствовать таковому, имеющему заданные характеристики, другой. Сопоставление изменений в ходе реализации эпидемического процесса ВЭБ-инфекции представлено в **таблице**.

Необходимо отметить, что понятие «популяционный иммунитет», как правило, сопряжено с применением средств специфической иммунопрофилактики. Вакцинация является высокоэффективным методом, позволяющим существенно снизить бремя инфекционных болезней, заболеваемость и смертность [15]. Однако на сегодняшний день в мире не разработаны вакцины против ВЭБ-инфекции, а уровень иммунной защиты, оптимальный для отсутствия эпидемического распространения возбудителя, не определен [6, 32]. Таким образом, в настоящей работе речь идет исключительно о постинфекционном иммунитете без использования количественной оценки его уровня, для определения которого требуется проведение отдельного исследования.

Из данных таблицы следует, что в фазу высокого уровня популяционного иммунитета среди населения накоплен резерв функциональных механизмов гуморальной и клеточной защиты, не позволяющий возбудителю перейти от латентного существования к репродукции вируса (реактивации) при хронической ВЭБ-инфекции. При этом данная фаза характеризуется высокой распространенностью возбудителя среди населения, что определяет минимальный удельный вес лиц, подверженных риску первичного инфицирования. Поскольку превалирующее большинство индивидуумов имеют высокий уровень иммунной защиты, популяция хозяина обладает низкой гетерогенностью и низкой восприимчивостью по отношению к ВЭБ.

Отсутствие интенсивной циркуляции возбудителя приводит к тому, что с течением времени иммунная система человека постепенно его «забывает», уровень настроенности к нему падает. Увеличивает-

ся доля детей, рожденных от неиммунных матерей [32]. На фоне снижения восприимчивости к ВЭБ у части индивидуумов создаются условия для реактивации хронической ВЭБ-инфекции. Гетерогенность популяции хозяина повышается. Происходит накопление источников инфекции, характерное для фазы снижения уровня популяционного иммунитета. Согласно теории саморегуляции, изменения, происходящие на этом фоне в популяции возбудителя, соответствуют фазе эпидемического преобразования и характеризуются ростом гетерогенности и вирулентности вируса [13].

В фазу низкого уровня популяционного иммунитета среди населения создаются идеальные условия для реализации механизма передачи: имеет место достаточное число источников инфекции и восприимчивых лиц. При этом и те и другие характеризуются минимальным уровнем иммунной защиты по отношению к ВЭБ, что определяет низкую гетерогенность и высокую восприимчивость популяции хозяина. Происходит инфицирование индивидуумов, ранее не имевших встречи с ВЭБ, и суперинфицирование лиц с хронической ВЭБ-инфекцией (эпидемическое распространение возбудителя).

Развитие первичной ВЭБ-инфекции, суперинфекции или реактивации хронической ВЭБ-инфекции у отдельных индивидуумов приводит к нарастанию уровня популяционного иммунитета. Несмотря на то что в этот период число источников инфекции велико, распространение возбудителя происходит исключительно до тех пор, пока не пройден пик гетерогенности. После чего доля восприимчивых лиц интенсивно падает, а ВЭБ постепенно утрачивает вирулентность и переходит к латентному существованию.

Подтверждением изложенному являются результаты ранее проведенного ретроспективного эпидемиологического анализа [31]. На **рисунке 1** представлен фрагмент многолетней динамики заболеваемости инфекционным мононуклеозом в Москве, в котором период между двумя минимумами (2004 и 2015 гг.) составил 11 лет. Наиболее низкие показатели заболеваемости (2003–2005 и 2015–2017 гг.) соответствуют фазам резервации в популяции возбудителя и высокого уровня популяционного иммунитета населения. Рост заболеваемости в 2006–2008 гг. является следствием повышения гетерогенности взаимодействующих популяций (фазы эпидемического и инфекционного преобразования). Максимальные показатели приходятся на 2009–2012 гг. и соответствуют фазам эпидемического распространения и низкого уровня популяционного иммунитета. Снижение вирулентности возбудителя и восприимчивости к нему популяции хозяина определяет спад заболеваемости в 2013–2014 гг. (фазы резервационного преобразования и нарастания уровня популяционного иммунитета).

Сходные тенденции имеют место и во внутригодовой динамике заболеваемости инфекционным мононуклеозом, для которой характерен слабо выраженный сезонный подъем в холодный период года (**рис. 2**). Средние многолетние значения показателя,

Таблица. Фазовая изменчивость популяции ВЭБ и человека в результате взаимодействия

Table. Interaction-induced phase variability of the EBV and human populations

Популяция ВЭБ EBV population		Область взаимодействия Interaction range	Популяция человека Human population	
фаза phase	характеристика description	проявления эпидемического процесса на примере динамики заболеваемости manifestations of the epidemic process through the incidence dynamics	характеристика description	фаза phase
Резервации Reservations	Гетерогенность и вирулентность низкая Low heterogeneity and virulence	Межэпидемический период (показатели заболеваемости низкие) Interepidemic period (low incidence rates)	Гетерогенность и восприимчивость низкая (максимальный уровень специфической иммунной защиты в отношении ВЭБ у лиц с хронической инфекцией – латентная фаза болезни; минимальная доля серонегативных лиц в общей популяции – низкий риск инфицирования) Low heterogeneity and susceptibility (the highest level of specific immune protection against EBV in individuals with chronic infection – the latent phase of the disease; the lowest proportion of seronegative individuals in the total population – low risk of infection)	Высокого уровня популяционного иммунитета High level of herd immunity
Эпидемического преобразования Epidemic transformation	Рост гетерогенности и вирулентности Increasing heterogeneity and virulence	Подъем заболеваемости Increasing incidence	Рост гетерогенности и восприимчивости (Снижение уровня специфической иммунной защиты в отношении ВЭБ у лиц с хронической инфекцией – реактивация; рост удельного веса серонегативных лиц) Increasing heterogeneity and susceptibility (Decreasing level of specific immune protection against EBV in people with chronic infection – reactivation; increase in the proportion of seronegative individuals)	Снижения уровня популяционного иммунитета Decreasing level of herd immunity
Эпидемического распространения Epidemic spread	Снижение гетерогенности на фоне высокой вирулентности Decreasing heterogeneity and high virulence	Стагнация показателей заболеваемости на высоком уровне Persistent high incidence	Снижение гетерогенности на фоне высокой восприимчивости (Минимальный уровень специфической иммунной защиты в отношении ВЭБ у лиц с хронической инфекцией; максимальная доля серонегативных лиц в популяции) Decreasing heterogeneity and high virulence (The lowest level of specific immune protection against EBV in people with chronic infection; the highest proportion of seronegative individuals in the population)	Низкого уровня популяционного иммунитета Low level of herd immunity
Резервационного преобразования Reservation transformation	Рост гетерогенности на фоне снижающейся вирулентности и численности Increasing heterogeneity along with decreasing virulence and the number	Спад заболеваемости Decline in the incidence	Рост гетерогенности и снижение восприимчивости (Повышение уровня специфической иммунной защиты в отношении ВЭБ у лиц с хронической инфекцией; снижение удельного веса серонегативных лиц) Increasing heterogeneity and decreasing susceptibility (Increasing level of specific immune protection against EBV in people with chronic infection; a decrease in the proportion of seronegative individuals)	Нарадания уровня популяционного иммунитета Increasing level of herd immunity

