



Д.И.ИВАНОВСКИЙ

ВОПРОСЫ ВИРУСОЛОГИИ

PROBLEMS OF VIROLOGY

6

Том 68 • 2023

Volume 68 • Issue 6 • 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 найдёт 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 29.12.2023.
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.

6

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)

Манапова 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)

Яшкулов 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 December 29, 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

6

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

ОБЗОРЫ

- Мищенко А.В., Мищенко, В.А., Гулюкин М.И. Оганесян А.С., Алексеенкова С.В., Забережный А.Д., Гулюкин А.М.**
Персистентная форма вирусной диареи крупного рогатого скота. 465
- Пономарева Н.В., Новикова Н.А.**
Нейротропные энтеровирусы (Picornaviridae: *Enterovirus*): доминирующие типы, основы нейровирулентности* 479
- Бобкова М.Р.**
Клеточные белки – потенциальные мишени антиретровирусной терапии* 488

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Роев Г.В., Борисова Н.И., Чистякова Н.В., Выходцева А.В., Акимкин В.Г., Хафизов К.Ф.**
Бастровирусы (*Astroviridae*): открытие, разнообразие и потенциальное влияние на здоровье человека и животных* 505
- Туысканова М.С., Жугунисов К.Д., Ozaslan M., Мырзахметова Б.Ш., Кутумбетов Л.Б.**
Клинические симптомы/признаки у хомяков при экспериментальном заражении вирусом SARS-CoV-2 (*Coronaviridae: Betacoronavirus*) 513
- Иванов П.А., Ляшко А.В., Кост В.Ю., Ломакина Н.Ф., Ртищев А.А., Бунькова Н.И., Тимофеева Т.А., Баланова М.А., Ионов С.А., Гориков Д.В., Маркушин С.Г.**
Определение активности полимеразы холодоадаптированного вируса гриппа (*Orthomyxoviridae: Alphainfluenzavirus*) методом минигенома с флуоресцентным белком* 526
- Назаренко А.С., Бирюкова Ю.К., Орлова Е.А., Трачук К.Н., Иванова А.Л., Белякова А.В., Пестов Н.Б., Ворovich М.Ф., Ишмухаметов А.А., Колясникова Н.М.**
Исследование онколитического потенциала вакцинных штаммов вирусов желтой лихорадки и клещевого энцефалита в отношении клеточных линий глиобластомы и карциномы поджелудочной железы 536
- Кичатова В.С., Потемкин И.А., Асади Мобархан Ф.А., Румянцева Т.Д., Семенов С.И., Кюрегян К.К., Михайлов М.И.**
Выявление антител к вирусу гепатита Е у домашних северных оленей (*Rangifer tarandus*) в Республике Саха (Якутия)* 549

ИНФОРМАЦИЯ

- Список статей, опубликованных в журнале «Вопросы вирусологии» в 2023 г. 557

CONTENTS

REVIEWS

Mishchenko A.V., Mishchenko V.A., Gulyukin M.I., Oganessian A.S., Alexeyenkova S.V., Zaberezhny A.D., Gulyukin A.M.
Persistent form of bovine viral diarrhoea 465

Ponomareva N.V., Novikova N.A.
Neurotropic enteroviruses (Picornaviridae: *Enterovirus*): predominant of types, basis of neurovirulence* 479

Bobkova M.R.
Cellular proteins as potential targets for antiretroviral therapy* 488

ORIGINAL RESEARCHES

Roev G.V., Borisova N.I., Chistyakova N.V., Vyhodtseva A.V., Akimkin V.G., Khafizov K.F.
Bastroviruses (*Astroviridae*): genetic diversity and potential impact on human and animal health* 505

Tuyskanova M.S., Zhugunissof K.D., Ozaslan M., Myrzakhmetova B.Sh., Kutumbetov L.B.
Clinical symptoms/signs in hamsters during experimental infection with the SARS-CoV-2 virus
(Coronaviridae: *Betacoronavirus*) 513

Ivanov P.A., Lyashko A.V., Kost V.Yu., Lomakina N.F., Rtishchev A.A., Bunkova N.I., Timofeeva T.A., Balanova M.A., Ionov S.A., Gorikov D.V., Markushin S.G.
Determination of cold-adapted influenza virus (Orthomyxoviridae: *Alphainfluenzavirus*) polymerase activity by the minigenome method with a fluorescent protein* 526

Nazarenko A.S., Biryukova Y.K., Orlova E.A., Trachuk K.N., Ivanova A.L., Belyakova A.V., Pestov N.B., Vorovitch M.F., Ishmukhametov A.A., Kolyasnikova N.M.
Investigation of oncolytic potential of vaccine strains of yellow fever and tick-borne encephalitis viruses against glioblastoma and pancreatic carcinoma cell lines. 536

Kichatova V.S., Potemkin I.A., Asadi Mobarkhan F.A., Romyantseva N.D., Semenov S.I., Kyuregyan K.K., Mikhailov M.I.
Detection of antibodies to the hepatitis E virus in domestic reindeer (*Rangifer tarandus*) in the Republic of Sakha (Yakutia)* 549

INFORMATION

Index of articles published in the journal «Problems of Virology» in 2023 557

ОБЗОРЫ



НАУЧНЫЙ ОБЗОР

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-184>

© МИЩЕНКО А.В., МИЩЕНКО В.А., ГУЛЮКИН М.И., ОГАНЕСЯН А.С., АЛЕКСЕЕНКОВА С.В., ЗАБЕРЕЖНЫЙ А.Д., ГУЛЮКИН А.М., 2023

Персистентная форма вирусной диареи крупного рогатого скота

Мищенко А.В.¹, Мищенко В.А.^{1,2}, Гулюкин М.И.¹, Оганесян А.С.², Алексеенкова С.В.¹, Забережный А.Д.³✉, Гулюкин А.М.¹

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

²ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», 111622, г. Владимир, Россия;

³ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности», 141142, Московская обл., п. Биокомбината, Россия

Резюме

В обзоре приведен анализ данных литературы по проблеме персистентной формы вирусной диареи – болезни слизистых оболочек (ВД-БС) крупного рогатого скота, особенностях возбудителя, организма-хозяина и иммунной системы, приводящих к персистенции вируса. ВД-БС крупного рогатого скота – заболевание, широко распространенное во всем мире, которое наносит значительный экономический ущерб молочному и мясному скотоводству и характеризуется многообразием клинических признаков и симптомов, в том числе поражением органов пищеварения и дыхания, абортными, мертворождениями и рождением нежизнеспособных телят, а также нарушением функции воспроизводства.

Ключевые слова: крупный рогатый скот; персистентная форма вирусной диареи; аборты; сперма; мертворождения; нежизнеспособные телята; лейкопения; тромбоцитопения; транзитная форма ВД-БС; биотипы и генотипы вируса диареи; цитопатогенные и нецитопатогенные штаммы вируса вирусной диареи; иммунодефицитные состояния

Для цитирования: Мищенко А.В., Мищенко В.А., Гулюкин М.И., Оганесян А.С., Алексеенкова С.В., Забережный А.Д., Гулюкин А.М. Персистентная форма вирусной диареи крупного рогатого скота. *Вопросы вирусологии*. 2023; 68(6): 465–478. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-184> EDN: <https://elibrary.ru/ksrusr>

Финансирование. Исследование выполнено за счет Государственного задания № FGUG-2022-0009 «Разработать систему управления рисками возникновения, прогнозирования динамики развития эмерджентных инфекций, с применением системы комплексного анализа биологических и филогенетических свойств возбудителя при использовании методов молекулярной и клеточной инженерии, основанной на фундаментальном изучении факторов инфекционного процесса с целью совершенствования методов диагностики, профилактики и лечения инфекционных заболеваний»; № FNCE-2022-0010 «Поддержание и развитие коллекций культур клеток и микроорганизмов на основе фундаментальных исследований, разработка бактериальных и вирусных штаммов с заданными свойствами для применения в ветеринарной медицине с использованием методов биотехнологии, в том числе на основе нанобиотехнологий, усовершенствование диагностики и средств специфической профилактики инфекционных болезней».

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

REVIEW

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-184>

Persistent form of bovine viral diarrhea

Alexey V. Mishchenko¹, Vladimir A. Mishchenko^{1,2}, Mikhail I. Gulyukin¹, Andrey S. Oganessian², Svetlana V. Alexeyenkova¹, Alexey D. Zaberezhny³✉, Alexey M. Gulyukin¹¹Federal Scientific Center VIEV, 109428, Moscow, Russia;²Federal Animal Healthcare Center, 111622, Vladimir, Russia;³All-Russian Research and Technological Institution of Industry, 141142, Moscow region, Biocombinata settlement, Russia**Abstract**

The review provides an analysis of literature data on the persistent form of Bovine Viral diarrhea/Mucosal disease (BVD) and is focused on virus and host factors, including those related to immune response, that contribute to the persistence of the virus. BVD is a cattle disease widespread throughout the world that causes significant economic damage to dairy and beef cattle. The disease is characterized by a variety of clinical signs, including damage to the digestive and respiratory organs, abortions, stillbirths and other failures of reproductive functions.

Keywords: *cattle; persistent form of bovine viral diarrhea; abortions; sperm; stillbirth; non-viable calves; leucopenia; thrombocytopenia; transitory form of BVD; biotypes and genotypes of viral diarrhea; cytopathogenic and non-cytopathogenic strains of bovine viral diarrhea virus; immune deficiency*

For citation: Mishchenko A.V., Mishchenko V.A., Gulyukin M.I., Oganessian A.S., Alexeyenkova S.V., Zaberezhny A.D., Gulyukin A.M. Persistent form of bovine viral diarrhea. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2023; 68(6): 465-478 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-184> EDN: <https://elibrary.ru/ksrusr>

Contribution: All authors made equal contributions to the search and analytical work and preparation of the article, read and approved the final version before publication.

Funding: The study was carried out at the expense of State Assignment No. FGUG-2022-0009 «To develop a system for managing the risks of occurrence, predicting the dynamics of the development of emerging infections, using a system for a comprehensive analysis of the biological and phylogenetic properties of the pathogen using molecular and cellular engineering methods based on a fundamental study of the factors of the infectious process in order to improve the methods of diagnostics, prevention and treatment of infectious diseases»; No. FNCE-2022-0010 «Maintenance and development of collections of cell cultures and microorganisms based on fundamental research, development of bacterial and viral strains with desired properties for use in veterinary medicine using biotechnology methods, including those based on nanobiotechnology, improvement of diagnostics and means of specific prevention of infectious diseases».

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

Введение

Рентабельность скотоводства обеспечивается рядом факторов, в том числе высоким генетическим потенциалом животных, полноценным кормлением и благополучием по инфекционным, инвазионным и массовым незаразным болезням. Среди многообразия вирусных агентов, вызывающих патологии у крупного рогатого скота (КРС), особую роль играет возбудитель вирусной диареи – болезни слизистых оболочек (ВД-БС), которая широко распространена в большинстве стран мира [1]. По вышеуказанным причинам в 2007 г. Всемирная организация охраны здоровья животных (ВОЗЖ) внесла ВД-БС в список болезней, подлежащих нотификации [2–4].

В результате инфицирования вирусом ВД-БС КРС у животных наблюдается широкий диапазон клинических проявлений, обусловленных поражением органов пищеварения, дыхания и репродуктивной системы [3, 5]. Заболевание может протекать как в субклинической, так и манифестной форме с гибелью инфицированных животных. Клинические признаки

и течение заболевания могут быть разными в зависимости от различных изолятов вируса.

Цель работы – обзор проблемы персистентной формы ВД-БС КРС.

Результаты

Возбудителем ВД-БС КРС являются три различающиеся антигенно и генетически вируса, относящиеся к роду *Pestivirus*, семейству *Flaviviridae*: пестивирус А (bovine viral diarrhea virus 1, BVDV-1), В (BVDV-2) и Н (BVDV-3, HoBiPeV) [6, 7]. В настоящее время в составе 1-го типа вируса диареи идентифицирован 21 подтип; 2-го типа – 5 подтипов; 3-го типа – 4 подтипа [4, 8, 9–14]. Все пестивирусы имеют сходное строение, их геном представлен одной положительной цепью РНК размером 12,3 тыс. нуклеотидов, которая имеет одну открытую рамку считывания длиной около 4000 кодонов, кодирующую 4 структурных белка (С, E^{ms}, E1 и E2) и 8 неструктурных белков (N^{pro}, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A и NS5B) [7, 15–19].

ВД-БС диагностируется у КРС всех возрастов и носит, как правило, стационарный характер [63, 64].

КРС является естественным хозяином вируса ВД-БС КРС, который вызывает поражение слизистых оболочек, респираторного и желудочно-кишечного тракта, а также репродуктивной системы. К вирусу ВД-БС восприимчивы КРС, овцы, козы, зубры, буйволы, олени, верблюды лоси, маралы и свиньи [16, 20–24]. Инкубационный период при ВД-БС колеблется от 2 до 14 сут. Клинические признаки вирусной диареи регистрируются у КРС всех возрастов, в том числе и у новорожденных телят, но при персистентной инфекции клинические признаки практически не проявляются. Клинико-морфологическая манифестация вирусной диареи КРС при современных условиях содержания определяется состоянием иммунной системы инфицированного животного, которое характеризуется вирусиндуцированной иммуносупрессией и является результатом прямого воздействия возбудителя на лимфоидные клетки [18, 25, 26]. Заболевание может протекать субклинически или в легкой форме, сопровождаясь субфебрильной лихорадкой, диареей и кашлем [25]. В редких случаях при остром течении у инфицированных животных могут наблюдаться высокая температура и кровотечение во внутренних органах. Во время вспышек в конце 80-х и начале 90-х годов прошлого века, вызванных высоковирулентными штаммами вируса ВД-БС 2-го генотипа, регистрировалась гибель животных. Считается, что изоляты вируса ВД-БС 1-го генотипа имеют низкую вирулентность, но также могут вызывать аналогичные клинические признаки при остром течении заболевания, хотя и очень редко [2, 27]. Степень и тяжесть клинических признаков, вызванных вирусом ВД-БС, у пораженных животных сильно варьирует [2, 28]. Основными факторами, обуславливающими клиническую картину заболевания, являются: два типа инфекции с совершенно разным участием иммунной системы (иммунный ответ при транзитной вирусемии и иммунотолерантность при персистирующей инфекции), два разных биотипа вируса (нецитопатический и цитопатический), а также генетическое разнообразие как изолятов возбудителя ВД-БС, так и животных-хозяев [14, 29].

Вирус ВД-БС передается контактным, аэрогенным, алиментарным, половым и трансплацентарным путями. Основным источником и резервуаром возбудителя ВД-БС являются больные и персистентно инфицированные, в том числе и дикие, животные [20, 31–34]. Эти животные выделяют во внешнюю среду большое количества вируса с мочой, фекалиями, молоком и другими выделениями [23]. Большую угрозу распространения нецитопатогенного вируса ВД-БС представляет сперма инфицированных быков-производителей [9, 21, 35, 36]. Все это приводит к циркуляции возбудителя в популяциях КРС, которая поддерживается, благодаря наличию персистентно инфицированных животных.

Межвидовая передача возбудителя отмечается после близкого контакта инфицированного КРС с овцами, козами и свиньями [31, 37]. У инфицированных вирусом ВД-БС беременных овец, коз, свиней и вер-

блюдовых регистрируются аборты, мертворождения и рождение нежизнеспособного потомства [16, 36].

Все штаммы вируса ВД-БС обладают тератогенными свойствами. При вирусной диарее аборты у КРС происходят в разные периоды (18–45, 40–125, 125–175 сут) стельности [8, 23, 35, 38], что наносит значительный экономический ущерб животноводству, особенно мясному скотоводству [8, 33, 39–43]. В США ущерб, наносимый вирусной диареей, в среднем составляет 200 долл. на корову [44–46]. По данным ряда других исследователей, прямые экономические потери среди серонегативных коров составляют 88–687 долл./животное [2, 47], а потери на национальном уровне составляют от 10 до 40 млн долл. на 1 млн отелов [33, 48].

Вирусы ВД-БС в зависимости от способности вызывать цитопатический эффект в культуре клеток классифицируются на цитопатогенный и нецитопатогенный биотипы. Цитопатогенные изоляты ВД-БС вызывают гибель инфицированных клеток посредством апоптоза и индуцируют экспрессию интерферонов (IFN) [49–51]. Серологически оба биотипа вируса идентичны [29]. Два биотипа вируса ВД-БС тесно связаны с двумя принципиально разными формами инфекции у КРС – транзитной у цитопатогенного и персистирующей у нецитопатогенного. Важно отметить, что цитопатогенность пестивируса не коррелирует с его вирулентностью, поскольку вирулентные изоляты возбудителя относятся к нецитопатическому биотипу [43, 52]. Нечитопатогенный вирус является наиболее распространенным природным биотипом.

Нечитопатогенный биотип вируса ВД-БС был обнаружен в пробах патологического материала от домашних и диких животных из фактически всех регионов мира, в том числе в Российской Федерации и сопредельных странах [1, 4, 6, 12, 14, 21, 28, 53–59]. В популяциях естественно-восприимчивых животных преобладание нецитопатогенного биотипа вируса ВД-БС выражено достаточно сильно (до 90% превалентности), что в большинстве случаев обусловлено способностью нецитопатогенного биотипа вызывать персистирующую инфекцию при внутриутробном инфицировании [60], которое в свою очередь приводит к рождению персистентно инфицированных телят – главного источника возбудителя в популяции, и способствует формированию стационарного неблагополучия по ВД-БС в хозяйстве. Укоренение в популяции хозяйства нецитопатогенного биотипа имеет большой эпизоотический эффект в силу большей вероятности трансплацентарной инфекции, абортов, развития персистентной инфекции плодов, а также острых иммуносупрессивных состояний поголовья при постнатальных формах инфекции [33, 45, 61].

Цитопатогенные биотипы вируса ВД-БС возникают из нецитопатогенных биотипов у персистентно инфицированных животных в результате рекомбинации РНК [62]. Одной из распространенных модификаций генома вируса ВД-БС для получения цитопатогенного биотипа является вставка фрагментов клеточного гена,

например, вставки убиквитин- или убиквитин-подобных генов, которые могут сопровождаться или не сопровождаться дупликациями вирусного генома, включая область NS3 [63]. Установлено, что точечная мутация (Y2441C) в NS4B может менять биотип вируса ВД-БС с цитопатического на нецитопатический [26].

На молекулярном уровне цитопатогенные и нецитопатогенные изоляты вируса ВД-БС можно различить по неструктурным белкам в инфицированной клетке. В результате репликации цитопатогенного изолята вируса ВД-БС в инфицированной клетке образуются неструктурный белок NS3 вместе с белком NS2-NS3, тогда как при репликации нецитопатогенного изолята вируса может быть обнаружена только нерасщепленная форма неструктурного белка NS2-NS3 [7]. Особенностью репликации нецитопатогенных пестивирусов является строго регламентированное подавление расщепления неструктурного белка NS2-NS3, которое необходимо для сохранения фенотипа нецитопатогенного вируса, что является предпосылкой для возникновения персистирующих инфекций при внутриутробной инфекции, которая приводит к внутриутробному инфицированию телят [15, 64].

Инфицирование неиммунного КРС нецитопатогенным биотипом вируса ВД-БС приводит к острой инфекции с транзитной виремией, которая начинается на 3-и сутки после заражения. Продолжительность составляет 10–14 сут, со следующими клиническими признаками: кратковременной транзитной лейкопенией (до 2880–3800 кл/мкл в течение 8–10 сут); лимфопенией и тромбоцитопенией; иммуносупрессией; абортами и диарей [23, 65–71]. У телят развивалась тяжелая тромбоцитопения (менее 5000 тромбоцитов/мкл) с гемorragиями после экспериментального заражения нецитопатогенным штаммом вируса ВД-БС, а в ряде случаев наступала их гибель [15]. Поражение мезентериальных лимфатических узлов и подслизистых ганглиев желудочно-кишечного тракта, а также нарушение нервной функции кишечника может быть причиной диареи при остром течении заболевания [28, 52]. Но у телят с титром 1 : 32 (5,0 log₁₀) и выше вируснейтрализующих антител к вирусу ВД-БС тромбоцитопения практически не развивалась [20].

При остром течении заболевания КРС может полностью выздороветь через 3 нед [72]. Переболевший КРС обладает иммунитетом к возбудителю, но вирус может быть выявлен в мононуклеарных клетках периферической крови в течение 98 сут и более после выздоровления. Несмотря на это, считается, что животные в естественных условиях маловероятно могут быть источниками возбудителя [37].

Попадание в организм КРС вируса ВД-БС сопряжено с накоплением его в местах первичной репликации (слизистые оболочки), поступлением его в кровеносную и лимфатическую системы, с последующим распространением и размножением во многих органах и тканях восприимчивого организма.

Иммуносупрессивное действие обоих биотипов вируса обусловлено прямым воздействием возбудителя на циркулирующие Т- и В-лимфоциты [73], разруше-

нием инфицированных вирусом лимфоцитов Т-клетками [74] и апоптозом лимфоцитов в лимфатических узлах и лимфоидных тканях респираторного и пищеварительного тракта [75], подавлением фагоцитарной функции макрофагов [76]. В результате снижается способность иммунной системы реагировать на другие инфекционные агенты, что способствует развитию вторичных заболеваний или рецидиву имеющихся инфекций, не позволяя сформировать иммунный ответ на введение вакцины [73, 77].

Согласно результатам экспериментального назального заражения телят нецитопатогенным биотипом возбудителя ВД-БС, основными местами локализации вируса были: энтероциты, пейеровы бляшки, тимус, лимфатические узлы, селезенка, миндалины и печень [68, 78]. Возбудитель обладает выраженным тропизмом к быстро размножающимся клеткам эпителиальной ретикулоэндотелиальной системы, особенно к клеткам плода. Нечитопатические штаммы вируса обладают тропизмом к лейкоцитам, лимфоидным органам и дыхательным путям, в то время как цитопатические штаммы более ограничены пищеварительным трактом [79].

G. Seong и соавт., используя мышей в качестве биологической модели, показали, что нецитопатогенный изолят вируса ВД-БС 1-го генотипа и нецитопатогенный изолят вируса ВД-БС 2-го генотипа по-разному взаимодействуют с врожденным иммунным ответом [19]. Так, у мышей, инфицированных нецитопатогенным изолятом вируса ВД-БС 2-го генотипа, проточный цитометрический анализ выявил заметно меньшее количество CD4⁺- и CD8⁺-Т-лимфоцитов и более низкую экспрессию костимулирующих молекул CD80 (B7-1) и CD86 (B7-2) и главного комплекса гистосовместимости класса II, чем у мышей, инфицированных нецитопатогенным изолятом вируса ВД-БС 1-го генотипа. Выработка интерлейкина-6 и моноцитарного хемотаксического белка-1 была выше в плазме мышей, инфицированных нецитопатогенным изолятом вируса ВД-БС 2-го генотипа, чем при инфицировании изолятом вируса ВД-БС 1-го генотипа [19].

E. Peterhans и соавт. установили, что вирусные белки N^{pro} и E^{ms} участвуют в уклонении вируса от иммунного ответа у КРС при инфицировании [17, 80, 81]. Нечитопатогенный вирус ингибирует индукцию IFN I типа (α/β) посредством действия вирусной РНКазы (E^{ms}) и N-концевой протеазы (N^{pro}) [82]. N^{pro} разрушает регуляторный фактор IFN III типа, таким образом ингибируя транскрипцию IFN- β и его противовирусную активность в соседних клетках [83]. Белок E^{ms} связывается с двухцепочечной РНК и разрушает ее, предотвращая ее связывание с клетками и индукцию IFN [74, 84]. Предполагается, что вышеуказанная особенность патогенеза нецитопатогенных изолятов вируса ВД-БС обуславливает развитие персистентной инфекции.

Последствия внутриутробных инфекций ВД-БС сложны и зависят от возраста плода и времени инфицирования. В течение первых 18 дней стельности, пока эмбрион не прикреплен, его инфицирование

не происходит. Заражение животных любым биотипом в период с 29-го по 41-й день стельности может привести к инфицированию эмбриона, его гибели и лизису [85]. Инфицирование в I триместре (с 40-го по 125-й дни) стельности нецитопатогенными вирусами ведет к виремии плода и иммунотолерантности. Инфицирование во II триместре (между 80-м и 150-м днями) стельности обоими биотипами может привести к аборту или тератогенным эффектам у плода, к которым относятся: атрофия мозжечка, дегенерация, брахигнатизм, образование псевдокист в головном мозге, а также в тимусе и костях [41, 65, 86]. Инфицирование плода вирусом ВД-БС на поздних сроках стельности (со 125-го дня) может приводить к транзиторной инфекции и адаптивному иммунному ответу у эмбриона. Происходит активная элиминация возбудителя, о чем свидетельствуют вируснейтрализующие антитела у телят после отела [87]. Телята при этом рождаются здоровые.

Экспериментальное заражение стельных коров цитопатогенным биотипом вируса ВД-БС в период между 63-м и 107-м днями стельности не приводило к рождению персистентно инфицированных телят, что свидетельствует о неспособности цитопатогенных биотипов вирусов ВД-БС вызывать персистирующую инфекцию, несмотря на инфицирование плода [60, 88]. Указанное выше свидетельствует о том, что в организме плода в ответ на инфицирование цитопатогенными изолятами возбудителя ВД-БС запускается комплекс реакций, которые подавляют его репликацию и не позволяют развиваться персистентной инфекции. Одним из объяснений данного явления может быть индукция IFN I типа плодом при инфицировании цитопатогенным возбудителем, который находился в амниотической жидкости и селезенке плода [27, 50]. При исследовании инфицированных плодов было установлено, что цитопатогенный изолят вируса выделяется только из проб селезенки, что позволяет сделать предположение об ограниченной его репликации, в отличие от нецитопатогенного изолята, который был выделен не только из селезенки, но из амниотической жидкости [60].

Персистирующая инфекция возникает только при инфицировании плода нецитопатогенным биотипом вируса ВД-БС до формирования его иммунной системы. Инфицирование животных нецитопатогенным биотипом вируса ВД-БС в период с 25-го до 90-го дня стельности, в редких случаях на 18-й и 125-й дни [30, 89], приводит к рождению персистентно инфицированных телят.

При инфицировании плода нецитопатогенным вирусом ВД-БС не было обнаружено активности IFN I типа в амниотической жидкости животных, наблюдалась низкая активность в пробах селезенки через 5 и 7 сут после заражения, несмотря то что нецитопатогенный вирус реплицировался на более высоких уровнях, чем цитопатогенный [60]. Вышеизложенное указывает на то, что индукция IFN I типа существенно подавлена у плодов, инфицированных нецитопатогенным вирусом ВД-БС, по сравнению

с плодами, инфицированными цитопатогенным вирусом [90]. Индукция IFN I типа при инфицировании цитопатогенным вирусом ВД-БС предотвращает развитие у плода иммунологической толерантности к нему, поэтому элиминация возбудителя происходит, когда плод становится иммунологически компетентным [77, 91].

Также возможным объяснением персистенции вируса ВД-БС является то, что инфицирование плода нецитопатогенным вирусом происходит на ранних стадиях стельности (< 125 дней), когда Т-клетки в тимусе плода отбираются на основе распознавания ими антигенов организма, что приводит к тому, что Т-клетки распознают антигены возбудителя как «собственные» антигены и, соответственно, формируется состояние, называемое иммунотолерантностью, при котором элементы адаптивной иммунной системы не реагируют на вирусные антигены и не выводят вирус из тканей плода [42, 92], что ведет к вирусоносительству [80] и постоянной виремии. Такие животные являются скрытыми источниками вируса, который они выделяют во внешнюю среду [81].

У персистентно инфицированных нецитопатогенным вирусом ВД-БС животных возбудитель концентрируется с высокой вирусной нагрузкой в лимфатических узлах, эпителиальных и лимфоидных клетках желудочно-кишечного тракта, легких, коже, тимусе и головном мозге [93]. После рождения у персистентно инфицированных телят не вырабатываются антитела к вирусу и не происходит элиминации, поэтому в течение жизни, они выделяют значительное количество вируса с выделениями, включая молоко, сперму, слюну, выделения из носа, мочу, кровь и аэрозоли [66]. Телята могут быть клинически здоровыми, но отставать в развитии [22]. Основные физиологические параметры (температура, частота дыхания и сердцебиения) у персистентно инфицированных животных находятся в пределах нормы [94], но концентрация гормонов щитовидной железы значительно ниже, чем у здоровых телят [95]. У животных наблюдается снижение привесов, задержка в росте [96]. Часто наблюдаются хронические или рецидивирующие кишечные и/или легочные симптомы, однако в ряде случаев единственными признаками персистирующей инфекции являются дерматологические, неврологические или гематологические нарушения [97].

Персистентно инфицированные животные восприимчивы к вторичным заболеваниям, что свидетельствует о плохом иммунном ответе [96], и более восприимчивы к развитию респираторных и кишечных заболеваний, вызванных вирусами парагриппа-3, инфекционного ринотрахеита, респираторно-синцитиальной инфекции, рота- и коронавирусами, а также пастреллами и манхеймиями. В сочетании с восприимчивостью к заболеваниям слизистых оболочек это приводит к низкой выживаемости большинства персистентно инфицированных животных [33, 51]. Считается, что только 28% персистентно инфицированных телят доживает до 2-летнего возраста [98].

У персистентно инфицированного КРС в результате мутаций или рекомбинаций персистирующего нецитопатогенного вируса в цитопатогенный биотип развивается заболевание слизистых оболочек [14, 40, 99, 100] с клиническими признаками их поражения, а также лимфоидной ткани, желудочно-кишечного тракта и с диареей [101]. Заболевание протекает в острой форме, при этом были описаны и единичные случаи хронического течения болезни [93]. В стадах, где циркулирует нецитопатогенный вирус ВД-БС, постинфекционные антитела регистрируются у 80% животных [29].

Заболевание может быть воспроизведено экспериментально суперинфекцией цитопатогенным штаммом вируса, антигенно гомологичным персистирующему нецитопатогенному штамму [14, 99, 102].

При заболевании слизистых оболочек цитопатогенный вирус первоначально локализуется в зародышевых центрах лимфатических узлов, миндалинах, лимфоидной ткани кишечника и пейеровых бляшек. Инфицирование клеток цитопатогенным вирусом приводит к апоптозу инфицированных клеток главным образом в пейеровых бляшках [75]. В дальнейшем возбудитель распространяется в эпителий желудочно-кишечного тракта [23, 93]. При поражении эпителия образуются эрозии и изъязвления с обнажением нижележащей соединительной ткани, что приводит к диарее, обезвоживанию с последующим осложнениям бактериальными инфекциями.

Цитопатогенный вирус способствует активации и дифференцировке моноцитов, но то же время ингибирует презентацию антигена Т-клеткам, что приводит к неконтролируемому воспалению и усилению виремии, и при этом одновременно ослабляет противовирусную защиту [103].

Основным путем распространения вируса ВД-БС в благополучные по заболеванию хозяйства являются:

- прямые и не прямые контакты с больными и персистентно инфицированными животными;
- введение в стада персистентно инфицированных животных;
- использование инфицированного генетического материала;
- использование контаминированных аттенуированных вакцин.

После заноса возбудителя вирусной диареи в стадо КРС распространение в популяции может происходить следующим образом:

1. Возникновение у восприимчивых животных проходящих («транзитных») острых форм вирусной диареи и дальнейшая передача вируса другим животным. Животные с «транзитной» острой формой инфекции являются кратковременными и тупиковыми источниками вируса.

2. Возникновение пожизненной персистентной инфекции у отдельных животных (не более чем у 1,5% в стаде) путем подавления их иммунной системы. Животные с персистентной формой инфекции представляют собой постоянный источник возбудителя в стаде, который играет основную роль в поддер-

жании стационарного неблагополучия хозяйства. Эти животные выделяют во внешнюю среду с секретами и экскрементами большое количество вируса на протяжении всей жизни, являются постоянным источником распространения возбудителя среди наивных животных и представляют собой наиболее важный резервуар, поддерживающий вирус в популяции [41, 62, 66]. Следовательно, фактически поголовный скрининг – это единственная эффективная диагностическая мера для их выявления.

Основополагающим пунктом программ контроля и ликвидации ВД-БС КРС являются диагностические исследования, которые предусматривают выявление и удаление персистентно инфицированных животных из инфицированных стад и последующий регулярный мониторинг, подтверждающий статус свободного от этой инфекции стада [104].

Для выявления персистентно инфицированных животных проводят выделение вируса из проб крови или индикацию вируса методами полимеразной цепной реакции (ПЦР) или иммуноферментного анализа [30]. С учетом наличия колостральных антител у телят до 3-месячного возраста, выделение вируса проводят из лейкоцитарных фракций цельной крови [105]. Диагноз на персистентную инфекцию устанавливают только при двукратных положительных результатах выделения вируса или обнаружении РНК в ПЦР в парных пробах крови или ее сыворотки [2, 32]. Методы диагностики и средства специфической профилактики вирусной диареи определены рекомендациями ВОЗЖ [3].

Контроль и ликвидации ВД-БС КРС в хозяйствах основывается на вакцинации, недопущении в стада и удалении персистентно инфицированных животных, соблюдении правил содержания КРС и общих мер биозащиты на предприятиях (сегрегация популяции и оборот стада, гигиена и санитария на фермах, контроль установленных режимов/процедур и управленческих решений) [104].

В РФ отсутствуют программы контроля ВД-БС на федеральном и региональных уровнях, а для иммунизации КРС широко используются инактивированные и живые вакцины отечественных и зарубежных производителей [106]. Для профилактики ВД-БС применяют аттенуированные, инактивированные вакцины и вакцины на основе генно-инженерных конструкций [107]. Цель вакцинации заключается в защите от острой инфекции нетелей и коров и от внутриутробного инфицирования плода. Считается, что идеальная вакцина должна обеспечить предотвращение трансплацентарного инфицирования эмбриона.

Установлено, что профилактическая иммунизация стельных животных может обеспечить защиту плода от внутриутробного инфицирования и последующего развития персистентной инфекции [102, 108–110].

Использование аттенуированных вакцин для профилактики вирусных болезней КРС представляет значительный риск, поскольку такие вакцины могут быть контаминированы нецитопатогенным вирусом ВД-БС при производстве и являться потенциальным источ-

ником вируса ВД-БС для восприимчивых животных [106, 111]. Наибольшую опасность живые вакцины представляют для стельных коров из-за риска трансплацентарной инфекции [2, 32, 44, 60, 65, 79, 97, 112]. Так, 23 февраля 1999 г. Служба охраны здоровья животных Нидерландов рекомендовала немедленно прекратить иммунизацию маркерной вакциной против вируса герпеса КРС по причине вспышек ВД-БС на четырех молочных фермах. При выяснении причин появления у КРС клинических симптомов вирусной диареи было установлено, что партия вакцины была контаминирована возбудителем ВД-БС 2-го типа [113].

На данный момент для профилактики ВД-БС применяют модифицированные живые вакцины, которые хорошо защищают от клинического проявления заболевания, но профилактика внутриутробной инфекции и инфицирования телят при их введении считается неполной [102, 110]. Установлено, что иммунизация стельных телок контаминированной нецитопатогенным вирусом ВД-БС модифицированной живой вакциной против ВД-БС привела к инфицированию плодов у всех вакцинированных животных, кроме того, нецитопатогенный вирус ВД-БС передавался от иммунизированных животных невакцинированным телкам, вызывая внутриутробные инфекции [90, 111, 112].

Инактивированные противовирусные вакцины являются безопасными и рекомендованы для иммунизации КРС, в том числе и стельных коров. Однако при этом требуется проведение ревакцинации [40, 102, 113].

Заключение

Суммируя вышеизложенное, можно заключить, что основным источником и естественным резервуаром возбудителя ВД-БС в популяции КРС являются персистентно инфицированные животные, которые выделяют во внешнюю среду вирус, заражая восприимчивых животных, в связи с чем выявление их в стадах при тестировании и удаление является ключевым в борьбе за благополучие.

Все штаммы вируса вирусной диареи являются тератогенными.

Заболевание вирусной диареей может возникать как спонтанно в результате мутации нецитопатогенного штамма вируса у инфицированных животных, так при суперинфицировании животных с персистентной инфекцией цитопатогенным вирусом.

Живые животные, генетический материал и живые противовирусные вакцины, изготовленные с использованием контаминированных цитопатическим вирусом культур клеток, могут быть потенциальным источником вируса ВД-БС для восприимчивых животных.

Основной мерой борьбы с персистентной формой диареи и ее профилактики является выявление и удаление из стада персистентно инфицированных вирусоносителей, что достигается путем диагностического тестирования всех животных стада и регулярного

мониторинга, подтверждающего статус стада, свободного от вирусной диареи. Исполнение мероприятий по биозащите предприятий содержащих КРС, будет способствовать профилактике распространения ВД-БС КРС в стадах РФ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеенкова С.В., Юров К.П., Гальнбек Т.В., Калита И.А., Юров К.П. Проверка клеточных культур на контаминацию вирусом диареи КРС – необходимое условие производства биологических препаратов. *Российский сельскохозяйственный журнал. Сельскохозяйственные животные*. 2013; (1): 15–8. <https://elibrary.ru/pyednf>
2. Алипер Т.И., Верховская А.Е., Верховский О.А. Вирусная диарея крупного рогатого скота. В кн.: Львов Д.К., ред. *Руководство по вирусологии: Вирусы и вирусные инфекции человека и животных*. М.: Медицинское информационное агентство; 2013: 890–6.
3. Блохин А.А., Молев А.И. Клинико-морфологическая манифестация вирусной диареи крупного рогатого скота у новорожденных телят. *Аграрная наука Евро-Северо-Востока*. 2013; (6) 42–6. <https://elibrary.ru/rknyuv>
4. Нефедченко А.В., Котенева С.В., Глотова Т.И., Готов А.Г. Выявление пестивирусов крупного рогатого скота при помощи мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. *Вопросы вирусологии*. 2020; 65(2): 95–102. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-2-95-102> <https://elibrary.ru/rddyvy>
5. Готов А.Г., Глотова Т.И., Нефедченко А.В., Котенева С.В. Генетический полиморфизм и распространение пестивирусов (Flaviviridae: Pestivirus) крупного рогатого скота в мире и в Российской Федерации. *Вопросы вирусологии*. 2022; 67(1): 18–26. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-96> <https://elibrary.ru/volumf>
6. Готов А.Г., Глотова Т.И. Вирусная диарея: значение в патологии воспроизводства крупного рогатого скота. *Ветеринария*. 2015; (4): 3–8. <https://elibrary.ru/tolyrt>
7. Готов А.Г., Глотова Т.И. Стратегия и принципы контроля вирусной диареи крупного рогатого скота. *Ветеринария*. 2018; (8): 3–12. <https://doi.org/10.30896/004224846.2018.21.8.03212> <https://elibrary.ru/xvrlzb>
8. Готов А.Г., Глотова Т.И., Зайцев Ю.Н., Пьянков О.В., Сергеев А.Н., Гулюкин М.И. Патогенность нецитопатогенных изолятов вируса диареи-болезни слизистых оболочек для серонегативных телят. *Вопросы вирусологии*. 2014; 59(4): 46–9. <https://elibrary.ru/sxuxkf>
9. Готов А.Г., Глотова Т.И., Семенова О.В., Котенева С.В., Сергеев А.А., Сергеев А.Н. Патогенность изолятов различных биотипов вируса вирусной диареи-болезни слизистых оболочек для серонегативных телят. *Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные*. 2015; (1): 19–22. <https://elibrary.ru/tilnfn>
10. Готов А.Г., Глотова Т.И., Южаков А.Г., Иванов Е.В. Вирусная диарея-болезнь слизистых оболочек крупного рогатого скота. В кн.: Алипер Т.И., ред. *Актуальные инфекционные болезни крупного рогатого скота: Руководство*. М.: Сельскохозяйственные технологии; 2021: 291–324. <https://doi.org/10.31016/viev-2020-6> <https://elibrary.ru/qxnxyt>
11. Готов А.Г., Глотова Т.И., Южаков А.Г., Забережный А.Д., Алипер Т.И. Выделение на территории Российской Федерации нецитопатогенного агента 2-го генотипа вируса диареи-болезни слизистых оболочек КРС. *Вопросы вирусологии*. 2009; 54(5): 43–7. <https://elibrary.ru/lajykf>
12. Готов А.Г., Никонова А.А., Котенева С.В., Готов А.Г. Способ борьбы с персистентной инфекцией при вирусной диарее. *Сибирский вестник сельскохозяйственной науки*. 2019; 49(2): 49–56. <https://doi.org/10.26898/0370-8799-2019-2-6> <https://elibrary.ru/zhfukt>
13. Гулюкин М.И., Юров К.П., Готов А.Г., Донченко Н.А. Стратегия борьбы с вирусной диареей-болезнью слизистых КРС в животноводческих хозяйствах Российской Федерации. *Вопросы вирусологии*. 2013; 58(6): 13–8. <https://elibrary.ru/rpbqur>
14. Дубаневич О.В. Вирусная диарея-болезнь слизистых КРС (обзор). *Этизоотология, иммунология, фармакология и санитария*. 2012; (3): 13–21.

15. Дубаневич О.В., Тяпша Ю. Выявление и генетическое типирование (по региону 5-UTR) вирусов диареи КРС, циркулирующих на территории Республики Беларусь. *Эпизоотология, иммунология, фармакология и санитария*. 2021; (2): 7–11. <https://doi.org/10.47612/2224-168X-2021-2-7-11> <https://elibrary.ru/uiedov>
16. Мищенко В.А., Черных О.Ю., Мищенко А.В., Якубенко Е.В., Думова В.В. Превалентность антител к вирусу вирусной диареи крупного рогатого скота в сыворотке крови жвачных животных. *Ветеринария Кубани*. 2012; (5): 19–20. <https://elibrary.ru/pfxhxl>
17. Котенева С.В., Нефедченко А.В., Глотова Т.И., Глов А.Г. Генетический полиморфизм возбудителя вирусной диареи (болезни слизистых оболочек) КРС на молочных комплексах Сибири. *Сельскохозяйственная биология*. 2018; 53(6): 1238–46. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2018.6.1238rus> <https://elibrary.ru/yufqkl>
18. Михайлова В.В., Лобова Т.П., Шишкина М.С., Скворцова А.Н. Анализ результатов эпизоотологического мониторинга вирусной диареи болезни слизистых крупного рогатого скота в Российской Федерации по данным отчетности 4-вет за 2020 год. *Аграрная наука*. 2021; 354(11-12): 36–9. <https://doi.org/10.32634/0869-8155-2021-354-11-12-36-39>
19. Нефедченко А.В., Глов А.Г., Глотова Т.И., Кунгурцева О.В. Выявление животных, персистентно инфицированных вирусом ВД-БС КРС, методом ПЦР. *Ветеринария*. 2011; (12): 21–5. <https://elibrary.ru/ououlv>
20. Нефедченко А.В., Котенева С.В., Глотова Т.И., Глов А.Г. Мониторинг инфицированности спермы бычков-производителей вирусами на головном предприятии. *Ветеринария*. 2022; (9): 18–23. <https://doi.org/10.30896/0042-4846.2022.25.9.18-23> <https://elibrary.ru/njavm>
21. Черных О.Ю., Мищенко А.В., Мищенко В.А., Кривонос Р.А., Дробин Ю.Д., Лысенко А.А. Проблема контаминация противовирусных вакцин в мире и в России. *Ветеринария Кубани*. 2019; (3): 3–6. <https://elibrary.ru/zjdbfu>
22. Черных О.Ю., Шевченко А.А., Джаилиди Г.А., Мищенко В.А., Мищенко А.В., Шевкопляс В.Н. Проблема вирусной диареи крупного рогатого скота. *Труды Кубанского государственного аграрного университета*. 2016; 58(1): 195–8. <https://elibrary.ru/whwkcbl>
23. Шилова Е.Н. Ликвидация вирусной диареи крупного рогатого скота в молочных стадах как мера повышения репродуктивного потенциала. *Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии*. 2019; (4): 45–7. <https://doi.org/10.17238/issn2072-6023.2019.4.45> <https://elibrary.ru/bonxoa>
24. Южаков А.Г., Устинова Г.И., Глов А.Г., Глотова Т.И., Нефедченко А.В., Кунгурцева О.В. и др. Филогенетический анализ нецитопатогенных изолятов вируса вирусной диареи крупного рогатого скота. *Ветеринария*. 2009; (6): 29–32. <https://elibrary.ru/kwzdpd>
25. Юров Г.К., Алексеенкова С.В., Диас-Хименес К.А., Неутров М.П., Юров К.П. Антигенные свойства нецитопатогенных штаммов вируса диареи-болезни слизистых крупного рогатого скота. *Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные*. 2013; (2): 24–6. <https://elibrary.ru/rxglhp>
26. Агаров Е.В., Murray C.L., Frolov I., Qu L., Myers T.M., Rice C.M. Uncleaved NS2-3 is required for production of infectious bovine viral diarrhoea virus. *J. Virol.* 2004; 78(5): 2414–25. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.5.2414-2425.2004>
27. Vachofen C., Braun U., Hilbe M., Ehrensperger F., Stalder H., Peterhans E. Clinical appearance and pathology of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus of different genetic subgroups. *Vet. Microbiol.* 2010; 141(3-4): 258–67. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.09.022>
28. Vachofen C., Vogt H.-R., Stalder H., Mathys T., Zanoni R., Hilbe M., et al. Persistent infections after natural transmission of bovine viral diarrhoea virus from cattle to goats and among goats. *Vet. Res.* 2013; 44(1): 32. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-32>
29. Baigent S.J., Goodbourn S., McCauley J.W. Differential activation of interferon regulatory factors-3 and -7 by non-cytopathogenic and cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2004; 100(3-4): 135–44. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2004.04.003>
30. Baigent S.J., Zhang G., Fray M.D., Flick-Smith H., Goodbourn S., McCauley J.W. Inhibition of beta interferon transcription by non-cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus is through an interferon regulatory factor 3-dependent mechanism. *J. Virol.* 2002; 76(18): 8979–88. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.18.8979-8988.2002>
31. Baker J.C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 1995; 11(3): 425–46. [https://doi.org/10.1016/s0749-0720\(15\)30460-6](https://doi.org/10.1016/s0749-0720(15)30460-6)
32. Barkema H.W., Bartek C.J., Van Wuyckhuise L., Hesselink J.W., Holzhauser M., Weber M.F., et al. Outbreak of bovine virus diarrhoea on Dutch dairy farms induced by bovine herpesvirus 1 marker vaccine contaminated with bovine virus diarrhoea virus type 2. *Tijdschr. Diergeneeskde.* 2001; 126(6): 158–65. (in Dutch)
33. Becher P., Tautz N. RNA recombination in pestiviruses: Cellular RNA sequences in viral genomes highlight the role of host factors for viral persistence and lethal disease. *RNA Biol.* 2011; 8(2): 216–24. <https://doi.org/10.4161/rna.8.2.14514>
34. Becher P., Orlich M., Thiel H.J. RNA recombination between persisting pestivirus and a vaccine strain: generation of cytopathogenic virus and induction of lethal disease. *J. Virol.* 2001; 75(14): 6256–64. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.14.6256-6264.2001>
35. Blanchard P.C., Ridpath J.F., Walker J.B., Hietala S.K. An outbreak of late-term abortions, premature births, and congenital deformities associated with a bovine viral diarrhoea virus 1 subtype b that induces thrombocytopenia. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2010; 22(1): 128–31. <https://doi.org/10.1177/104063871002200127>
36. Booth R.E., Brownlie J. Establishing a pilot bovine viral diarrhoea virus eradication scheme in Somerset. *Vet. Rec.* 2012; 170(3): 73. <https://doi.org/10.1136/vr.100191>
37. Chapter 3.4.7. Bovine viral diarrhoea. In: *Manual of Standards for Diagnostic and Vaccines for Terrestrial Animals*. WOAHP Terrestrial Manual; 2018: 1075–96.
38. Braun U., Thür B., Weiss M., Giger T. Bovine virus diarrhoea/mucosal disease in cattle—clinical findings in 103 calves and cattle. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 1996; 138(10): 465–75. (in German)
39. Brock K.V., Cortese V.S. Experimental fetal challenge using type II bovine viral diarrhoea virus in cattle vaccinated with modified-live virus vaccine. *Vet. Ther.* 2001; 2(4): 354–60.
40. Brock K.V. The many faces of bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 2004; 20(1): 1–3. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2003.12.002>
41. Brown T.T., DeLahunta A., Bistner S.I., Scott F.W., McEntee K. Pathogenetic studies of infection of the bovine fetus with bovine viral diarrhoea virus. I. Cerebellar atrophy. *Vet. Pathol.* 1974; 11(6): 486–505. <https://doi.org/10.1177/030098587401100604>
42. Brownlie J., Clarke M.C., Howard C.J. Experimental infection of cattle in early pregnancy with a cytopathic strain of bovine viral diarrhoea virus. *Res. Vet. Sci.* 1989; 46(3): 307–11.
43. Brownlie J., Clarke M.C., Howard C.J. Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. *Vet. Rec.* 1984; 114(22): 535–6. <https://doi.org/10.1136/vr.114.22.535>
44. Brownlie J., Clarke M.C., Howard C.J., Pocock D.H. Pathogenesis and epidemiology of bovine viral diarrhoea infection of cattle. *Ann. Rech. Vet.* 1987; 18(2): 157–66.
45. Charleston B., Fray M.D., Baigent S., Carr B.V., Morrison W.I. Establishment of persistent infection with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus in cattle is associated with a failure to induce type I interferon. *J. Gen. Virol.* 2001; 82(Pt. 8): 1893–7. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-8-1893>
46. Chase C.C.L. The impact of BVDV infection on adaptive immunity. *Biologicals.* 2013; 41(1): 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.biologics.2012.09.009>
47. Chen Z., Rijnbrand R., Jangra R.K., Devaraj S.G., Qu L., Ma Y., et al. Ubiquitination and proteasomal degradation of interferon regulatory factor-3 induced by N^{pro} from a cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Virology.* 2007; 366(2): 277–92. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.04.023>
48. Chi S., Chen S., Jia W., He Y., Ren L., Wang X. Non-structural proteins of bovine viral diarrhoea virus. *Virus Genes.* 2022; 58(6): 491–500. <https://doi.org/10.1007/s11262-022-01914-8>
49. Collins M.E., Heaney J., Thomas C.J., Brownlie J. Infectivity of pestivirus following persistence of acute infection. *Vet. Microbiol.* 2009; 138(3-4): 289–96. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.04.022>
50. Constable P.D., Hull B.L., Wicks J.R., Myer W. Femoral and tibial fractures in a newborn calf after transplacental infection with bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Rec.* 1993; 132(15): 383–5. <https://doi.org/10.1136/vr.132.15.383>

51. Cortese V.S., Grooms D.L., Ellis J., Bolin S.R., Ridpath J.F., Brock K.V. Protection of pregnant cattle and their fetuses against infection with bovine viral diarrhoea virus type 1 by use of a modified-live virus vaccine. *Am. J. Vet. Res.* 1998; 59(11): 1409–13.
52. Deregt D., Loewen K.G. Bovine viral diarrhoea virus: biotypes and disease. *Can. Vet. J.* 1995; 36(6): 371–8.
53. Ficken M.D., Ellsworth M.A., Tucker C.M., Cortese V.S. Effects of modified-live bovine viral diarrhoea virus vaccines containing either type 1 or types 1 and 2 BVDV on heifers and their offspring after challenge with noncytopathic type 2 BVDV during gestation. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2006; 228(10): 1559–64. <https://doi.org/10.2460/javma.228.10.1559>
54. Fulton R.W., Cook B.J., Payton M.E., Burge L.J., Step D.L. Immune response to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) vaccines detecting antibodies to BVDV subtypes 1a, 1b, 2a, and 2c. *Vaccine*. 2020; 38(24): 4032–7. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.03.058>
55. Fulton R.W., Whitley E.M., Johnson B.J., Ridpath J.F., Kapil S., Burge L.J., et al. Prevalence of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in persistently infected cattle and BVDV subtypes in affected cattle in beef herds in south central United States. *Can. J. Vet. Res.* 2009; 73(4): 283–91.
56. Fulton R.W., Saliki J.T., Confer A.W., Burge L.J., d'Offay J.M., Helman R.G., et al. Bovine viral diarrhoea virus cytopathic and noncytopathic biotypes and type 1 and 2 genotypes in diagnostic laboratory accessions: clinical and necropsy samples from. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2000; 12(1): 33–8. <https://doi.org/10.1177/104063870001200106>
57. García-Sastre A. Ten strategies of interferon evasion by viruses. *Cell Host Microbe*. 2017; 22(2): 176–84. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.07.012>
58. Глотов А.Г., Котенева С.В., Глотова Т.И., Трегубчук Т.В., Максютов Р.А. Молекулярная эпизоотология вирусной диареи крупного рогатого скота в Сибири. *Ветеринария*. 2018; (12): 14–20. <https://elibrary.ru/zvmhphj>
59. Grooms D.L. Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 2004; 20(1): 5–19. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2003.11.006>
60. Hanon J., van der Stede Y., Antonissen A., Mullender C., Tignon M., van den Berg T., et al. Distinction between persistent and transient infection in a bovine viral diarrhoea control programme: appropriate interpretation of real-time RT-PCR and antigen-ELISA test result. *Transbound. Emerg. Dis.* 2014; 61(2): 156–62. <https://doi.org/10.1111/tbed.12011>
61. Hansen T.R., Smirnova N.P., Webb B.T., Bielefeldt-Ohmann H., Sacco R.E., Van Campen H. Innate and adaptive immune responses to in utero infection with bovine viral diarrhoea virus. *Anim. Health Res. Rev.* 2015; 16(1): 15–26. <https://doi.org/10.1017/s1466252315000122>
62. Houe H. Epidemiological features and economic importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infection. *Vet. Microbiol.* 1999; 64(2-3): 89–107. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(98\)00262-4](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(98)00262-4)
63. Houe H. Survivorship of animals persistently infected with bovine virus diarrhoea virus (BVDV). *Prev. Vet. Med.* 1993; 15(4): 275–83. [https://doi.org/10.1016/0167-5877\(93\)90099-F](https://doi.org/10.1016/0167-5877(93)90099-F)
64. Houe H., Lindberg A., Moennig V. Test strategies in bovine viral diarrhoea virus control eradication campaigns in Europe. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2006; 18(5): 427–36. <https://doi.org/10.1177/104063870601800501>
65. Houe H. Economic impact of BVDV infection in dairies. *Biologicals*. 2003; 31(2): 137–43. [https://doi.org/10.1016/s1045-1056\(03\)00030-7](https://doi.org/10.1016/s1045-1056(03)00030-7)
66. Howard C.J. Immunological responses to bovine virus diarrhoea virus infections. *Rev. Sci. Tech.* 1990; 9(1): 95–103. <https://doi.org/10.20506/rst.9.1.488>
67. Knapke K.J., Georges H.M., Van Campen H., Bishop J.V., Bielefeldt-Ohmann H., Smirnova N.P., et al. Fetal lymphoid organ immune responses to transient and persistent infection with bovine viral diarrhoea virus. *Viruses*. 2020; 12(8): 816. <https://doi.org/10.3390/v12080816>
68. Kümmerer B.M., Stoll D., Meyers G. Bovine viral diarrhoea virus strain Oregon: a novel mechanism for processing of NS2-3 based on point mutations. *J. Virol.* 1998; 72(5): 4127–38. <https://doi.org/10.1128/jvi.72.5.4127-4138.1998>
69. Lanyon S.R., Hill F.I., Reichel M.P., Brownlie J. Bovine viral diarrhoea: pathogenesis and diagnosis. *Vet. J.* 2014; 199(2): 201–9. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.07.024>
70. Larsson B., Tråvén M., Hultén C., Hård af Segerstad C., Belák K., Alenius S. Serum concentrations of thyroid hormones in calves with a transient or persistent infection with bovine viral diarrhoea virus. *Res. Vet. Sci.* 1995; 58(2): 186–9. [https://doi.org/10.1016/0034-5288\(95\)90075-6](https://doi.org/10.1016/0034-5288(95)90075-6)
71. Lee S.R., Nanduri B., Pharr G.T., Stokes J.V., Pinchuk L.M. Bovine viral diarrhoea virus infection affects the expression of proteins related to professional antigen presentation in bovine monocytes. *Biochim. Biophys. Acta*. 2009; 1794(1): 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.09.005>
72. Liebler E.M., Küsters C., Pohlenz J.F. Experimental mucosal disease in cattle: changes of lymphocyte subpopulations in Peyer's patches and in lymphoid nodules of large intestine. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1995; 48(3-4): 233–48. [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(95\)05440-h](https://doi.org/10.1016/0165-2427(95)05440-h)
73. Liebler-Tenorio E.M., Greiser-Wilke I., Pohlenz J.F. Organ and tissue distribution of the antigen of the cytopathogenic bovine virus diarrhoea virus in the early and advanced phase of experimental mucosal disease. *Arch. Virol.* 1997; 142(8): 1613–34. <https://doi.org/10.1007/s007050050184>
74. Liebler-Tenorio E.M., Lanwehr A., Greiser-Wilke I., Loehr B.I., Pohlenz J. Comparative investigation of tissue alterations and distribution of BVD-viral antigen in cattle with early onset versus late onset mucosal disease. *Vet. Microbiol.* 2000; 77(1-2): 163–74. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(00\)00273-x](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(00)00273-x)
75. Liebler-Tenorio E.M., Ridpath J.F., Neill J.D. Distribution of viral antigen and tissue lesions in persistent and acute infection with the homologous strain of noncytopathic bovine viral diarrhoea virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2004; 16(5): 388–96. <https://doi.org/10.1177/104063870401600504>
76. Magouras I., Mätzner P., Rümener T., Peterhans E., Schweizer M. RNase-dependent inhibition of extracellular, but not intracellular, dsRNA-induced interferon synthesis by Erns of pestiviruses. *J. Gen. Virol.* 2008; 89(Pt. 10): 2501–6. <https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/003749-0>
77. Makoschey B., Janssen M.G., Vrijenhoek M.P., Korsten J.H., Marel P. An inactivated bovine virus diarrhoea virus (BVDV) type 1 vaccine affords clinical protection against BVDV type 2. *Vaccine*. 2001; 19(23-24): 3261–8. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(01\)00003-2](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(01)00003-2)
78. Marshall D.J., Moxley R.A., Kelling C.L. Distribution of virus and viral-antigen in specific pathogen-free calves following inoculation with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Pathol.* 1996; 33(3): 311–8. <https://doi.org/10.1177/030098589603300308>
79. McGowan M.R., Kirkland P.D., Richards S.G., Littlejohns I. Increased reproductive losses in cattle infected with bovine pestivirus around the time of insemination. *Vet. Rec.* 1993; 133(2): 39–43. <https://doi.org/10.1136/vr.133.2.39>
80. Meyers G., Thiel H.J. Molecular characterization of pestiviruses. *Adv. Virol. Res.* 1996; 47: 53–118. [https://doi.org/10.1016/s0065-3527\(08\)60734-4](https://doi.org/10.1016/s0065-3527(08)60734-4)
81. Moennig V., Becher P. Control of bovine viral diarrhoea. *Pathogens*. 2018; 7(1): 29. <https://doi.org/10.3390/pathogens7010029>
82. Müller-Doblies D., Arquint A., Schaller P., Heegaard P.M., Hilbe M., Albin S., et al. Innate immune responses of calves during transient infection with a noncytopathic strain of bovine viral diarrhoea virus. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2004; 11(2): 302–12. <https://doi.org/10.1128/cdli.11.2.302-312.2004>
83. Nettleton P.F., Entrican G. Ruminant pestiviruses. *Br. Vet. J.* 1995; 151(6): 615–42. [https://doi.org/10.1016/s0007-1935\(95\)80145-6](https://doi.org/10.1016/s0007-1935(95)80145-6)
84. Nilson S.M., Workman A.M., Sjeklocha D., Brodersen B., Grotelueschen D.M., Petersen J.L. Upregulation of the type I interferon pathway in feedlot cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *Virus Res.* 2020; 278: 197862. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.197862>
85. Palomares R.A., Marley S.M., Givens M.D., Gallardo R.A., Brock K.V. Bovine viral virus fetal persistent infection after immunization with a contaminated modified-live virus vaccine. *Theriogenology*. 2013; 79(8): 1184–95. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.02.017>
86. Passler T., Walz H., Ditchkoff S., van Santen E., Brock K.V., Walz P.H. Distribution of bovine viral diarrhoea virus antigen in persistently infected white tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *J. Comp. Pathol.* 2012; 147(4): 433–51. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2012.02.008>

87. Patel J., Shillette R., Williams J., Alexander D.C. Prevention of transplacental infection of bovine foetus by bovine viral diarrhoea virus through vaccination. *Arch. Virol.* 2002; 147(12): 2453–63. <https://doi.org/10.1007/s00705-002-0878-3>
88. Pedrera M., Gómez-Villamandos J.C., Molina V., Riscalde M.A., Rodriguez-Sanchez B., Sanchez-Cordon P.J. Quantification and determination of spread mechanisms of bovine viral diarrhoea virus in blood and tissues from colostrum-deprived calves during an experimental acute infection induced by a non-cytopathic genotype 1 strain. *Transbound. Emerg. Dis.* 2011; 59(5): 377–84. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2011.01281.x>
89. Pedrera M., Gómez-Villamandos J.C., Riscalde M.A., Molina V., Sanchez-Cordon P.J. Characterization of apoptosis pathways (intrinsic and extrinsic) in lymphoid tissues of calves inoculated with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus genotype 1. *J. Comp. Pathol.* 2012; 146(1): 30–9. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2011.03.015>
90. Peterhans E., Bachofen C., Stalder H., Schweizer M. Cytopathic bovine viral diarrhoea viruses (BVDV): emerging pestiviruses doomed to extinction. *Vet. Res.* 2010; 41(6): 44. <https://doi.org/10.1051/vetres/2010016>
91. Peterhans E., Jungi T.W., Schweizer M. BVDV and innate immunity. *Biologicals.* 2003, 31(2): 107–12. [https://doi.org/10.1016/s1045-1056\(03\)00024-1](https://doi.org/10.1016/s1045-1056(03)00024-1)
92. Peterhans E., Jungi T.W., Schweizer M. How the bovine viral diarrhoea virus outwits the immune system. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 2006; 113(4): 124–9. (in German)
93. Peterhans E., Schweizer M. Pestiviruses: How to outmaneuver your hosts. *Vet. Microbiol.* 2010; 142(1-2): 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.09.038>
94. Peterhans E., Schweizer M. BVDV: A pestivirus inducing tolerance of the innate immune response. *Biologicals.* 2013; 41(1): 39–51. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2012.07.006>
95. Piniar B., Firth C.L., Richter V., Lebl K., Trauffer M., Dzieciol M., et al. A systematic review of financial and economic assessments of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) prevention and mitigation activities worldwide. *Prev. Vet. Med.* 2017; 137(Pt. A): 77–92. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2016.12.014>
96. Potgieter L.N. Immunology of bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 1995; 11(3): 501–20. [https://doi.org/10.1016/s0749-0720\(15\)30464-3](https://doi.org/10.1016/s0749-0720(15)30464-3)
97. Potgieter L.N. Immunosuppression in cattle because of bovine viral diarrhoea virus infection. *Agri. Pract.* 1988; (9): 7–14.
98. Qu L., McMullan L.K., Rice C.M. Isolation and characterization of noncytopathic pestivirus mutants reveals a role for nonstructural protein NS4B in viral cytopathogenicity. *J. Virol.* 2001; 75(22): 10651–62. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.22.10651-10662.2001>
99. Quinn H.E., Windsor P.A., Kirkland P.D., Ellis T.J. An outbreak of abortion in a dairy herd associated with *Neospora caninum* and bovine pestivirus infection. *Aust. Vet. J.* 2004; 82(1-2): 99–101. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2004.tb14656.x>
100. Ridpath J.F. Bovine viral diarrhoea virus: global status. *Vet. Clin. North Am. Food. Anim. Pract.* 2010; 26(1): 105–21. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2009.10.007>
101. Ridpath J.F., Neill J.D., Peterhans E. Impact of variation in acute virulence of BVDV1 strains on design of better vaccine efficacy challenge models. *Vaccine.* 2007; 25(47): 8058–66. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.09.014>
102. Rinaldo C.R. Jr, Isackson D.W., Overall J.C., Glasgow L.A., Brown T.T., Bistner S.I., et al. Fetal and adult bovine interferon production during bovine viral diarrhoea virus infection. *Infect. Immun.* 1976; 14(3): 660–6. <https://doi.org/10.1128/iai.14.3.660-666.1976>
103. Sauter-Louis C.M., Staubach C., Reichmann F., Stoll A., Rademacher G., Cussler K., et al. Spatial distribution and incidence of bovine neonatal pancytopenia in Bavaria, Germany. *BMC Vet. Res.* 2020; 16(1): 155. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02371-x>
104. Schweizer M., Matzener P., Pfaffen G., Stalder H., Peterhans E. “Self” and “nonself” manipulation of interferon defense during persistent infection: bovine viral diarrhoea virus resists alpha/beta interferon without blocking antiviral activity against unrelated viruses replicating in its host cells. *J. Virol.* 2006; 80(14): 6926–35. <https://doi.org/10.1128/JVI.02443-05>
105. Seong G., Lee J.S., Lee K.H., Shin S.U., Yoon J.Y., Choi K.S. Noncytopathic bovine viral diarrhoea virus 2 impairs virus control in a mouse model. *Arch. Virol.* 2016; 161(2): 395–403. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2665-y>
106. Tautz N., Tews B.A., Meyers G. The molecular biology of pestiviruses. *Adv. Virus Res.* 2015; 93: 47–160. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2015.03.002>
107. Taylor L.F., Janzen E.D., Ellis J.A., van den Hurk J.V., Ward P. Performance, survival, necropsy, and virological findings from calves persistently infected with the bovine viral diarrhoea virus originating from a single Saskatchewan beef herd. *Can. Vet. J.* 1997; 38(1): 29–37.
108. Voges H., Young S., Nash M. Direct adverse effects of persistent BVDV infection in dairy heifers – A retrospective case control study. *VetScript.* 2006; 19(8): 22–5.
109. Walz P.H., Grooms D.L., Passler T., Ridpath J.F., Tremblay R., Step D.L., et al. Control of bovine viral diarrhoea virus in ruminants. *J. Vet. Intern. Med.* 2010; 24(3): 476–86. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2010.0502.x>
110. Webb B.T., Norrdin R.W., Smirnova N.P., Van Campen H., Weiner C.M., Antoniazzi A.Q., et al. Bovine viral diarrhoea virus cyclically impairs long bone trabecular modeling in experimental persistently infected fetuses. *Vet. Pathol.* 2012; 49(6): 930–40. <https://doi.org/10.1177/0300985812436746>
111. Wilhelmsen C.L., Bolin S.R., Ridpath J.F., Cheville N.F., Kluge J.P. Experimental primary postnatal bovine viral diarrhoea viral infections in six-month-old calves. *Vet. Pathol.* 1990; 27(4): 235–43. <https://doi.org/10.1177/030098589002700404>
112. Woodard L. BVD virus associated with outbreaks of abortion, stillbirths and weak calves. *Vet. Med.* 1994; (4): 379–84.
113. Yeşilbağ K., Alpay G., Becher R. Variability and global distribution of subgenotypes of bovine viral diarrhoea virus. *Viruses.* 2017; 9(6): 128. <https://doi.org/10.3390/v9060128>

REFERENCES

- Alekseenkova S.V., Yurov K.P., Gal'nbek T.V., Kalita I.A., Yurov K.P. Cell cultures control contamination by bovine viral diarrhoea virus is the necessary condition for biology drugs production. *Rossiyskiy sel'skokhozyaystvennyy zhurnal. Sel'skokhozyaystvennyye zhivotnye.* 2013; (1): 15–8. <https://elibrary.ru/pyednf> (in Russian)
- Aliper T.I., Verkhovskaya A.E., Verkhovskiy O.A. Viral diarrhoea of cattle. In: L'vov D.K., ed. *Guide to Virology: Viruses and Viral Infections of Humans and Animals [Rukovodstvo po virusologii: Virusy i virusnye infektsii cheloveka i zhivotnykh]*. Moscow: Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo; 2013: 890–6. (in Russian)
- Blokhin A.A., Molev A.I. Clinical and morphological manifestation of cattle viral diarrhoea in newborn calves. *Agrarnaya nauka Evro-Severo-Vostoka.* 2013; (6) 42–6. <https://elibrary.ru/rknyyv> (in Russian)
- Nefedchenko A.V., Koteneva S.V., Glotova T.I., Glotov A.G. Detection of bovine pestiviruses by a multiplex real-time polymerase chain reaction. *Voprosy virusologii.* 2020; 65(2): 95–102. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-2-95-102> <https://elibrary.ru/rddyvy> (in Russian)
- Glotov A.G., Glotova T.I., Nefedchenko A.V., Koteneva S.V. Genetic diversity and distribution of bovine pestiviruses (Flaviviridae; Pestivirus) in the world and in the Russian Federation. *Voprosy virusologii.* 2022; 67(1): 18–26. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-96> <https://elibrary.ru/volumf> (in Russian)
- Glotov A.G., Glotova T.I. Impact of bovine viral diarrhoea virus to fertility in cattle. *Veterinariya.* 2015; (4): 3–8. <https://elibrary.ru/tylort> (in Russian)
- Glotov A.G., Glotova T.I. Strategy and control principles of bovine viral diarrhoea. *Veterinariya.* 2018; (8): 3–12. <https://doi.org/10.3089/6/004224846.2018.21.8.03212> <https://elibrary.ru/xvlrzb> (in Russian)
- Glotov A.G., Glotova T.I., Zaytsev Yu.N., P'yankov O.V., Sergeev A.N., Gulyukin M.I. Pathogenicity of noncytopathic isolates of bovine viral diarrhoea virus in experimentally infected seronegative calves. *Voprosy virusologii.* 2014; 59(4): 46–9. <https://elibrary.ru/sxuxkf> (in Russian)
- Glotov A.G., Glotova T.I., Semenova O.V., Koteneva S.V., Sergeev A.A., Sergeev A.N. Pathogenicity isolates from different biotypes of bovine viral diarrhoea virus in experimentally infected seronegative calves. *Rossiyskiy veterinarnyy zhurnal. Sel'skokhozyaystvennyye zhivotnye.* 2015; (1): 19–22. <https://elibrary.ru/tilnnf> (in Russian)

10. Glotov A.G., Glotova T.I., Yuzhakov A.G., Ivanov E.V. Viral diarrhea is a disease of the mucous membranes of cattle. In: Aliper T.I., ed. *Topical Infectious Diseases of Cattle: Handbook [Aktual'nye infektsionnye bolezni krupnogo rogatogo skota: Rukovodstvo]*. Moscow: Sel'skokhozyaystvennyye tekhnologii; 2021: 291–324. <https://doi.org/10.31016/viev-2020-6> <https://elibrary.ru/qxnytt> (in Russian)
11. Glotov A.G., Glotova T.I., Yuzhakov A.G., Zaberezhnyy A.D., Aliper T.I. Isolation of noncytopathogenic genotype 2 bovine viral diarrhea virus from the cattle mucosa in the Russian Federation. *Voprosy virusologii*. 2009; 54(5): 43–7. <https://elibrary.ru/lajykf> (in Russian)
12. Glotov A.G., Nikonova A.A., Koteneva S.V., Glotov A.G. The means of combating persistent infection of viral diarrhea. *Sibirskiy vestnik sel'skokhozyaystvennoy nauki*. 2019; 49(2): 49–56. <https://doi.org/10.26898/0370-8799-2019-2-6> <https://elibrary.ru/zhfukt> (in Russian)
13. Gulyukin M.I., Yurov K.P., Glotov A.G., Donchenko N.A. Bovine viral diarrhea control in Russian Federation. *Voprosy virusologii*. 2013; 58(6): 13–8. <https://elibrary.ru/rpbqup> (in Russian)
14. Dubanevich O.V. Viral diarrhea is a disease of the mucous membranes of cattle (review). *Epizootologiya, immunologiya, farmakologiya i sanitariya*. 2012; (3): 13–21. (in Russian)
15. Dubanevich O.V., Tyapsha Yu. Detection and genetic typing (by region 5'-UTR) of isolates of bovine viral diarrhea virus circulating in the territory of the Republic of Belarus. *Epizootologiya, immunologiya, farmakologiya i sanitariya*. 2021; (2): 7–11. <https://doi.org/10.47612/2224-168X-2021-2-7-11> <https://elibrary.ru/uiedov> (in Russian)
16. Mishchenko V.A., Chernykh O.Yu., Mishchenko A.V., Yakubenko E.V., Dumova V.V. Antibody prevalence to bovine viral diarrhea virus in ruminant sera. *Veterinariya Kubani*. 2012; (5): 19–20. <https://elibrary.ru/pfxhlx> (in Russian)
17. Koteneva S.V., Nefedchenko A.V., Glotova T.I., Glotov A.G. Genetic polymorphism of the bovine viral diarrhea viruses in big dairy farms in Siberia. *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya*. 2018; 53(6): 1238–46. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2018.6.1238rus> <https://elibrary.ru/yyfqkl> (in Russian)
18. Mikhaylova V.V., Lobova T.P., Shishkina M.S., Skvortsova A.N. Analysis of the results of epizootic monitoring of viral diarrhea – a disease of mucous membranes in cattle in the Russian Federation according to the reporting of 4-vet for 2020. *Agrarnaya nauka*. 2021; 354(11-12): 36–9. <https://doi.org/10.32634/0869-8155-2021-354-11-12-36-39> (in Russian)
19. Nefedchenko A.V., Glotov A.G., Glotova T.I., Kungurtseva O.V. Detection of cattle persistently infected by bovine viral diarrhea virus with PCR. *Veterinariya*. 2011; (12): 21–5. <https://elibrary.ru/ououlv> (in Russian)
20. Nefedchenko A.V., Koteneva S.V., Glotova T.I., Glotov A.G. Monitoring of infection of the semen of bulls with viruses on the artificial insemination center. *Veterinariya*. 2022; (9): 18–23. <https://doi.org/10.30896/0042-4846.2022.25.9.18-23> <https://elibrary.ru/njavrn> (in Russian)
21. Chernykh O.Yu., Mishchenko A.V., Mishchenko V.A., Krivonos R.A., Drobin Yu.D., Lysenko A.A. Problem of antiviral vaccines' contamination in the world and in Russia. *Veterinariya Kubani*. 2019; (3): 3–6. <https://elibrary.ru/zjdbfu> (in Russian)
22. Chernykh O.Yu., Shevchenko A.A., Dzhalidi G.A., Mishchenko V.A., Mishchenko A.V., Shevkoplyas V.N. Problems of viral diarrhea in cattle. *Trudy Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*. 2016; 58(1): 195–8. <https://elibrary.ru/whwkcj> (in Russian)
23. Shilova E.N. Elimination of cattle viral diarrhea in dairy herds as a measure of reproductive potential. *Voprosy normativno-pravovogo regulirovaniya v veterinarii*. 2019; (4): 45–7. <https://doi.org/10.17238/issn2072-6023.2019.4.45> <https://elibrary.ru/bonxoq> (in Russian)
24. Yuzhakov A.G., Ustinova G.I., Glotov A.G., Glotova T.I., Nefedchenko A.V., Kungurtseva O.V., et al. phylogenetic Analysis of noncytopathogenic isolates of cattle BVD virus. *Veterinariya*. 2009; (6): 29–32. <https://elibrary.ru/kwzdpd> (in Russian)
25. Yurov G.K., Alekseenkova S.V., Dias-Khimenos K.A., Neutroev M.P., Yurov K.P. Antigenicity of noncytopathogenic strains of bovine viral diarrhea virus. *Rossiyskiy veterinarnyy zhurnal. Sel'skokhozyaystvennyye zhivotnye*. 2013; (2): 24–6. <https://elibrary.ru/rxglhp> (in Russian)
26. Agapov E.V., Murray C.L., Frolov I., Qu L., Myers T.M., Rice C.M. Uncleaved NS2-3 is required for production of infectious bovine viral diarrhea virus. *J. Virol*. 2004; 78(5): 2414–25. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.5.2414-2425.2004>
27. Bachofen C., Braun U., Hilbe M., Ehrensperger F., Stalder H., Peterhans E. Clinical appearance and pathology of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus of different genetic subgroups. *Vet. Microbiol*. 2010; 141(3-4): 258–67. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.09.022>
28. Bachofen C., Vogt H-R., Stalder H., Mathys T., Zanoni R., Hilbe M., et al. Persistent infections after natural transmission of bovine viral diarrhoea virus from cattle to goats and among goats. *Vet. Res*. 2013; 44(1): 32. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-32>
29. Baigent S.J., Goodbourn S., McCauley J.W. Differential activation of interferon regulatory factors-3 and -7 by non-cytopathogenic and cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Immunol. Immunopathol*. 2004; 100(3-4): 135–44. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2004.04.003>
30. Baigent S.J., Zhang G., Fray M.D., Flick-Smith H., Goodbourn S., McCauley J.W. Inhibition of beta interferon transcription by non-cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus is through an interferon regulatory factor 3-dependent mechanism. *J. Virol*. 2002; 76(18): 8979–88. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.18.8979-8988.2002>
31. Baker J.C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract*. 1995; 11(3): 425–46. [https://doi.org/10.1016/s0749-0720\(15\)30460-6](https://doi.org/10.1016/s0749-0720(15)30460-6)
32. Barkema H.W., Bartek C.J., Van Wuyckhuise L., Hesselink J.W., Holzhauer M., Weber M.F., et al. Outbreak of bovine virus diarrhoea on Dutch dairy farms induced by bovine herpesvirus 1 marker vaccine contaminated with bovine virus diarrhoea virus type 2. *Tijdschr. Diergeneeskd*. 2001; 126(6): 158–65. (in Dutch)
33. Becher P., Tautz N. RNA recombination in pestiviruses: Cellular RNA sequences in viral genomes highlight the role of host factors for viral persistence and lethal disease. *RNA Biol*. 2011; 8(2): 216–24. <https://doi.org/10.4161/rna.8.2.14514>
34. Becher P., Orlich M., Thiel H.J. RNA recombination between persisting pestivirus and a vaccine strain: generation of cytopathogenic virus and induction of lethal disease. *J. Virol*. 2001; 75(14): 6256–64. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.14.6256-6264.2001>
35. Blanchard P.C., Ridpath J.F., Walker J.B., Hietala S.K. An outbreak of late-term abortions, premature births, and congenital deformities associated with a bovine viral diarrhoea virus 1 subtype b that induces thrombocytopenia. *J. Vet. Diagn. Invest*. 2010; 22(1): 128–31. <https://doi.org/10.1177/104063871002200127>
36. Booth R.E., Brownlie J. Establishing a pilot bovine viral diarrhoea virus eradication scheme in Somerset. *Vet. Rec*. 2012; 170(3): 73. <https://doi.org/10.1136/vr.100191>
37. Chapter 3.4.7. Bovine viral diarrhoea. In: *Manual of Standards for Diagnostic and Vaccines for Terrestrial Animals*. WOAHP Terrestrial Manual; 2018: 1075–96.
38. Braun U., Thür B., Weiss M., Giger T. Bovine virus diarrhoea/mucosal disease in cattle—clinical findings in 103 calves and cattle. *Schweiz. Arch. Tierheilkd*. 1996; 138(10): 465–75. (in German)
39. Brock K.V., Cortese V.S. Experimental fetal challenge using type II bovine viral diarrhoea virus in cattle vaccinated with modified-live virus vaccine. *Vet. Ther*. 2001; 2(4): 354–60.
40. Brock K.V. The many faces of bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract*. 2004; 20(1): 1–3. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2003.12.002>
41. Brown T.T., DeLahunta A., Bistner S.I., Scott F.W., McEntee K. Pathogenetic studies of infection of the bovine fetus with bovine viral diarrhoea virus. I. Cerebellar atrophy. *Vet. Pathol*. 1974; 11(6): 486–505. <https://doi.org/10.1177/030098587401100604>
42. Brownlie J., Clarke M.C., Howard C.J. Experimental infection of cattle in early pregnancy with a cytopathic strain of bovine virus diarrhoea virus. *Res. Vet. Sci*. 1989; 46(3): 307–11.
43. Brownlie J., Clarke M.C., Howard C.J. Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. *Vet. Rec*. 1984; 114(22): 535–6. <https://doi.org/10.1136/vr.114.22.535>
44. Brownlie J., Clarke M.C., Howard C.J., Pocock D.H. Pathogenesis and epidemiology of bovine virus diarrhoea infection of cattle. *Ann. Rech. Vet*. 1987; 18(2): 157–66.
45. Charleston B., Fray M.D., Baigent S., Carr B.V., Morrison W.I. Establishment of persistent infection with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus in cattle is associated with a failure to induce