превышающие верхний предел фонового уровня, зарегистрированы с сентября по май месяц. Незначительное снижение заболеваемости в январе может быть обусловлено как разобщением популяции хозяина, так и снижением регистрации случаев инфекционного мононуклеоза в период новогодних праздников [31, 33, 34]. На рисунке 2 показатели заболеваемости инфекционным мононуклеозом сопоставлены с превалентностью IgG VCA среди жителей столицы. С июня по сентябрь месяц частота выявления IgG VCA является максимальной, что определяет низкий уровень заболеваемости населения. В октябре–ноябре имеет место выраженное снижение превалентности,

соответствующее росту заболеваемости. В апреле–мае, напротив, на фоне постепенного снижения числа случаев заболевания инфекционным мононуклеозом частота выявления исследуемого маркера постепенно увеличивается. Представленные данные являются наглядным примером, иллюстрирующим фазовые преобразования, происходящие в популяции хозяина при взаимодействии с ВЭБ.

Регулирующая роль условий (социальных и природных факторов)

В соответствии с положениями теории саморегуляции, все социальные и природные факторы можно

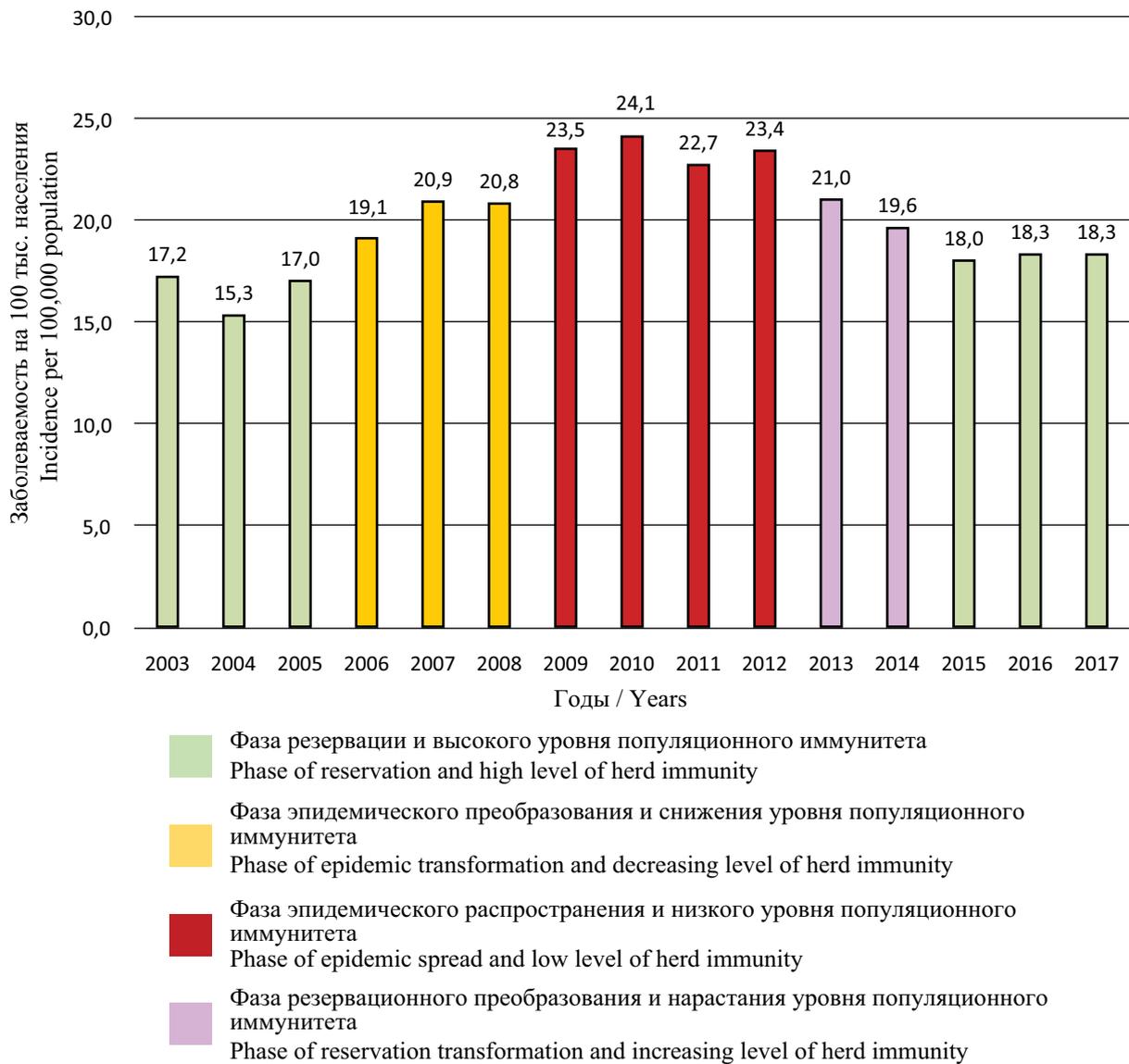


Рис. 1. Многолетняя динамика заболеваемости инфекционным мононуклеозом в Москве в 2003–2017 гг. (на 100 тыс. населения)

Fig. 1. Multi-year dynamics of the infectious mononucleosis incidence in Moscow in 2003–2017 (per 100,000 population)

разделить на три группы в зависимости от характера их влияния на фазность развития эпидемического процесса [13]:

- факторы, определяющие «вертикальное» (за счет смены поколений) и «горизонтальное» (миграция, формирование новых коллективов) «перемешивание» людей;

- факторы, определяющие активизацию механизма передачи возбудителя;

- факторы, снижающие иммунитет и резистентность.

Под «перемешиванием» необходимо понимать взаимодействие индивидуумов, не имевших ранее встречи с ВЭБ (или с одним из его геновариантов), с инфицированными лицами. При этом важно учитывать, что максимальный удельный вес не иммунных в отношении ВЭБ лиц отмечается в возрастной группе де-

тей до 2 лет [32]. С увеличением возраста показатель серопревалентности увеличивается, достигая максимума к 30–40 годам, а к 50–60 годам незначительно снижается [7]. Описанные особенности определяют роль демографических изменений в структуре населения как одного из факторов регуляции интенсивности эпидемического процесса [14].