- type I interferon. *J. Gen. Virol.* 2001; 82(Pt. 8): 1893–7. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-8-1893>
46. Chase C.C.L. The impact of BVDV infection on adaptive immunity. *Biologicals.* 2013; 41(1): 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.biologics.2012.09.009>
 47. Chen Z., Rijnbrand R., Jangra R.K., Devaraj S.G., Qu L., Ma Y., et al. Ubiquitination and proteasomal degradation of interferon regulatory factor-3 induced by N^{pro} from a cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Virology.* 2007; 366(2): 277–92. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.04.023>
 48. Chi S., Chen S., Jia W., He Y., Ren L., Wang X. Non-structural proteins of bovine viral diarrhoea virus. *Virus Genes.* 2022; 58(6): 491–500. <https://doi.org/10.1007/s11262-022-01914-8>
 49. Collins M.E., Heaney J., Thomas C.J., Brownlie J. Infectivity of pestivirus following persistence of acute infection. *Vet. Microbiol.* 2009; 138(3-4): 289–96. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.04.022>
 50. Constable P.D., Hull B.L., Wicks J.R., Myer W. Femoral and tibial fractures in a newborn calf after transplacental infection with bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Rec.* 1993; 132(15): 383–5. <https://doi.org/10.1136/vr.132.15.383>
 51. Cortese V.S., Grooms D.L., Ellis J., Bolin S.R., Ridpath J.F., Brock K.V. Protection of pregnant cattle and their fetuses against infection with bovine viral diarrhoea virus type 1 by use of a modified-live virus vaccine. *Am. J. Vet. Res.* 1998; 59(11): 1409–13.
 52. Deregt D., Loewen K.G. Bovine viral diarrhoea virus: biotypes and disease. *Can. Vet. J.* 1995; 36(6): 371–8.
 53. Ficken M.D., Ellsworth M.A., Tucker C.M., Cortese V.S. Effects of modified-live bovine viral diarrhoea virus vaccines containing either type 1 or types 1 and 2 BVDV on heifers and their offspring after challenge with noncytopathic type 2 BVDV during gestation. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2006; 228(10): 1559–64. <https://doi.org/10.2460/javma.228.10.1559>
 54. Fulton R.W., Cook B.J., Payton M.E., Burge L.J., Step D.L. Immune response to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) vaccines detecting antibodies to BVDV subtypes 1a, 1b, 2a, and 2c. *Vaccine.* 2020; 38(24): 4032–7. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.03.058>
 55. Fulton R.W., Whitley E.M., Johnson B.J., Ridpath J.F., Kapil S., Burge L.J., et al. Prevalence of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in persistently infected cattle and BVDV subtypes in affected cattle in beef herds in south central United States. *Can. J. Vet. Res.* 2009; 73(4): 283–91.
 56. Fulton R.W., Saliki J.T., Confer A.W., Burge L.J., d'Offay J.M., Helman R.G., et al. Bovine viral diarrhoea virus cytopathic and noncytopathic biotypes and type 1 and 2 genotypes in diagnostic laboratory accessions: clinical and necropsy samples from. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2000; 12(1): 33–8. <https://doi.org/10.1177/104063870001200106>
 57. García-Sastre A. Ten strategies of interferon evasion by viruses. *Cell Host Microbe.* 2017; 22(2): 176–84. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.07.012>
 58. Glotov A.G., Koteneva S.V., Glotova T.I., Tregubchak T.V., Maksyutov R.A. Molecular epidemiology of bovine viral diarrhoea virus on the big dairy farms in Siberia. *Veterinariya.* 2018; (12): 14–20. <https://elibrary.ru/zvmhpj> (in Russian)
 59. Grooms D.L. Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 2004; 20(1): 5–19. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2003.11.006>
 60. Hanon J., van der Stede Y., Antonissen A., Mullender C., Tignon M., van den Berg T., et al. Distinction between persistent and transient infection in a bovine viral diarrhoea control programme: appropriate interpretation of real-time RT-PCR and antigen-ELISA test result. *Transbound. Emerg. Dis.* 2014; 61(2): 156–62. <https://doi.org/10.1111/tbed.12011>
 61. Hansen T.R., Smirnova N.P., Webb B.T., Bielefeldt-Ohmann H., Sacco R.E., Van Campen H. Innate and adaptive immune responses to in utero infection with bovine viral diarrhoea virus. *Anim. Health Res. Rev.* 2015; 16(1): 15–26. <https://doi.org/10.1017/s1466252315000122>
 62. Houe H. Epidemiological features and economic importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infection. *Vet. Microbiol.* 1999; 64(2-3): 89–107. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(98\)00262-4](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(98)00262-4)
 63. Houe H. Survivorship of animals persistently infected with bovine virus diarrhoea virus (BVDV). *Prev. Vet. Med.* 1993; 15(4): 275–83. [https://doi.org/10.1016/0167-5877\(93\)90099-F](https://doi.org/10.1016/0167-5877(93)90099-F)
 64. Houe H., Lindberg A., Moennig V. Test strategies in bovine viral diarrhoea virus control eradication campaigns in Europe. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2006; 18(5): 427–36. <https://doi.org/10.1177/104063870601800501>
 65. Houe H. Economic impact of BVDV infection in dairies. *Biologicals.* 2003; 31(2): 137–43. [https://doi.org/10.1016/s1045-1056\(03\)00030-7](https://doi.org/10.1016/s1045-1056(03)00030-7)
 66. Howard C.J. Immunological responses to bovine virus diarrhoea virus infections. *Rev. Sci. Tech.* 1990; 9(1): 95–103. <https://doi.org/10.20506/rst.9.1.488>
 67. Knapek K.J., Georges H.M., Van Campen H., Bishop J.V., Bielefeldt-Ohmann H., Smirnova N.P., et al. Fetal lymphoid organ immune responses to transient and persistent infection with bovine viral diarrhoea virus. *Viruses.* 2020; 12(8): 816. <https://doi.org/10.3390/v12080816>
 68. Kümmerer B.M., Stoll D., Meyers G. Bovine viral diarrhoea virus strain Oregon: a novel mechanism for processing of NS2-3 based on point mutations. *J. Virol.* 1998; 72(5): 4127–38. <https://doi.org/10.1128/jvi.72.5.4127-4138.1998>
 69. Lanyon S.R., Hill F.I., Reichel M.P., Brownlie J. Bovine viral diarrhoea: pathogenesis and diagnosis. *Vet. J.* 2014; 199(2): 201–9. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.07.024>
 70. Larsson B., Tråvén M., Hultén C., Hård af Segerstad C., Belák K., Alenius S. Serum concentrations of thyroid hormones in calves with a transient or persistent infection with bovine viral diarrhoea virus. *Res. Vet. Sci.* 1995; 58(2): 186–9. [https://doi.org/10.1016/0034-5288\(95\)90075-6](https://doi.org/10.1016/0034-5288(95)90075-6)
 71. Lee S.R., Nanduri B., Pharr G.T., Stokes J.V., Pinchuk L.M. Bovine viral diarrhoea virus infection affects the expression of proteins related to professional antigen presentation in bovine monocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009; 1794(1): 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.09.005>
 72. Liebler E.M., Küsters C., Pohlenz J.F. Experimental mucosal disease in cattle: changes of lymphocyte subpopulations in Peyer's patches and in lymphoid nodules of large intestine. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1995; 48(3-4): 233–48. [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(95\)05440-h](https://doi.org/10.1016/0165-2427(95)05440-h)
 73. Liebler-Tenorio E.M., Greiser-Wilke I., Pohlenz J.F. Organ and tissue distribution of the antigen of the cytopathogenic bovine virus diarrhoea virus in the early and advanced phase of experimental mucosal disease. *Arch. Virol.* 1997; 142(8): 1613–34. <https://doi.org/10.1007/s007050050184>
 74. Liebler-Tenorio E.M., Lanwehr A., Greiser-Wilke I., Loehr B.I., Pohlenz J. Comparative investigation of tissue alterations and distribution of BVD-viral antigen in cattle with early onset versus late onset mucosal disease. *Vet. Microbiol.* 2000; 77(1-2): 163–74. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(00\)00273-x](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(00)00273-x)
 75. Liebler-Tenorio E.M., Ridpath J.F., Neill J.D. Distribution of viral antigen and tissue lesions in persistent and acute infection with the homologous strain of noncytopathic bovine viral diarrhoea virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2004; 16(5): 388–96. <https://doi.org/10.1177/104063870401600504>
 76. Magouras I., Mätzener P., Rümnapf T., Peterhans E., Schweizer M. RNase-dependent inhibition of extracellular, but not intracellular, dsRNA-induced interferon synthesis by Erns of pestiviruses. *J. Gen. Virol.* 2008; 89(Pt. 10): 2501–6. <https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/003749-0>
 77. Makoschey B., Janssen M.G., Vrijenhoek M.P., Korsten J.H., Marel P. An inactivated bovine virus diarrhoea virus (BVDV) type 1 vaccine affords clinical protection against BVDV type 2. *Vaccine.* 2001; 19(23-24): 3261–8. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(01\)00003-2](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(01)00003-2)
 78. Marshall D.J., Moxley R.A., Kelling C.L. Distribution of virus and viral-antigen in specific pathogen-free calves following inoculation with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Pathol.* 1996; 33(3): 311–8. <https://doi.org/10.1177/030098589603300308>
 79. McGowan M.R., Kirkland P.D., Richards S.G., Littlejohns I. Increased reproductive losses in cattle infected with bovine pestivirus around the time of insemination. *Vet. Rec.* 1993; 133(2): 39–43. <https://doi.org/10.1136/vr.133.2.39>
 80. Meyers G., Thiel H.J. Molecular characterization of pestiviruses. *Adv. Virus Res.* 1996; 47: 53–118. [https://doi.org/10.1016/s0065-3527\(08\)60734-4](https://doi.org/10.1016/s0065-3527(08)60734-4)
 81. Moennig V., Becher P. Control of bovine viral diarrhoea. *Pathogens.* 2018; 7(1): 29. <https://doi.org/10.3390/pathogens7010029>

82. Müller-Doblies D., Arquint A., Schaller P., Heegaard P.M., Hilbe M., Albini S., et al. Innate immune responses of calves during transient infection with a noncytopathic strain of bovine viral diarrhoea virus. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2004; 11(2): 302–12. <https://doi.org/10.1128/cdli.11.2.302-312.2004>
83. Nettleton P.F., Entrican G. Ruminant pestiviruses. *Br. Vet. J.* 1995; 151(6): 615–42. [https://doi.org/10.1016/s0007-1935\(95\)80145-6](https://doi.org/10.1016/s0007-1935(95)80145-6)
84. Nilson S.M., Workman A.M., Sjeklocha D., Brodersen B., Grotelueschen D.M., Petersen J.L. Upregulation of the type I interferon pathway in feedlot cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *Virus Res.* 2020; 278: 197862. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.197862>
85. Palomares R.A., Marley S.M., Givens M.D., Gallardo R.A., Brock K.V. Bovine viral virus fetal persistent infection after immunization with a contaminated modified-live virus vaccine. *Theriogenology.* 2013; 79(8): 1184–95. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.02.017>
86. Passler T., Walz H., Ditchkoff S., van Santen E., Brock K.V., Walz P.H. Distribution of bovine viral diarrhoea virus antigen in persistently infected white tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *J. Comp. Pathol.* 2012; 147(4): 433–51. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2012.02.008>
87. Patel J., Shilileto R., Williams J., Alexander D.C. Prevention of transplacental infection of bovine foetus by bovine viral diarrhoea virus through vaccination. *Arch. Virol.* 2002; 147(12): 2453–63. <https://doi.org/10.1007/s00705-002-0878-3>
88. Pedrera M., Gómez-Villamandos J.C., Molina V., Rialde M.A., Rodríguez-Sánchez B., Sánchez-Cordon P.J. Quantification and determination of spread mechanisms of bovine viral diarrhoea virus in blood and tissues from colostrum-deprived calves during an experimental acute infection induced by a non-cytopathic genotype 1 strain. *Transbound. Emerg. Dis.* 2011; 59(5): 377–84. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2011.01281.x>
89. Pedrera M., Gómez-Villamandos J.C., Rialde M.A., Molina V., Sánchez-Cordon P.J. Characterization of apoptosis pathways (intrinsic and extrinsic) in lymphoid tissues of calves inoculated with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus genotype 1. *J. Comp. Pathol.* 2012; 146(1): 30–9. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2011.03.015>
90. Peterhans E., Bachofen C., Stalder H., Schweizer M. Cytopathic bovine viral diarrhoea viruses (BVDV): emerging pestiviruses doomed to extinction. *Vet. Res.* 2010; 41(6): 44. <https://doi.org/10.1051/vetres/2010016>
91. Peterhans E., Jungi T.W., Schweizer M. BVDV and innate immunity. *Biologicals.* 2003; 31(2): 107–12. [https://doi.org/10.1016/s1045-1056\(03\)00024-1](https://doi.org/10.1016/s1045-1056(03)00024-1)
92. Peterhans E., Jungi T.W., Schweizer M. How the bovine viral diarrhoea virus outwits the immune system. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 2006; 113(4): 124–9. (in German)
93. Peterhans E., Schweizer M. Pestiviruses: How to outmaneuver your hosts. *Vet. Microbiol.* 2010; 142(1-2): 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.09.038>
94. Peterhans E., Schweizer M. BVDV: A pestivirus inducing tolerance of the innate immune response. *Biologicals.* 2013; 41(1): 39–51. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2012.07.006>
95. Piniór B., Firth C.L., Richter V., Lebl K., Trauffler M., Dzieciol M., et al. A systematic review of financial and economic assessments of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) prevention and mitigation activities worldwide. *Prev. Vet. Med.* 2017; 137(Pt. A): 77–92. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2016.12.014>
96. Potgieter L.N. Immunology of bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 1995; 11(3): 501–20. [https://doi.org/10.1016/s0749-0720\(15\)30464-3](https://doi.org/10.1016/s0749-0720(15)30464-3)
97. Potgieter L.N. Immunosuppression in cattle because of bovine viral diarrhoea virus infection. *Agri. Pract.* 1988; (9): 7–14.
98. Qu L., McMullan L.K., Rice C.M. Isolation and characterization of noncytopathic pestivirus mutants reveals a role for nonstructural protein NS4B in viral cytopathogenicity. *J. Virol.* 2001; 75(22): 10651–62. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.22.10651-10662.2001>
99. Quinn H.E., Windsor P.A., Kirkland P.D., Ellis T.J. An outbreak of abortion in a dairy herd associated with *Neospora caninum* and bovine pestivirus infection. *Aust. Vet. J.* 2004; 82(1-2): 99–101. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2004.tb14656.x>
100. Ridpath J.F. Bovine viral diarrhoea virus: global status. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 2010; 26(1): 105–21. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2009.10.007>
101. Ridpath J.F., Neill J.D., Peterhans E. Impact of variation in acute virulence of BVDV1 strains on design of better vaccine efficacy challenge models. *Vaccine.* 2007; 25(47): 8058–66. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.09.014>
102. Rinaldo C.R. Jr, Isackson D.W., Overall J.C., Glasgow L.A., Brown T.T., Bistner S.I., et al. Fetal and adult bovine interferon production during bovine viral diarrhoea virus infection. *Infect. Immun.* 1976; 14(3): 660–6. <https://doi.org/10.1128/iai.14.3.660-666.1976>
103. Sauter-Louis C.M., Staubach C., Reichmann F., Stoll A., Rademacher G., Cussler K., et al. Spatial distribution and incidence of bovine neonatal pancytopenia in Bavaria, Germany. *BMC Vet. Res.* 2020; 16(1): 155. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02371-x>
104. Schweizer M., Matzener P., Pfaffen G., Stalder H., Peterhans E. “Self” and “nonself” manipulation of interferon defense during persistent infection: bovine viral diarrhoea virus resists alpha/beta interferon without blocking antiviral activity against unrelated viruses replicating in its host cells. *J. Virol.* 2006; 80(14): 6926–35. <https://doi.org/10.1128/JVI.02443-05>
105. Seong G., Lee J.S., Lee K.H., Shin S.U., Yoon J.Y., Choi K.S. Noncytopathic bovine viral diarrhoea virus 2 impairs virus control in a mouse model. *Arch. Virol.* 2016; 161(2): 395–403. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2665-y>
106. Tautz N., Tews B.A., Meyers G. The molecular biology of pestiviruses. *Adv. Virus Res.* 2015; 93: 47–160. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2015.03.002>
107. Taylor L.F., Janzen E.D., Ellis J.A., van den Hurk J.V., Ward P. Performance, survival, necropsy, and virological findings from calves persistently infected with the bovine viral diarrhoea virus originating from a single Saskatchewan beef herd. *Can. Vet. J.* 1997; 38(1): 29–37.
108. Voges H., Young S., Nash M. Direct adverse effects of persistent BVDv infection in dairy heifers – A retrospective case control study. *VetScript.* 2006; 19(8): 22–5.
109. Walz P.H., Grooms D.L., Passler T., Ridpath J.F., Tremblay R., Step D.L., et al. Control of bovine viral diarrhoea virus in ruminants. *J. Vet. Intern. Med.* 2010; 24(3): 476–86. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2010.0502.x>
110. Webb B.T., Norrdin R.W., Smirnova N.P., Van Campen H., Weiner C.M., Antoniazzi A.Q., et al. Bovine viral diarrhoea virus cyclically impairs long bone trabecular modeling in experimental persistently infected fetuses. *Vet. Pathol.* 2012; 49(6): 930–40. <https://doi.org/10.1177/0300985812436746>
111. Wilhelmssen C.L., Bolin S.R., Ridpath J.F., Chevillie N.F., Kluge J.P. Experimental primary postnatal bovine viral diarrhoea virus infections in six-month-old calves. *Vet. Pathol.* 1990; 27(4): 235–43. <https://doi.org/10.1177/030098589002700404>
112. Woodardt L. BVD virus associated with outbreaks of abortion, stillbirths and weak calves. *Vet. Med.* 1994; (4): 379–84.
113. Yeşilbaş K., Alpaya G., Becher R. Variability and global distribution of subgenotypes of bovine viral diarrhoea virus. *Viruses.* 2017; 9(6): 128. <https://doi.org/10.3390/v9060128>

Информация об авторах:

Мищенко Алексей Владимирович – д-р ветеринар. наук, главный научный сотрудник ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, Москва, Россия. E-mail: studebaker@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-9752-6337>

Мищенко Владимир Александрович – профессор, д-р ветеринар. наук, главный научный сотрудник ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, Москва, Россия; главный научный сотрудник ФГБУ «ВНИИЗЖ», Владимир, Россия. E-mail: mishenko@arriah.ru; <https://orcid.org/0000-0003-3751-2168>

Гулюкин Михаил Иванович – академик РАН, профессор, д-р ветеринар. наук, руководитель научного направления ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, Москва, Россия. E-mail: admin@viev.ru; <https://orcid.org/0000-0002-7489-6175>

Оганесян Андрей Серожович – канд. ветеринар. наук, заведующий сектором анализа риска ФГБУ «ВНИИЗЖ», Владимир, Россия. E-mail: oganesyan@arriah.ru; <https://orcid.org/0000-0002-0061-5799>

Алексеев Светлана Валерьевна – канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, Москва, Россия. E-mail: admin@viev.ru; <https://orcid.org/0000-0001-9580-6047>

Забережный Алексей Дмитриевич ✉ – член-корр. РАН, д-р биол. наук, директор ФГБНУ ВНИТИБП, Московская обл., п. Биоккомбината, Россия. E-mail: zaberezhny@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-7635-2596>

Гулюкин Алексей Михайлович – член-корр. РАН, д-р ветеринар. наук, директор ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, Москва, Россия. E-mail: admin@viev.ru; <https://orcid.org/0000-0003-2160-4770>

Участие авторов: Мищенко А.В., Мищенко В.А., Гулюкин М.И., Оганесян А.С., Алексеев С.В., Забережный А.Д., Гулюкин А.М. – концепция обзора, проведение поисково-аналитической работы, подготовка статьи, одобрение финальной версии статьи до публикации.

Поступила 25.07.2023

Принята в печать 10.10.2023

Опубликована 29.12.2023

Information about the authors:

Alexey V. Mishchenko – Doctor of Veterinary Sciences, Chief Researcher, All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after K.I. Scriabin and Y.R. Kovalenko of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia. E-mail: studebaker@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-9752-6337>

Vladimir A. Mishchenko – Professor, Doctor of Veterinary Sciences, Chief Researcher, All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after K.I. Scriabin and Y.R. Kovalenko of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia; Chief Researcher, Federal Animal Healthcare Center, Vladimir, Russia. E-mail: mishchenko@arriah.ru; <https://orcid.org/0000-0003-3751-2168>

Mikhail I. Gulyukin – Academician of RAS, Professor, Doctor of Veterinary Sciences, head of scientific direction All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after K.I. Scriabin and Y.R. Kovalenko of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia. E-mail: admin@viev.ru; <https://orcid.org/0000-0002-7489-6175>

Andrey S. Oganesyan – Candidate of Veterinary Sciences, Head of the Risk Analysis Sector, Federal Animal Healthcare Center, Vladimir, Russia. E-mail: oganesyan@arriah.ru; <https://orcid.org/0000-0002-0061-5799>

Svetlana V. Alexeyenkova – Candidate of Biological Sciences, All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after K.I. Scriabin and Y.R. Kovalenko of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia. E-mail: admin@viev.ru; <https://orcid.org/0000-0001-9580-6047>

Alexey D. Zaberezhny ✉ – Corresponding Member of RAS, Doctor of Biological Sciences, All-Russian Research and Technological Institution of Industry, Moscow region, Biocombinata settlement, Russia. E-mail: zaberezhny@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-7635-2596>

Alexey M. Gulyukin – Corresponding Member of RAS, Doctor of Veterinary Sciences, Director, All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after K.I. Scriabin and Y.R. Kovalenko of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia. E-mail: admin@viev.ru; <https://orcid.org/0000-0003-2160-4770>

Contribution: Mishchenko A.V., Mishchenko V.A., Gulyukin M.I., Oganesyan A.S., Alexeyenkova S.V., Zaberezhny A.D., Gulyukin A.M. – 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.

Received 25 July 2023

Accepted 10 October 2023

Published 29 December 2023

НАУЧНЫЙ ОБЗОР

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-205>

© ПОНОМАРЕВА Н.В., НОВИКОВА Н.А., 2023



Нейротропные энтеровирусы (Picornaviridae: *Enterovirus*): доминирующие типы, основы нейровирулентности

Пономарева Н.В.✉, Новикова Н.А.

ФБУН «Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, 603950, г. Нижний Новгород, Россия

Резюме

Энтеровирусы являются одной из наиболее частых причин инфекционных заболеваний центральной нервной системы (ЦНС). Их объединяет генетическая вариабельность, способность инфицировать широкий спектр клеток, в том числе клетки микроглии мозга и астроциты, а также персистировать в ткани ЦНС, обуславливая отсроченные и хронические заболевания. В обзоре представлен материал об основах нейровирулентности непوليوмиелитных энтеровирусов и наиболее распространенных возбудителях энтеровирусных нейроинфекций.

Ключевые слова: непوليوмиелитные энтеровирусы; энтеровирусные нейроинфекции; серозный менингит; острые вялые параличи

Для цитирования: Пономарева Н.В., Новикова Н.А. Нейротропные энтеровирусы (Picornaviridae: *Enterovirus*): доминирующие типы, основы нейровирулентности. *Вопросы вирусологии*. 2023; 68(6): 479–489. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-205> EDN: <https://elibrary.ru/kdllsv>

Финансирование. Исследование проведено на средства федерального бюджета, выделенные на финансирование отраслевой научной программы Роспотребнадзора.

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

REVIEW

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-205>

Neurotropic enteroviruses (Picornaviridae: *Enterovirus*): predominant types, basis of neurovirulence

Natalia V. Ponomareva✉, Nadezhda A. Novikova

Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Rospotrebnadzor, 603950, Nizhny Novgorod, Russia

Abstract

Enteroviruses are one of the most common causative agents of infectious diseases of the central nervous system. They are characterized by genetic variability, the ability to infect a wide range of cells, including brain microglial cells and astrocytes, and persist in the central nervous system tissue, causing delayed and chronic diseases. The review presents data on the basis of neurovirulence of non-polio enteroviruses and the most common pathogens causing enteroviral neuroinfections.

Keywords: non-polio enteroviruses; enteroviral neuroinfections; serous meningitis; acute flaccid paralysis

For citation: Ponomareva N.V., Novikova N.A. Neurotropic enteroviruses (Picornaviridae: *Enterovirus*): predominant of types, basis of neurovirulence. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2023; 68(6): 479-489. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-205> EDN: <https://elibrary.ru/kdllsv>

Funding. The study was carried out with funds from the federal budget allocated to finance the industry scientific program of Rospotrebnadzor.

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

Введение

Род *Enterovirus*, входящий в состав большого и разнообразного семейства *Picornoviridae*, подразделяется на 15 видов: *Enterovirus A–L* и *Rhinovirus A–C*.

Среди непوليوмиелитных энтеровирусов (НПЭВ) патогенными для человека являются вирусы видов *Enterovirus A–D*, включающих более 100 антигенно и генетически различающихся типов. В состав вида *Enterovirus A* входит 25 типов, самый многочис-

ленный вид, *Enterovirus B*, объединяет 63 типа, вид *Enterovirus C* – 23 типа, а вид *Enterovirus D* – 5 типов¹. Энтеровирусы представляют собой мелкие (около 30 нм в диаметре) безоболочечные вирусы с однонитевым РНК-геномом позитивной полярности размером 7,5 тыс. н.о. и единственной открытой рамкой считывания, фланкированной 5'- и 3'-нетранслируемыми областями (НТР). Репликация вирусной РНК катализируется РНК-зависимой РНК-полимеразой, имеющей низкую точность работы, что наряду с отсутствием механизма репараций обуславливает высокую частоту мутаций и определяет генетическое разнообразие энтеровирусов [1]. Высокая генетическая пластичность энтеровирусов дополнительно создает риск возникновения высоковирулентных штаммов, способных реализовать свой нейротропный потенциал, провоцируя масштабные вспышки заболеваний. Наиболее этиологически значимыми нейротропными НПЭВ являются представители вида *Enterovirus B* (CVB1–5, CVA9, ECHO 6, 7, 9, 30 и др.). НПЭВ вида *Enterovirus A* (EV-A71, CA2, CVA6, CA10 и CVA16 и др.) в основном ассоциируют с экзантемными формами энтеровирусной инфекции, которые могут сопровождаться тяжелыми неврологическими осложнениями. *Enterovirus D68* (EV-D68) связывают с рядом вспышек и спорадических случаев острого вялого паралича (ОВП). Реже причиной нейроинфекций энтеровирусной этиологии выступают НПЭВ вида *Enterovirus C* [2, 3]. Инфицирование разных анатомических областей центральной нервной системы (ЦНС) обуславливает разнообразие клинических форм нейроинфекций (менингит, энцефалит, ОВП, менингоэнцефалит, энцефаломиелит и др.) [4, 5]. По частоте встречаемости среди инфекционных заболеваний ЦНС вирусной этиологии лидирует серозный менингит (поражение твердой или мягкой мозговых оболочек) [6–8]. С НПЭВ связаны 85–90% всех случаев серозного менингита, также некоторые типы способны вызывать энцефалит, ОВП и другие формы заболеваний с разной степенью выраженности: от легких форм до тяжелых поражений сердечно-сосудистой системы и ЦНС [9–11].

Цель обзора – анализ актуальной информации о наиболее распространенных возбудителях энтеровирусных нейроинфекций и основах нейровирулентности НПЭВ.

Доминирующие типы нейротропных энтеровирусов

Нейротропные вирусы вида Enterovirus B (ЭВВ). Наибольшее число случаев групповой и спорадической заболеваемости энтеровирусным серозным менингитом (ЭВМ) связано с НПЭВ вида **ЭВВ**, среди которых наиболее распространенным в настоящее время в условиях умеренного климата является вирус ECHO30 (**Е30**). Филогенетический анализ на основе полных нуклеотидных последовательностей гена *ID*,

кодирующего основной белок капсида VP1, показал обширное генетическое разнообразие штаммов Е30, представленное 8 генотипами. Показано существование трех основных филогенетических кластеров вируса Е30, образованных генотипами a/b, c и d/e/f/g/h, в пределах которых дифференцируются субтипы: Е30f – подразделяется на субтипы С3–5, а Е30e – на субтипы С0, С1, С2 [12]. Вспышки и спорадические случаи ЭВМ, обусловленного Е30, с начала XXI в. регулярно регистрировали на территории Европы, Китая (в основном восточные провинции), США, Бразилии и России [13]. В России наиболее крупные вспышки Е30-ассоциированного менингита были зарегистрированы в 2003, 2006–2009 гг. (Хабаровский край, Нижегородская, Новгородская, Архангельская области и ряд других территорий), в 2013 г. (ряд территорий Северо-Западного федерального округа (СЗФО): Новгородская, Вологодская области, Санкт-Петербург) и в 2017 г. (Ханты-Мансийский автономный округ – Югра, Тюменская область). Энтеровирусы типа Е30, изолированные во время вспышки в 2008–2009 гг., относились к распространенному в России на тот период времени генотипу eC2. Штаммы Е30, циркулировавшего в СЗФО во время вспышек 2013 и 2017 гг., принадлежали разным линиям генотипа Е30h [14–16].

Регулярно фиксируются вспышки и спорадические случаи **Е9**-ассоциированного серозного менингита. В США, по данным эпидемиологического надзора, с 1970 по 2005 г. Е9 был наиболее распространенным типом, выявляемым при ЭВМ установленной этиологии [17, 18]. В 1992 г. Е9 стал этиологической причиной крупной вспышки вирусного менингита в Западной Австралии, а в 2009–2010 гг. впервые был идентифицирован как преобладающий тип при спорадической заболеваемости серозным менингитом в Юго-Западной части Китая [19]. В этот же период Е9 стал причиной сезонного подъема заболеваемости и нескольких вспышек ЭВМ в ряде регионов России [20].

Вирус **Е6** в 2006 г. явился возбудителем крупной вспышки серозного менингита в Хабаровском крае [21]. В 2010–2012 гг. тип Е6 превалировал в качестве возбудителя серозного менингита в Московской области, вытеснив доминирующий тип Е30 [22], а также явился основным возбудителем, выделенным от пациентов с ЦНС-инфекциями в период с 2007 по 2012 г. в Южной Австралии [23]. Энтеровирусные инфекции у детей младшего возраста, вызванные вирусами типов Е6 и Е9, нередко имеют тяжелое течение и в некоторых случаях приводят к летальному исходу [18].

Инфицирование вирусом Коксаки В5 (**CVB5**) может приводить к развитию энцефалита, ОВП, панкреатита и некоторых хронических заболеваний. Этот вирус входит в число наиболее частых возбудителей вспышек серозных менингитов во всем мире: США (1961, 1972 и 1983 гг.), Греция (1999, 2001 гг.), Бельгия (2000 г.). На территории Китая наиболее крупные вспышки зафиксированы в провинция Шаньдун в 2005 и 2009 гг. и ряде других провинций в 2009–2012 гг. [24].

¹Picornavirus Home [Электронный ресурс]. Available at: <http://www.picornaviridae.com/> (дата обращения: 10.09.2023)

Среди вирусов вида *Enterovirus B*, ассоциированных со вспышками и спорадическими случаями ЭВМ, также следует отметить **E13** (Германия, Испания, 2000 г.), **E11** (Греция, 2003–2005 гг.), представляющий особую угрозу для новорожденных, и **E4**, выявляющийся как этиологическая причина серозных менингитов на территории Африки (Претория, 2010–2011 гг., Западно-Капская и Восточно-Капская провинции Южной Африки, 2018–2019 гг.) и Европы (Финляндия, Швеция, Норвегия, Дания, Исландия и Германия, 2013–2014 гг.) [25–27].

Частым возбудителем серозного менингита считается вирус **E18**. Крупные вспышки E18-ассоциированного ЭВМ зафиксированы в США (2000–2001 гг.) и на Тайване (2006 г.) [28]. В 2013–2015 гг. (провинция Хэбэй, Китай) E18 явился доминирующим типом, выявляемым у детей с вирусным менингитом и энцефалитом. В России E18 впервые стал преобладающим возбудителем ЭВМ на отдельной территории в 2017 г. (Саратовская область) [29].

Вирус Коксаки A9 (**CVA9**) редко выступает в качестве доминирующего варианта, но регулярно вызывает спорадические случаи ЭВМ во всем мире. Ассоциированные с CVA9 вспышки были зарегистрированы в 2010 г. (г. Альберта, Канада) и в 2015–2016 г. (г. Моссел-Бей, ЮАР) [30, 31].

Степень тяжести клинических проявлений ЭВВ-инфекции связана с возрастом пациентов. У новорожденных и детей младшего возраста заболевание обычно протекает в более тяжелой форме, что некоторые исследователи объясняют незрелостью иммунной системы и особенностью экспрессии энтеровирусных рецепторов в клетках развивающегося мозга [32].