На частоту и интенсивность контактов между индивидуумами влияет их социальная активность, которая является наиболее низкой среди детей младшей возрастной группы и лиц пожилого возраста. К социальным процессам, способствующим «горизонтальному перемешиванию», следует отнести миграцию населения, включая маятниковые суточные миграции с использованием общественного транспорта, формирование новых организованных коллективов (например, призыв на военную службу), и обновление ранее

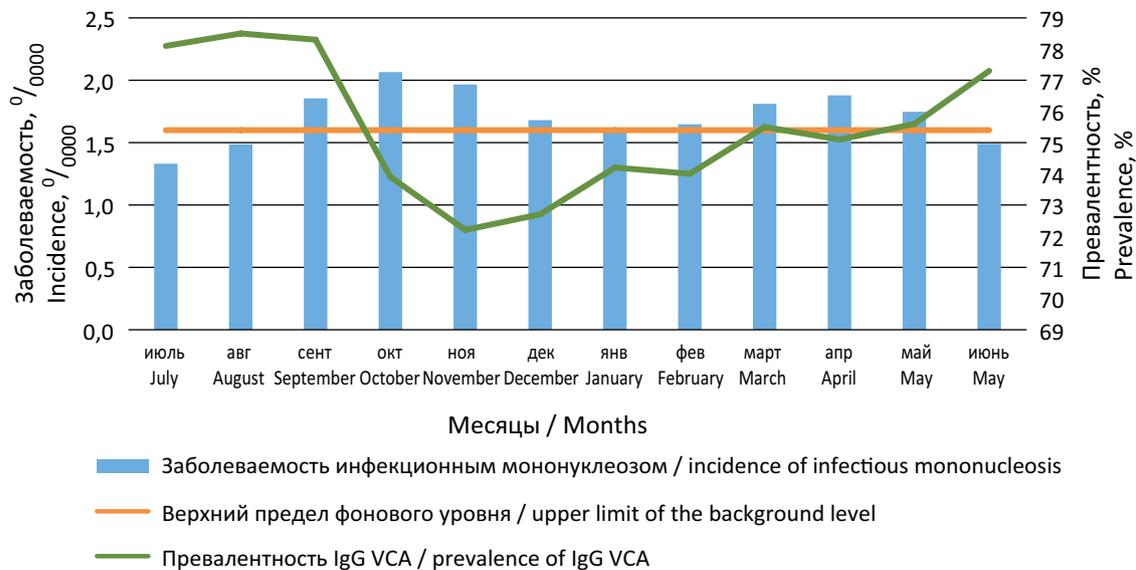


Рис. 2. Внутригодовая динамика заболеваемости инфекционным мононуклеозом и превалентность IgG VCA в Москве: средние многолетние уровни за период 2010–2022 гг.

Fig. 2. Intra-annual dynamics of the infectious mononucleosis incidence and VCA IgG prevalence in Moscow: The multi-year average rates in 2010–2022.

сложившихся, в том числе после перерыва на летний отдых (дошкольные и школьные образовательные организации) [35, 36]. Основной предпосылкой для «горизонтального перемешивания» применительно к ВЭБ является наличие территориальных особенностей распространения его геновариантов [24].

Помимо перечисленного, роль «горизонтального перемешивания» в регуляции эпидемического процесса может определяться плотностью населения территории. Для ВЭБ-инфекции выявлено отсутствие какой-либо значимой корреляционной связи между частотой выявления IgM VCA и IgG EA и плотностью населения территорий Российской Федерации. В то же время связь между средними многолетними уровнями заболеваемости инфекционным мононуклеозом и плотностью населения была достоверной прямой средней силы. Объяснением может являться тот факт, что теснота контактов между индивидуумами оказывает влияние на распространение ВЭБ среди не иммунных к нему лиц и не играет значимой роли в реактивации хронической инфекции, триггерами которой являются иные факторы [37]. Так, анализ причин изменения заболеваемости инфекционным мононуклеозом в 2020 г. позволил установить, что ограничительные мероприятия, направленные на разобщение населения и снижение риска аэрозольной передачи SARS-CoV-2, привели к уменьшению интенсивности эпидемического процесса ВЭБ-инфекции [38].

Немаловажную роль в эпидемическом распространении возбудителя играет формирование условий, способствующих активизации механизмов передачи. Ведущим механизмом передачи ВЭБ является аэрозольный, для реализации которого необходимы наличие патогена в верхних дыхательных путях и факторы, способствующие образованию аэрозоля.

Ранее было установлено, что частота выявления ДНК ВЭБ в слюне обследованных лиц не имеет достоверных различий в теплый и холодный периоды года, в то время как для заболеваемости инфекционным мононуклеозом характерно наличие осенне-весеннего сезонного подъема [33], совпадающего с таковым для других инфекций верхних дыхательных путей [34]. Необходимо отметить, что при инфекционном мононуклеозе отсутствуют выраженные катаральные проявления, которые, в свою очередь, способствуют образованию инфекционного аэрозоля. В период сезонного подъема ВЭБ циркулирует в популяции хозяина совместно с другими патогенами, вызывающими инфекции верхних дыхательных путей. Результаты ранее проведенных исследований показали, что в холодный период года ВЭБ выделяется в мазках из носо- и ротоглотки у 33,7–37,1% лиц, обследованных в рамках мониторинга гриппа и ОРВИ, при этом в 16,3–18,6% случаев – в сочетании с другими возбудителями. Наличие насморка и кашля при сочетанных инфекциях приводит к образованию инфекционного аэрозоля, содержащего ВЭБ в числе прочих патогенов [39, 40].

Необходимо отметить, что возбудители других инфекционных болезней не только играют важное значение в активизации аэрозольного механизма передачи, но и являются триггерными факторами реактивации хронической ВЭБ-инфекции, поскольку существенно изменяют иммунологическую реактивность и могут вступать в конкурентные взаимоотношения с ВЭБ, обладая с ним тропностью к одним и тем же клеткам. В научных публикациях описаны случаи реактивации ВЭБ-инфекции на фоне ВИЧ-инфекции [41, 42], гепатита В [43], туберкулеза [44, 45], COVID-19 [46].

Помимо патогенных микроорганизмов, описана реактивация ВЭБ под воздействием различных видов ионизирующих излучений, в том числе при совершении астронавтами полетов в космос [47]. В эксперименте на культуре клеток проводили облучение инфицированных ВЭБ клеточных линий отдельно 4 разными типами излучения: гамма-излучением ^{137}Cs , протонным излучением 150 МэВ, ионами углерода 600 МэВ/н и ионами железа 600 МэВ/н в дозах 0,1, 0,5, 1,0 и 2,0 Гр. Установлено, что реактивация ВЭБ, проявляющаяся в транскрипции литических генов, происходила при всех типах и дозах излучения уже через четверо суток после воздействия. Наиболее эффективно реактивацию вызывало гамма-излучение. Еще одним важным выводом данного исследования явился тот факт, что реактивация ВЭБ может происходить за счет воздействия разных видов излучения на латентно инфицированные клетки без взаимодействия с иммунной системой макроорганизма [48].

В числе прочих факторов, оказывающих непосредственное влияние на систему «паразит-хозяин», можно выделить климатическое воздействие. Было показано, что в Российской Федерации территории с высокими уровнями серопревалентности у взрослых по IgG EBNA расположены в неблагоприятных климатических зонах. Так, для Республики Калмыкия, Астраханской и Оренбургской областей (зона степей, полупустынь и пустынь) характерен континентальный климат с большими колебаниями температуры как в течение суток, так и в разные сезоны года. Для Мурманской области и Республики Саха (Якутия), расположенных в тундре, свойственно сочетание низких температур и высокой влажности воздуха [37].

Таким образом, различные природные и социальные факторы являются основным рычагом, регулирующим эпидемический процесс, влияющим на его интенсивность и динамику, и как следствие – на гетерогенность популяций паразита и хозяина. В.Д. Беляков считал, что управление этими факторами должно лежать в основе профилактических и противоэпидемических мероприятий [13]. При этом наиболее эффективным представляется воздействие, направленное на повышение иммунной защиты хозяина [14].

На настоящий момент в мире отсутствуют зарегистрированные вакцины для профилактики ВЭБ-инфекции. За рубежом ведется разработка кандидатных препаратов, ни один из которых пока не дал желаемого результата [6]. В этих условиях в перечне мероприятий, направленных на повышение иммунной защиты, следует рассматривать вакцинопрофилактику против других патогенов, играющих триггерную роль в развитии реактивации хронической ВЭБ-инфекции, а также неспецифическую иммунопрофилактику. Немаловажное значение играет снижение влияния иных факторов, способствующих реактивации, которое должно заключаться в профилактике и своевременном лечении сопутствующих соматических болезней, минимизации негативных бытовых, производственных и иных воздействий, ведении здорового образа жизни.

Для предотвращения активизации механизма передачи необходимо предусмотреть комплекс дезинфекционно-стерилизационных мероприятий (дезинфекция воздуха, предметов обихода, посуды, поверхностей, дезинфекция, предстерилизационная очистка и стерилизация изделий медицинского назначения, дезинфекция эпидемиологически опасных медицинских отходов), а также использование средств защиты органов дыхания в местах большого скопления людей, особенно в период сезонного подъема заболеваемости инфекциями верхних дыхательных путей.

Факторы, определяющие перемешивание людей, в меньшей степени подвержены искусственному влиянию. В то же время запрет на перемещение между странами и регионами, введенный в момент развития пандемии COVID-19, сыграл решающую роль в подготовке органов здравоохранения противодействию новой инфекции и может быть использован в экстренных случаях при болезнях иной этиологии.

Заключение

Проведенный анализ показал, что хроническое течение ВЭБ-инфекции способствует тесному длительному взаимодействию возбудителя и хозяина. Генетическая вариабельность патогена и особенности функционирования систем специфической и неспецифической иммунной защиты человека определяют взаимодействие двух гетерогенных популяций и лежат в основе их фазовой самоперестройки. Отдельные социальные и природные факторы (неблагоприятные химические, физические, биологические, климатические воздействия и др.) являются триггерами реактивации хронической ВЭБ-инфекции, что обеспечивает постоянное наличие в популяции хозяина дополнительных (помимо больных первичной инфекцией) источников инфекции.

Оценка проявлений хронической ВЭБ-инфекции с позиций теории саморегуляции паразитарных систем способствует пониманию причин неравномерности течения ее эпидемического процесса. Полученные данные могут быть аппроксимированы на другие инфекции со сходным механизмом передачи и аналогичным жизненным циклом возбудителя (в т.ч. иные герпетические заболевания), что позволит определить возможные направления контроля за эпидемическим процессом хронических инфекций с аэрозольным механизмом передачи возбудителя.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агаева М.И., Агаева З.А. Характерные особенности течения герпесвирусных инфекций во время беременности. *Клинический разбор в общей медицине*. 2022; (1): 49–55. <https://doi.org/10.47407/kr2022.3.1.00118>
2. Соломай Т.В., Семенов Т.А., Каражас Н.В., Рыбалкина Т.Н., Корниенко М.Н., Бошняк Р.Е. и др. Оценка риска инфицирования герпесвирусами при переливании донорской крови и ее компонентов. *Анализ риска здоровью*. 2020; (2): 136–42. <https://doi.org/10.21668/health.risk/2020.2.15> <https://elibrary.ru/hrzlyu>
3. Федорова И.М., Котелева С.И., Капустин И.В., Бляхер М.С., Тульская Е.А., Зверева Н.Н. и др. Влияние гормонотерапии на состояние интерфероновой защиты у детей, больных инфекционным мононуклеозом. *Инфекция и иммунитет*. 2021; 11(5):