Нейротропные вирусы вида Enterovirus A. Наиболее значимым в инфекционной нейропатологии является энтеровирус A71 (**EV-A71**), который известен как основная этиологическая причина вспышек экзантемы полости рта и конечностей (HFMD). Заболевание может осложняться тяжелыми неврологическими проявлениями – от вирусного менингита, ОВП и энцефалита до системных расстройств, включая отек легких и кардиореспираторный коллапс. На основе вариабельности гена, кодирующего капсидный белок VP1, выделяют 8 генотипов EV-A71 (A–H) [32]. Генотип A представлен единственным прототипным штаммом (BrCr), изолированным в 1969 г., и несколькими штаммами, возобновившими циркуляцию в материковом Китае в 2008–2010 гг. Генотипы B и C подразделяются на 6 субгенотипов (B0–B5 и C0–C5 соответственно). EV-A71 субгенотипов B4, B5 и C4 циркулирует в основном в Восточной и Юго-Восточной Азии, тогда как C1 и C2 преобладают в Европе. Генотипы D и G были идентифицированы в Индии, а генотипы E, F и H – в Африке, на Мадагаскаре и в Пакистане соответственно [2, 34]. Наиболее тяжелые формы HFMD связывают с EV-A71 субгенотипов C4 и B5, циркулирующих в основном на территории Юго-Восточной Азии [35].

Впервые EV-A71 был выделен в 1969 г. от детей с менингитом и энцефалитом в США. В последующие

несколько лет EV-A71 распространился по территории Северной и Южной Америки, Европы и других стран, вызывая небольшие вспышки и спорадические случаи, за исключением нескольких крупных вспышек, зафиксированных в 1975 г. в Болгарии и в 1978 г. в Венгрии [36, 37]. Масштабные вспышки HFMD происходили в Азиатско-Тихоокеанском регионе в конце XX – начале XXI вв. С 2008 по 2015 г. в материковом Китае зафиксировано около 13,7 млн случаев HFMD, среди которых 3322 летальных, в 93% случаев этиологически ассоциированных с EV-A71 [33]. Три инактивированные EV-A71-вакцины, полученные на основе вируса генотипа C4, доказали свою эффективность против EV71-ассоциированного HFMD у детей в возрасте 6–35 мес. В период с 2016 по 2020 г. во время эпидемий EV-A71 в материковом Китае на фоне применения EV-A71-вакцин было зарегистрировано приблизительно 9,5 млн случаев заболевания, среди которых 358 летальных, что свидетельствует о многократном снижении смертности благодаря вакцинации [38, 39].

На территории России до 2013 г. EV-A71 выделяли в единичных случаях. В июне 2013 г. в Ростове-на-Дону среди детей младшего дошкольного возраста была зарегистрирована вспышка энтеровирусной инфекции, связанная с циркуляцией EV-A71 субгенотипа C4. Заболевания характеризовались острым началом с проявлениями интоксикационного и ящуроподобного синдромов и развитием у 37,4% пациентов патологии ЦНС (менингит, менингоэнцефалит) [40, 41].

В последнее десятилетие заметно увеличилось число случаев инфекции Коксаки A10 (**CVA10**), сопровождающейся серьезными поражениями ЦНС. В Шанхае (Китай) в 2016 и 2018 гг. значительно возросла частота выявления CVA10 у больных менингитом, энцефалитом и менингоэнцефалитом [42]. В 2017 г. в субъектах Дальневосточного федерального округа РФ был отмечен значительный рост числа случаев CVA10-инфекции с увеличением доли энтеровирусного менингита. Случаи CVA10-ассоциированных ОВП регистрировались в 2009–2017 гг. на территории Индии [43].

Вирус Коксаки A2 (**CVA2**), ассоциированный прежде всего с везикулярным фарингитом, HFMD, плевродинией, миокардитом и сахарным диабетом 1-го типа, периодически выявляют у пациентов с менингитом, энцефалитом и ОВП, которые сопровождаются стойкими двигательными нарушениями, клинически сходными с паралитическим полиомиелитом. В исследовании, проведенном в Бразилии в рамках эпидемиологического надзора за полиомиелитом в период с 2005 по 2017 г., CVA2 был одним из доминирующих типов НПЭВ, выявлявшихся у пациентов с ОВП. В течение 20-летнего периода эпиднадзора за ОВП в Российской Федерации были установлены 5 случаев ОВП, ассоциированных с энтеровирусом CVA2 [44]. В 2012 г. CVA2 вызвал вспышку тяжелых респираторных заболеваний в Гонконге, в числе которых было 2 летальных случая. В 2014 г. появились сообщения о вспышке ОВП, ассоциированного с CVA2, на Тайване [45].

Нейротропные вирусы вида Enterovirus C (ЭВС). Со вспышками ОВП, энцефалита, менингита и HFMD ассоциируют некоторые типы энтеровирусов вида ЭВС. Энтеровирус EV-C105 был этиологической причиной вспышек ОВП в Индии и Новой Зеландии. EV-C96, впервые изолированный в 2000 г. от пациента с ОВП в Бангладеш, в последующие годы выявлялся в Финляндии, Словакии, на Филиппинах, в Камбодже, Китае и Боливии как от пациентов с ОВП, так и от здоровых лиц [46].

Нейротропные вирусы вида Enterovirus D. EV-D68 связывают со спорадическими случаями и рядом вспышек ОВП. Впервые EV-D68 был выделен в 1962 г. от детей с пневмонией. В первую очередь он является респираторным вирусом, вызывающим заложенность носа, кашель, боль в горле и лихорадку. В 2014 г. в Северной Америке произошла первая крупная вспышка тяжелых респираторных EV-D68-ассоциированных заболеваний, сопровождавшихся ОВП. Небольшие очаги EV-D68-инфекции были зарегистрированы также в Европе и Азии. Увеличение числа случаев EV-D68-инфекции с неврологическими проявлениями отмечалось в 2016 г. в Швеции, Нидерландах, Италии и США, в 2018 г. в США. В Японии рост активности EV-D68 был зафиксирован в 2013 и 2015 гг. [47–49].

Основы нейровирулентности энтеровирусов

Входными воротами для энтеровирусов в организме человека служат слизистые оболочки ротоглотки и желудочно-кишечного тракта, где в окологлоточных и мезентериальных лимфатических узлах происходит первичная репликация. При попадании вируса в клетки ретикулоэндотелиальной системы и кровь развивается первичная вирусемия, способствующая проникновению вирусов в разные органы и ткани: нервную систему, миокард, печень, поджелудочную железу и др. [50]. Проникновению вирусных частиц из крови в ЦНС препятствует гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), представляющий собой высокоселективный фильтр между клетками головного мозга и кровеносными сосудами. Целостность ГЭБ может быть нарушена как в результате прямого инфицирования составляющих его эндотелиальных клеток микрососудов головного мозга, так и под воздействием цитокинов, увеличивающих проницаемость ГЭБ и вырабатываемых активированными клетками микроглии ЦНС в ответ на вирусную инфекцию [51, 52]. Предполагается, что в развивающемся головном мозге микроглия постоянно находится в «активированном» состоянии, что подтверждает гипотезу о влиянии функционального состояния и зрелости иммунной системы ЦНС на степень выраженности неврологических проявлений при энтеровирусной инфекции [53].

Энтеровирусы способны проникать в ЦНС посредством инфицирования широкого спектра периферических циркулирующих иммунных клеток, которые служат «троянским конем» для их доставки в ткань ЦНС. Спинальная жидкость содержит популяцию мононуклеарных клеток, состоящую из Т-клеток (~ 90%),

В-клеток (~ 5%), моноцитов (~ 5%) и дендритных клеток (< 1%), являющихся потенциальными переносчиками энтеровирусов. После проникновения мононуклеарных клеток в ЦНС энтеровирусы высвобождаются и инфицируют нейроглию и нейроны головного мозга, реализуя свой нейрогенный потенциал [54]. Некоторые нейротропные энтеровирусы способны включаться в ретроградный аксональный транспорт и проникать в ЦНС через периферические нервные окончания, что экспериментально показано для нейротропных вирусов EV-A71 и EV-D68, проникающих в ЦНС при инфицировании периферических спинномозговых моторных нейронов. Эндоцитированные в терминальном конце аксона энтеровирусные частицы перемещаются к телу нейрона в ретроградном направлении посредством динейн-опосредованного везикулярного транспорта [55]. Таким образом имеется несколько альтернативных стратегий проникновения энтеровирусов в клетки ЦНС.

Существует гипотеза, что в процессе репликации могут формироваться генетические варианты энтеровируса, различающиеся способностью проникать в клетки ЦНС. При анализе респираторных образцов, образцов кишечного тракта и ЦНС, изолированных от пациентов с EV-A71-инфекцией, были обнаружены различные квазивиды вируса. Исследования *in vitro* показали, что квазивид, преобладающий в образцах ЦНС, наиболее эффективно реплицировался именно в нейрональных клетках. Предполагается, что долевое соотношение различных квазивидов в их общей «популяции» может определять динамику клинической картины. Дальнейшее изучение и характеристика квазивидов, выделенных из разных клинических образцов при легких и тяжелых формах энтеровирусной нейроинфекции, интересно в плане выявления генетических вариантов, обладающих повышенной нейротропностью [10, 56].

В зависимости от тропности к определенным клеткам и тканям энтеровирусы могут поражать разные анатомические отделы ЦНС, что обуславливает различные клинические формы нейроинфекции. Менингоэнцефалит, развивающийся вследствие поражения EV-A71 ствола головного мозга, способен приводить к нарушению регуляции сердечно-сосудистой и дыхательной деятельности и, как следствие, нейрогенному отеку легких и сердечной недостаточности [57]. В эксперименте с новорожденными мышами показано, что вирус Коксаки А3 может обуславливать очаговые поражения в правой лобной доле головного мозга, приводящие к развитию энцефалита, а вирус Коксаки В и некоторые типы эховирусов способны инфицировать различные области коры головного мозга и гиппокамп, вызывая развитие спастических параличей [58].

Важным фактором, определяющим нейротропные свойства вируса, является активность регуляторных элементов IRES (Internal Ribosome Entry Site). Показано, что мутации в сайте IRES приводят к дефектам трансляции и снижению уровня репликации энтеровируса, в том числе и в ЦНС [59]. Дифференциальная восприимчивость тканей к инфицированию энтеровирусами также может определяться противовирус-

ной активностью врожденного иммунитета. Предполагают, что система α/β -интерферонов ограничивает репликацию энтеровирусов в экстраневральных тканях и предотвращает его проникновение в ЦНС [60].

Эффективность проникновения энтеровирусов в клетки хозяина определяется доступностью и уровнем экспрессии специфических поверхностных энтеровирусных рецепторов. Одной из отличительных особенностей НПЭВ является разнообразие этих рецепторов. Например, в отличие от полиовирусов, использующих для проникновения единственный рецептор (гликопротеин CD155), энтеровирус EV-A71 для связывания с клеточной поверхностью использует несколько рецепторов, включая hSCARB2, hPSGL1, Apx2, гепарансульфат, виментин, триптофанил-тРНК-синтетазу человека и др. Множество рецепторов позволяет вирусу инфицировать более широкий спектр клеток, использовать различные пути маршрутизации вирусосодержащих эндосом в клетке хозяина, а также объясняет полиморфизм клинических проявлений, обусловленных EV-A71 [10, 61].

Уникальный тканевой тропизм НПЭВ проявляется в способности инфицировать нейрональные клетки-предшественники и астроциты. Потеря нейрональных клеток-предшественников, способных дифференцироваться в линии нейронов, астроцитов и олигодендроцитов, ведет к снижению нейрогенеза, задержке развития нервной системы и снижению когнитивных функций, памяти и обучения. Область локализации астроцитов в головном мозге гораздо шире, чем нейрональных клеток-предшественников, благодаря чему инфицирование астроцитов наряду с их способностью к митозу создает резервуар для вирусной пролиферации и способствует эффективному распространению вируса в ЦНС. Способность инфицировать астроцитарные культуры показана для многих типов энтеровирусов: EV-A71, CVA9, CVB3, CVB4 и EV-D68 [10, 62].

Еще одной особенностью нейротропных энтеровирусов является их способность к длительной персистенции в тканях ЦНС, что многие исследователи ассоциируют с развитием таких отсроченных заболеваний, как постполиомиелитный синдром, шизофрения, боковой амиотрофический склероз, инсулинзависимый диабет, хроническая вирусная кардиомиопатия, хронический энтеровирусный менингоэнцефалит, а также мультисистемное заболевание – миалгический энцефаломиелит/синдром хронической усталости [63, 64]. Предполагается, что персистирующая инфекция обусловлена отбором мутантных форм вируса, обладающих менее выраженными цитопатическими свойствами, что является частью коэволюции энтеровирусов и клеток организма, которые в свою очередь ограничивают распространение инфекции за счет снижения экспрессии рецепторов проникновения [65]. Однако точные механизмы данного феномена до сих пор неизвестны.

Учитывая огромное разнообразие НПЭВ и широкий спектр вызываемых ими заболеваний, эпидемиологический надзор за энтеровирусной инфекцией представляет достаточно сложную задачу,

для реализации которой организованы Европейская сеть по надзору за неполиомиелитными энтеровирусами (ENPEN, the European Non-Poliovirus Enterovirus Network) [66], Азиатско-Тихоокеанская сеть (APNES, the Asia-Pacific Network for Enterovirus), созданная на основе сотрудничества между академическими институтами и больницами в Камбодже, Малайзии, Вьетнаме и Тайване [67], и действующая с 1961 г. Национальная система надзора за энтеровирусами США (NESS, the National Enterovirus Surveillance System) [17]. В Российской Федерации официальная статистическая регистрация энтеровирусной инфекции введена в 2006 г. В настоящее время на территории РФ наблюдается рост заболеваемости энтеровирусными менингитами. Вызывает беспокойство выявление у больных серозным менингитом и менингоэнцефалитом энтеровирусов, которые ранее вызывали преимущественно респираторные или экзантемные заболевания, что может свидетельствовать о вероятности возникновения новых нейровирулентных вариантов энтеровирусов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Tapparel C., Siegrist F., Petty T.J., Kaiser L. Picornavirus and enterovirus diversity with associated human diseases. *Infect. Genet. Evol.* 2013; 14: 282–93. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.10.016>
2. Brown D.M., Zhang Y., Scheuermann R.H. Epidemiology and sequence-based evolutionary analysis of circulating non-polio enteroviruses. *Microorganisms*. 2020; 8(12): 1856. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121856>
3. Brouwer L., Moreni G., Wolthers K.C., Pajkrt D. World-wide prevalence and genotype distribution of enteroviruses. *Viruses*. 2021; 13(3): 434. <https://doi.org/10.3390/v13030434>
4. Лобзин Ю.В., Пилипенко В.В., Громько Ю.Н. Менингиты и энцефалиты. СПб.: Фолиант; 2003. EDN: <https://elibrary.ru/zfgsev>
5. Rao S., Elkon B., Flett K.B., et al. Long-term outcomes and risk factors associated with acute encephalitis in children. *J. Pediatric Infect. Dis. Soc.* 2017; 6(1): 20–7. <https://doi.org/10.1093/jpids/piv075>
6. Khandaker G., Jung J., Britton P., et al. Long-term outcomes of infective encephalitis in children: a systematic review and meta-analysis. *Dev. Med. Child Neurol.* 2016; 58(11): 1108–15. <https://doi.org/10.1111/dmcn.13197>
7. Скрипченко Н.В., Иванова М.В., Вильниц А.А., Скрипченко Е.Ю. Нейроинфекции у детей: тенденции и перспективы. *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. 2016; 61(4): 9–22. <https://doi.org/10.21508/1027-4065-2016-61-4-9-22> <https://elibrary.ru/yuckad>
8. Морозова Е.А., Ертахова М.Л. Исходы нейроинфекций и их предикторы. *Русский журнал детской неврологии*. 2020; 15(3-4): 55–64. <https://doi.org/10.17650/2073-8803-2020-15-3-4-55-64> <https://elibrary.ru/thmrq>
9. Ярмухамедова Н.А., Эргашева М.Я. Клинико-лабораторная характеристика при серозном менингите энтеровирусной этиологии. *Вопросы науки и образования*. 2019; 27(76): 134–44. <https://elibrary.ru/bxerha>
10. Majer A., McGreevy A., Booth T.F. Molecular pathogenicity of enteroviruses causing neurological disease. *Front. Microbiol.* 2020; 11: 540. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00540>
11. Wörner N., Rodrigo-García R., Antón A., Castellarnau E., Delgado I., Vazquez E., et al. Enterovirus-A71 Rhombencephalitis outbreak in Catalonia: characteristics, management and outcome. *Pediatr. Infect. Dis.* 2021; 40(7): 628–33. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000003114>
12. Bailly J.L., Mirand A., Henquell C., Archimbaud C., Chambon M., Charbonné F., et al. Phylogeography of circulating populations of human echovirus 30 over 50 years: Nucleotide polymorphism and signature of purifying selection in the VP1 capsid protein gene. *Infect. Genet. Evol.* 2009; 9(4): 699–708. <https://doi.org/10.1016/j.infevol.2009.04.001>

- meegid.2008.04.009
13. Tian X., Han Z., He Y., Sun Q., Wang W., Xu W., et al. Temporal phylogeny and molecular characterization of echovirus 30 associated with aseptic meningitis outbreaks in China. *J. Virol.* 2021; 18(1): 118. <https://doi.org/10.1186/s12985-021-01590-4>
 14. Новикова Н.А., Голицына Л.Н., Фомина С.Г., Ефимов Е.И. Молекулярный мониторинг непوليوмиелитных энтеровирусов на европейской территории России в 2008–2011 гг. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2013; 90(1): 75–8. <https://elibrary.ru/qayeqt>
 15. Голицына Л.Н., Зверев В.В., Селиванова С.Г., Пономарёва Н.В., Кашников А.Ю., Созонов Д.В. и др. Этиологическая структура энтеровирусных инфекций в Российской Федерации в 2017–2018 гг. *Здоровье населения и среда обитания – ЗНУСО.* 2019; 27(8): 30–8. <https://doi.org/10.35627/2219-5238/2019-317-8-30-38> <https://elibrary.ru/rszlbld>
 16. Бичурина М.А., Романенкова Н.И., Голицына Л.Н., Розаева Н.Р., Канаева О.И., Фомина С.Г. и др. Роль энтеровируса ЕСНО 30 в этиологии энтеровирусной инфекции на северо-западе России в 2013 г. *Журнал инфектологии.* 2014; 6(3): 84–91. <https://elibrary.ru/padalz>
 17. Khetsuriani N., Lamonte-Fowlkes A., Oberst S., Pallansch M.A. Centers for Disease Control and Prevention. Enterovirus surveillance – United States, 1970–2005. *MMWR Surveill. Summ.* 2006; 55(8): 1–20.
 18. Lee H.Y., Chen C.J., Huang Y.C., Li W.C., Chiu C.H., Huang C.G., et al. Clinical features of echovirus 6 and 9 infections in children. *J. Clin. Virol.* 2010; 49(3): 175–9. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2010.07.010>
 19. Zhu Y., Zhou X., Liu J., Xia L., Pan Y., Chen J., et al. Molecular identification of human enteroviruses associated with aseptic meningitis in Yunnan province, Southwest China. *Springerplus.* 2016; 5(1): 1515. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-3194-1>
 20. Голицына Л.Н., Фомина С.Г., Новикова Н.А. Молекулярно-генетические варианты вируса ЕСНО 9, идентифицированные у больных серозным менингитом в России в 2007–2009 гг. *Вопросы вирусологии.* 2011; 56(6): 37–42. <https://elibrary.ru/ooqzaf>
 21. Лукашев А.Н., Резник В.И., Иванова О.Е., Еремеева Т.П., Караванская Т.Н., Перескокова М.А. и др. Молекулярная эпидемиология вируса ЕСНО 6, возбудителя вспышки серозного менингита 2006 года в Хабаровске. *Вопросы вирусологии.* 2008; 53(1): 16–21. <https://elibrary.ru/iisrvh>
 22. Иванова О.Е., Еремеева Т.П., Лукашев А.Н., Байкова О.Ю., Ярмольская М.С., Курибко С.Г. и др. Вирусологическая и клинико-эпидемиологическая характеристика серозных менингитов в Москве (2008–2012 гг.). *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2014; (3): 10–7. <https://elibrary.ru/sghrgp>
 23. Papadakis G., Chibo D., Druce J., Catton M., Birch C. Detection and genotyping of enteroviruses in cerebrospinal fluid in patients in Victoria, Australia, 2007–2013. *J. Med. Virol.* 2014; 6(9): 1609–13. <https://doi.org/10.1002/jmv.23885>
 24. Shen H. Recombination analysis of coxsackievirus B5 genogroup C. *Arch. Virol.* 2018; 163(2): 539–44. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3608-6>
 25. Trallero G., Casas I., Avellón A., Pérez C., Tenorio A., De La Loma A. First epidemic of aseptic meningitis due to echovirus type 13 among Spanish children. *Epidemiol. Infect.* 2003; 130(2): 251–6. <https://doi.org/10.1017/s0950268802008191>
 26. Wang P., Xu Y., Liu M., Li H., Wang H., Liu Y., et al. Risk factors and early markers for echovirus type 11 associated haemorrhage-hepatitis syndrome in neonates, a retrospective cohort study. *Front. Pediatr.* 2023; 11: 1063558. <https://doi.org/10.3389/fped.2023.1063558>
 27. Nkosi N., Preiser W., van Zyl G., Claassen M., Cronje N., Maritz J., et al. Molecular characterisation and epidemiology of enterovirus-associated aseptic meningitis in the Western and Eastern Cape Provinces, South Africa 2018–2019. *J. Clin. Virol.* 2021; 139: 104845. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2021.104845>
 28. Jiang C., Xu Z., Li J., Zhang J., Xue X., Jiang J., et al. Case report: Clinical and virological characteristics of aseptic meningitis caused by a recombinant echovirus 18 in an immunocompetent adult. *Front. Med. (Lausanne).* 2023; 9: 1094347. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.1094347>
 29. Романенкова Н.И., Голицына Л.Н., Бичурина М.А., Розаева Н.Р., Канаева О.И., Зверев В.В. и др. Заболеваемость энтеровирусной инфекцией и особенности циркуляции непوليوмиелитных энтеровирусов на некоторых территориях России в 2017 году. *Журнал инфектологии.* 2018; 10(4): 124–33. <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2018-10-4-124-133> <https://elibrary.ru/vvmeua>
 30. Pabbaraju K., Wong S., Chan E.N., Tellier R. Genetic characterization of a Coxsackie A9 virus associated with aseptic meningitis in Alberta, Canada in 2010. *J. Virol.* 2013; 10: 93. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-93>
 31. Smuts H., Cronje S., Thomas J., Brink D., Korsman S., Hardie D. Molecular characterization of an outbreak of enterovirus-associated meningitis in Mossel Bay, South Africa, December 2015 – January 2016. *BMC Infect. Dis.* 2018; 18(1): 709. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3641-4>
 32. Moliner-Calderón E., Rabella-García N., Turón-Viñas E., Ginovart-Galiana G., Figueras-Aloy J. Relevance of enteroviruses in neonatal meningitis. *Enferm. Infect. Microbiol. Clin. (Engl. Ed.).* 2023; S2529-993X (22)00313-6. <https://doi.org/10.1016/j.eimce.2022.12.012>
 33. Sun H., Gao M., Cui D. Molecular characteristics of the VP1 region of enterovirus 71 strains in China. *Gut. Pathog.* 2020; 12: 38. <https://doi.org/10.1186/s13099-020-00377-2>
 34. Liu Y., Zhou J., Ji G., Gao Y., Zhang C., Zhang T., et al. A novel subgenotype C6 Enterovirus A71 originating from the recombination between subgenotypes C4 and C2 strains in mainland China. *Sci. Rep.* 2022; 12(1): 593. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-04604-x>
 35. Romanenkova N.I., Nguyen T.T.T., Golitsyna L.N., Ponomareva N.V., Rozaeva N.R., Kanaeva O.I., et al. Enterovirus 71-associated infection in South Vietnam: vaccination is a real solution. *Vaccines (Basel).* 2023; 11(5): 931. <https://doi.org/10.3390/vaccines11050931>
 36. Melnick J.L., Schmidt N.J., Mirkovic R.R., Chumakov M.P., Lavrova I.K., Voroshilova M.K. Identification of Bulgarian strain 258 of enterovirus 71. *Intervirology.* 1980; 12(6): 297–302. <https://doi.org/10.1159/000149088>
 37. Abubakar S., Chee H.Y., Shafee N., Chua K.B., Lam S.K. Molecular detection of enteroviruses from an outbreak of hand, foot and mouth disease in Malaysia in 1997. *Scand. J. Infect. Dis.* 1999; 31(4): 331–5. <https://doi.org/10.1080/00365549950163734>
 38. Mao Q., Cheng T., Zhu F., Li J., Wang Y., Li Y., et al. The cross-neutralizing activity of enterovirus 71 subgenotype C4 vaccines in healthy Chinese infants and children. *PLoS One.* 2013; 8(11): e79599. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079599>
 39. Nguyen T.T., Chiu C.H., Lin C.Y., Chiu N.C., Chen P.Y., Le T.T.V., et al. Efficacy, safety, and immunogenicity of an inactivated, adjuvanted enterovirus 71 vaccine in infants and children: a multiregion, double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet.* 2022; 399(10336): 1708–17. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)00313-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)00313-0)
 40. Ковалев Е.В., Ягвкин Э.А., Онищенко Г.Г., Симованьян Э.Н., Ненадская С.А., Твердохлебова Т.И. и др. Эпидемиологические и клинические особенности энтеровирусной (неполио) инфекции 71 типа у детей в Ростове-на-Дону. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение.* 2018; 7(4): 44–51. <https://doi.org/10.24411/2305-3496-2018-14007> <https://elibrary.ru/yphxnz>
 41. Ковалёв Е.В., Твердохлебова Т.И., Симованьян Э.Н. Молекулярно-эпидемиологические и клинические аспекты энтеровирусной инфекции на юге России. *Медицинский вестник Юга России.* 2023; 14(1): 83–92. <https://doi.org/10.21886/2219-8075-2023-14-1-83-92> <https://elibrary.ru/efrjdb>
 42. Li J., Wang X., Cai J., Ge Y., Wang C., Qiu Y., et al. Non-polio enterovirus infections in children with central nervous system disorders in Shanghai, 2016–2018: Serotypes and clinical characteristics. *J. Clin. Virol.* 2020; 129: 104516. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104516>
 43. Munivenkatappa A., Yadav P.D., Nyayanit D.A., Majumdar T.D., Sangal L., Jain S., et al. Molecular diversity of Coxsackievirus A10 circulating in the southern and northern region of India [2009–17]. *Infect. Genet. Evol.* 2018; 66: 101–10. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.09.004>
 44. Ivanova O.E., Shakaryan A.K., Morozova N.S., Vakulenko Y.A., Eremeeva T.P., Kozlovskaya L.L., et al. Cases of acute flaccid paralysis associated with coxsackievirus A2: Findings of a 20-year surveillance in the Russian Federation. *Microorganisms.* 2022; 10(1): 112. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010112>

45. Chiang K.L., Wei S.H., Fan H.C., Chou Y.K., Yang J.Y. Outbreak of recombinant coxsackievirus A2 infection and polio-like paralysis of children, Taiwan, 2014. *Pediatr. Neonatol.* 2019; 60(1): 95–9. <https://doi.org/10.1016/j.pedneo.2018.02.003>
46. Hu L., Zhang Y., Hong M., Fan Q., Yan D., Zhu S., et al. Phylogenetic analysis and phenotypic characteristics of two Tibet EV-C96 strains. *J. Virol.* 2019; 16(1): 40. <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1151-7>
47. Helfferich J., Knoester M., Van Leer-Buter C.C., Neuteboom R.F., Meiners L.C., Niesters H.G., et al. Acute flaccid myelitis and enterovirus D68: lessons from the past and present. *Eur. J. Pediatr.* 2019; 178(9): 1305–15. <https://doi.org/10.1007/s00431-019-03435-3>
48. Lopez A., Lee A., Guo A., Konopka-Anstadt J.L., Nisler A., Rogers S.L., et al. Vital signs: surveillance for acute flaccid myelitis – United States, 2018. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 2019; 68(27): 608–14. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6827e1>
49. Зверев В.В., Новикова Н.А. Энтгеровирус D68: молекулярно-биологическая характеристика, особенности инфекции. *Журнал МедиАль.* 2019; (2): 40–54. <https://doi.org/10.21145/2225-0026-2019-2-40-54> <https://elibrary.ru/ljyeyg>
50. Анохин В.А., Сабитова А.М., Кравченко И.Э., Мартынова Т.М. Энтгеровирусные инфекции: современные особенности. *Практическая медицина.* 2014; (9): 52–9. <https://elibrary.ru/tamufx>
51. Almutairi M.M., Gong C., Xu Y.G., Chang Y., Shi H. Factors controlling permeability of the blood-brain barrier. *Cell. Mol. Life Sci.* 2016; 73(1): 57–77. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2050-8>
52. You Q., Wu J., Liu Y., Zhang F., Jiang N., Tian X., et al. HMGB1 release induced by EV71 infection exacerbates blood-brain barrier disruption via VE-cadherin phosphorylation. *Virus Res.* 2023; 338: 199240. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2023.199240>
53. Lenz K.M., Nelson L.H. Microglia and beyond: innate immune cells as regulators of brain development and behavioral function. *Front. Immunol.* 2018; 13(9): 698. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00698>
54. Forrester J.V., McMenamin P.G., Dando S.J. CNS infection and immune privilege. *Nat. Rev. Neurosci.* 2018; 19(11): 655–71. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0070-8>
55. Ohka S., Sakai M., Bohnert S., Igarashi H., Deinhardt K., Schiavo G., et al. Receptor-dependent and -independent axonal retrograde transport of poliovirus in motor neurons. *J. Virol.* 2009; 83(10): 4995–5004. <https://doi.org/10.1128/JVI.02225-08>
56. Huang S.W., Huang Y.H., Tsai H.P., Kuo P.H., Wang S.M., Liu C.C., et al. A selective bottleneck shapes the evolutionary mutant spectra of enterovirus A71 during viral dissemination in humans. *J. Virol.* 2017; 91(23): e01062-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.01062-17>
57. Chen B.S., Lee H.C., Lee K.M., Gong Y.N., Shih S.R. Enterovirus and encephalitis. *Front. Microbiol.* 2020; 11: 261. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00261>
58. Wang L., Dong C., Chen D.E., Song Z. Coxsackievirus-induced acute neonatal central nervous system disease model. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2014; 7(3): 858–69.
59. Ohka S., Nomoto A. The molecular basis of poliovirus neurovirulence. *Dev. Biol. (Basel).* 2001; 105: 51–8.
60. Racaniello V.R. One hundred years of poliovirus pathogenesis. *Virology.* 2006; 344(1): 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.09.015>
61. Baggen J., Thibaut H.J., Strating J.R.P.M., van Kuppeveld F.J.M. The life cycle of non-polio enteroviruses and how to target it. *Nat. Rev. Microbiol.* 2018; 16(6): 368–81. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0005-4>
62. Volterra A., Meldolesi J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat. Rev. Neurosci.* 2005; 6(8): 626–40. <https://doi.org/10.1038/nrn1722>
63. O’Neal A.J., Hanson M.R. The enterovirus theory of disease etiology in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome: a critical review. *Front. Med. (Lausanne).* 2021; 8: 688486. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.688486>
64. Jacksch C., Dargvainiene J., Böttcher S., Diedrich S., Leyboldt F., Stürner K., et al. Chronic enterovirus meningoencephalitis in prolonged B-cell depletion after rituximab therapy: case report. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm.* 2023; 10(6): e200171. <https://doi.org/10.1212/NXI.000000000200171>
65. Pinkert S., Klingel K., Lindig V., Dörner A., Zeichhardt H., Spilker O.B., et al. Virus-host coevolution in a persistently coxsackievirus B3-infected cardiomyocyte cell line. *J. Virol.* 2011; 85(24): 13409–19. <https://doi.org/10.1128/JVI.00621-11>
66. Fischer T.K., Simmonds P., Harvala H. The importance of enterovirus surveillance in a post-polio world. *Lancet Infect. Dis.* 2022; 22(1): e35–e40. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30852-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30852-5)
67. Chiu M.L., Luo S.T., Chen Y.Y., Chung W.Y., Duong V., Dussart P., et al. Establishment of Asia-Pacific Network for Enterovirus Surveillance. *Vaccine.* 2020; 38(1): 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.09.111>

REFERENCES

- Tapparel C., Siegrist F., Petty T.J., Kaiser L. Picornavirus and enterovirus diversity with associated human diseases. *Infect. Genet. Evol.* 2013; 14: 282–93. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.10.016>
- Brown D.M., Zhang Y., Scheuermann R.H. Epidemiology and sequence-based evolutionary analysis of circulating non-polio enteroviruses. *Microorganisms.* 2020; 8(12): 1856. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121856>
- Brouwer L., Moreni G., Wolthers K.C., Pajkrt D. World-wide prevalence and genotype distribution of enteroviruses. *Viruses.* 2021; 13(3): 434. <https://doi.org/10.3390/v13030434>
- Lobzin Yu.V., Pilipenko V.V., Gromyko Yu.N. *Meningitis and Encephalitis [Meningity i entsefality]*. St. Petersburg: Foliant; 2003. EDN: <https://elibrary.ru/zfsgsev> (in Russian)
- Rao S., Elkon B., Flett K.B., et al. Long-term outcomes and risk factors associated with acute encephalitis in children. *J. Pediatric Infect. Dis. Soc.* 2017; 6(1): 20–7. <https://doi.org/10.1093/jpids/piv075>
- Khandaker G., Jung J., Britton P., et al. Long-term outcomes of infective encephalitis in children: a systematic review and meta-analysis. *Dev. Med. Child Neurol.* 2016; 58(11): 1108–15. <https://doi.org/10.1111/dmcn.13197>
- Skripchenko N.V., Ivanova M.V., Vil’ nits A.A., Skripchenko E.Yu. Neuroinfections in children: tendencies and prospects. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii.* 2016; 61(4): 9–22. <https://doi.org/10.21508/1027-4065-2016-61-4-9-22> <https://elibrary.ru/yuckad> (in Russian)
- Morozova E.A., Ertakhova M.L. Outcomes of neuroinfections and their predictors. *Russkiy zhurnal detskoy nevrologii.* 2020; 15(3-4): 55–64. <https://doi.org/10.17650/2073-8803-2020-15-3-4-55-64> <https://elibrary.ru/thmrqq> (in Russian)
- Yarmukhamedova N.A., Ergasheva M.Ya. Clinical and laboratory characteristics in serous meningitis of enterovirus etiology. *Voprosy nauki i obrazovaniya.* 2019; 27(76): 134–44. <https://elibrary.ru/bxerha> (in Russian)
- Majer A., McGreevy A., Booth T.F. Molecular pathogenicity of enteroviruses causing neurological disease. *Front. Microbiol.* 2020; 11: 540. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00540>
- Wörner N., Rodrigo-García R., Antón A., Castellarnau E., Delgado I., Vazquez E., et al. Enterovirus-A71 Rhombencephalitis outbreak in Catalonia: characteristics, management and outcome. *Pediatr. Infect. Dis.* 2021; 40(7): 628–33. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000003114>
- Bailey J.L., Mirand A., Henquell C., Archimbaud C., Chambon M., Charbonné F., et al. Phylogeography of circulating populations of human echovirus 30 over 50 years: Nucleotide polymorphism and signature of purifying selection in the VP1 capsid protein gene. *Infect. Genet. Evol.* 2009; 9(4): 699–708. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2008.04.009>
- Tian X., Han Z., He Y., Sun Q., Wang W., Xu W., et al. Temporal phylogeny and molecular characterization of echovirus 30 associated with aseptic meningitis outbreaks in China. *J. Virol.* 2021; 18(1): 118. <https://doi.org/10.1186/s12985-021-01590-4>
- Novikova N.A., Golitsyna L.N., Fomina S.G., Efimov E.I. Molecular monitoring of non-polio enteroviruses in european territory of Russia in 2008–2011. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2013; 90(1): 75–8. <https://elibrary.ru/qayeqt> (in Russian)
- Golitsyna L.N., Zverev V.V., Selivanova S.G., Ponomareva N.V., Kashnikov A.Yu., Sozonov D.V., et al. Etiological structure of enterovirus infections in the Russian Federation in 2017–2018. *Zdorov’e naseleniya i sreda obitaniya – ZnISO.* 2019; 27(8): 30–8. <https://doi.org/10.35627/2219-5238/2019-317-8-30-38> <https://elibrary.ru/rszld> (in Russian)
- Bichurina M.A., Romanenkova N.I., Golitsyna L.N., Rozaeva N.R., Kanaeva O.I., Fomina S.G., et al. Role of enterovirus echo 30 as the etiological agent of enterovirus infection in the north-west of Russia