DISCUSSION

- 943–50. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-TSC-1350> <https://elibrary.ru/dnyuor>
4. Иванов А.А., Куличенко Т.В. Полипрагмазия при лечении инфекционного мононуклеоза: серия клинических случаев. *Педиатрическая фармакология*. 2022; 19(5): 412–6. <https://doi.org/10.15690/pf.v19i5.2462> <https://elibrary.ru/zxqiuu>
 5. Викулов Г.Х., Орадовская И.В., Колобухина Л.В. Герпесвирусные инфекции у детей: распространенность, заболеваемость, клинические формы и алгоритм ведения. *Вопросы практической педиатрии*. 2022; 17(6): 126–41. <https://doi.org/10.20953/1817-7646-2022-6-126-140>
 6. Соломай Т.В., Семенов Т.А., Филатов Н.Н., Костинов М.П., Ильина Н.И. Вирус Эпштейна–Барр: разработка вакцин. *Иммунология*. 2020; 41(4): 381–90. <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-3-381-390> <https://elibrary.ru/kmmvgr>
 7. Соломай Т.В., Семенов Т.А., Блох А.И. Распространённость антител к вирусу Эпштейна–Барр в разных возрастных группах населения Европы и Азии: систематический обзор и метаанализ. *Здравоохранение Российской Федерации*. 2021; 65(3): 276–86. <https://doi.org/10.47470/0044-197X-2021-65-3-276-286> <https://elibrary.ru/sljiyb>
 8. Бурмагина И.А., Поздеева М.А., Агафонов В.М. Инфекционный мононуклеоз в северном регионе. *Санитарный врач*. 2014; (11): 38–41. <https://elibrary.ru/szoiyb>
 9. Соломай Т.В., Семенов Т.А. Эпштейна–Барр вирусная инфекция – глобальная эпидемиологическая проблема. *Вопросы вирусологии*. 2022; 67(4): 265–77. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-122> <https://elibrary.ru/cnyvgi>
 10. Соломай Т.В. Многолетняя динамика заболеваемости и территориальное распространение инфекционного мононуклеоза. *Здравоохранение Российской Федерации*. 2019; 63(4): 186–92. <https://doi.org/10.18821/0044-197X-2019-63-4-186-192> <https://elibrary.ru/aymphv>
 11. Rostgaard K., Balfour H.H. Jr., Jarrett R., Erikstrup C., Pedersen O., Ullum H., et al. Primary Epstein–Barr virus infection with and without infectious mononucleosis. *PLoS One*. 2019; 14(12): e0226436. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226436>
 12. Kuri A., Jacobs V.M., Vickaryous N., Pakpoor J., Middeldorp J., Giovannoni G., et al. Epidemiology of Epstein–Barr virus infection and infectious mononucleosis in the United Kingdom. *BMC Public Health*. 2020; 20(1): 912. <https://doi.org/10.1186/s12889-020-09049-x>
 13. Беляков В.Д. Общие закономерности функционирования паразитарных систем (механизмы саморегуляции). *Паразитология*. 1986; 20(4): 249–55.
 14. Брико Н.И., Миндлина А.Я., Полибин Р.В. Универсальность изменений в проявлениях эпидемического процесса антропонозных инфекций за последние десятилетия. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2015; 55(5): 12–20. <https://elibrary.ru/zqjyud>
 15. Брико Н.И. Теоретические обобщения в эпидемиологии: от истории к современности. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2018; 17(5): 5–16. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2018-17-5-5-16> <https://elibrary.ru/pkownv>
 16. Беляков В.Д., Яфаев Р.Х. *Эпидемиология*. М.: Медицина; 1989.
 17. Семенов Т.А., Акимкин В.Г., Бурцева Е.И., Ноздрачева А.В., Симонова Е.Г., Тутельян А.В. и др. Особенности эпидемической ситуации по острым респираторным вирусным инфекциям с учетом пандемического распространения COVID-19. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2022; 21(4): 4–15. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2022-21-4-4-15> <https://elibrary.ru/zovucq>
 18. Редненко В.В., Семенов В.М., Коробов Г.Д. Эпидемиологический анализ годовой динамики заболеваемости респираторными инфекциями в закрытом коллективе. *Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях*. 2011; (1): 24–8. <https://elibrary.ru/qjkhkt>
 19. Колесин И.Д. Анализ механизма вытеснения пандемическим штаммом своих предшественников. *Биофизика*. 2016; 61(6): 1190–3. <https://elibrary.ru/xknvov>
 20. Акимкин В.Г., Семенов Т.А., Углева С.В., Дубоделов Д.В., Кузин С.Н., Яцышина С.Б. и др. COVID-19 в России: эпидемиология и молекулярно-генетический мониторинг. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2022; 77(4): 254–60. <https://doi.org/10.15690/vramn2121> <https://elibrary.ru/doiizj>
 21. Билёв А.Е., Билёва Н.А., Чупахина Л.В., Вандышева Т.В., Арискина М.А. Приемлема ли теория саморегуляции эпидемического процесса для новой коронавирусной инфекции COVID-19? *Вестник медицинского института «РЕАВИЗ». Реабилитация, Врач и Здоровье*. 2022; (4): 12–8. <https://doi.org/10.20340/vmi-rvz.2022.4.COVID.2>
 22. Акимкин В.Г., Кузин С.Н., Семенов Т.А., Плоскирева А.А., Дубоделов Д.В., Тиванова Е.В. и др. Характеристика эпидемиологической ситуации по COVID-19 в Российской Федерации в 2020 г. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2021; 76(4): 412–22. <https://doi.org/10.15690/vramn1505> <https://elibrary.ru/zmowbe>
 23. Акимкин В.Г., Попова А.Ю., Плоскирева А.А., Углева С.В., Семенов Т.А., Пшеничная Н.Ю. и др. COVID-19: эволюция пандемии в России. Сообщение I: проявления эпидемического процесса COVID-19. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2022; 99(3): 269–86. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-276> <https://elibrary.ru/xzgtfd>
 24. Попкова М.И., Уткин О.В. Генетическое разнообразие вируса Эпштейна–Барр: современный взгляд на проблему. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2022; 99(1): 93–108. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-228> <https://elibrary.ru/kbfbkm>
 25. Соломай Т.В., Малахова М.В., Шитиков Е.А., Беспятовых Д.А., Веселовский В.А., Семенов Т.А. и др. Вирус Эпштейна–Барр: оценка варибельности генов gp350 и EBNA2. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2022; 40(3): 32–40. <https://doi.org/10.17116/molgen20224003132> <https://elibrary.ru/dmfxfl>
 26. Кукушкина Е.А., Котелева С.И., Бляхер М.С., Федорова И.М., Рамазанова З.К., Зверева Н.Н. и др. Изменение состояния интерфероновой защиты у детей, больных инфекционным мононуклеозом, в динамике заболевания. *Инфекция и иммунитет*. 2021; 11(1): 157–64. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-TIP-1349> <https://elibrary.ru/asboym>
 27. Ершов Ф.И., Оспельникова Т.П., Наровлянский А.Н. Интерфероновый статус как метод определения неспецифических биомаркеров иммунопатологии человека. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2019; (3): 91–9. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-3-91-99> <https://elibrary.ru/jmogdb>
 28. Триско А.А., Колесникова Н.В., Авдеева М.Г., Чудилова Г.А., Ломтагидзе Л.В. Особенности клеточного иммунитета при острой инфекции, вызванной вирусом Эпштейна–Барр. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2015; 20(4): 13–5. <https://elibrary.ru/uhyuvv>
 29. Чуйкова К.И., Попова О.А. Совершенствование терапии инфекционного мононуклеоза у детей. *Детские инфекции*. 2012; 11(4): 48–51. <https://elibrary.ru/phgfzl>
 30. Наговицына Е.Б. Современные подходы к диагностике и лечению инфекционного мононуклеоза Эпштейна–Барр-вирусной этиологии. *Дальневосточный медицинский журнал*. 2016; (3): 45–50. <https://elibrary.ru/wmwfkx>
 31. Соломай Т.В., Семенов Т.А., Тутельян А.В., Боброва М.В. Эпидемиологические особенности инфекции, вызванной вирусом Эпштейна–Барр. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2021; 98(6): 685–96. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-139> <https://elibrary.ru/cyuyrd>
 32. Соломай Т.В., Семенов Т.А., Никитина Г.Ю., Шувалов А.Н. Прогнозные сценарии развития эпидемического процесса инфекции, вызванной вирусом Эпштейна–Барр, на этапе отсутствия мер специфической профилактики и при их внедрении. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2023; 13(1): 60–9. <https://doi.org/10.18565/epidem.2023.13.1.60-9>
 33. Соломай Т.В., Филатов Н.Н. Сезонность инфекции, вызванной вирусом Эпштейна–Барр. *Журнал инфектологии*. 2020; 12(4): 93–100. <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2020-12-4-93-100> <https://elibrary.ru/dshwpx>
 34. Соломай Т.В., Филатов Н.Н., Каира А.Н., Лавров В.Ф., Кузин А.А., Ланцов Е.В. Сходство проявлений эпидемических процессов инфекционного мононуклеоза и инфекций верхних дыхательных путей. *Вестник Российской Военно-медицинской академии*. 2020; (3): 46–51. <https://elibrary.ru/fwoegg>
 35. Коротченко С.И. Проблемы иммунопрофилактики лиц, подлежащих призыву на военную службу. *Санитарный врач*. 2016; (12): 8–13. <https://elibrary.ru/xrmzgv>

36. Готвянская Т.П., Мукашева Е.А., Ноздрачева А.В., Сипачева Н.Б., Семенов А.В., Игнатьева А.В. и др. Заболеваемость и популяционный иммунитет к гриппу и ОРВИ в условиях пандемии COVID-19. *Санитарный врач*. 2023; (3): 153–63. <https://doi.org/10.33920/med-08-2303-03>
37. Соломай Т.В., Семенов Т.А., Кузин С.Н., Акимкин В.Г. Территориальные особенности эпидемического процесса инфекции, вызванной вирусом Эпштейна–Барр. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2021; 10(4): 81–9. <https://doi.org/10.33029/2305-3496-2021-10-4-81-89> <https://elibrary.ru/zsblzm>
38. Соломай Т.В., Семенов Т.А., Исаева Е.И., Ветрова Е.Н., Чернышова А.И., Роменская Э.В. и др. COVID-19 и риск реактивации герпесвирусной инфекции. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2021; 11(2): 55–62. <https://doi.org/10.18565/epidem.2021.11.2.55-62> <https://elibrary.ru/rqixoj>
39. Соломай Т.В., Семенов Т.А., Филатов Н.Н., Колбутова К.Б., Олейникова Д.Ю., Каражас Н.В. Роль детей и взрослых как резервуара возбудителей в период сезонного подъема заболеваемости инфекциями верхних дыхательных путей. *Детские инфекции*. 2020; 19(3): 5–11. <https://doi.org/10.22627/2072-8107-2020-19-3-5-11> <https://elibrary.ru/zchylf>
40. Gralton J., Tovey E., McLaws M.L., Rawlinson W.D. The role of particle size in aerosolized pathogen transmission: a review. *J. Infect.* 2011; 62(1): 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2010.11.010>
41. Farisiy M.A., Sufiawati I. Detection of Epstein–Barr virus DNA in saliva of HIV-1-infected individuals with oral hairy leukoplakia. *Oral Dis.* 2020; 26(Suppl. 1): 158–60. <https://doi.org/10.1111/odi.13400>
42. Koshy E., Mengting L., Kumar H., Jianbo W. Epidemiology, treatment and prevention of zoster: A comprehensive review. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.* 2018; 84(3): 251–62. https://doi.org/10.4103/ijdv.IJVDL_1021_16
43. Suarez F., Lortholary O., Hermine O., Lecuit M. Infection-associated lymphomas derived from marginal zone B cells: a model of antigen-driven. *Blood*. 2006; 107(8): 3034–44. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-09-3679>
44. Снитцын М.В., Богородская Е.М., Родина О.В., Кубракова Е.П., Романова Е.Ю., Бугун А.В. Поражение центральной нервной системы у больных туберкулезом в современных эпидемиологических условиях. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2018; 7(1): 111–20. <https://doi.org/10.24411/2305-3496-2018-00015> <https://elibrary.ru/yshtny>
45. Мордык А.В., Ситникова С.В., Пузырева Л.В., Назарова О.И., Фурсевич Л.Н. Оценка проявлений ВИЧ-инфекции и результатов лечения пациентов от туберкулеза в специализированном стационаре. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии*. 2015; 7(1): 69–75. <https://elibrary.ru/tnbset>
46. Соломай Т.В., Семенов Т.А., Филатов Н.Н., Ведунова С.Л., Лавров В.Ф., Смирнова Д.И. и др. Реактивация инфекции, вызванной вирусом Эпштейна–Барр (*Herpesviridae: Lymphocryptovirus*, HHV-4), на фоне COVID-19: эпидемиологические особенности. *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(2): 152–61. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-40> <https://elibrary.ru/nhbzyr>
47. Rooney B.V., Crucian B.E., Pierson D.L., Laudenslager M.L., Mehta S.K. Herpes virus reactivation in astronauts during spaceflight and its application on earth. *Front. Microbiol.* 2019; 10: 16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00016>
48. Mehta S.K., Bloom D.C., Plante I., Stowe R., Feiveson A.H., Renner A., et al. Reactivation of latent Epstein–Barr virus: a comparison after exposure to gamma, proton, carbon, and iron radiation. *Int. J. Mol. Sci.* 2018; 19(10): 2961. <https://doi.org/10.3390/ijms19102961>
49. *munitet*. 2021; 11(5): 943–50. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-TSC-1350> <https://elibrary.ru/dnyuor> (in Russian)
50. Ivanov A.A., Kulichenko T.V. Polypharmacy in infectious mononucleosis management: case series. *Pediatricheskaya farmakologiya*. 2022; 19(5): 412–6. <https://doi.org/10.15690/pf.v19i5.2462> <https://elibrary.ru/zxqiuy> (in Russian)
51. Vikulov G.Kh., Oradovskaya I.V., Kolobukhina L.V. Herpesvirus infections in children: prevalence, incidence, clinical forms, and management algorithm. *Voprosy prakticheskoy pediatrii*. 2022; 17(6): 126–41. <https://doi.org/10.20953/1817-7646-2022-6-126-140> (in Russian)
52. Solomay T.V., Semenenko T.A., Filatov N.N., Kostinov M.P., Il'ina N.I. Epstein–Barr virus: vaccine development. *Immunologiya*. 2020; 41(4): 381–90. <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-3-381-390> <https://elibrary.ru/kmmvgr> (in Russian)
53. Solomay T.V., Semenenko T.A., Blokh A.I. Prevalence of Epstein–Barr virus antibodies in different age groups in Europe and Asia: a systematic review and meta-analysis. *Zdravookhranenie Rossiyskoy Federatsii*. 2021; 65(3): 276–86. <https://doi.org/10.47470/0044-197X-2021-65-3-276-286> <https://elibrary.ru/slyeb> (in Russian)
54. Burmagina I.A., Pozdeeva M.A., Agafonov V.M. Infectious mononucleosis in the northern region. *Sanitarnyy vrach*. 2014; (11): 38–41. <https://elibrary.ru/szojrb> (in Russian)
55. Solomay T.V., Semenenko T.A. Epstein–Barr viral infection is a global epidemiological problem. *Voprosy virusologii*. 2022; 67(4): 265–77. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-122> <https://elibrary.ru/cnyvgi> (in Russian)
56. Solomay T.V. Dynamics of morbidity and territorial spread of infectious mononucleosis. *Zdravookhranenie Rossiyskoy Federatsii*. 2019; 63(4): 186–92. <https://doi.org/10.18821/0044-197X-2019-63-4-186-192> <https://elibrary.ru/aymphv> (in Russian)
57. Rostgaard K., Balfour H.H. Jr., Jarrett R., Erikstrup C., Pedersen O., Ullum H., et al. Primary Epstein–Barr virus infection with and without infectious mononucleosis. *PLoS One*. 2019; 14(12): e0226436. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226436>
58. Kuri A., Jacobs B.M., Vickaryous N., Pakpoor J., Middeldorp J., Giovannoni G., et al. Epidemiology of Epstein–Barr virus infection and infectious mononucleosis in the United Kingdom. *BMC Public Health*. 2020; 20(1): 912. <https://doi.org/10.1186/s12889-020-09049-x>
59. Belyakov V.D. General laws of functioning of parasitic systems (mechanisms of self-regulation). *Parazitologiya*. 1986; 20(4): 249–55. (in Russian)
60. Briko N.I., Mindlina A.Ya., Polibin R.V. Universality of changes in epidemic process manifestations of anthroponosis infections in recent decades. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2015; 55(5): 12–20. <https://elibrary.ru/zqjycd> (in Russian)
61. Briko N.I. Theoretical generalizations in epidemiology: from history to the present. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika*. 2018; 17(5): 5–16. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2018-17-5-5-16> <https://elibrary.ru/pkowvr> (in Russian)
62. Belyakov V.D., Yafaev R.Kh. *Epidemiology [Epidemiologiya]*. Moscow: Meditsina; 1989. (in Russian)
63. Semenenko T.A., Akimkin V.G., Burtseva E.I., Nozdracheva A.V., Simonova E.G., Tutel'yan A.V., et al. Characteristics of the epidemic situation associated with acute respiratory viral infections in the Russian Federation during the pandemic spread of COVID-19. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika*. 2022; 21(4): 4–15. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2022-21-4-4-15> <https://elibrary.ru/zovuqr> (in Russian)
64. Rednenko V.V., Semenov V.M., Korobov G.D. Epidemiological analysis of the annual dynamics of respiratory infections in a closed group. *Mediko-biologicheskie i sotsial'no-psikhologicheskie problemy bezopasnosti v chrezvychaynykh situatsiyakh*. 2011; (1): 24–8. <https://elibrary.ru/qjhktx> (in Russian)
65. Kolesin I.D. An analysis of the displacement mechanism of predecessors by a pandemic strain. *Biofizika*. 2016; 61(6): 985–8. <https://doi.org/10.1134/S0006350916060105> <https://elibrary.ru/yvhdgd> (in Russian)
66. Akimkin V.G., Semenenko T.A., Ugleva S.V., Dubodelov D.V., Kuzin S.N., Yatsyshina S.B., et al. COVID-19 in Russia: epidemiology and molecular genetic monitoring. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk*. 2022; 77(4): 254–60. <https://doi.org/10.15690/vramn2121> <https://elibrary.ru/dozijs> (in Russian)