- in 2013. *Zhurnal infektologii*. 2014; 6(3): 84–91. <https://elibrary.ru/padalz> (in Russian)
17. Khetsuriani N., Lamonte-Fowlkes A., Oberst S., Pallansch M.A. Centers for Disease Control and Prevention. Enterovirus surveillance – United States, 1970–2005. *MMWR Surveill. Summ.* 2006; 55(8): 1–20.
 18. Lee H.Y., Chen C.J., Huang Y.C., Li W.C., Chiu C.H., Huang C.G., et al. Clinical features of echovirus 6 and 9 infections in children. *J. Clin. Virol.* 2010; 49(3): 175–9. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2010.07.010>
 19. Zhu Y., Zhou X., Liu J., Xia L., Pan Y., Chen J., et al. Molecular identification of human enteroviruses associated with aseptic meningitis in Yunnan province, Southwest China. *Springerplus*. 2016; 5(1): 1515. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-3194-1>
 20. Golitsyna L.N., Fomina S.G., Novikova N.A. Molecular genetic echovirus 9 variants identified in patients with aseptic meningitis in Russia in 2007–2009. *Voprosy virusologii*. 2011; 56(6): 37–42. <https://elibrary.ru/ooqzaf> (in Russian)
 21. Lukashev A.N., Reznik V.I., Ivanova O.E., Ereemeeva T.P., Karavanskaya T.N., Pereskokova M.A., et al. Molecular epidemiology of echo 6 virus, the causative agent of the 2006 outbreak of serous meningitis in Khabarovsk. *Voprosy virusologii*. 2008; 53(1): 16–21. <https://elibrary.ru/iisrvh> (in Russian)
 22. Ivanova O.E., Ereemeeva T.P., Lukashev A.N., Baykova O.Yu., Yarmol'skaya M.S., Kuribko S.G., et al. Virological, clinical and epidemiological characteristics of aseptic meningitis in Moscow (2008–2012). *Epidemiologiya i vaksino profilaktika*. 2014; (3): 10–7. <https://elibrary.ru/sghrgp> (in Russian)
 23. Papadakis G., Chibo D., Druce J., Catton M., Birch C. Detection and genotyping of enteroviruses in cerebrospinal fluid in patients in Victoria, Australia, 2007–2013. *J. Med. Virol.* 2014; 6(9): 1609–13. <https://doi.org/10.1002/jmv.23885>
 24. Shen H. Recombination analysis of coxsackievirus B5 genogroup C. *Arch. Virol.* 2018; 163(2): 539–44. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3608-6>
 25. Trallero G., Casas I., Avellón A., Pérez C., Tenorio A., De La Loma A. First epidemic of aseptic meningitis due to echovirus type 13 among Spanish children. *Epidemiol. Infect.* 2003; 130(2): 251–6. <https://doi.org/10.1017/s0950268802008191>
 26. Wang P., Xu Y., Liu M., Li H., Wang H., Liu Y., et al. Risk factors and early markers for echovirus type 11 associated haemorrhage-hepatitis syndrome in neonates, a retrospective cohort study. *Front. Pediatr.* 2023; 11: 1063558. <https://doi.org/10.3389/fped.2023.1063558>
 27. Nkosi N., Preiser W., van Zyl G., Claassen M., Cronje N., Maritz J., et al. Molecular characterisation and epidemiology of enterovirus-associated aseptic meningitis in the Western and Eastern Cape Provinces, South Africa 2018–2019. *J. Clin. Virol.* 2021; 139: 104845. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2021.104845>
 28. Jiang C., Xu Z., Li J., Zhang J., Xue X., Jiang J., et al. Case report: Clinical and virological characteristics of aseptic meningitis caused by a recombinant echovirus 18 in an immunocompetent adult. *Front. Med. (Lausanne)*. 2023; 9: 1094347. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.1094347>
 29. Romanenkova N.I., Golitsyna L.N., Bichurina M.A., Rozaeva N.R., Kanaeva O.I., Zverev V.V., et al. Enterovirus infection morbidity and peculiarities of nonpolio enteroviruses circulation on some territories of Russia in 2017. *Zhurnal infektologii*. 2018; 10(4): 124–33. <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2018-10-4-124-133> <https://elibrary.ru/vvmeua> (in Russian)
 30. Pabbaraju K., Wong S., Chan E.N., Tellier R. Genetic characterization of a Coxsackie A9 virus associated with aseptic meningitis in Alberta, Canada in 2010. *J. Virol.* 2013; 10: 93. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-93>
 31. Smuts H., Cronje S., Thomas J., Brink D., Korsman S., Hardie D. Molecular characterization of an outbreak of enterovirus-associated meningitis in Mossel Bay, South Africa, December 2015 – January 2016. *BMC Infect. Dis.* 2018; 18(1): 709. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3641-4>
 32. Moliner-Calderón E., Rabella-García N., Turón-Viñas E., Ginovart-Galiana G., Figueras-Aloy J. Relevance of enteroviruses in neonatal meningitis. *Enferm. Infect. Microbiol. Clin. (Engl. Ed.)*. 2023; S2529-993X (22)00313-6. <https://doi.org/10.1016/j.eimce.2022.12.012>
 33. Sun H., Gao M., Cui D. Molecular characteristics of the VP1 region of enterovirus 71 strains in China. *Gut. Pathog.* 2020; 12: 38. <https://doi.org/10.1186/s13099-020-00377-2>
 34. Liu Y., Zhou J., Ji G., Gao Y., Zhang C., Zhang T., et al. A novel subgenotype C6 Enterovirus A71 originating from the recombination between subgenotypes C4 and C2 strains in mainland China. *Sci. Rep.* 2022; 12(1): 593. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-04604-x>
 35. Romanenkova N.I., Nguyen T.T.T., Golitsyna L.N., Ponomareva N.V., Rozaeva N.R., Kanaeva O.I., et al. Enterovirus 71-associated infection in South Vietnam: vaccination is a real solution. *Vaccines (Basel)*. 2023; 11(5): 931. <https://doi.org/10.3390/vaccines11050931>
 36. Melnick J.L., Schmidt N.J., Mirkovic R.R., Chumakov M.P., Lavrova I.K., Voroshilova M.K. Identification of Bulgarian strain 258 of enterovirus 71. *Intervirology*. 1980; 12(6): 297–302. <https://doi.org/10.1159/000149088>
 37. Abubakar S., Chee H.Y., Shafee N., Chua K.B., Lam S.K. Molecular detection of enteroviruses from an outbreak of hand, foot and mouth disease in Malaysia in 1997. *Scand. J. Infect. Dis.* 1999; 31(4): 331–5. <https://doi.org/10.1080/00365549950163734>
 38. Mao Q., Cheng T., Zhu F., Li J., Wang Y., Li Y., et al. The cross-neutralizing activity of enterovirus 71 subgenotype C4 vaccines in healthy Chinese infants and children. *PLoS One*. 2013; 8(11): e79599. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079599>
 39. Nguyen T.T., Chiu C.H., Lin C.Y., Chiu N.C., Chen P.Y., Le T.T.V., et al. Efficacy, safety, and immunogenicity of an inactivated, adjuvanted enterovirus 71 vaccine in infants and children: a multiregion, double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 2022; 399(10336): 1708–17. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)00313-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)00313-0)
 40. Kovalev E.V., Yagovkin E.A., Onishchenko G.G., Simovan'yan E.N., Nenadskaya S.A., Tverdokhlebova T.I., et al. Epidemiological and clinical features of enterovirus (nepolio) infection of 71st type in children in the city of Rostov-on-Don. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie*. 2018; 7(4): 44–51. <https://doi.org/10.24411/2305-3496-2018-14007> <https://elibrary.ru/yphxnz> (in Russian)
 41. Kovalev E.V., Tverdokhlebova T.I., Simovan'yan E.N. Molecular epidemiological and clinical aspects of enterovirus infection in the south of Russia. *Meditsinskiy vestnik Yuga Rossii*. 2023; 14(1): 83–92. <https://doi.org/10.21886/2219-8075-2023-14-1-83-92> <https://elibrary.ru/efrjdb> (in Russian)
 42. Li J., Wang X., Cai J., Ge Y., Wang C., Qiu Y., et al. Non-polio enterovirus infections in children with central nervous system disorders in Shanghai, 2016–2018: Serotypes and clinical characteristics. *J. Clin. Virol.* 2020; 129: 104516. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104516>
 43. Munivenkatappa A., Yadav P.D., Nyayanit D.A., Majumdar T.D., Sangal L., Jang S., et al. Molecular diversity of Coxsackievirus A10 circulating in the southern and northern region of India [2009–17]. *Infect. Genet. Evol.* 2018; 66: 101–10. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.09.004>
 44. Ivanova O.E., Shakaryan A.K., Morozova N.S., Vakulenko Y.A., Ereemeeva T.P., Kozlovskaya L.I., et al. Cases of acute flaccid paralysis associated with coxsackievirus A2: Findings of a 20-year surveillance in the Russian Federation. *Microorganisms*. 2022; 10(1): 112. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010112>
 45. Chiang K.L., Wei S.H., Fan H.C., Chou Y.K., Yang J.Y. Outbreak of recombinant coxsackievirus A2 infection and polio-like paralysis of children, Taiwan, 2014. *Pediatr. Neonatol.* 2019; 60(1): 95–9. <https://doi.org/10.1016/j.pedneo.2018.02.003>
 46. Hu L., Zhang Y., Hong M., Fan Q., Yan D., Zhu S., et al. Phylogenetic analysis and phenotypic characteristics of two Tibet EV-C96 strains. *J. Virol.* 2019; 16(1): 40. <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1151-7>
 47. Helfferich J., Knoester M., Van Leer-Buter C.C., Neuteboom R.F., Meiners L.C., Niesters H.G., et al. Acute flaccid myelitis and enterovirus D68: lessons from the past and present. *Eur. J. Pediatr.* 2019; 178(9): 1305–15. <https://doi.org/10.1007/s00431-019-03435-3>
 48. Lopez A., Lee A., Guo A., Konopka-Anstadt J.L., Nisler A., Rogers S.L., et al. Vital signs: surveillance for acute flaccid myelitis – United States, 2018. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 2019; 68(27): 608–14. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6827e1>
 49. Zverev V.V., Novikova N.A. Enterovirus D68: molecular biological characteristics, features of infection. *Zhurnal Meditsinal'.* 2019; (2): 40–54. <https://doi.org/10.21145/2225-0026-2019-2-40-54> <https://elibrary.ru/ljyeyg> (in Russian)
 50. Anokhin V.A., Sabitova A.M., Kravchenko I.E., Martynova T.M.

- Enterovirus infections: modern features. *Prakticheskaya meditsina*. 2014; (9): 52–9. <https://elibrary.ru/tamufx> (in Russian)
51. Almutairi M.M., Gong C., Xu Y.G., Chang Y., Shi H. Factors controlling permeability of the blood-brain barrier. *Cell. Mol. Life Sci*. 2016; 73(1): 57–77. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2050-8>
 52. You Q., Wu J., Liu Y., Zhang F., Jiang N., Tian X., et al. HMGB1 release induced by EV71 infection exacerbates blood-brain barrier disruption via VE-cadherin phosphorylation. *Virus Res*. 2023; 338: 199240. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2023.199240>
 53. Lenz K.M., Nelson L.H. Microglia and beyond: innate immune cells as regulators of brain development and behavioral function. *Front. Immunol*. 2018; 13(9): 698. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00698>
 54. Forrester J.V., McMenamin P.G., Dando S.J. CNS infection and immune privilege. *Nat. Rev. Neurosci*. 2018; 19(11): 655–71. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0070-8>
 55. Ohka S., Sakai M., Bohnert S., Igarashi H., Deinhardt K., Schiavo G., et al. Receptor-dependent and -independent axonal retrograde transport of poliovirus in motor neurons. *J. Virol*. 2009; 83(10): 4995–5004. <https://doi.org/10.1128/JVI.02225-08>
 56. Huang S.W., Huang Y.H., Tsai H.P., Kuo P.H., Wang S.M., Liu C.C., et al. A selective bottleneck shapes the evolutionary mutant spectra of enterovirus A71 during viral dissemination in humans. *J. Virol*. 2017; 91(23): e01062-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.01062-17>
 57. Chen B.S., Lee H.C., Lee K.M., Gong Y.N., Shih S.R. Enterovirus and encephalitis. *Front. Microbiol*. 2020; 11: 261. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00261>
 58. Wang L., Dong C., Chen D.E., Song Z. Coxsackievirus-induced acute neonatal central nervous system disease model. *Int. J. Clin. Exp. Pathol*. 2014; 7(3): 858–69.
 59. Ohka S., Nomoto A. The molecular basis of poliovirus neurovirulence. *Dev. Biol. (Basel)*. 2001; 105: 51–8.
 60. Racaniello V.R. One hundred years of poliovirus pathogenesis. *Virology*. 2006; 344(1): 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.09.015>
 61. Baggen J., Thibaut H.J., Strating J.R.P.M., van Kuppeveld F.J.M. The life cycle of non-polio enteroviruses and how to target it. *Nat. Rev. Microbiol*. 2018; 16(6): 368–81. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0005-4>
 62. Volterra A., Meldolesi J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat. Rev. Neurosci*. 2005; 6(8): 626–40. <https://doi.org/10.1038/nrn1722>
 63. O’Neal A.J., Hanson M.R. The enterovirus theory of disease etiology in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome: a critical review. *Front. Med. (Lausanne)*. 2021; 8: 688486. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.688486>
 64. Jacksch C., Dargvainiene J., Böttcher S., Diedrich S., Leypoldt F., Stürner K., et al. Chronic enterovirus meningoencephalitis in prolonged B-cell depletion after rituximab therapy: case report. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm*. 2023; 10(6): e200171. <https://doi.org/10.1212/NXI.000000000200171>
 65. Pinkert S., Klingel K., Lindig V., Dörner A., Zeichhardt H., Spiller O.B., et al. Virus-host coevolution in a persistently coxsackievirus B3-infected cardiomyocyte cell line. *J. Virol*. 2011; 85(24): 13409–19. <https://doi.org/10.1128/JVI.00621-11>
 66. Fischer T.K., Simmonds P., Harvala H. The importance of enterovirus surveillance in a post-polio world. *Lancet Infect. Dis*. 2022; 22(1): e35–e40. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30852-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30852-5)
 67. Chiu M.L., Luo S.T., Chen Y.Y., Chung W.Y., Duong V., Dussart P. et al. Establishment of Asia-Pacific Network for Enterovirus Surveillance. *Vaccine*. 2020; 38(1): 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.09.111>

Информация об авторах:

Пономарева Наталья Вячеславовна ✉ – канд. биол. наук, на-

учный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии вирусных инфекций ФБУН «Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия. E-mail: natalia.ponomareva.rfc@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0001-8950-6259>

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

Участие авторов: Пономарева Н.В. – анализ литературных источников, написание текста; Новикова Н.А. – внесение правок, корректура, утверждение окончательного варианта обзорной статьи.

Поступила 02.11.2023
 Принята в печать 14.12.2023
 Опубликовано 29.12.2023

Information about the authors:

Natalia V. Ponomareva ✉ – Ph.D. (Biology), Researcher of Laboratory of Molecular Epidemiology of Viral Infections, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Rospotrebnadzor, Nizhny Novgorod, Russia. E-mail: natalia.ponomareva.rfc@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0001-8950-6259>

Nadezhda A. Novikova – Dr Sci. (Biology), professor, Head of the laboratory of molecular epidemiology of viral infections Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Rospotrebnadzor, Nizhny Novgorod, Russia. E-mail: novikova_na@mail.ru <https://orcid.org/0000-0002-3710-6648>

Contribution: Ponomareva N.V. – analysis of literary sources, writing of the text; Novikova N.A. – making edits, adjustments, approval of the final version of the review article.

Received 02 November 2023
 Accepted 14 December 2023
 Published 29 December 2023

НАУЧНЫЙ ОБЗОР

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-207>

© БОБКОВА М.Р., 2023



Клеточные белки – потенциальные мишени антиретровирусной терапии

Бобкова М.Р.✉

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 105064, г. Москва, Россия

Резюме

Обзорная статья содержит анализ информации, полученной в результате поиска литературы по базам данных Scopus, Web of Science, MedLine. Тема поиска – идентификация и изучение механизмов действия факторов хозяйской клетки, участвующих в цикле репликации вируса иммунодефицита человека (ВИЧ, Retroviridae: *Orthoretrovirinae: Lentivirus: Human immunodeficiency virus-1*). Приведены примеры двух основных групп белков – факторов зависимости ВИЧ (CypA, LEDGF, TSG101 и др.) и факторов рестрикции (SERINC5, TRIM5 α , APOBEC3G и др.); описано современное состояние представлений о механизмах их функционирования. Дана оценка перспектив разработки лекарственных средств для лечения ВИЧ-инфекции, направленных на ингибирование либо стимуляцию активности хозяйских факторов.

Ключевые слова: ВИЧ; хозяйские белки; факторы зависимости; факторы рестрикции; обзор

Для цитирования: Бобкова М.Р. Клеточные белки – потенциальные мишени антиретровирусной терапии. *Вопросы вирусологии*. 2023; 68(6): 488–504. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-207> EDN: <https://elibrary.ru/klgwak>

Финансирование. Исследование выполнено с привлечением средств гранта Российского научного фонда № 22-15-00117, <https://rscf.ru/project/22-15-00117/>

Конфликт интересов. Автор декларирует отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

REVIEW

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-207>

Cellular proteins as potential targets for antiretroviral therapy

Marina R. Bobkova✉

I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, 105064, Moscow, Russia

Abstract

The review article conducts an in-depth analysis of information gleaned from a comprehensive literature search across Scopus, Web of Science, and MedLine databases. The focal point of this search revolves around the identification and exploration of the mechanisms orchestrated by host cell factors in the replication cycle of the human immunodeficiency virus (HIV-1, Retroviridae: *Orthoretrovirinae: Lentivirus: Human immunodeficiency virus-1*). The article delves into two primary categories of proteins, namely HIV dependence factors (such as CypA, LEDGF, TSG101) and restriction factors (including SERINC5, TRIM5 α , APOBEC3G), providing illustrative examples. The current understanding of the functioning mechanisms of these proteins is elucidated, and an evaluation is presented on the potential development of drugs for treating HIV infection. These drugs aim to either inhibit or stimulate the activity of host factors, offering insights into promising avenues for future research and therapeutic advancements.

Keywords: HIV, host proteins; dependence factors; restriction factors; review

For citation: Bobkova M.R. Cellular proteins as potential targets for antiretroviral therapy. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2023; 68(6): 488–504. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-207> EDN: <https://elibrary.ru/klgwak>

Funding. The study was supported by a grant from the Russian Science Foundation (project No. 22-15-00117, <https://rscf.ru/project/22-15-00117/>)

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

Успехи антиретровирусной терапии (АРТ), основанной на применении препаратов, непосредственно воздействующих на ферменты вируса, радикально изменили лицо эпидемии ВИЧ-инфекции, превратив ее из неминуемо смертельной в контролируемую с восстановлением срока и качества жизни инфицированных людей. Несмотря на этот замечательный прогресс, все проблемы АРТ решить не удается до сих пор, спустя почти 30 лет с начала внедрения эффективных схем тритерапии препаратами прямого действия. Главные из этих проблем: 1) невозможность полного излечения ВИЧ-инфекции вследствие феномена латентности, лежащего в основе патогенеза этого заболевания; 2) как следствие, необходимость пожизненного лечения; 3) требование высокой приверженности, трудновыполнимое для многих пациентов; 4) прогрессирование гиперактивации иммунной системы и ее последствий даже при условии высокой вирусологической эффективности лечения; 5) наличие побочных эффектов даже у современных лекарств; 6) формирование лекарственно-устойчивых вариантов вируса.

Последний из перечисленных феноменов связан с особенностью жизненного цикла ВИЧ, включающего стадию обратной транскрипции (рис. 1). Значительное число ошибок, совершаемых ферментом ВИЧ – обратной транскриптазой (reverse transcriptase,

RT), затрагивает все области генома, включая позиции, определяющие связывание молекул лекарственных средств в составе мишенной АРТ. Результатом становятся мутации лекарственной устойчивости и снижение эффективности АРТ.

Перечень мишенной АРТ ограничен и включает три фермента ВИЧ: RT, интегразу (integrase, IN) и протеазу (protease, PR), а также вирусные белки, участвующие в заражении клетки вирусом на этапах присоединения (связывания) и слияния (рис. 1). Феномен лекарственной устойчивости реализуется в отношении каждой из них, хотя и с разной частотой. На протяжении жизни примерно у 40% пациентов возникают устойчивые к АРТ штаммы ВИЧ, что требует замены схем лечения, как правило, на более дорогостоящие. Кроме того, устойчивые варианты ВИЧ могут передаваться в контакте и вызывать заражение, тем самым делая заведомо неэффективной уже первую схему АРТ. Инновационные препараты, направленные против тех же мишеней, хотя и реже, но вызывают формирование устойчивых вирусов и феномена в целом не отменяют.

Все это побуждает к поиску принципиально новых подходов к лечению ВИЧ-инфекции, в числе которых в последние годы все чаще обсуждается возможность разработки препаратов, направленных на взаимодействие ВИЧ с клеточными белками и структурами,

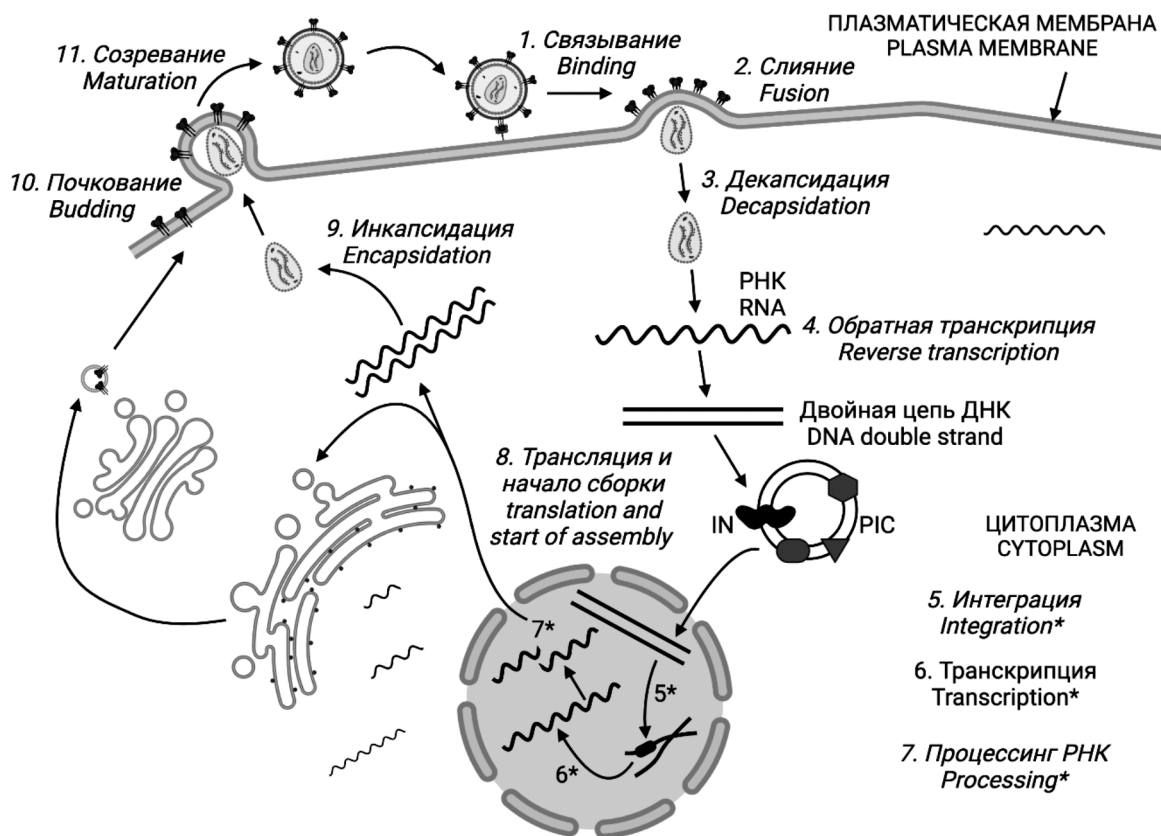


Рис. 1. Жизненный цикл ВИЧ. Рисунки 1–10 созданы в программе BioRender (BioRender.com).

Fig. 1. HIV life cycle. Figures 1–10 were created in the BioRender program (BioRender.com).

важными для размножения вируса [1–7]. Ожидания от такого подхода заключаются в создании терапевтических альтернатив для лечения вирусных инфекций, не вызывающих лекарственной резистентности по причине того, что они имеют своей мишенью белки хозяина (host-targeted antivirals, HTA), генетически существенно более стабильные, чем вирусные.

Действительно, репликативные и биосинтетические механизмы клетки-хозяина играют критическую роль в жизненном цикле всех вирусов, являющихся по своей природе внутриклеточными паразитами. В этом кратком обзоре будет обсуждаться современное состояние исследований в этой сфере применительно к ВИЧ, включая провирусные и антивирусные клеточные факторы, функционирующие на разных этапах инфекционного цикла вируса, и некоторые подходы к разработке лекарственных препаратов, направленных на эти факторы.

Начало изобильному потоку публикаций на указанную тему было положено еще в 2008 г. сенсационной работой ученых из Гарварда [8], которые провели полногеномный скрининг генома человека с применением библиотеки из более чем 21 000 малых интерферирующих РНК (siRNAs) в поиске хозяйских факторов, участвующих в размножении ВИЧ. Последовательное «выключение» генов с последующей оценкой продукции р24-антигена в модельной системе, основанной на HeLa-производных клетках, позволило получить ошеломительный результат – как оказалось, 274 белка клеток человека так или иначе участвовали в репликации ВИЧ, причем до получения результатов этого эксперимента было известно только о 37 (13%) из них. Это участие осуществлялось на всех стадиях жизненного цикла ВИЧ – от присоединения вируса к клетке до почкования новых вирионов и проявления позитивной регуляцией продукции ВИЧ; за такими факторами закрепилось не вполне удачное название «факторы зависимости ВИЧ» (HIV-dependency factors, HDFs).

Строго говоря, поражало воображение число обнаруженных HDFs, но не факт их существования, ведь очевидно, что обладающий столь минимальным набором собственных возможностей вирус непременно должен прибегать к помощи белков-посредников для реализации всех этапов размножения. Последующие исследования показали, что речь идет не просто о приспособлении процессов репликации вируса в клетке к существующей для нужд самой клетки машинерии, но и об активном вмешательстве ВИЧ в широкий спектр клеточных процессов, которые включают ремоделирование эндомембран, полимеризацию и организацию цитоскелета, модуляцию экспрессии генов и белков-хозяев, апоптоз и деление клеток, уклонение от иммунного ответа и многое другое [2, 6, 7, 9]. Далеко не все HDFs детально изучены, однако о некоторых из них уже вполне можно говорить как о потенциальных мишенях терапии.

Еще более увлекательной становилась картина по мере того, как накапливались данные о существовании другой группы белков, пусть и не столь много-

численной, зато очень перспективной с точки зрения разработки терапевтических средств. Речь идет о так называемых факторах рестрикции (restriction factors, RFs) – белках человека, способных блокировать размножение ВИЧ в клетках. Механизмы, с помощью которых они это делают, чрезвычайно затейливы, отличаются большим разнообразием и являются сейчас предметом самого активного изучения.

Некоторые примеры белков, относящихся к обеим группам – «пособников» и «противников» ВИЧ, будут приведены далее в порядке, приблизительно соответствующем порядку событий размножения вируса в клетке. Цикл репликации ВИЧ включает следующие этапы: 1) присоединение вирусных частиц и последующее 2) слияние клеточной и вирусной мембран с участием рецепторов клетки; 3) декапсидация («раздевание») вирусных частиц; 4) обратная транскрипция с участием обратной транскриптазы ВИЧ и образованием комплементарной ДНК (кДНК); 5) формирование преинтеграционного комплекса (preintegration complex, PIC) и интеграция кДНК в хроматин клетки с участием интегразы ВИЧ; 6) транскрипция с участием клеточной РНК-полимеразы; 7) процессинг (сплайсинг) РНК и экспорт ее в цитоплазму; 8) синтез белков и сборка новых вирусных частиц; 9) инкапсидация с образованием внутренней структуры частицы; 10) отпочковывание частиц от клетки с присоединением оболочечных белков; 11) созревание с участием протеазы ВИЧ (рис. 1).

В составе вириона, заражающего чувствительную клетку, всегда, помимо структурных белков, присутствует небольшое количество ферментов – RT, IN и PR, а также некоторые клеточные белки, захваченные вирионом в момент отпочковывания от клетки и необходимые на ранних этапах размножения вируса.

Присоединение. Первыми клеточными белками, с которыми встречается ВИЧ, являются клеточные рецепторы (CD4 и CCR5), необходимые для присоединения вируса. Присутствие первого из них на мембране клетки абсолютно необходимо для ее заражения, отсутствие второго корецептора (CCR5) в случаях гомозиготного дефекта – делеции CCR5D32 – в подавляющем числе случаев защищает от заражения, однако оставляет редкую возможность инфицирования вирусами, тропными к альтернативному корецептору CXCR4. Подробно этот феномен был многократно описан в литературе (рис. 2) [10–12].

Препарат, направленный на ингибирование корецептора CCR5, уже существует и применяется под названием «Маравирик» (MVC); новые ингибиторы CCR5 и CXCR4 находятся на стадии клинических испытаний; ингибиторы CD4 также находятся в разработке и вместе с ингибиторами корецепторов формируют класс антагонистов рецепторов ВИЧ.

Помимо хорошо известных поверхностных рецепторов CD4 и CCR5, идентифицированы еще несколько дополнительных факторов, функция которых критична для заражения клеток ВИЧ.

Известно, что ВИЧ способен заражать клетки не только путем взаимодействия «вирус–клетка»,

но и в результате прямого контакта клеток, не требующего наличия рецепторов. Такой способ заражения («клетка–клетка») многократно превосходит по эффективности «классический» вариант и находит поддержку в лице молекул ALCAM (activated leukocyte cell adhesion molecule) – гликопротеинов из суперсемейства иммуноглобулинов, обладающих сильно выраженными адгезивными свойствами. ALCAM опосредуют межклеточную адгезию и способствуют эффективному распространению вируса посредством прямой передачи от клетки к клетке (рис. 2) [13, 14].

Еще одна молекула с адгезивными свойствами – DC-SIGN (dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin). На поверхности основных мишеней ВИЧ – CD4⁺-Т-клеток – ее нет, но зато много на макрофагах и особенно дендритных клетках, первыми встречающих вирус на периферии при заражении. DC-SIGN – лектин С-типа, который распознает гликопротеины на поверхности микроорганизмов и в случае ВИЧ-инфекции выступает в роли неспецифического корецептора, взаимодействующего с gp120. Последующая интернализация комплекса DC-SIGN–gp120 приводит к формированию внутриклеточных «хранилищ» вируса, и после рециркуляции комплекса на поверхность клетки инфицирование CD4⁺-Т-клеток в лимфоидных органах вследствие прибытия в них дендритных клеток существенно облегчается [15].

Для выполнения функции корецептора CCR5 очень важна сульфатная группа в составе его N-кон-

цевого тирозина. В сульфатировании этой аминокислоты участвуют сразу два клеточных белка – SLC35B2 (solute carrier family 35 member B2) и TPST2 (tyrosylprotein sulfotransferase 2) (рис. 2). В роли донора активированного сульфата выступает PAPS (3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate transporter), который синтезируется в цитозоле и при помощи SLC35B2 перемещается в просвет аппарата Гольджи, где резидентный белок TPST2 катализирует сульфатирование тирозина CCR5. Как оказалось [14], отсутствие TPST2 и/или SLC35B2 полностью предотвращает заражение клеток ВИЧ.

Всем описанным выше белкам клетки, способствующим заражению ВИЧ, противостоит фактор рестрикции SERINC5 (serine incorporator 5), обнаруживаемый в составе вирусных частиц. Его природная функция мало изучена; известно, что этот белок имеет трансмембранный домен из 10 звеньев и является, таким образом, родственником корецептору CCR5 [16]. Механизм его участия в репликации ВИЧ также не вполне ясен; есть предположения о том, что он способен связывать белок gp120 и тем самым препятствовать процессу слияния мембран, при этом gp120 «задерживается» на поверхности мембраны и становится объектом действия антител к ВИЧ (рис. 2) [4, 17, 18].

Антагонистом SERINC5 является вирусный белок Nef, который способен удалять его из состава мембраны и секвестрировать в эндосоме с последующей деградацией [19].

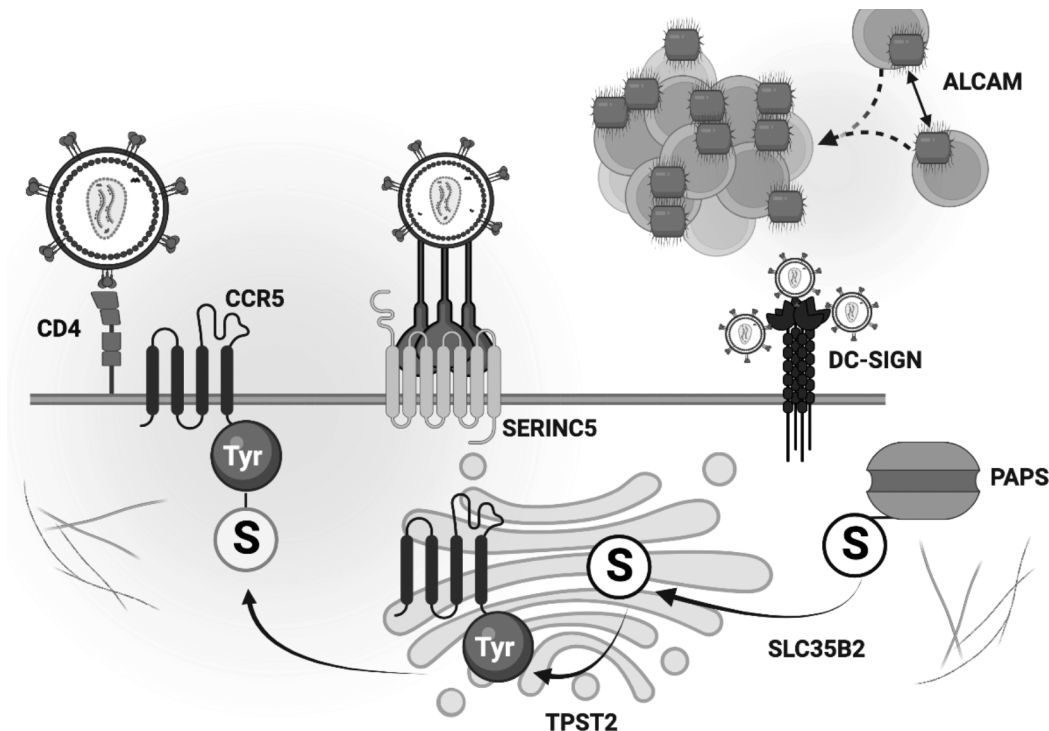


Рис. 2. Этапы проникновения ВИЧ в клетку.

Fig. 2. Stages of HIV entry into the cell.

Декапсидация. До недавнего времени считалось, что после попадания ретровируса в цитозоль клетки-хозяина происходит немедленное сбрасывание капсида с высвобождением РНК и последующей обратной транскрипцией. Этой точке зрения в наши дни противостоит другая, справедливо обращающая внимание на то, что кДНК, образующаяся в ходе обратной транскрипции, может сделаться объектом молекулярных сенсоров [20, 21], чувствительных к присутствию ДНК в цитозоле, и вызвать ненужную для вируса иммунную реакцию. Избежать этого можно, если защитить образующуюся кДНК белковой оболочкой, именно поэтому теперь многие исследователи считают, что процесс декапсидации и обратная транскрипция сопряжены во времени, при этом транскрипция начинается в составе нуклеокапсида, а сбрасывание капсида происходит по мере продвижения кДНК к ядру и заканчивается непосредственно перед импортом РИС (см. далее) в ядро [3, 22] либо даже в ядре (рис. 3) [23].

Центральным звеном всех взаимодействий на этом этапе оказывается вирусный капсидный белок (CA) p24, составляющий внутреннюю оболочку вириона. За право контактировать с ним борются представители обеих «группировок» клеточных белков, при этом наиболее известными из них являются RF TRIM5 α (tripartite motif-containing protein 5) и циклофилин из группы HDFs. Механизм функционирования обоих изучен пока недостаточно, и далее изложены лишь некоторые обоснованные предположения о событиях с их участием.

TRIM5 α непосредственно связывает молекулы CA нуклеокапсида вирусов, вновь проникших в цито-

плазму после завершения слияния вирусной и клеточной мембран. Димеризация CA нарушает архитектуру капсида и вызывает его ускоренную фрагментацию, тем самым отменяя обратную транскрипцию (рис. 3) [3, 24]. Белок TRIM5 α есть у всех приматов, однако описанная выше функция его видоспецифична: TRIM5 α от обезьян Старого Света, таких как макаки резус, ограничивают широкий спектр ретровирусов, включая ВИЧ, а человеческий TRIM5 α эффективно препятствовать ВИЧ не способен [3], хотя есть сведения о полиморфных вариантах TRIM5 α , ассоциированных с замедленной прогрессией ВИЧ-инфекции [25].

Возможно, причина недостаточного эффекта TRIM5 α состоит в наличии в клетках человека эффективно работающего циклофилина (cyclophilin A, CypA). Этот белок из группы шаперонов присутствует в клетке в значительных количествах и формах, принимая участие в процессах укладки (folding) белковых молекул. Его можно встретить на разных этапах репликации ВИЧ, и в составе вирусных частиц он тоже всегда есть, видимо для того, чтобы начать свою деятельность сразу после заражения клетки. Предполагается, что механизм повышения инфекционности ВИЧ в присутствии CypA объясняется его способностью взаимодействовать с CA, при этом стабильность капсида повышается, что, в свою очередь, позволяет сохранить в целостности кДНК до момента пересечения ею ядерной мембраны [5, 22, 23]. Простое объяснение этого факта заключается в конкуренции CypA с TRIM5 α за связывание с CA, чуть более сложное, но и вполне вероятное, – в непосредственном взаи-

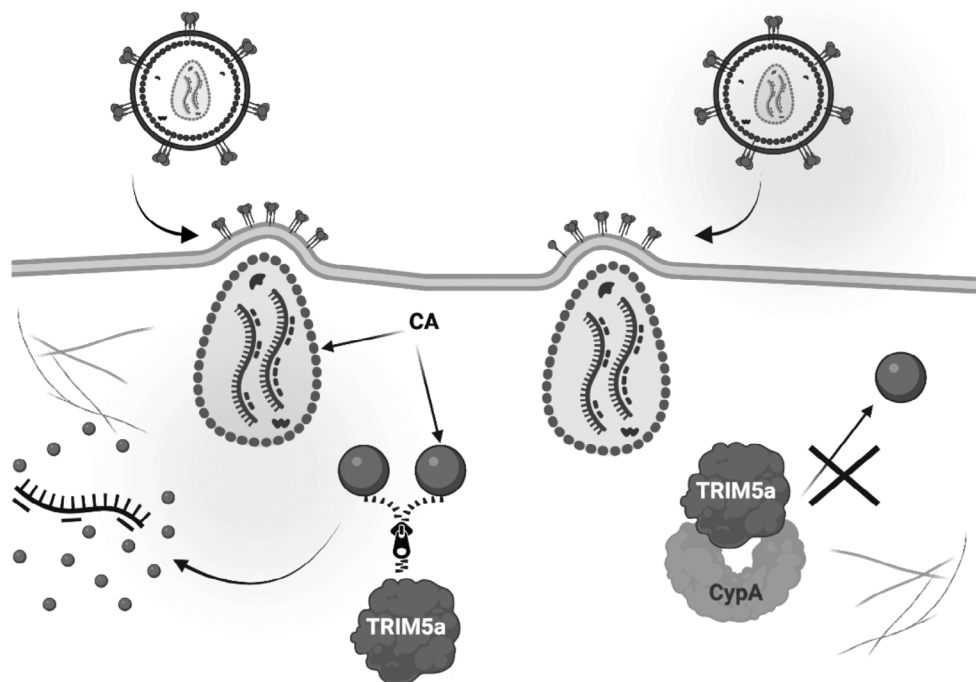


Рис. 3. Факторы зависимости (CypA) и рестрикции (TRIM5 α) на этапе декапсидации ВИЧ.