REFERENCES

1. Agaeva M.I., Agaeva Z.A. Characteristic features of the course of herpesvirus infections during pregnancy. *Klinicheskii razbor v obshchey meditsine*. 2022; (1): 49–55. <https://doi.org/10.47407/kr2022.3.1.00118> (in Russian)
2. Solomay T.V., Semenenko T.A., Karazhas N.V., Rybalkina T.N., Komienco M.N., Bosh'yan R.E., et al. Assessing risks of infection with herpes viruses during transfusion of donor blood and its components. *Analiz riska zdorov'yu*. 2020; (2): 135–42. <https://doi.org/10.21668/health.risk/2020.2.15> <https://elibrary.ru/mjiicr>
3. Fedorova I.M., Koteleva S.I., Kapustin I.V., Blyakher M.S., Tul'skaya E.A., Zvereva N.N., et al. Hormone therapy affecting interferon defense in children with infectious mononucleosis. *Infektsiya i im-*

DISCUSSION

21. Bilev A.E., Bileva N.A., Chupakhina L.V., Vandysheva T.V., Ariskina M.A. Is the theory of self-regulation of the epidemic process acceptable for the new coronavirus infection COVID-19? *Vestnik meditsinskogo instituta «REAVIZ». Reabilitatsiya, Vrach i Zdorov'e*. 2022; (4): 12–8. <https://doi.org/10.20340/vmi-rvz.2022.4.COVID.2> (in Russian)
22. Akimkin V.G., Kuzin S.N., Semenenko T.A., Ploskireva A.A., Dubodelov D.V., Tivanova E.V., et al. Characteristics of the COVID-19 epidemiological situation in the Russian Federation in 2020. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk*. 2021; 76(4): 412–22. <https://doi.org/10.15690/vramn1505> <https://elibrary.ru/zmowbe> (in Russian)
23. Akimkin V.G., Popova A.Yu., Ploskireva A.A., Ugleva S.V., Semenenko T.A., Pshenichnaya N.Yu., et al. COVID-19: the evolution of the epidemic in Russia. Report I: Manifestations of the COVID-19 epidemic process. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2022; 99(3): 269–86. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-276> <https://elibrary.ru/zxgtfd> (in Russian)
24. Popkova M.I., Utkin O.V. Genetic diversity of the Epstein–Barr virus: a modern view of the problem. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2022; 99(1): 93–108. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-228> <https://elibrary.ru/kbfbkm> (in Russian)
25. Solomay T.V., Malakhova M.V., Shitikov E.A., Bespyatykh D.A., Veselovskiy V.A., Semenenko T.A., et al. Epstein–Barr virus: evaluation of gp350 and EBNA2 gene variability. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya*. 2022; 40(3): 32–40. <https://doi.org/10.17116/molgen20224003132> <https://elibrary.ru/dmfrxl> (in Russian)
26. Kukushkina E.A., Koteleva S.I., Blyakher M.S., Fedorova I.M., Ramazanova Z.K., Zvereva N.N., et al. Altered interferon defense in children with dynamically changed infectious mononucleosis. *Infektsiya i immunitet*. 2021; 11(1): 157–64. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-TIP-1349> <https://elibrary.ru/asboym> (in Russian)
27. Ershov F.I., Ospel'nikova T.P., Narovlyanskiy A.N. Interferon status as a method of determination of nonspecific biomarkers of human immunopathology. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2019; (3): 91–9. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-3-91-99> <https://elibrary.ru/jmogdb> (in Russian)
28. Trisko A.A., Kolesnikova N.V., Avdeeva M.G., Chudilova G.A., Lomtadize L.V. Peculiarities of cellular immunity in acute Epstein–Barr virus infection. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni*. 2015; 20(4): 13–5. <https://elibrary.ru/uhyrv> (in Russian)
29. Chuykova K.I., Popova O.A. Improvement of treatment of infectious mononucleosis in children. *Deitskie infektsii*. 2012; 11(4): 48–51. <https://elibrary.ru/phgfzl> (in Russian)
30. Nagovitsyna E.B. Modern approaches to diagnostics and treatment of Epstein–Barr virus infectious mononucleosis. *Dal'nevostochnyy meditsinskiy zhurnal*. 2016; (3): 45–50. <https://elibrary.ru/wmwfxx> (in Russian)
31. Solomay T.V., Semenenko T.A., Tutel'yan A.V., Bobrova M.V. Epidemiological features of infection caused by the Epstein–Barr virus. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii*. 2021; 98(6): 685–96. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-139> <https://elibrary.ru/cyuyrd> (in Russian)
32. Solomay T.V., Semenenko A.V., Nikitina G.Yu., Shuvalov A.N. Predictive scenarios for the development of the epidemic process of Epstein–Barr virus infection in the absence of specific prevention measures and their implementation. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni. Aktual'nye voprosy*. 2023; 13(1): 60–9. <https://doi.org/10.18565/epidem.2023.13.1.60-9> (in Russian)