Fig. 3. Dependency (CypA) and restriction (TRIM5 α) factors at the HIV decapsidation stage.

модействии TRIM5 α –СурА, создающем стерическое препятствие для его контакта с СА (рис. 3) [26]. Замысел будущих разработок лекарственных АРТ-препаратов включает создание неиммуносупрессивных ингибиторов СурА, а также повышение эффективности связывания TRIM5 α –СА [6, 26].

Цитоскелет клетки. Размеры вирусных и субвирусных компонентов поступающих в клетку вирионов не позволяют им свободно диффундировать в «густонаселенной» цитоплазме, поэтому ранние этапы жизненного цикла ВИЧ критически зависят от процессов цитоплазматического транспорта.

Один из белков клетки, вовлеченных в организацию этого процесса, – сократительный белок актин (actin). Его микрофиламенты выполняют свою функцию на периферии клетки и, возможно, связаны с процессом эндоцитоза вирусных частиц (см. выше) [6].

Роль микротрубочек неоднократно обсуждалась в отношении как минимум двух аспектов жизненного цикла ВИЧ – слияния мембран и внутриклеточного перемещения поступающих капсидов. Белками клетки, ассоциируемыми с трафиком, являются MAP1A и MAP1S (microtubule-associated proteins), а также динеин (dynein), составляющие основную часть микротрубочек. О механизмах их функционирования известно лишь то, что они способны связывать вездесущий СА в составе всех вирусных компонентов и направлять их нужным курсом, то есть в сторону клеточного ядра [6, 23].

Поскольку элементы цитоплазматического трафика составляют значительную часть белков клетки хозяи-

на и необходимы для всех внутриклеточных процессов, представить их себе в роли терапевтических мишеней (например, путем деполимеризации) довольно трудно. С учетом того, что микрофиламенты и микротрубочки физически и функционально переплетаются, взаимодействие между ВИЧ и цитоскелетом представляется еще более сложным и требует продолжения исследований.

Обратная транскрипция. На этом важнейшем этапе размножения ВИЧ наибольшую известность приобрели два RFs – АРОВЕС3G и SAMHD1.

АРОВЕС3G (apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic subunit 3G) в ходе синтеза кДНК функционирует как дезаминаза, превращая дезоксицитидин (dC) в дезоксиуридин (dU) в составе минус-цепи. На следующем этапе результирующая плюс-цепь ДНК содержит множество гипермутаций G-A, приводящих к формированию преждевременных стоп-кодонов и продукции aberrантных вирусных транскриптов, которые со временем подвергаются деградации (рис. 4).

У белка АРОВЕС3G есть свой антагонист среди белков ВИЧ – Vif, также обнаруживаемый в составе вирионов. Связываясь с АРОВЕС3G, Vif опосредует его протеосомную деградацию с использованием механизма убиквитинирования [4, 19, 27].

Клеточный белок SAMHD1 (sterile a motif domain, HD domain-containing protein 1), действуя в роли фосфогидролазы, осуществляет превращение нуклеотид-трифосфатов (dNTPs) в дезоксинуклеотиды, тем самым истощая ресурс для синтеза кДНК (рис. 4). В дополнение к этому, результирующее снижение

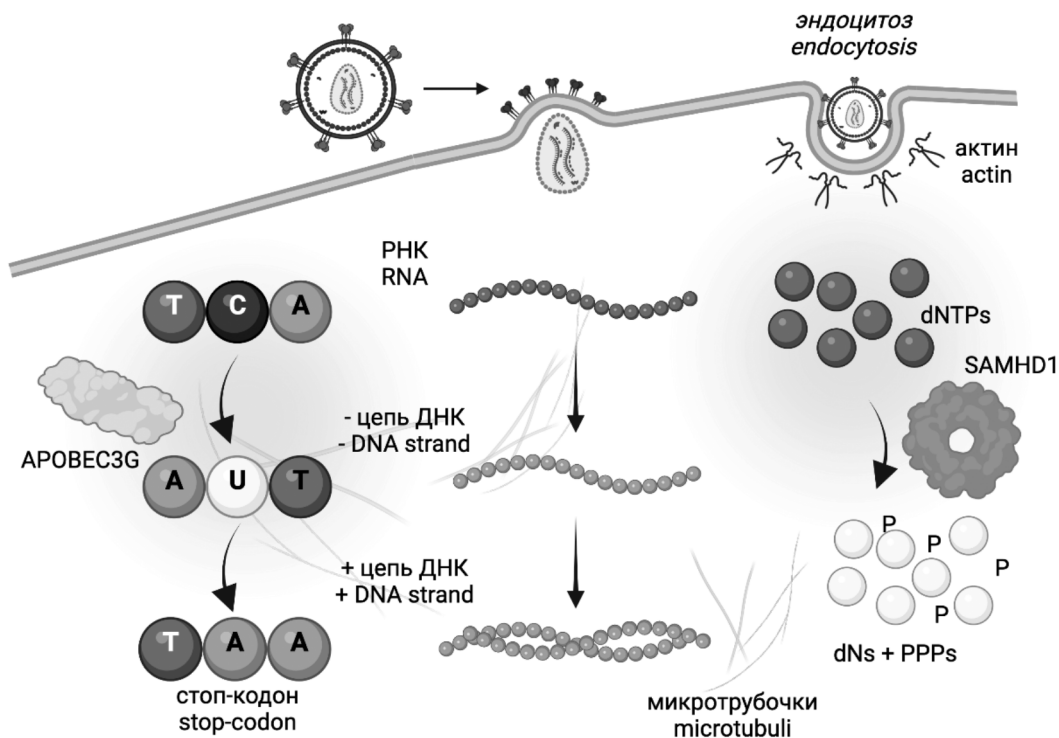


Рис. 4. Факторы рестрикции АРОВЕС3G и SAMHD1 на этапе обратной транскрипции ВИЧ.
Fig. 4. The restriction factors APOBEC3G and SAMHD1 at the HIV reverse transcription stage.

уровня ДНК в цитозоле ограждает клетку от включения молекулярных сенсоров и последующей нежелательной секреции интерферона и хронического воспаления [3, 6, 23]. У ВИЧ-1 нет белка – антагониста SAMHD1, а у ВИЧ-2 есть – это белок Vpr, который участвует в деградации SAMHD1 [3, 27].

Формирование преинтеграционного комплекса. После завершения синтеза молекул кДНК им предстоит встроиться в хромосомную ДНК клетки. В отличие от прочих ретровирусов, которые обычно заражают клетки в стадии митоза, когда ядерная мембрана отсутствует и ДНК легкодоступна, ВИЧ обладает способностью заражать неделящиеся клетки, то есть клетки, находящиеся в периоде интерфазы. Поскольку продолжительность этой фазы существенно превышает длительность митоза, такая возможность предоставляет вирусу колоссальные преимущества, обеспечивая ему огромное число мишеней и высочайший уровень репликации. В неделящихся клетках ядро окружено плотной оболочкой – ядерной мембраной, поэтому пассивной диффузией вопрос не решается и требует активного транспорта кДНК. Преинтеграционный этап и собственно интеграция являются центральным и наиболее сложно организованным событием размножения ВИЧ.

Преинтеграция начинается с формирования минимальной структуры – интасомы, состоящей из кДНК

и фермента IN; вначале IN имеет димерную структуру, а на этапе интеграции в составе функционального PIC находится в форме тетрамера [28]. Молекулы IN «сводят» между собой концы кДНК, после чего образуется незамкнутое кольцо, на концах которого находятся длинные концевые повторы (LTR). После присоединения нескольких коровых вирусных и клеточных белков образуется PIC (рис. 5).

В составе PIC в цитоплазме происходит первый этап интеграции ВИЧ – 3'-процессинг кДНК, в котором на первый план выходит деятельность IN. В ходе 3'-процессинга на каждом из 3'-концов вирусной ДНК в составе PIC удаляются по два нуклеотида с образованием свободных гидроксильных (OH)-групп, и в ядро кДНК попадет уже в процессированном виде. На этом этапе возникает проблема, требующая «помощи» со стороны клетки. Заключается она в том, что в окружении PIC находится заметное число линейных молекул кДНК, которые с помощью IN легко могут «самоинтегрироваться» и тем самым снизить эффективность последующей истинной интеграции. Предотвращение этого феномена происходит при содействии клеточного фактора BAF (barrier-to-autointegration factor) – ДНК-связывающего белка, способного конденсировать ДНК [29]. Защиту от подобных суицидальных событий также обеспечивают

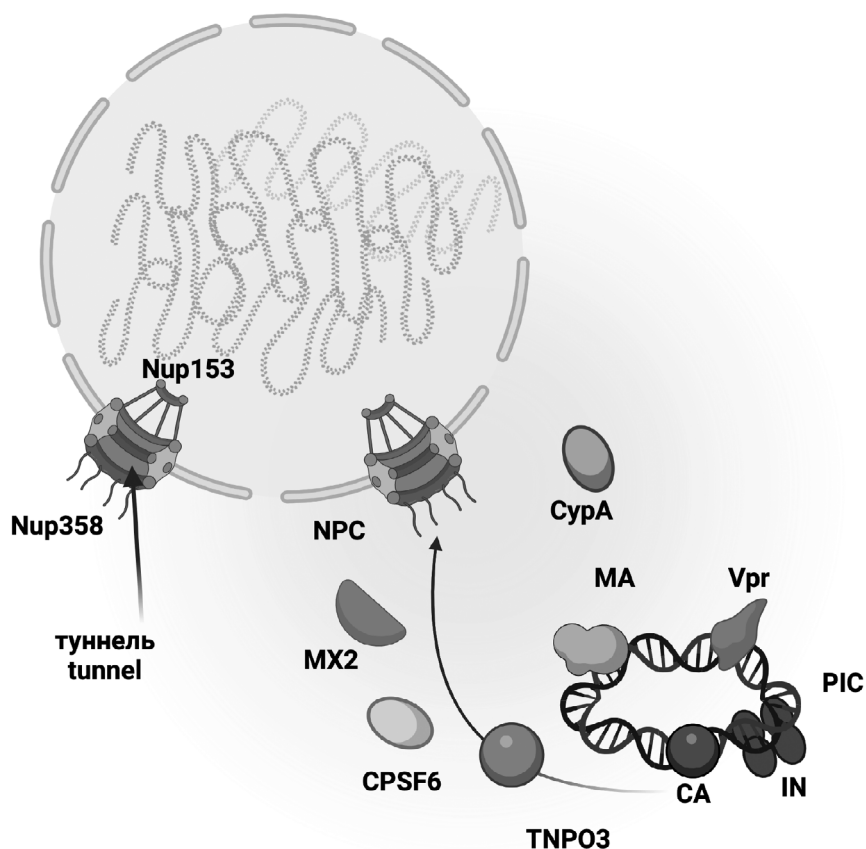


Рис. 5. Участие нуклеопоринов в транслокации преинтеграционного комплекса ВИЧ.
Fig. 5. Involvement of nucleoporins in the translocation of the HIV pre-integration complex.

несколько ДНКаз, связанных с эндоплазматическим ретикуломом [30].

Транслокация преинтеграционного комплекса. После завершения 3'-процессинга PIC начинает двигаться по направлению к ядру клетки. Транслокация PIC обеспечивается взаимодействием кариофильных вирусных белков, содержащих особые последовательности аминокислот – сигналы ядерной локализации (nuclear localization signal, NLS), с клеточными белками, функционирующими на всех этапах ядерного транспорта. К числу вирусных белков, имеющих NLS, относятся MA, IN, а также неструктурный белок ВИЧ Vpr [31].

В составе ядерной мембраны есть поры (nuclear pore complex, NPC), в основном состоящие из высококонсервативных нуклеопоринов (nucleoporins, NUPs) [32]. Они обеспечивают транспорт крупных гидрофильных молекул с массой более 40 kDa, при этом все остальные молекулы проникают в ядро путем пассивной диффузии. В зависимости от выполняемой функции NUPs могут располагаться в цитозоле либо в нуклеоплазме.

Около 30 белков этой группы образуют NPC, имеющий кольцевую структуру: цитоплазматическое кольцо с 50 филаментами (примером может быть Nup358), ядерное кольцо («корзинка» из 8 филаментов), включающее Nup153, и туннель между ними (Nup170, Nup155 и пр.) [32]. Внутренние размеры пор значительно меньше (около 8 нм), чем диаметр PIC (~ 28 нм) [33], поэтому PIC приходится в буквальном смысле «протискиваться» через каналы в мембране, при этом энергетические затраты обеспечивает адензинтрифосфат (АТФ).

Для транслокации PIC может непосредственно контактировать с компонентами NPC либо использовать растворимые белки-транспортеры из группы кариоферринов [22]. Природная функция этих белков состоит в транспортировке факторов сплайсинга мРНК в ядро клетки; в клетке, инфицированной ВИЧ, наиболее известными «помощниками» ВИЧ являются кариоферрины TNPO3 (transportin-3) и CPSF6 (cleavage and polyadenylation specificity factor 6). Непосредственно с СА, не имеющим собственного NLS, взаимодействует, по-видимому, лишь CPSF6, а задача TNPO3 состоит в том, чтобы осуществлять нарезание и полиаденилирование CPSF6. В качестве альтернативы этим белкам может выступать Nup358, также имеющий сродство к СА [34]. Наконец, в процессе интеграции активно участвует все тот же СурА, закрепляя PIC на цитоплазматической стороне ядерной мембраны и направляя его в ядерную пору; считается [22, 31], что в этом как-то участвует и вирусный белок Vpr (рис. 5).

Прохождение через поры обеспечивается несколькими NUPs, каждый из которых взаимодействует с одним или более компонентами PIC. На ядерной стороне мембраны PIC встречает белок NUP153, который локализуется в конце «туннеля» NPC и непосредственно связывает IN, СА и Vpr ВИЧ-1.

Отметим здесь, что процесс транслокации PIC включает большое число участников как со стороны

вируса (здесь перечислены не все даже из хорошо изученных), так и со стороны клетки, при этом функции каждого из них дублируются, и на каждом этапе имеется выбор в пользу того или иного компонента в зависимости от состояния процесса размножения вируса.

Все перечисленные выше факторы, в конечном счете способствующие репликации ВИЧ-1, можно отнести к группе HDFs. На данный момент описан только один внутриклеточный RF, ингибирующий транслокацию PIC, – это белок MX2 (от Mxovirus resistance, он же GTPase MxB). Индуцируемый интерфероном MX2 имеет сродство к СА и концентрируется на цитоплазматической стороне ядерной мембраны [35]. О механизмах его действия известно мало; MX2 ингибирует разные штаммы ВИЧ-1, а также другие лентивирусы приматов, но минимально активен в отношении лентивирусов, не относящихся к приматам. Некоторые штаммы ВИЧ-1 проявляют естественную устойчивость к MX2 без каких-либо очевидных последствий для фитнеса вируса [36].

Собственно интеграция ВИЧ. Попад внутрь ядра, PICs ВИЧ-1 начинают медленное диффузное движение и преимущественно концентрируются на периферии ядра [37], не слишком удаляясь от ядерных пор. Последовательность хромосомной ДНК в участке встраивания провируса не имеет существенного значения, однако назвать локализацию этого процесса полностью случайной было бы неправильно. В выборе участка интеграции ведущую роль играет, по-видимому, доступность ДНК, то есть окружающая ее структура хроматина. В неделящихся клетках значительная часть ДНК клетки находится в конденсированном состоянии (гетерохроматин) и связана с гистонами, поэтому ВИЧ-1 преимущественно связывается с деконденсированным хроматином (эухроматином), а «горячими точками» для интеграции являются транскрипционно активные участки ДНК, освобожденные от гистонов [38]. По всей видимости, это не просто облегчает процесс встраивания, но и дает вирусу эволюционные преимущества, обеспечивая ему в последующем высокий уровень транскрипции в тандеме с геном-мишенью [6].

Интересно, что клеточные гены, которые чаще других становятся объектами встраивания провируса ВИЧ-1, так называемые «гены рекуррентной интеграции», также концентрируются на периферии ядра и контактируют с ядерными порами. Организованный таким образом процесс позволяет свести затраты времени на собственно интеграцию кДНК к минимуму.

Этот процесс в значительной степени регулируется капсидом и белками, взаимодействующими с СА [22, 39], что вновь указывает на хорошую координацию проникновения кДНК в ядро и интеграции. Выбор локуса интеграции может быть организован иерархически: топологическая локализация определяется компонентом NPC NUP153, тогда как доминирующая роль в выборе участка транскрипционно активного хроматина и последующего встраивания принадлежит клеточным белкам CPSF6, LEDGF/p75

(lens epithelium-derived growth factor) и IN11 (INtegrase interactor protein 1) [37, 40], а также, разумеется, и самой IN ВИЧ-1 (рис. 6).

Считается, что CPSF6, в ассоциации с СА на этапе транслокации обеспечивший проникновение PIC в ядро, играет решающую роль и в локализации PIC в ядре, направляя его в эухроматин [40]. Что касается IN11, то, по некоторым предположениям [41], этот фактор может стабилизировать PIC в клетке-хозяине, поддерживая IN в устойчивой конформации, которая предотвращает неспецифические взаимодействия и самоинтеграцию. Белок BAF, ответственный за профилактику самоинтеграции в составе PIC [29], продолжает выполнять эту функцию и на этапе интеграции [28, 31, 39].

Белок LEDGF/p75, изученный лучше других, служит связующим звеном (или мостом) между преинтеграционным комплексом и ДНК хозяина. Последовательность связывания LEDGF/p75 с ДНК хозяина и PIC остается неясной, однако независимо от последовательности событий считается, что присутствие LEDGF/p75 приводит к сближению димеров IN друг с другом с образованием тетрамера. Этот аллостерический эффект приводит к активации IN, которая после этого переходит к выполнению своей основной функции – реакции переноса цепи (strand transfer) [29, 42]. Она заключается в том, что с использованием ранее сформированных гидроксильных групп IN разрезает хромосомную ДНК в выбранном участке

и одновременно соединяет ее 5'-фосфатные группы с концами вирусной кДНК. Промежуточным результатом становится участок ДНК, имеющий разрывы и свободные 5'-концы вирусной ДНК; этот временный дефект восстанавливается инструментами клетки-хозяина с образованием интегрированного провируса [29, 42].

Интерес к LEDGF/p75 возник более десятка лет назад [43] и реализовался в разработке группы препаратов, мишенью которых является интерфейс между активным центром IN и связывающим его доменом LEDGF (LEDGINs). Действие этих ингибиторов основано на аллостерическом эффекте и проявляется двумя феноменами: ранним, то есть очевидным снижением активности IN и интеграции провируса, и поздним, который приводит к морфологическим изменениям продуцируемых вирусных частиц и нарушениям архитектуры кора вируса вследствие повышенной мультимеризации IN [43–46], при этом рибонуклеопротеин оказывается за пределами кора. Такие «увечные» частицы составляют до 70% и не способны во время последующего раунда заражения обеспечить нормальный ход событий размножения вируса [46]. В доклинических испытаниях был подтвержден также негативный эффект некоторых LEDGINs в отношении формирования вирусных резервуаров [47], и это дает основания для надежд на применение этих препаратов в целях функционального излечения ВИЧ-инфекции [47, 48] уже в ближайшем будущем.

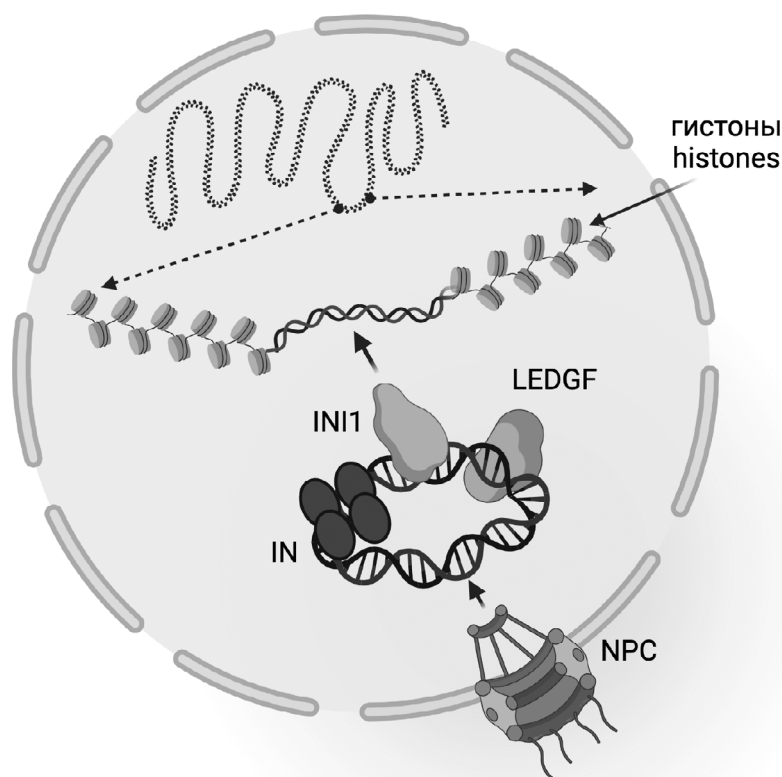


Рис. 6. Интеграция провирусной ДНК ВИЧ.

Fig. 6. Integration of HIV proviral DNA.

Транскрипция. Собственных инструментов для транскрипции провирусной ДНК у ВИЧ нет, и для транскрипции своего генома вирус привлекает все необходимые компоненты клеточного аппарата, и прежде всего РНК-полимеразу. Для того, чтобы их «завербовать» в пользу работы на вирус, используется главнейший из регуляторных факторов ВИЧ – белок Tat. Именно от его активности зависит уровень транскрипции ВИЧ, а отсутствие Tat приводит провирусную ДНК в состояние латентности. События, которые при этом происходят, многократно описывались в литературе [49–52] и здесь подробно рассматриваться не будут.

Кратко, сигналом для инициации считывания РНК становится контакт между активаторными белками SP1 (specificity protein 1) и NF-κB (nuclear factor [κB]), каждый из которых располагается в соответствующем участке промотора LTR. После этого РНК-полимераза (RNA-PII), распознав TATA-бокс, приступает к синтезу РНК, однако в отсутствие Tat синтез быстро останавливается, и результатом этого этапа транскрипции становится короткий фрагмент РНК, образующий петлю TAR (рис. 7).

С появлением Tat ситуация кардинальным образом меняется, поскольку он инспирирует формирование комплекса P-TEFb (positive transcription elongation factor b), включающего CDK9 (cyclin-dependent kinase 9) и CysT (Cyclin T). Взаимодействие TAR/Tat/P-TEFb с «апатичной» RNA-PII вызывает ряд ее

модификаций (главным образом фосфорилирование) и приводит в активное состояние, после чего полимеразы переходит к продуктивной элонгации с образованием полноразмерных мРНК ВИЧ.

Все указанные выше (а также неуказанные) клеточные факторы транскрипции способствуют формированию мРНК ВИЧ и по определению являются, таким образом, HDFs. Судьба образующихся мРНК, однако, складывается не всегда благополучно, поскольку на этапе транскрипции обнаружены RFs, способные приводить к деградации РНК.

Одним из них является РНКазы-L – медиатор противовирусной активности, индуцированный интерфероном-1. Этот фермент обладает широким спектром активностей, связанных с регуляцией рибосомальных и вирусных РНК и, в частности, способен проявлять рибонуклеазные свойства [53]. Эффективная деградация мРНК ВИЧ с участием РНКазы-L может препятствовать вхождению ВИЧ в продуктивный цикл размножения и способствовать поддержанию его латентного состояния.

Еще один фактор, вызывающий деградацию мРНК ВИЧ, – ZAP (zinc finger antiviral protein). Этот белок обладает широкой противовирусной активностью и ограничивает не только ретровирусы, но и многие другие РНК- и ДНК-вирусы. Механизм его функционирования долго оставался неясным, и лишь недавно стало понятно, что мишенью ZAP являются динуклотиды CpG в вирусной РНК, за распознаванием кото-

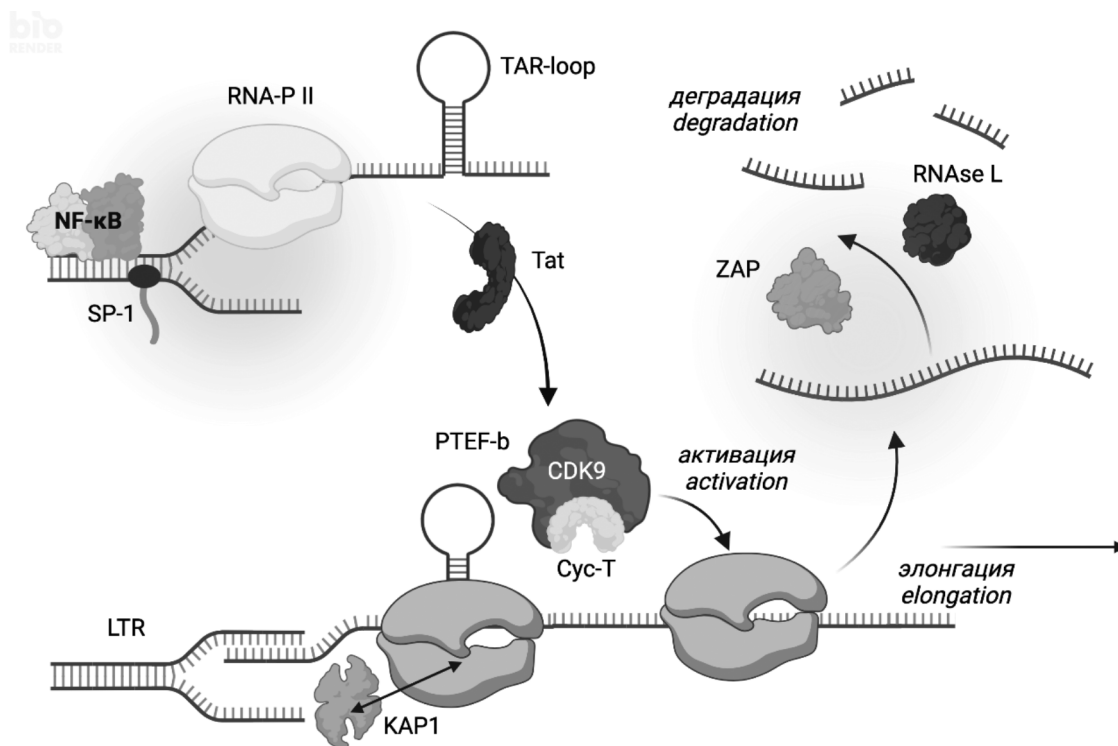


Рис. 7. Активность хозяйских факторов на этапе транскрипции ВИЧ.
Fig. 7. Activity of host factors at the HIV transcription stage.

рых следует рекрутирование компонентов экзосомного комплекса для деградации РНК (рис. 7) [53].

Другой механизм рестрикции использует белок KAP1 (Kruppel-associated box (KRAB)-interacting protein 1), который ослабляет взаимодействие RNA-PII с комплексом Р-TEFb и задерживает ее таким образом в составе промотора, снижая эффективность элонгации [54].

Ядерный экспорт. По завершении транскрипции образуется лишь один вид молекул РНК, имеющих размеры, соответствующие размерам провируса. Как оказалось, судьба вновь синтезированных полно-размерных молекул РНК не predetermined, и одни и те же молекулы могут выступать в роли матричной либо геномной РНК, встраиваясь в будущие вирусные частицы в ходе сборки [2, 51]. Существование таких несплайсированных транскриптов ВИЧ-1 противоречит клеточному «внутреннему распорядку», поэтому для их «спасения» разработана специальная стратегия с участием вирусного белка Rev и клеточных «помощников».

По завершении транскрипции полноразмерный транскрипт мРНК ВИЧ-1 вначале подвергается сплайсингу с образованием мРНК белков ВИЧ-1 Rev, Tat и Nef [51], после чего мРНК Rev транспортируется в цитоплазму для трансляции Rev. Белок Rev, имеющий NLS, возвращается в ядро с участием импортинов. На поздних стадиях размножения ВИЧ-1, когда достигается достаточная концентрация Rev, он приступает к выполнению своей основной функции по выводу несплайсированных мРНК из ядра.

В составе Rev есть сигнал ядерного экспорта (nucleus export signal, NES), с помощью которого он связывает белок из группы кариоферин CRM1 (chromosome maintenance region 1), известный также под именем экспортин-1, и выводит полноразмерные транскрипты в цитоплазму, где они становятся матрицей для трансляции структурных белков Gag и Pol, а также входят в состав новообразованных вирионов. Прочие продукты сплайсинга необходимы для формирования вспомогательных белков Vif и Vpr, а также оболочечных белков Env [23]. Для осуществления собственно сплайсинга используются те же рибонуклеиновые комплексы (spliceosomes), которые применяет клетка для выполнения этой задачи в отношении собственных белков, при этом имеются сведения о том, что белок Rev вовлекает в это событие клеточные РНК-хеликазы [55], выступающие в роли молекулярных «шаттлов» для коротких транскриптов ВИЧ (рис. 8).

Ядерный экспорт мРНК, как и импорт PIC, требует прохождения через ядерные поры (NPC) и опосредуется растворимыми рецепторами-шаттлами, которые перемещаются между ядром и цитоплазмой. Помимо описанного выше CRM1, на этапе экспорта функционирует белок TAP-p15 [32], а также около десятка менее изученных клеточных факторов, которые также присоединяются к мРНК с образованием mRNP (messenger ribonucleoprotein). Дальнейшие события развиваются следующим образом: mRNP взаимодей-

ствует с NUPs, иницируя экспорт. После успешной «стыковки» mRNP продвигается по внутреннему каналу NPC, контактируя с NUPs, и высвобождает мРНК с участием цитоплазматических филаментов NPC NUP214 [32].

Трансляция и сборка вирионов. На этом этапе размножения, как и на предыдущем, ВИЧ полностью зависит от клеточного аппарата биосинтеза, однако, применяя множество ухищрений, эффективно изменяет соотношение продукции вирусных и клеточных белков в свою пользу. Среди приспособлений, которые использует ВИЧ для повышения уровня и регуляции синтеза собственных белков, находятся использование энхансеров трансляции – дополнительного участка посадки рибосомы IRES (internal ribosome entry site) и PCE (post-transcriptional control element), усиливающего связь с полисомой; механизм leaky scanning для прочтения двух белков с общей рамкой считывания; рибосомное сканирование (ribosome scanning) и пр. Самым известным из «изобретений» ВИЧ является феномен «игнорирования» стоп-кодона и сдвига рамки считывания на уровне трансляции, позволяющий регулировать соотношение продукции структурных белков и ферментов, кодируемых одним и тем же геном *pol*.

Эти механизмы, будучи крайне интересными, не имеют прямого отношения к теме настоящего обзора и подробно освещены в ряде работ [2, 19, 23, 51, 56], а здесь будут приведены примеры менее известных случаев взаимодействия ВИЧ с хозяйскими факторами на этапе трансляции и последующей сборки.

После окончания процесса сплайсинга и экспорта всех РНК в цитоплазму наступает этап инициации трансляции, определяющий скорость размножения ВИЧ в целом. Иницирующие элементы есть в каждом из транскриптов ВИЧ, что позволяет им транслироваться независимо друг от друга и само по себе способствует повышению уровня продукции вируса. Белки Gag, Pol, Tat и Rev синтезируются отдельно от высоко модифицированных гликопротеинов Env, встречаясь с ними уже на этапе почкования (рис. 9).

Эффективность инициации определяется частотой «посадки» мРНК на полирибосому (полисому, polysome) и прочностью связывания с ней. На эти процессы влияют сразу несколько белков – одни способны их усиливать, например регулятор сплайсинга 9G8, белок Sam68 (Src-associated in mitosis 68), РНК-хеликаза А (RHA), а другие, напротив, играют роль факторов рестрикции, ингибируя или отменяя события инициации. К ним относится белок IFITM (interferon-induced transmembrane protein), способный исключать взаимодействие мРНК с полисомой [23]; его вирусным антагонистом является белок Nef. Другой пример – hnRNP E1 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein E1), который обладает способностью разобщать большую и малую субъединицы рибосомы [2].

По мере приближения финального этапа размножения – сборки (assembly) и почкования (budding) вирионов – соперничество двух групп белков проявляется все сильнее. После достижения достаточной

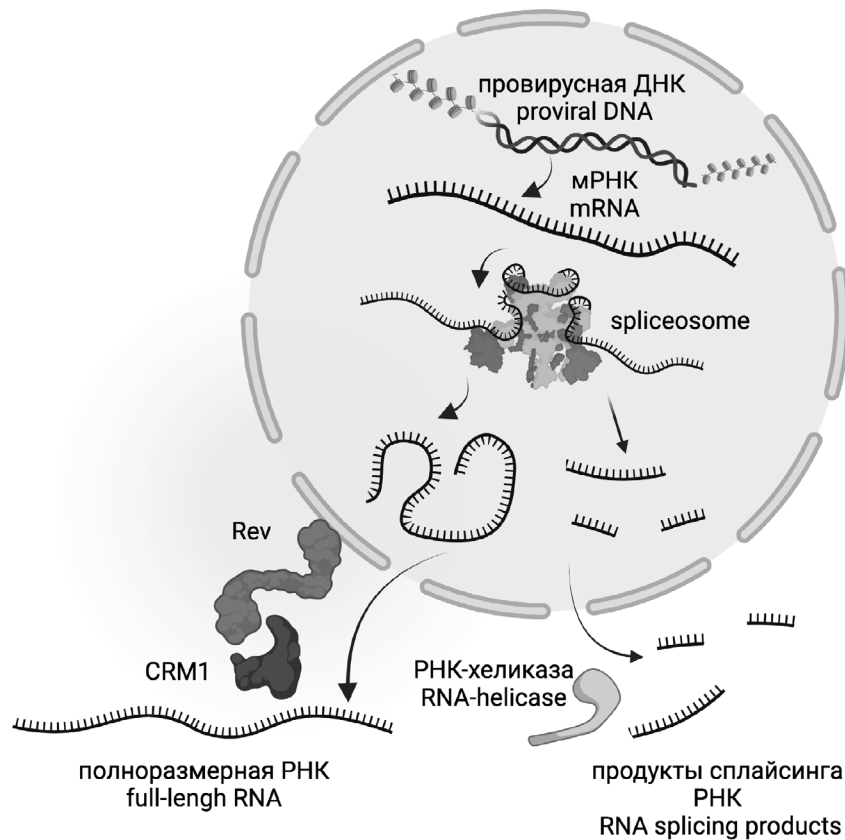


Рис. 8. Сплайсинг и ядерный экспорт мРНК ВИЧ.
Fig. 8. Splicing and nuclear export of HIV mRNAs.

концентрации продуктов биосинтеза – вирусных белков – начинается процесс сборки вирионов, при этом главная роль в организации внутренней структуры частиц, включения РНК и продвижения к мембране клетки принадлежит вирусным белкам группы Gag [56]. На начальном этапе сборки вирусные частицы являются незрелыми, и лишь после нарезания предшественника Gag-Pol формируются все внутренние белки, в частности CA, формирующий капсидную часть вириона конической формы.

Как выяснилось [57], на последующих этапах ВИЧ активно использует для почкования комплекс клеточных белков аппарата ESCRT (endosomal sorting complexes required for transport), участвующий в процессах ремоделирования мембран. Известной своей активной деятельностью белок CA, взаимодействуя с компонентом ESCRT – белком TSG101 (tumor susceptibility gene 101), способствует перемещению формирующихся вирусных частиц в эндосомы с последующим образованием мультивезикулярных тел (multivesicular body, MVB) (рис. 10). В таком виде будущие вирионы могут сохраняться в цитоплазме вплоть до момента почкования.

Белок Env синтезируется в виде предшественника gp160 в шероховатом ретикулуме (EPR) и подвергается созреванию/гликозилированию с образованием gp120 и gp41 с участием аппарата Гольджи. Переме-

щению из EPR к месту окончательного формирования ему помогает клеточный белок Rab11-FIP1C (FIP1C) (Rab coupling protein) [56]. Предпочтительными местом последующего «заякоривания» Env в мембране становятся «липидные плотки» (lipid rafts), обогащенные холестерином и насыщенными жирными кислотами.

Кульминация наступает на этапе собственно почкования, когда проявляется эффект сразу нескольких факторов рестрикции. Два из них – белки GBP5 (guanylate binding protein 5) и MARCH8 (E3 ubiquitin ligase membrane-associated RING-CH 8) – препятствуют «нарезанию» gp160 и тем самым понижают эффективность включения белков Env в новые вирионы; результатом становится формирование неинфекционных вирусных частиц. В дополнение к этому MARCH8 обладает способностью удерживать Env в цитоплазме с помощью не вполне ясного механизма. Белок PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand 1) ограничивает динамику актина вблизи клеточной мембраны и задерживает Env в ее составе [56].

Самым изученным из факторов рестрикции, действующих на этапе сборки, является тетерин (tetherin, BST-2, bone marrow stromal antigen 2). Этот белок имеет необычную структуру, включающую Т-концевой трансмембранный и С-концевой гликозилированный концы, что позволяет ему удерживаться в мембране и одно-

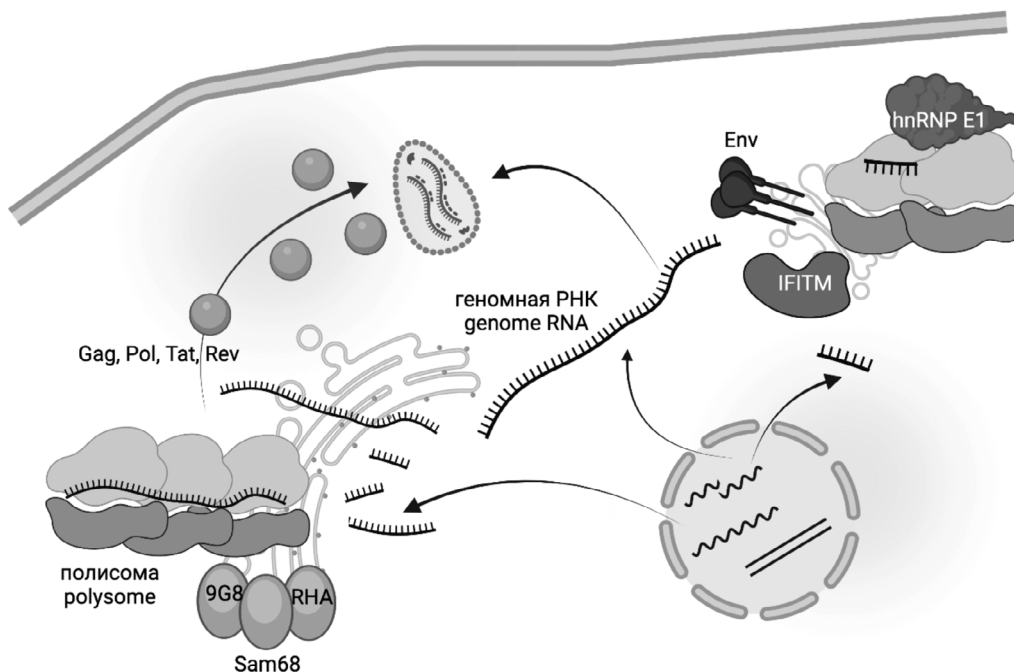


Рис. 9. Факторы хозяйской клетки на этапе трансляции ВИЧ.

Fig. 9. Host cell factors at the HIV translation stage.

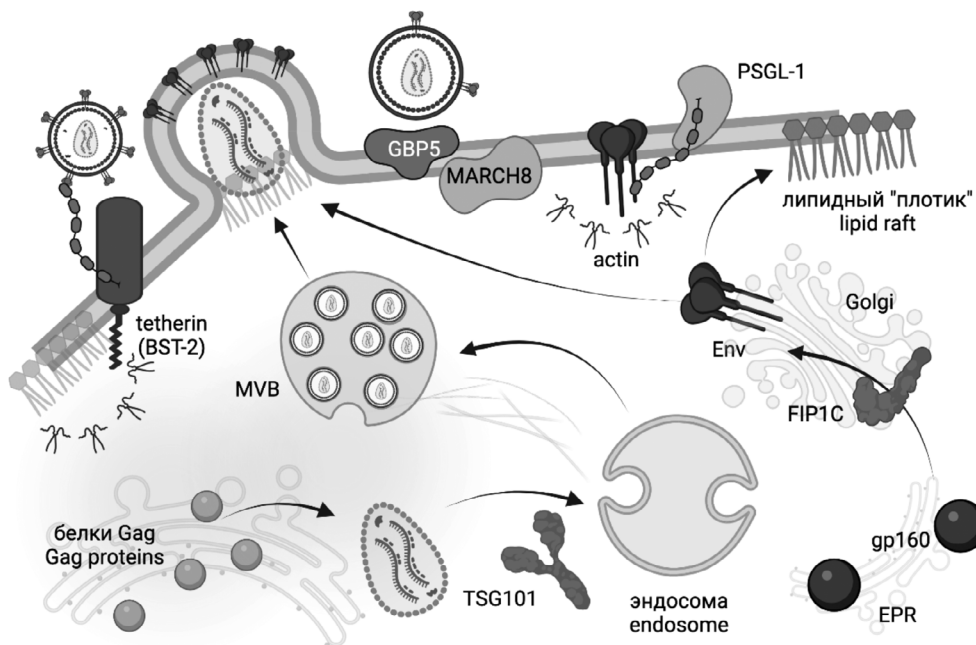


Рис. 10. Сборка и почкование вирусных частиц ВИЧ.

Fig. 10. Assembly and budding of HIV viral particles.

временно захватывать вновь образованные вирионы. BST-2 связывает между собой липидные «плотки» и молекулы актина, тем самым непосредственно ограничивая подвижность вирионов в тот момент, когда они уже готовы отделиться от мембраны [3, 16, 19, 56] (рис. 10). Тетерин существенно снижает заражение по типу «вирус–клетка» и в меньшей степени – по типу «клетка–

клетка» [16]; на этом основана точка зрения, в соответствии с которой заражение по типу «вирус–клетка» преимущественно происходит при передаче вируса, в то время как на стадии его распространения в организме путь «клетка–клетка» преобладает.

В роли антагониста BST-2 выступает вирусный белок Vpr, который связывает N-концевую область ци-

топлазматического домена BST-2, удаляет его из мембраны и стимулирует его деградацию по протеасомальному или лизосомальному пути; альтернативный вариант – простое вытеснение BST-2 из участка сборки вирионов [58]. Интересно, что у ВИЧ-2 нет белка Vpr, и его функцию берет на себя белок Nef [59].

Этот последний пример наводит на размышления, касающиеся совместной эволюции ВИЧ и его природных хозяев, наблюдающейся на протяжении многих десятков тысяч лет. Факторы рестрикции – клеточные белки, каждый из которых имеет функцию, связанную с жизнеобеспечением клетки. Нередко выполнение этой функции «пересекается» с репликативным циклом вируса и проявляется мощной ингибирующей активностью. Это обстоятельство поставило перед вирусом задачу приспособления, с которой он изобретательно справился, в ходе эволюции приобретя дополнительные белки, к тому же обладающие возможностью перекрывания и «подстраховки» обязанностей. Понимание структуры и функции этих вспомогательных белков и механизмов их взаимодействия с лигандами в клетке-хозяине может иметь важное значение для разработки новых методов лечения ВИЧ-инфекции.

Еще один аспект, касающийся будущих разработок, связан с детальным изучением природных функций самих клеточных факторов – как HDFs, так и RFs. Первые из них предположительно должны стать объектом ингибирования, а вторые быть стимулированы с целью ограничения размножения ВИЧ.

Разработка препаратов с ингибирующими свойствами – традиционная задача фармакологии, однако ингибирование клеточных белков с разнообразными функциями потенциально всегда таит в себе опасность нарушения метаболизма клетки и последующей за ним токсичности, поэтому вполне очевидно, что из множества HDFs значительная часть будет «отбракована» в ходе испытаний, и на это потребуются много времени. То же касается и RFs, при этом разработки стимуляторов имеют меньше примеров и требуют значительной креативности.

В этой связи интересна позиция авторов, предлагающих провести испытания противовирусной активности препаратов, применяемых для лечения других заболеваний – как инфекционных, так и неинфекционных. Примеры такого рода имеются в истории разработки антиретровирусных средств; например, легендарный азидотимидин был изобретен как препарат с широким антибактериальным и противопаразитарным эффектом [60]. Есть сведения о том, что препараты для коррекции липидного обмена (статины) оказываются эффективны в предотвращении роста вирусной нагрузки у ВИЧ-инфицированных пациентов [61], хотя механизм этого эффекта остается непонятен. Очевидное достоинство «старых» препаратов заключается в том, что для их внедрения не потребуются долгие годы предварительных клинических испытаний.

Наконец, перспективной представляется мысль о том, чтобы сделать объектом антиретровирусного воздействия не сами вирусные и клеточные белки, а возможность их контакта – так называемый интер-

актом (interactome) «вирус–хозяин» [7], и обеспечить таким образом прерывание ключевых взаимодействий хозяина с вирусом. Примером такого рода могут быть описанные выше аллостерические ингибиторы LEDGINS, играющие роль «распорки» между вирусным белком IN и клеточным фактором LEDGF.

Итак, участие различных клеточных образований в патогенезе ВИЧ-инфекции становится все более очевидным. В настоящем обзоре сделана попытка кратко представить некоторые из внутриклеточных и молекулярных взаимодействий вирусных и клеточных белков, известных на сегодняшний день. Идентификация и исследование множества белков клетки, эксплуатируемых вирусом на всех этапах жизненного цикла, представляет большие возможности для АРТ. Клеточные мишени особенно привлекательны тем, что практически не подвержены мутационным изменениям, а значит, проблема лекарственной устойчивости для них существенно менее актуальна, чем для вирусных мишеней. Тем не менее, прежде чем имеющиеся знания станут основой для разработки новых лекарственных препаратов, нужно получить ответы на многие вопросы. Следует выяснять, насколько явления и процессы, наблюдаемые пока в основном в условиях *in vitro*, соответствуют реальности *in vivo*; какие из активностей клеточных белков могут быть ингибированы без заметного ущерба для метаболизма самой клетки; функцию каких факторов можно «выключить» без ощутимых физиологических последствий. За результатами этих исследований мы будем с интересом наблюдать в ближайшие годы.

ЛИТЕРАТУРА


1. Roa-Linares V.C., Escudero-Florez M., Vicente-Manzanares M., Gallego-Gomez J.C. Host cell targets for unconventional antivirals against RNA viruses. *Viruses*. 2023; 15(3): 776. <https://doi.org/10.3390/v15030776>
2. Bolinger C., Boris-Lawrie K. Mechanisms employed by retroviruses to exploit host factors for translational control of a complicated proteome. *Retrovirology*. 2009; 6: 8. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-6-8>
3. Colomer-Lluch M., Ruiz A., Moris A., Prado J.G. Restriction factors: from intrinsic viral restriction to shaping cellular immunity against HIV-1. *Front. Immunol.* 2018; 9: 2876. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02876>
4. Ghimire D., Rai M., Gaur R. Novel host restriction factors implicated in HIV-1 replication. *J. Gen. Virol.* 2018; 99(4): 435–46. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001026>
5. Puhl A.C., Garzino Demo A., Makarov V.A., Ekins S. New targets for HIV drug discovery. *Drug Discov. Today*. 2019; 24(5): 1139–47. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.03.013>
6. Schaller T., Herold N. The early bird catches the worm – can evolution teach us lessons in fighting HIV? *Curr. HIV Res.* 2016; 14(3): 183–210. <https://doi.org/10.2174/1570162x14999160224094914>
7. Shukla E., Chauhan R. Host-HIV-1 interactome: a quest for novel therapeutic intervention. *Cells*. 2019; 8(10): 1155. <https://doi.org/10.3390/cells8101155>
8. Brass A.L., Dykxhoorn D.M., Benita Y., Yan N., Engelman A., Xavier R.J., et al. Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. *Science*. 2008; 319(5865): 921–6. <https://doi.org/10.1126/science.1152725>
9. Goffinet C. Cellular antiviral factors that target particle infectivity of HIV-1. *Curr. HIV Res.* 2016; 14(3): 211–6. <https://doi.org/10.2174/1570162x14666151216145521>
10. Alvarez V., Lopez-Larrea C., Coto E. Mutational analysis of the CCR5 and CXCR4 genes (HIV-1 co-receptors) in resistance to HIV-1 infection and AIDS development among intravenous drug users. *Hum. Genet.* 1998; 102(4): 483–6. <https://doi.org/10.1007/s004390050726>

11. Cohn S.K. Jr., Weaver L.T. The black death and AIDS: CCR5-Delta32 in genetics and history. *QJM*. 2006; 99(8): 497–503. <https://doi.org/10.1093/qjmed/hcl076>
12. Dean M., Carrington M., Winkler C., Huttley G.A., Smith M.W., Allikmets R., et al. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science*. 1996; 273(5283): 1856–62. <https://doi.org/10.1126/science.273.5283.1856>
13. Tsui C.K., Gupta A., Bassik M.C. Finding host targets for HIV therapy. *Nat. Genet.* 2017; 49(2): 175–6. <https://doi.org/10.1038/ng.3777>
14. Park R.J., Wang T., Koundakjian D., Hultquist J.F., Lamothe-Molina P., Monel B., et al. A genome-wide CRISPR screen identifies a restricted set of HIV host dependency factors. *Nat. Gen.* 2017; 49(2): 193–203. <https://doi.org/10.1038/ng.3741>
15. Blumenthal R., Durell S., Viard M. HIV entry and envelope glycoprotein-mediated fusion. *J. Biol. Chem.* 2012; 287(49): 40841–9. <https://doi.org/10.1074/jbc.r112.406272>
16. Hadpech S., Moonmuang S., Chupradit K., Yasamut U., Tayapiwatana C. Updating on roles of HIV intrinsic factors: A review of their antiviral mechanisms and emerging functions. *Intervirology*. 2022; 65(2): 67–79. <https://doi.org/10.1159/000519241>
17. Gonzalez-Enriquez G.V., Escoto-Delgadillo M., Vazquez-Valls E., Torres-Mendoza B.M. SERINC as a Restriction Factor to Inhibit Viral Infectivity and the Interaction with HIV. *J. Immunol. Res.* 2017; 2017: 1548905. <https://doi.org/10.1155/2017/1548905>
18. Tedbury P.R., Sarafianos S.G. Exposing HIV's weaknesses. *J. Biol. Chem.* 2017; 292(14): 6027–8. <https://doi.org/10.1074/jbc.h117.777714>
19. Lopez Hernandez M., Lopez De Lucio S. Accessory regulatory proteins of HIV-1 and host restriction factors interactions. *Biomed. J. Sci. Tech. Res.* 2020; 31(4): 24308–12. <https://doi.org/10.26717/BJSTR.2020.31.005120>
20. Huérfano S., Šroller V., Bruštková K., Horníková L., Forstová J. The interplay between viruses and host DNA sensors. *Viruses*. 2022; 14(4): 666. <https://doi.org/10.3390/v14040666>
21. Yin X., Langer S., Zhang Z., Herbert K.M., Yoh S., König R., et al. Sensor sensibility-HIV-1 and the innate immune response. *Cells*. 2020; 9(1): 254. <https://doi.org/10.3390/cells9010254>
22. Yamashita M., Engelman A.N. Capsid-dependent host factors in HIV-1 infection. *Trends Microbiol.* 2017; 25(9): 741–55. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.04.004>
23. Ramdas P., Sahu A.K., Mishra T., Bhardwaj V., Chande A. From entry to egress: strategic exploitation of the cellular processes by HIV-1. *Front. Microbiol.* 2020; 11: 559792. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.559792>
24. Malim M.H., Bieniasz P.D. HIV restriction factors and mechanisms of evasion. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2012; 2(5): a006940. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006940>
25. van Manen D., Rits M.A., Beugeling C., van Dort K., Schuitemaker H., Kootstra N.A. The effect of Trim5 polymorphisms on the clinical course of HIV-1 infection. *PLoS Pathog.* 2008; 4(2): e18. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0040018>
26. Kim K., Dauphin A., Komurlu S., McCauley S.M., Yurkovetskiy L., Carbone C., et al. Cyclophilin A protects HIV-1 from restriction by human TRIM5a. *Nat. Microbiol.* 2019; 4(12): 2044–51. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0592-5>
27. Harris R.S., Hultquist J.F., Evans D.T. The restriction factors of human immunodeficiency virus. *J. Biol. Chem.* 2012; 287(49): 40875–83. <https://doi.org/10.1074/jbc.r112.416925>
28. Engelman A., Cherepanov P. The lentiviral integrase binding protein LEDGF/p75 and HIV-1 replication. *PLoS Pathog.* 2008; 4(3): e1000046. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000046>
29. Renzi G., Carta F., Supuran C.T. The integrase: an overview of a key player enzyme in the antiviral scenario. *Int. J. Mol. Sci.* 2023; 24(15): 12187. <https://doi.org/10.3390/ijms241512187>
30. Lee M.S., Craigie R. A previously unidentified host protein protects retroviral DNA from autointegration. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1998; 95(4): 1528–33. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.4.1528>
31. Bin Hamid F., Kim J., Shin C.G. Cellular and viral determinants of retroviral nuclear entry. *Can. J. Microbiol.* 2016; 62(1): 1–15. <https://doi.org/10.1139/cjm-2015-0350>
32. Tingey M., Li Y., Yu W., Young A., Yang W. Spelling out the roles of individual nucleoporins in nuclear export of mRNA. *Nucleus*. 2022; 13(1): 170–93. <https://doi.org/10.1080/19491034.2022.2076965>
33. Endsley M.A., Somasunderam A.D., Li G., Oezguen N., Thivyanathan V., Murray J.L., et al. Nuclear trafficking of the HIV-1 pre-integration complex depends on the ADAM10 intracellular domain. *Virology*. 2014; 454–455: 60–6. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.02.006>
34. Lee K., Ambrose Z., Martin T.D., Oztop I., Mulky A., Julias J.G., et al. Flexible use of nuclear import pathways by HIV-1. *Cell Host Microbe*. 2010; 7(3): 221–33. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.02.007>
35. Kane M., Yadav S.S., Bitzegeio J., Kutluay S.B., Zang T., Wilson S.J., et al. MX2 is an interferon-induced inhibitor of HIV-1 infection. *Nature*. 2013; 502(7472): 563–6. <https://doi.org/10.1038/nature12653>
36. Wei W., Guo H., Ma M., Markham R., Yu X.F. Accumulation of MxB/Mx2-resistant HIV-1 capsid variants during expansion of the HIV-1 epidemic in human populations. *EBioMedicine*. 2016; 8: 230–6. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.04.020>
37. Lelek M., Casartelli N., Pellin D., et al. Chromatin organization at the nuclear pore favours HIV replication. *Nat. Commun.* 2015; 6: 6483. <https://doi.org/10.1038/ncomms7483>
38. Demeulemeester J., De Rijck J., Gijssbers R., Debyser Z. Retroviral integration: Site matters: Mechanisms and consequences of retroviral integration site selection. *Bioessays*. 2015; 37(11): 1202–14. <https://doi.org/10.1002/bies.201500051>
39. Bedwell G.J., Engelman A.N. Factors that mold the nuclear landscape of HIV-1 integration. *Nucleic Acids Res.* 2021; 49(2): 621–35. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1207>
40. Saito A., Henning M.S., Serrao E., Dubose B.N., Teng S., Huang J., et al. Capsid-CPSF6 interaction is dispensable for HIV-1 replication in primary cells but is selected during virus passage in vivo. *J. Virol.* 2016; 90(15): 6918–35. <https://doi.org/10.1128/jvi.00019-16>
41. Maillot B., Lévy N., Eiler S., Crucifix C., Granger F., Richert L., et al. Structural and functional role of IN1 and LEDGF in the HIV-1 preintegration complex. *PLoS One*. 2013; 8(4): e60734. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060734>
42. Lapailierie D., Lelandais B., Mauro E., Lagadec F., Tumiotto C., Miskey C., et al. Modulation of the intrinsic chromatin binding property of HIV-1 integrase by LEDGF/p75. *Nucleic Acids Res.* 2021; 49(19): 11241–56. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab886>
43. Christ F., Voet A., Marchand A., Nicolet S., Besimie B.A., Marchand D., et al. Rational design of small-molecule inhibitors of the LEDGF/p75-integrase interaction and HIV replication. *Nat. Chem. Biol.* 2010; 6(6): 442–8. <https://doi.org/10.1038/nchembio.370>
44. Desimie B.A., Schrijvers R., Demeulemeester J., Borrenberghs D., Weydert C., Thys W., et al. LEDGINS inhibit late stage HIV-1 replication by modulating integrase multimerization in the virions. *Retrovirology*. 2013; 10: 57. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-10-57>
45. Le Rouzic E., Bonnard D., Chasset S., Bruneau J.M., Chevreuil F., Le Strat F., et al. Dual inhibition of HIV-1 replication by integrase-LEDGF allosteric inhibitors is predominant at the post-integration stage. *Retrovirology*. 2013; 10: 144. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-10-144>
46. Vranckx L.S., Demeulemeester J., Saleh S., Boll A., Vansant G., Schrijvers R., et al. LEDGIN-mediated inhibition of integrase-LEDGF/p75 interaction reduces reactivation of residual latent HIV. *EBioMedicine*. 2016; 8: 248–64. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.04.039>
47. Bruggemans A., Vansant G., Balakrishnan M., Mitchell M.L., Cai R., Christ F., et al. GS-9822, a preclinical LEDGIN candidate, displays a block-and-lock phenotype in cell culture. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2023; 65(5): e02328-20. <https://doi.org/10.1128/aac.02328-20>
48. Debyser Z., Bruggemans A., Van Belle S., Janssens J., Christ F. LEDGINS, inhibitors of the interaction between HIV-1 integrase and LEDGF/p75, are potent antivirals with a potential to cure HIV infection. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2021; 1322: 97–114. https://doi.org/10.1007/978-981-16-0267-2_4
49. Romani B., Allahbakhshi E. Underlying mechanisms of HIV-1 latency. *Virus Genes*. 2017; 53(3): 329–39. <https://doi.org/10.1007/s11262-017-1443-1>
50. Wang S., Qiu L., Yan X., Jin W., Wang Y., Chen L., et al. Loss of microRNA 122 expression in patients with hepatitis B enhances hepatitis B virus replication through cyclin G(1)-modulated P53 activity. *Hepatology*. 2012; 55(3): 730–41. <https://doi.org/10.1002/hep.24809>
51. Бобкова М.Р. *Латентность ВИЧ*. М.: Человек; 2021.
52. Кузнецова А.И., Громов К.Б., Киреев Д.Е., Шлыкова А.В., Лопатухин А.Э., Казеннова Е.В. и др. Анализ особенностей

- белка Tat вируса иммунодефицита человека 1 типа суб-суб-типа A6 (Retroviridae: Orthoretrovirinae: Lentivirus: Human immunodeficiency virus-1). *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(6): 452–64. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-83> <https://elibrary.ru/cmzgyz> (in Russian)
53. Nchioua R., Bosso M., Kmiec D., Kirchhoff F. Cellular factors targeting HIV-1 transcription and viral RNA transcripts. *Viruses*. 2020; 12(5): 495. <https://doi.org/10.3390/v12050495>
 54. Mousseau G., Valente S.T. Role of host factors on the regulation of tat-mediated HIV-1 transcription. *Curr. Pharm. Des.* 2017; 23(28): 4079–90. <https://doi.org/10.2174/1381612823666170622104355>
 55. Naji S., Ambrus G., Cimermančič P., Reyes J.R., Johnson J.R., Filbrandt R., et al. Host cell interactome of HIV-1 Rev includes RNA helicases involved in multiple facets of virus production. *Mol. Cell. Proteomics*. 2012; 11(4): M111.015313. <https://doi.org/10.1074/mcp.m111.015313>
 56. Lerner G., Weaver N., Anokhin B., Spearman P. Advances in HIV-1 assembly. *Viruses*. 2022; 14(3): 478. <https://doi.org/10.3390/v14030478>
 57. Rose K.M. When in need of an ESCRT: The nature of virus assembly sites suggests mechanistic parallels between nuclear virus egress and retroviral budding. *Viruses*. 2021; 13(6): 1138. <https://doi.org/10.3390/v13061138>
 58. Sauter D. Counteraction of the multifunctional restriction factor tethrin. *Front. Microbiol.* 2014; 5: 163. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00163>
 59. McNatt M.W., Zang T., Bieniasz P.D. Vpu binds directly to tetherin and displaces it from nascent virions. *PLoS Pathog.* 2013; 9(4): e1003299. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003299>
 60. Pattishal K. Discovery and development of Zidovudine as the cornerstone of therapy to control human immunodeficiency virus infection. In: Adams J., Merluzzi V.J., eds. *The Search for Antiviral Drugs: Case Histories from Concept to Clinic*. Boston, MA: Birkhäuser; 1993.
 61. Drechsler H., Ayers C., Cutrell J., Maalouf N., Tebas P., Bedimo R. Current use of statins reduces risk of HIV rebound on suppressive HAART. *PLoS One*. 2017; 12(3): e0172175. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172175>
- ### REFERENCES
1. Roa-Linares V.C., Escudero-Florez M., Vicente-Manzanares M., Gallego-Gomez J.C. Host cell targets for unconventional antivirals against RNA viruses. *Viruses*. 2023; 15(3): 776. <https://doi.org/10.3390/v15030776>
 2. Bolinger C., Boris-Lawrie K. Mechanisms employed by retroviruses to exploit host factors for translational control of a complicated proteome. *Retrovirology*. 2009; 6: 8. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-6-8>
 3. Colomer-Lluch M., Ruiz A., Moris A., Prado J.G. Restriction factors: from intrinsic viral restriction to shaping cellular immunity against HIV-1. *Front. Immunol.* 2018; 9: 2876. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02876>
 4. Ghimire D., Rai M., Gaur R. Novel host restriction factors implicated in HIV-1 replication. *J. Gen. Virol.* 2018; 99(4): 435–46. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001026>
 5. Puhl A.C., Garzino Demo A., Makarov V.A., Ekins S. New targets for HIV drug discovery. *Drug Discov. Today*. 2019; 24(5): 1139–47. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.03.013>
 6. Schaller T., Herold N. The early bird catches the worm – can evolution teach us lessons in fighting HIV? *Curr. HIV Res.* 2016; 14(3): 183–210. <https://doi.org/10.2174/1570162x14999160224094914>
 7. Shukla E., Chauhan R. Host-HIV-1 interactome: a quest for novel therapeutic intervention. *Cells*. 2019; 8(10): 1155. <https://doi.org/10.3390/cells8101155>
 8. Brass A.L., Dykxhoorn D.M., Benita Y., Yan N., Engelman A., Xavier R.J., et al. Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. *Science*. 2008; 319(5865): 921–6. <https://doi.org/10.1126/science.1152725>
 9. Goffinet C. Cellular antiviral factors that target particle infectivity of HIV-1. *Curr. HIV Res.* 2016; 14(3): 211–6. <https://doi.org/10.2174/1570162x14666151216145521>
 10. Alvarez V., Lopez-Larrea C., Coto E. Mutational analysis of the CCR5 and CXCR4 genes (HIV-1 co-receptors) in resistance to HIV-1 infection and AIDS development among intravenous drug users. *Hum. Genet.* 1998; 102(4): 483–6. <https://doi.org/10.1007/s004390050726>
 11. Cohn S.K. Jr., Weaver L.T. The black death and AIDS: CCR5-Delta32 in genetics and history. *QJM*. 2006; 99(8): 497–503. <https://doi.org/10.1093/qjmed/hcl076>
 12. Dean M., Carrington M., Winkler C., Huttley G.A., Smith M.W., Allikmets R., et al. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CCR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science*. 1996; 273(5283): 1856–62. <https://doi.org/10.1126/science.273.5283.1856>
 13. Tsui C.K., Gupta A., Bassik M.C. Finding host targets for HIV therapy. *Nat. Genet.* 2017; 49(2): 175–6. <https://doi.org/10.1038/ng.3777>
 14. Park R.J., Wang T., Koundakjian D., Hultquist J.F., Lamothe-Molina P., Monel B., et al. A genome-wide CRISPR screen identifies a restricted set of HIV host dependency factors. *Nat. Gen.* 2017; 49(2): 193–203. <https://doi.org/10.1038/ng.3741>
 15. Blumenthal R., Durell S., Viard M. HIV entry and envelope glycoprotein-mediated fusion. *J. Biol. Chem.* 2012; 287(49): 40841–9. <https://doi.org/10.1074/jbc.r112.406272>
 16. Hadpech S., Moonmuang S., Chupradit K., Yasamut U., Tayapiwatana C. Updating on roles of HIV intrinsic factors: A review of their antiviral mechanisms and emerging functions. *Intervirology*. 2022; 65(2): 67–79. <https://doi.org/10.1159/000519241>
 17. Gonzalez-Enriquez G.V., Escoto-Delgadillo M., Vazquez-Valls E., Torres-Mendoza B.M. SERINC as a Restriction Factor to Inhibit Viral Infectivity and the Interaction with HIV. *J. Immunol. Res.* 2017; 2017: 1548905. <https://doi.org/10.1155/2017/1548905>
 18. Tedbury P.R., Sarafianos S.G. Exposing HIV's weaknesses. *J. Biol. Chem.* 2017; 292(14): 6027–8. <https://doi.org/10.1074/jbc.h117.777714>
 19. Lopez Hernandez M., Lopez De Lucio S. Accessory regulatory proteins of HIV-1 and host restriction factors interactions. *Biomed. J. Sci. Tech. Res.* 2020; 31(4): 24308–12. <https://doi.org/10.26717/BJSTR.2020.31.005120>
 20. Huérffano S., Šroller V., Bruštková K., Horníková L., Forstová J. The interplay between viruses and host DNA sensors. *Viruses*. 2022; 14(4): 666. <https://doi.org/10.3390/v14040666>
 21. Yin X., Langer S., Zhang Z., Herbert K.M., Yoh S., König R., et al. Sensor sensibility-HIV-1 and the innate immune response. *Cells*. 2020; 9(1): 254. <https://doi.org/10.3390/cells9010254>
 22. Yamashita M., Engelman A.N. Capsid-dependent host factors in HIV-1 infection. *Trends Microbiol.* 2017; 25(9): 741–55. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.04.004>
 23. Ramdas P., Sahu A.K., Mishra T., Bhardwaj V., Chande A. From entry to egress: strategic exploitation of the cellular processes by HIV-1. *Front. Microbiol.* 2020; 11: 559792. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.559792>
 24. Malim M.H., Bieniasz P.D. HIV restriction factors and mechanisms of evasion. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2012; 2(5): a006940. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006940>
 25. van Manen D., Rits M.A., Beugeling C., van Dort K., Schuitemaker H., Kootstra N.A. The effect of Trim5 polymorphisms on the clinical course of HIV-1 infection. *PLoS Pathog.* 2008; 4(2): e18. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0040018>
 26. Kim K., Dauphin A., Komurlu S., McCauley S.M., Yurkovetskiy L., Carbone C., et al. Cyclophilin A protects HIV-1 from restriction by human TRIM5α. *Nat. Microbiol.* 2019; 4(12): 2044–51. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0592-5>
 27. Harris R.S., Hultquist J.F., Evans D.T. The restriction factors of human immunodeficiency virus. *J. Biol. Chem.* 2012; 287(49): 40875–83. <https://doi.org/10.1074/jbc.r112.416925>
 28. Engelman A., Cherepanov P. The lentiviral integrase binding protein LEDGF/p75 and HIV-1 replication. *PLoS Pathog.* 2008; 4(3): e1000046. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000046>
 29. Renzi G., Carta F., Supuran C.T. The integrase: an overview of a key player enzyme in the antiviral scenario. *Int. J. Mol. Sci.* 2023; 24(15): 12187. <https://doi.org/10.3390/ijms241512187>
 30. Lee M.S., Craigie R. A previously unidentified host protein protects retroviral DNA from autointegration. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1998; 95(4): 1528–33. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.4.1528>
 31. Bin Hamid F., Kim J., Shin C.G. Cellular and viral determinants of retroviral nuclear entry. *Can. J. Microbiol.* 2016; 62(1): 1–15. <https://doi.org/10.1139/cjm-2015-0350>
 32. Tingey M., Li Y., Yu W., Young A., Yang W. Spelling out the roles of individual nucleoporins in nuclear export of mRNA. *Nucleus*. 2022; 13(1): 170–93. <https://doi.org/10.1080/19491034.2022.2076965>

33. Endsley M.A., Somasunderam A.D., Li G., Oezguen N., Thiviyanathan V., Murray J.L., et al. Nuclear trafficking of the HIV-1 pre-integration complex depends on the ADAM10 intracellular domain. *Virology*. 2014; 454-455: 60–6. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.02.006>
34. Lee K., Ambrose Z., Martin T.D., Oztop I., Mulky A., Julias J.G., et al. Flexible use of nuclear import pathways by HIV-1. *Cell Host Microbe*. 2010; 7(3): 221–33. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.02.007>
35. Kane M., Yadav S.S., Bitzegeio J., Kutluay S.B., Zang T., Wilson S.J., et al. MX2 is an interferon-induced inhibitor of HIV-1 infection. *Nature*. 2013; 502(7472): 563–6. <https://doi.org/10.1038/nature12653>
36. Wei W., Guo H., Ma M., Markham R., Yu X.F. Accumulation of MxB/Mx2-resistant HIV-1 capsid variants during expansion of the HIV-1 epidemic in human populations. *EBioMedicine*. 2016; 8: 230–6. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.04.020>
37. Lelek M., Casartelli N., Pellin D., et al. Chromatin organization at the nuclear pore favours HIV replication. *Nat. Commun.* 2015; 6: 6483. <https://doi.org/10.1038/ncomms7483>
38. Demeulemeester J., De Rijck J., Gijsbers R., Debysers Z. Retroviral integration: Site matters: Mechanisms and consequences of retroviral integration site selection. *Bioessays*. 2015; 37(11): 1202–14. <https://doi.org/10.1002/bies.201500051>
39. Bedwell G.J., Engelman A.N. Factors that mold the nuclear landscape of HIV-1 integration. *Nucleic Acids Res.* 2021; 49(2): 621–35. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1207>
40. Saito A., Henning M.S., Serrao E., Dubose B.N., Teng S., Huang J., et al. Capsid-CPSF6 interaction is dispensable for HIV-1 replication in primary cells but is selected during virus passage in vivo. *J. Virol.* 2016; 90(15): 6918–35. <https://doi.org/10.1128/jvi.00019-16>
41. Maillot B., Lévy N., Eiler S., Crucifix C., Granger F., Richert L., et al. Structural and functional role of IN1 and LEDGF in the HIV-1 preintegration complex. *PLoS One*. 2013; 8(4): e60734. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060734>
42. Lapaillierie D., Lelandais B., Mauro E., Lagadec F., Tumiottio C., Miskey C., et al. Modulation of the intrinsic chromatin binding property of HIV-1 integrase by LEDGF/p75. *Nucleic Acids Res.* 2021; 49(19): 11241–56. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab886>
43. Christ F., Voet A., Marchand A., Nicolet S., Desimmi B.A., Marchand D., et al. Rational design of small-molecule inhibitors of the LEDGF/p75-integrase interaction and HIV replication. *Nat. Chem. Biol.* 2010; 6(6): 442–8. <https://doi.org/10.1038/nchembio.370>
44. Desimmi B.A., Schrijvers R., Demeulemeester J., Borrenberghs D., Weydert C., Thys W., et al. LEDGINS inhibit late stage HIV-1 replication by modulating integrase multimerization in the virions. *Retrovirology*. 2013; 10: 57. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-10-57>
45. Le Rouzic E., Bonnard D., Chasset S., Bruneau J.M., Chevreuril F., Le Strat F., et al. Dual inhibition of HIV-1 replication by integrase-LEDGF allosteric inhibitors is predominant at the post-integration stage. *Retrovirology*. 2013; 10: 144. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-10-144>
46. Vranckx L.S., Demeulemeester J., Saleh S., Boll A., Vansant G., Schrijvers R., et al. LEDGIN-mediated inhibition of integrase-LEDGF/p75 interaction reduces reactivation of residual latent HIV. *EBioMedicine*. 2016; 8: 248–64. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.04.039>
47. Bruggemans A., Vansant G., Balakrishnan M., Mitchell M.L., Cai R., Christ F., et al. GS-9822, a preclinical LEDGIN candidate, displays a block-and-lock phenotype in cell culture. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2023; 65(5): e02328-20. <https://doi.org/10.1128/aac.02328-20>
48. Debysers Z., Bruggemans A., Van Belle S., Janssens J., Christ F. LEDGINS, inhibitors of the interaction between HIV-1 integrase and LEDGF/p75, are potent antivirals with a potential to cure HIV infection. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2021; 1322: 97–114. https://doi.org/10.1007/978-981-16-0267-2_4
49. Romani B., Allahbakhshi E. Underlying mechanisms of HIV-1 latency. *Virus Genes*. 2017; 53(3): 329–39. <https://doi.org/10.1007/s11262-017-1443-1>
50. Wang S., Qiu L., Yan X., Jin W., Wang Y., Chen L., et al. Loss of microRNA 122 expression in patients with hepatitis B enhances hepatitis B virus replication through cyclin G(1)-modulated P53 activity. *Hepatology*. 2012; 55(3): 730–41. <https://doi.org/10.1002/hep.24809>
51. Bobkova M.R. *HIV Latency [Latentmost' VICH]*. Moscow: Chelovek; 2021. (in Russian)
52. Kuznetsova A.I., Gromov K.B., Kireev D.E., Shlykova A.V., Lopatukhin A.E., Kazennova E.V., et al. Analysis of Tat protein characteristics in human immunodeficiency virus type 1 subtype A6 (Retroviridae: Orthoretrovirinae: Lentivirus: Human immunodeficiency virus-1). *Voprosy virusologii*. 2022; 66(6): 452–64. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-83>
53. Nchioua R., Bosso M., Kmiec D., Kirchhoff F. Cellular factors targeting HIV-1 transcription and viral RNA transcripts. *Viruses*. 2020; 12(5): 495. <https://doi.org/10.3390/v12050495>
54. Mousseau G., Valente S.T. Role of host factors on the regulation of tat-mediated HIV-1 transcription. *Curr. Pharm. Des.* 2017; 23(28): 4079–90. <https://doi.org/10.2174/1381612823666170622104355>
55. Naji S., Ambrus G., Cimermančić P., Reyes J.R., Johnson J.R., Filbrandt R., et al. Host cell interactome of HIV-1 Rev includes RNA helicases involved in multiple facets of virus production. *Mol. Cell. Proteomics*. 2012; 11(4): M111.015313. <https://doi.org/10.1074/mcp.m111.015313>
56. Lerner G., Weaver N., Anokhin B., Spearman P. Advances in HIV-1 assembly. *Viruses*. 2022; 14(3): 478. <https://doi.org/10.3390/v14030478>
57. Rose K.M. When in need of an ESCRT: The nature of virus assembly sites suggests mechanistic parallels between nuclear virus egress and retroviral budding. *Viruses*. 2021; 13(6): 1138. <https://doi.org/10.3390/v13061138>
58. Sauter D. Counteraction of the multifunctional restriction factor tetherin. *Front. Microbiol.* 2014; 5: 163. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00163>
59. McNatt M.W., Zang T., Bieniasz P.D. Vpu binds directly to tetherin and displaces it from nascent virions. *PLoS Pathog.* 2013; 9(4): e1003299. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003299>
60. Pattishal K. Discovery and development of Zidovudine as the cornerstone of therapy to control human immunodeficiency virus infection. In: Adams J., Merluzzi V.J., eds. *The Search for Antiviral Drugs: Case Histories from Concept to Clinic*. Boston, MA: Birkhäuser; 1993.
61. Drechsler H., Ayers C., Cutrell J., Maalouf N., Tebas P., Bedimo R. Current use of statins reduces risk of HIV rebound on suppressive HAART. *PLoS One*. 2017; 12(3): e0172175. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172175>


Информация об авторе:

Бобкова Марина Ридовна  – д-р биол. наук, главный специалист лаборатории биологии лентивирусов ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия. E-mail: mrbobkova@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-5481-8957>

Вклад автора: концепция обзора, проведение поисково-аналитической работы, создание рисунков, подготовка и написание статьи.