33. Solomay T.V., Filatov N.N. Seasonality of infection caused by the Epstein–Barr virus. *Zhurnal infektologii*. 2020; 12(4): 93–100. <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2020-12-4-93-100> <https://elibrary.ru/dshwpx> (in Russian)
34. Solomay T.V., Filatov N.N., Kaira A.N., Lavrov V.F., Kuzin A.A., Lantsov E.V. Similarity of manifestations of epidemic processes of infectious mononucleosis and upper respiratory tract infections. *Vestnik Rossiyskoy Voенно-meditsinskoy akademii*. 2020; (3): 46–51. <https://elibrary.ru/fwocgg> (in Russian)
35. Korotchenko S.I. Problems of immunization of persons subject to military conscription. *Sanitarnyy vrach*. 2016; (12): 8–13. <https://elibrary.ru/xrmzgv> (in Russian)
36. Gotvyanskaya T.P., Mukasheva E.A., Nozdracheva A.V., Sipacheva N.B., Semenenko A.V., Ignat'eva A.V., et al. Incidence and population immunity to influenza and ARVI in the context of the COVID-19 pandemic. *Sanitarnyy vrach*. 2023; (3): 153–63. <https://doi.org/10.33920/med-08-2303-03> (in Russian)
37. Solomay T.V., Semenenko T.A., Kuzin S.N., Akimkin V.G. Territorial features of the epidemic process of infection caused by the Epstein–Barr virus. *Epshteyna-Barr. Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie*. 2021; 10(4): 81–9. <https://doi.org/10.33029/2305-3496-2021-10-4-81-89> <https://elibrary.ru/zsblzm> (in Russian)
38. Solomay T.V., Semenenko T.A., Isaeva E.I., Vetrova E.N., Chernyshova A.I., Romenskaya E.V., et al. COVID-19 and the risk of herpesvirus reactivation. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni. Aktual'nye voprosy*. 2021; 11(2): 55–62. <https://doi.org/10.18565/epidem.2021.11.2.55-62> <https://elibrary.ru/rgixoj> (in Russian)
39. Solomay T.V., Semenenko T.A., Filatov N.N., Kolbutova K.B., Oleynikova D.Yu., Karazhas N.V. The role of children and adults as a reservoir of pathogens during the seasonal rise in the incidence of upper respiratory tract infections. *Deitskie infektsii*. 2020; 19(3): 5–11. <https://doi.org/10.22627/2072-8107-2020-19-3-5-11> <https://elibrary.ru/zchylf> (in Russian)
40. Gralton J., Tovey E., McLaws M.L., Rawlinson W.D. The role of particle size in aerosolised pathogen transmission: a review. *J. Infect*. 2011; 62(1): 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2010.11.010>
41. Farisyi M.A., Sufiawati I. Detection of Epstein–Barr virus DNA in saliva of HIV-1-infected individuals with oral hairy leukoplakia. *Oral Dis*. 2020; 26(Suppl. 1): 158–60. <https://doi.org/10.1111/odi.13400>
42. Koshy E., Mengting L., Kumar H., Jianbo W. Epidemiology, treatment and prevention of zoster: A comprehensive review. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol*. 2018; 84(3): 251–62. https://doi.org/10.4103/ijdvl.IJDVL_1021_16
43. Suarez F., Lortholary O., Hermine O., Lecuit M. Infection-associated lymphomas derived from marginal zone B cells: a model of antigen-driven. *Blood*. 2006; 107(8): 3034–44. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-09-3679>
44. Sinityn M.V., Bogorodskaya E.M., Rodina O.V., Kubrakova E.P., Romanova E.Yu., Bugun A.V. The damage of the central nervous system in the patients with tuberculosis in modern epidemiological conditions. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie*. 2018; 7(1): 111–20. <https://doi.org/10.24411/2305-3496-2018-00015> <https://elibrary.ru/yshtny> (in Russian)
45. Mordyk A.V., Sitnikova S.V., Puzyreva L.V., Nazarova O.I., Fursevich L.N. Manifestations of HIV infection associated with the results of treatment of tuberculosis in patients admitted to a specialized hospital. *VICH-infektsiya i immunosuppressii*. 2015; 7(1): 69–75. <https://elibrary.ru/tnbset> (in Russian)
46. Solomay T.V., Semenenko T.A., Filatov N.N., Vedunova S.L., Lavrov V.F., Smirnova D.I., et al. Reactivation of Epstein–Barr virus (Herpesviridae: Lymphocryptovirus, HHV-4) infection during COVID-19: epidemiological features. *Voprosy virusologii*. 2021; 66(2): 152–61. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-40> <https://elibrary.ru/nhbzyr> (in Russian)
47. Rooney B.V., Crucian B.E., Pierson D.L., Laudenslager M.L., Mehta S.K. Herpes virus reactivation in astronauts during spaceflight and its application on earth. *Front. Microbiol*. 2019; 10: 16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00016>
48. Mehta S.K., Bloom D.C., Plante I., Stowe R., Feiveson A.H., Renner A., et al. Reactivation of latent Epstein–Barr virus: a comparison after exposure to gamma, proton, carbon, and iron radiation. *Int. J. Mol. Sci*. 2018; 19(10): 2961. <https://doi.org/10.3390/ijms19102961>

Problems
of Virology

Voprosy
Virusologii