Поступила 10.11.2023
Принята в печать 21.12.2023
Опубликована 29.12.2023

Information about the author:

Marina R. Bobkova  – Dr. Sci. (Biol.), Chief Researcher of the laboratory of biology of lentiviruses I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia. E-mail: mrbobkova@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-5481-8957>

Contribution: conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, creating of figures, drafting and revising the work, final approval.

Received 10 November 2023
Accepted 21 December 2023
Published 29 December 2023

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕDOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-192>

© РОЕВ Г.В., БОРИСОВА Н.И., ЧИСТЯКОВА Н.В., ВЫХОДЦЕВА А.В., АКИМКИН В.Г., ХАФИЗОВ К.Ф., 2023



Бастровирусы (*Astroviridae*): генетическое разнообразие и потенциальное влияние на здоровье человека и животных

Роев Г.В.^{1,2}, Борисова Н.И.¹, Чистякова Н.В.³, Выходцева А.В.¹, Акимкин В.Г.¹, Хафизов К.Ф.¹✉¹ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, 111123, г. Москва, Россия;²ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», 115184, г. Долгопрудный, Россия;³ФБУН «Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова» РАН, 119071, г. Москва, Россия**Резюме****Введение.** Бастровирусы были обнаружены в Нидерландах в 2016 г. в кале человека. Они демонстрируют частичное генетическое сходство с астровирусами, а также вирусами гепатита E. Их связь с возникновением заболеваний пока не была установлена.**Цель работы.** Получение новой генетической информации о бастровирусах, циркулирующих среди летучих мышей на территории России.**Материалы и методы.** Было проведено метагеномное секвенирование образцов фекалий летучих мышей вида *Nyctalus noctula*, выловленных на территории РФ в 2023 г. Собрано два почти полных генома бастровирусов. Был оценен зоонозный потенциал данных вирусов методами машинного обучения, изучена их рекомбинация, а также построены филогенетические деревья.**Результаты.** *De novo* был собран почти полный геном (длина около 5800 оснований) нового бастровируса в одном из образцов, он был использован как референс для получения другого генома в другом образце. Зоонозный потенциал вируса одного из этих образцов методами машинного обучения был оценен как высокий. Показано существование рекомбинации между структурным и неструктурным полипротеинами.**Заключение.** Первое обнаружение бастровируса на территории РФ дополняет мировые данные о широте ареала его распространения. Наличие рекомбинации между полипротеинами и высокий зоонозный потенциал вируса подчеркивают важность его дальнейшего изучения.**Ключевые слова:** бастровирусы; NGS; метагеномика; летучие мыши**Для цитирования:** Роев Г.В., Борисова Н.И., Чистякова Н.В., Выходцева А.В., Акимкин В.Г., Хафизов К.Ф. Бастровирусы (*Astroviridae*): открытие, разнообразие и потенциальное влияние на здоровье человека и животных. *Вопросы вирусологии*. 2023; 68(6): 505–512. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-192> EDN: <https://elibrary.ru/iqblwy>**Финансирование.** Работа поддержана грантом РФ 22-24-00078.**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.**Этическое утверждение.** Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus author guidelines for animal use (IAVES 23 July 2010). Протокол исследования одобрен Комиссией по биоэтике ИПЭЭ РАН им. А.Н. Северцова (Протокол № 50 от 07.08.2021).

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-192>

Bastroviruses (*Astroviridae*): genetic diversity and potential impact on human and animal health

German V. Roev^{1,2}, Nadezhda I. Borisova¹, Nadezhda V. Chistyakova³,
Anastasia V. Vyhotdseva¹, Vasilii G. Akimkin¹, Kamil F. Khafizov¹✉

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

²Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), 115184, Dolgoprudny, Russia;

³A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution of the Russian Academy of Sciences, 119071, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. Bastroviruses were discovered in the Netherlands in 2016 in human stool samples and show partial genetic similarities to astroviruses and hepatitis E viruses. Their association with disease onset has not yet been established.

Materials and methods. Metagenomic sequencing of fecal samples of *Nyctalus noctula* bats collected in the Russian Federation in 2023 was performed. Two almost complete genomes of bastroviruses were assembled. The zoonotic potential of these viruses was assessed using machine learning methods, their recombination was studied, and phylogenetic trees were constructed.

Results. A nearly complete bastrovirus genome was de novo assembled in one of the samples, and it was used to assemble another genome in another sample. The zoonotic potential of the virus from one of these samples was estimated as high. The existence of recombination between structural and non-structural polyproteins was demonstrated.

Conclusion. Two bastrovirus genomes were assembled, phylogenetic and recombination analyses were performed, and the zoonotic potential was evaluated.

Keywords: *bastroviruses*; NGS; *metagenomics*; *bats*

For citation: Roev G.V., Borisova N.I., Chistyakova N.V., Vyhotdseva A.V., Akimkin V.G., Khafizov K.F. Bastroviruses (*Astroviridae*): genetic diversity and potential impact on human and animal health. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2023; 68(6): 505-512. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-192> EDN: <https://elibrary.ru/iqblwy>

Funding. The research was funded by the RSF grant 22-24-00078.

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

Ethics approval. Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with Consensus author guidelines for animal use (IAVES 23 July 2010). The research protocol was approved by the Severtsov Institute Bioethics commission (Protocol No. 50 dated 07.08.2021).

Введение

В 2016 г. в Нидерландах при проведении метагеномного секвенирования 200 образцов кала людей был найден ранее неизвестный РНК-вирус [1]. В 7 из этих образцов был идентифицирован новый патоген, имеющий некоторое генетическое сходство с астровирусом и вирусом гепатита E. Длина последовательностей варьировала от 6017 до 6339 оснований. Вирус во всех 7 образцах имел одну и ту же структуру генома, а сходство аминокислотных последовательностей предполагаемого неструктурного белка ORF1 варьировало от 67 до 93%. Аналогично, сходство потенциального структурного белка ORF2 составляло от 73 до 98%. Такая высокая степень разнообразия позволила авторам статьи сделать предположение, что бастровирус как инфекционный агент человека, скорее всего, циркулировал среди человека в течение длительного времени, а не появился недавно. Подобное разнообразие также может быть связано с возникновением в разных переносчиках инфекции и передачей человеку через загрязненную пищу или в качестве зоонозной инфекции от домашних животных, скота или диких животных. Все гено-

мы бастровирусов содержали схожие консервативные аминокислотные домены. Капсидный белок бастровирусов демонстрирует заметную вариабельность, особенно в начальной 40-нуклеотидной N-концевой и конечной 242-нуклеотидной C-концевой последовательностях. На C-конце капсидного белка обнаружено несколько антигенных эпитопов, имеющих длину более десяти аминокислот. Проведение вложенной полимеразной цепной реакции (ПЦР), направленной на выявление 5'-области генома, позволило идентифицировать бастровирус в 32 из 200 исследованных образцов фекалий. Однако явной корреляции между клиническим симптомом, таким как диарея, и наличием вируса выявлено не было [1].

С момента первоначального обнаружения бастровируса в фекалиях человека в 2016 г. его неоднократно определяли в различных образцах. В 2017 г. в сточных водах Бразилии был идентифицирован бастровирус с размером генома 5875 оснований. Идентичность его генома составила 56% по сравнению с ранее известными бастровирусами (GenBank: KX907135) [2]. Исследователи предположили, что его переносчиком может быть млекопитающее. В иссле-

довании 2018 г. бастровирус (GenBank: MG693175) был идентифицирован в 87 образцах фекалий летучих мышей двух разных видов в Камеруне [3]. В исследовании 2019 г. во время вспышки диареи свиней в США [4] в образцах фекалий был обнаружен геном бастровируса длиной 5881 основание с 84% идентичностью бастровирусу свиней (GenBank: KX907134), который впоследствии получил название PBastV-USA 2017-1. Анализ последовательности его генома выявил 97 и 87% сходства с последовательностями ORF1 и ORF2 обнаруженного бастровируса соответственно, что свидетельствует о значительном генетическом сходстве с бастровирусом свиней. Эти данные о последовательности полного генома позволили создать тест на основе количественной ПЦР для выявления патогена. В июне 2017 г. этот тест был использован для изучения 368 образцов свиней, поступивших в лабораторию болезней животных Университета штата Южная Дакота. Основную часть из них составляли образцы мазков из ротовой полости (90%), а остальные (10%) – фекальные, ректальные мазки или образцы из окружающей среды. Из 368 исследованных образцов 114 (или 31%) оказались положительными на вирус. При этом следует отметить, что большинство образцов были получены от здоровых свиней, так как были взяты в рамках инициативы по надзору за заболеваниями животных на фермах. Таким образом, обнаруженный бастровирус не был связан с каким-либо конкретным заболеванием.

В 2019 г. вышла статья, посвященная изучению 72 образцов летучих мышей четырех видов, выловленных в 2012 г. в городе Биша и его окрестностях в Саудовской Аравии [5]. У двух видов летучих мышей нашли вирус, схожий с бастровирусом, но обнаруженные вирусы в Саудовской Аравии были ближе к гепевирусам, чем к человеческому бастровирусу, имея 50% сходство по аминокислотной последовательности с ним. В результате исследователи классифицировали их как Middle East Hepe-Astrovirus, так как они демонстрировали около 70% сходства с бастровирусом летучих мышей и бастровирусом крысы из Вьетнама.

В 2021 г. японские исследователи идентифицировали практически полные последовательности геномов четырех бастровирусов, обнаруженных в фекалиях здоровых свиней [6]. Они обнаружили, что бастровирусы, присутствующие в организме свиней и других животных, включая человека, имеют схожую геномную организацию. В частности, все они имеют три консервативных домена: вирусную мегилтрансферазу, РНК-хеликаз и RdRp в структурном ORF1 и капсидный домен астровируса в структурном ORF2. Сравнение аминокислотных последовательностей показало, что полученные бастровирусы имеют 95–99 и 76–96% сходства в областях ORF1 и ORF2 соответственно. Однако при сравнении бастровирусов свиней с бастровирусами других животных сходство составило лишь 21–43 и 9–21% для областей ORF1 и ORF2 соответственно. Это указывает на то, что хотя бастровирусы могли иметь общего предка, они эволюционировали отдельно в каждой группе хозяев

в течение длительного времени. Наличие в геноме потенциальных рекомбинационных событий также свидетельствует о том, что бастровирусы приобретают генетическое разнообразие в результате рекомбинационных событий.

В 2023 г. была опубликована работа [7], посвященная малоизученному вирусному разнообразию низших позвоночных, включая рыб, земноводных и рептилий. Объектом изучения служила азиатская жаба, обитающая в Китае. В результате проведенных исследований было выявлено более 20 новых РНК-вирусов в материалах жаб. Так, выявлен практически полный геном бастровируса, сильно отличающийся от ранее известных вариантов, что позволило выделить новые ветви на филогенетическом дереве. Этот геном, обозначенный как AtBastV/GCCDC11/2022, состоит из трех предполагаемых белок-кодирующих областей, каждая из которых имеет разную степень идентичности с различными известными вирусами. При более глубоком изучении филогении RdRp и капсидных сегментов AtBastV/GCCDC11 было обнаружено, что он имеет сильное генетическое сходство со штаммом бастровируса амфибий из рода *Rana*. Кроме того, этот штамм имел заметное сходство с астровирусом 2, обнаруженным у хайнаньской черноглазой жабы, и некоторыми астровирусами животных, хотя и имел отдаленное отношение к гепевирусам.

Филогенетический анализ, проведенный на основе последовательности РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRP), показывает, что бастровирусы и вирусы гепатита Е формируют на дереве отдельную кладу, отличную от астровирусов [3]. Большинство бастровирусов животных образуют монофилетическую группу и группируются по видам хозяев, которых они заражают. Исключением является линия Bat_Bastrovirus-like_virus/VietNam/Bat/17819_21, образующая на дереве отдельную внешнюю группу. Филогенетический анализ по белку капсида дает схожие результаты. В статье 2016 г. [1] была высказана гипотеза, о том что между участками генома, кодирующими белок капсида и полимеразу, в прошлом произошла рекомбинация. В качестве свидетельства авторы указывают на то, что филогенетически белок капсида больше связан с астровирусами, а ген полимеразы – с вирусом гепатита Е. На дополнительные события рекомбинации также указывает тот факт, что штамм CMR/Bat/P24 группируется с двумя штаммами летучих мышей на дереве полимеразы и только с одним штаммом на дереве белка капсида [3].

Бастровирусы можно дифференцировать на основе генетических признаков. ORF1 всех бастровирусов млекопитающих кодирует вирусную мегилтрансферазу, за которой следуют вирусная геликаза и RdRp, тогда как ORF2 кодирует капсидный белок. ORF3 присутствует в геноме не всех бастровирусов, а если и присутствует, как в случае бастровирусов человека, то кодирует папаин-подобную цистеиновую протеазу вируса гепатита Е. Хотя астровирусы и бастровирусы имеют некоторое сходство в структурном белке, структура генома бастровирусов и его особенности могут способствовать будущей классификации этих

вирусов в новое вирусное семейство. Кроме того, обширное генетическое разнообразие среди бастровирусов, полученных от разных видов хозяев, может потребовать дальнейшей классификации бастровирусов в разные линии или роды.

Рассмотренные выше источники позволяют сделать вывод об очень широком распространении бастровирусов среди человека и различных видов животных. Бастровирусы выявлены у человека, свиней, летучих мышей, речных моллюсков и жаб и даже в сточных водах. Такое разнообразие носителей вируса подтверждает теорию о том, что данный вирус циркулирует в природе уже в течение какого-то периода времени, а не зародился недавно. До сих пор в литературе не было описано случаев обнаружения бастровирусов на территории России. В настоящей работе мы провели метагеномное секвенирование генетического материала образцов фекалий летучих мышей вида *Nyctalus noctula* из Саратовской области, в результате чего был обнаружен неизвестный ранее бастровирус и собран его полный геном. Мы провели аннотирование нового генома бастровируса, построили филогенетические деревья и провели рекомбинационный анализ.

Материалы и методы

Проведено метагеномное секвенирование образцов фекалий летучих мышей вида *N. noctula*, собранных в феврале 2023 г. в России. Выделение РНК из образцов выполняли с использованием набора QIAamp Viral RNA (Qiagen, Германия). Обратную транскрипцию осуществляли с использованием набора РЕВЕРТА-Л («АмплиСенс», Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Синтез второй цепи ДНК был выполнен с помощью набора NEBNext Ultra II Non-Directional RNA Second Strand Synthesis Module (E6111L). Очищенную двухцепочечную кДНК фрагментировали в microTUBE-50 AFA Fiber Screw-Cap (PN 520166) на приборе Covaris M220 (Covaris, Woburn, США) до ~ 550 п.о. Библиотеки для парноконцевого секвенирования сконструировали с помощью наборов NEBNext Ultra End Repair/dA-Tailing Module (NEB E7546L), NEBNext Ultra Ligation Module (NEB E7595L) и Y-адаптера, совместимого с IDT for Illumina Nextera DNA UD Indexes. Индексирование ПЦР проводили с использованием NEBNext Ultra II Q5 Master Mix (NEB #M0492). Финальную библиотеку валидировали на приборе Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, США). Секвенирование проводили на платформах MiSeq и NextSeq 2000 (Illumina, США).

Сборка консенсусных последовательностей

В «сырых» прочтениях удаляли адаптеры при помощи опции в Trimmomatic v0.39 ILLUMINACLIP [8]. Также применяли опции LEADING:7, TRAILING:7, SLIDINGWINDOW:4:20, и MINLEN:40. Парные прочтения объединяли при помощи BBmerge [9] (maxstrict=t), файлы с непарными прочтениями для каждого образца объединяли в один. Таким образом, для каждого образца получили по три файла: два файла – парно-концевые чтения и один файл – непарные.

Прочтения, соответствующие хосту, удаляли выравниванием на референсные геномы летучих мышей *Pipistrellus kuhlii* (GCF_014108245.1) и *Myotis myotis* (GCF_014108235.1) при помощи bowtie2 (опции –un и –un-conc отдельно соответственно для непарных и парных ридов). Использовали геномы этих двух видов, так как референсный геном для *N. noctula* отсутствует в доступных базах данных. Далее с использованием Kaiju v1.9.2 [10] (использовалась база nr_euk) оставили только прочтения либо определяющиеся как вирусные, либо не классифицирующиеся (файлы с парно-концевыми чтениями и непарными снова обрабатывали отдельно). Оставшиеся после такой фильтрации прочтения были собраны *de novo* в контиги с использованием MEGANIT v1.2.9 [11], получившиеся контиги использовали для поиска в базе NCBI nr при помощи DIAMOND [12] blastx (опции –very-sensitive, evalue 1e-08, –k 3).

В образце N.noctula_3 (MiSeq) на основе поиска по гомологии был найден длинный (5,832 bp) контиг, относящийся к бастровирусам. Этот контиг в дальнейшем использовали как референс для сборки консенсусов для другого образца. Также контиги бастровируса обнаружили в образцах фекалий летучих мышей N.noctula_4 (NextSeq), N.noctula_4 (MiSeq, техническая реплика предыдущего образца). Фильтрованные при помощи Kaiju прочтения с соответствующих образцов выравнивали bowtie2 v2.4.4 [13] (--local) на вышеуказанный референс. «Bam»-файлы реплик объединяли командой «samtools merge» [14] v1.15.1, сборку консенсусов производили командой «samtools consensus» (-m simple -aa -c 0.51). В результате получили две консенсусные последовательности (образцы № 3, 4).

Филогенетический анализ

В собранных последовательностях были выделены открытые рамки считывания с использованием NCBI ORFfinder [15] (опция «ATG» and alternative initiation codons) и BLASTX [16]. Аминокислотные последовательности, соответствующие неструктурному полипротеину (NSP) и структурному полипротеину (SP), использовали для дальнейшего филогенетического анализа. Для построения деревьев использовали 31 последовательность генома бастровирусов из NCBI, у которых были проаннотированы полипротеины NSP и SP. Список accession numbers использовавшихся образцов: KU318321.1, NC_035758.1, KU318317.1, KU318320.1, KU318315.1, KU318318.1, KU318319.1, KU318316.1, KX907134.1, NC_032423.1, MK387176.1, KX907130.1, MT549856.1, LC549662.1, MF042208.1, KX907133.1, NC_035471.1, OM104033.1, OQ835729.1, KX907129.1, KX907131.1, NC_032484.1, KX907132.1, KX907128.1, KX907127.1, MG693175.1, MT549857.1, KX907135.1, NC_032426.1, OQ835730.1, MT766313.1. Последовательность астровируса гуся (GenBank: OM200916.1) использовали как аутгруппу. Выравнивание осуществляли с помощью программы MAFFT v7.490 [17]. Построение дерева производили в IQ-TREE v2.2.3 [18] (опция -alrt 1000), оптимальную модель определяли при помощи ModelFinder [19].

Визуализацию дерева выполняли с применением онлайн-инструмента iTOL [20].

Анализ рекомбинации

Для изучения потенциальной рекомбинации в программе MAFFT были построены множественные выравнивания по аминокислотным последовательностям белков NSP и SP для 33 образцов (31 – получены из NCBI и 2 – в этом исследовании), которые затем обратно транслировали в нуклеотидные выравнивания при помощи PAL2NAL [21]. Далее выравнивания для белков NSP и SP объединяли. Матрицу филогенетической совместимости с метрикой Робинсона–Фолдса строили с применением протокола RDP4. Ширина окна составляла 400, шаг – 50 нуклеотидов [22].

Анализ зоонозного потенциала

Для оценки зоонозного потенциала бастровируса использовали обученную модель машинного обучения [23], доступную по ссылке https://github.com/Nardus/zoonotic_rank. На вход подавали два генома бастровируса, а также таблицу с аннотацией. С помощью команды PredictNovel.R получили файлы с результатами.

Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus author guidelines for animal use (IAVES 23 July 2010). Утверждено заключение этического комитета по работе с животными, номер 50 от 07.08.2021. Все процедуры проводились в соответствии с разрешением комиссии по биоэтике ИПЭЭ РАН им. А.Н. Северцова.

Результаты

В настоящем исследовании на основе данных метагеномного секвенирования генетического материала фекалий летучих мышей *N. noctula*, пойманных на территории Российской Федерации в 2023 г., были получены практически полные последовательности генома бастровируса для двух образцов. В одном из образцов был собран *de novo* длинный контиг (около 5800 п.о.), покрывающий практически полный геном бастровируса, который затем использовали как референс для сборки генома бастровируса из другого образца. После аннотации геномов путем поиска с помощью программ BLASTX в базе NCBI nr и инструмента NCBI ORFfinder для этих двух образцов удалось получить аминокислотную последовательность NSP длиной около 1200 аминокислот и SP длиной порядка 630 аминокислот. Филогенетический анализ, проведенный по неструктурному (рис. 1) и структурному (рис. 2) полипротеинам показал сходство с образцами бастровируса из летучих мышей, пойманных во Вьетнаме. По результатам, полученным с помощью программы BLASTP, сходство с уже известными последовательностями по белку NSP составляет менее 77%, а по SP белку – менее 63%, что дает основание полагать, что вирусы из данных образцов являются новыми.

Изучение рекомбинации в геномах бастровирусов

Анализ последовательностей геномов бастровирусов с помощью матрицы филогенетической совместимости (рис. 3) указывает на наличие возможной рекомбинации между рамками считывания, кодирую-

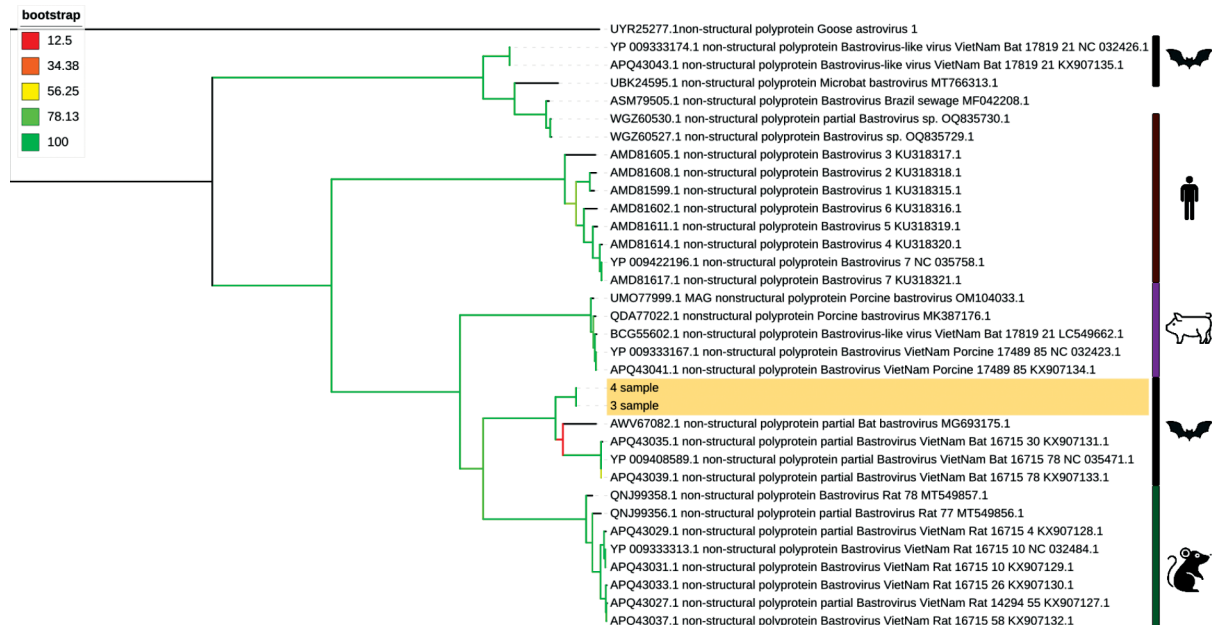


Рис. 1. Филогенетическое дерево, построенное на основе аминокислотной последовательности неструктурного полипротеина (NSP) бастровирусов.

Образцы, отсековированные в рамках этого исследования, выделены желтым. Цветом показана поддержка узлов, рассчитанная по методу SH-aLRT.

Fig. 1. Phylogenetic tree of the non-structural polyprotein (NSP) of bastroviruses.

Samples sequenced as part of this study are highlighted in yellow. Branch colors indicate node support calculated by the SH-aLRT method.

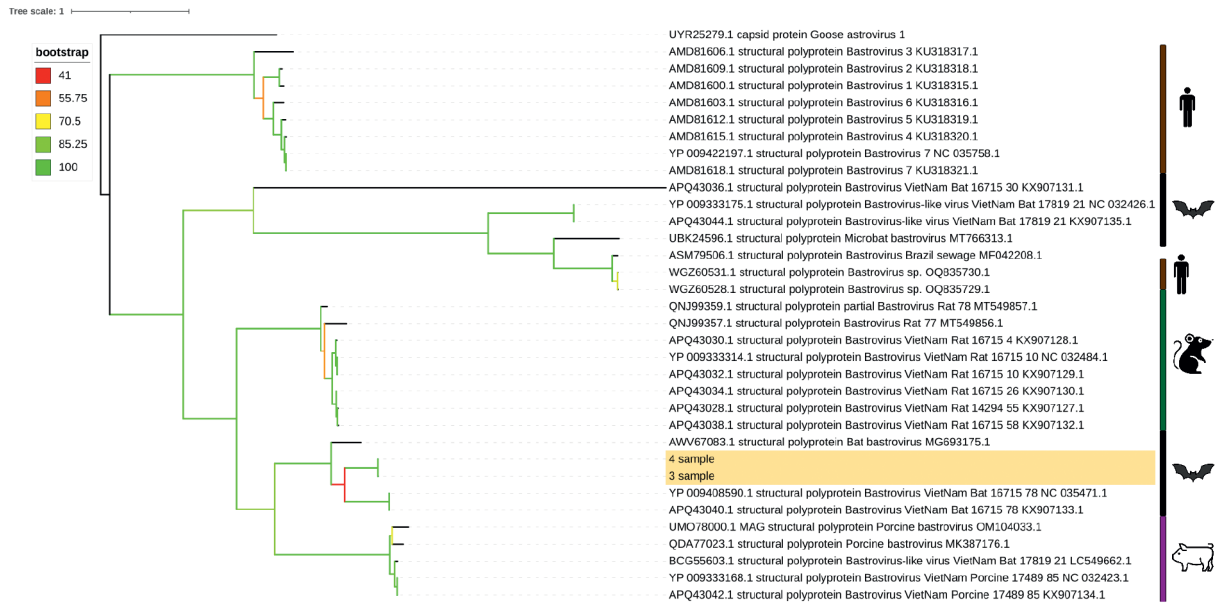


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное на основе аминокислотной последовательности структурного полипротеина (SP) бастровирусов.

Образцы, отсеквенированные в рамках этого исследования, выделены желтым. Цветом показана поддержка узлов, рассчитанная по методу SH-aLRT.

Fig. 2. Phylogenetic tree of the structural polyprotein (SP) of batroviruses.

Samples sequenced as part of this study are highlighted in yellow. Branch colors indicate node support calculated by the SH-aLRT method.

щими полипротеины SP и NSP, что в целом типично для астровирусов [24, 25], ближайшими родственниками которых являются бастровирусы. Также это подтверждается разной топологией филогенетических деревьев, построенных по белкам SP и NSP. Так, например, образец KX907131.1, представленный на рис. 1, находится в одной кладе с полученными в настоящем исследовании образцами, а на рис. 2 он показан в другой кладе бастровирусов летучих мышей.

Оценка степени зоонозного риска

N. Mollentze и соавт. [23] была предложена методология оценки степени риска заболевания человеком для вирусов, исходя из их геномной последовательности. Обученная авторами модель машинного обучения использовала филогенетическую информацию, нуклеотидный и динуклеотидный состав вирусного генома, его сходство с интерферон-стимулированными генами и т.д. Использование всех этих признаков позволило вычислить интегральную характеристику, отражающую вероятность зоонозов. Применение этой методологии на двух геномах бастровируса, полученных в настоящем исследовании, продемонстрировало следующие результаты: бастровирус из 3-го образца был отнесен к категории High (т.е. имеющий высокий зоонозный потенциал), из 4-го образца – Medium (средний).

Обсуждение

В рамках проведенного исследования на основе метагеномного секвенирования генетического материала образцов фекалий летучих мышей, пойманных в Российской Федерации в 2023 г., были успешно собраны

Матрица филогенетической совместимости (Робинсон-Фолдс)
Phylogenetic compatibility matrix (Robinson-Foulds)

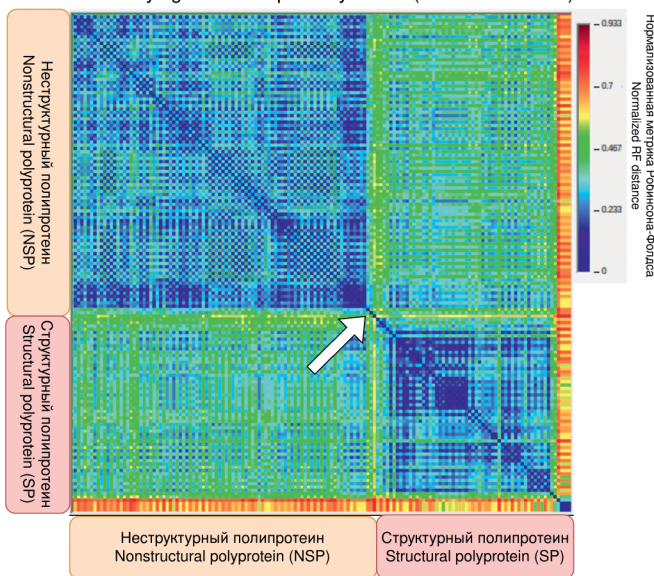


Рис. 3. Матрица филогенетической совместимости, построенная по объединенным выравниваниям белков NSP и SP.

Цветом показана нормализованная метрика Робинсона-Фолдса. Белой стрелкой показано место «стыка» двух рамок считывания.

Fig. 3. Phylogenetic compatibility matrix constructed from the merged alignments of NSP and SP proteins.

Color indicates the normalized Robinson-Foulds metric. The white arrow shows the junction of the two ORFs.

практически полные консенсусные последовательности генома бастровируса в 2 образцах вида *N. noctula*. Так, в одном из них, благодаря *de novo* сборке, получена практически полная (5832 оснований) последовательность генома бастровируса, что позволило использовать ее в качестве референса для сборки генома (5669 оснований) в другом образце. По результатам аннотации геномов и сравнительного анализа аминокислотных последовательностей, установлено, что рассматриваемые вирусы обладают значительными различиями по сравнению с уже известными, и их сходство с ближайшими гомологами не превышает 77% по белку NSP и 63% по белку SP. Филогенетический анализ подтвердил их относительную уникальность и выявил их ближайшие гомологи – образцы бастровирусов из Вьетнама. Геномные последовательности были загружены в базы данных VGARus (cric051639, cric051640) и NCBI GenBank (OR552430, OR552431).

Рекомбинация – частое явление у РНК-вирусов [26]. Проведенный нами анализ с помощью матриц филогенетической совместимости показал наличие события рекомбинации внутри вируса, что должно учитываться при построении филогений. Выделяются две клады бастровирусов летучих мышей, причем топологии деревьев, построенных по разным участкам генома, не совпадают. Все это указывает на непрерывно идущий процесс рекомбинации у бастровирусов, что потенциально может быстро привести к появлению у вируса новых свойств, а учитывая высокий зоонозный потенциал вируса, вычисленный методами машинного обучения, важно его дальнейшее изучение. Таким образом, первое обнаружение бастровируса на территории РФ дополняет мировые данные о широте ареала распространения бастровируса, а новые данные не только расширяют наше понимание генетического разнообразия бастровирусов, но и подчеркивают важность будущих исследований для определения потенциального влияния этих вирусов на здоровье человека и животных. Нуклеотидные последовательности были загружены в базы данных VGARus и NCBI GenBank.

Заключение

Появление и развитие технологий секвенирования нового поколения (NGS) не только произвело революцию во многих областях биологии и медицины, но и все чаще используется в вирусологии. Так, новые подходы позволяют исследовать огромное количество вирусов, и по мере снижения стоимости NGS [27] масштабные метагеномные исследования, в том числе для выявления новых вирусных патогенов, становятся все более доступными. Преимуществом метагеномного секвенирования является отсутствие необходимости использования специфических зондов или праймеров для выявления вирусов, что потенциально позволяет обнаружить любой патоген, присутствующий в образце, независимо от его известного или неизвестного статуса [28]. Благодаря этому уникальному свойству метагеномное секвенирование стало основным методом обнаружения как известных, так и новых вирусов [29, 30], что особенно актуально для

анализа таких природных резервуаров вирусов, как летучие мыши [31]. Возможность описывать множество вирусов в таких объектах, независимо от того являются ли они патогенами, специфичными для хозяина, или рассматриваются в качестве пищевых или экологических образцов, может способствовать лучшему пониманию некоторых зоонозных событий передачи инфекции и предупредить органы здравоохранения и эпидемиологического надзора о возможном их возникновении.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Oude Munnink B.B., Cotten M., Canuti M., Deijs M., Jebbink M.F., van Hemert F.J., et al. A Novel astrovirus-like RNA virus detected in human stool. *Virus Evol.* 2016; 2(1): vew005. <https://doi.org/10.1093/ve/vew005>
- Dos Anjos K., Nagata T., Melo F.L. Complete genome sequence of a novel bastrovirus isolated from raw sewage. *Genome Announc.* 2017; 5(40): e01010–17. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01010-17>
- Yinda C.K., Ghogomu S.M., Conceição-Neto N., Beller L., Deboutte W., Vanhulle E., et al. Cameroonian fruit bats harbor divergent viruses, including rotavirus H, bastroviruses, and picobirnaviruses using an alternative genetic code. *Virus Evol.* 2018; 4(1): vey008. <https://doi.org/10.1093/ve/vey008>
- Bauermaier F.V., Hause B., Buysse A.R., Joshi L.R., Diel D.G. Identification and genetic characterization of a porcine hepe-astrovirus (bastrovirus) in the United States. *Arch. Virol.* 2019; 164(9): 2321–6. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04313-x>
- Mishra N., Fagbo S.F., Alagaili A.N., Nitido A., Williams S.H., Ng J., et al. A viral metagenomic survey identifies known and novel mammalian viruses in bats from Saudi Arabia. *PLoS One.* 2019; 14(4): e0214227. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214227>
- Nagai M., Okabayashi T., Akagami M., Matsuu A., Fujimoto Y., Hashem M.A., et al. Metagenomic identification, sequencing, and genome analysis of porcine hepe-astroviruses (bastroviruses) in porcine feces in Japan. *Infect. Genet. Evol.* 2021; 88: 104664. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104664>
- Chen Z., Zhao H., Li Z., Huang M., Si N., Zhao H., et al. First discovery of phenuiviruses within diverse RNA viromes of Asiatic toad (*Bufo gargarizans*) by metagenomics sequencing. *Viruses.* 2023; 15(3): 750. <https://doi.org/10.3390/v15030750>
- 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>
- Bushnell B., Rood J., Singer E. BBMerge – accurate paired shotgun read merging via overlap. *PLoS One.* 2017; 12(10): e0185056. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185056>
- Menzel P., Ng K.L., Krogh A. Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju. *Nat. Commun.* 2016; 7: 11257. <https://doi.org/10.1038/ncomms11257>
- Li D., Liu C.M., Luo R., Sadakane K., Lam T.W. MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. *Bioinformatics.* 2015; 31(10): 1674–6. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv033>
- Buchfink B., Reuter K., Drost H.G. Sensitive protein alignments at tree-of-life scale using DIAMOND. *Nat. Methods.* 2021; 18(4): 366–8. <https://doi.org/10.1038/s41592-021-01101-x>
- Langmead B., Wilks C., Antonescu V., Charles R. Scaling read aligners to hundreds of threads on general-purpose processors. *Bioinformatics.* 2019; 35(3): 421–32. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty648>
- 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>
- Wheeler D.L., Church D.M., Federhen S., Lash A.E., Madden T.L., Pontius J.U., et al. Database resources of the National Center for Biotechnology. *Nucleic. Acids Res.* 2003; 31(1): 28–33. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg033>
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 1990; 215(3): 403–10. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)

17. Katoh K., Standley D.M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* 2013; 30(4): 772–80. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
18. Nguyen L.T., Schmidt H.A., von Haeseler A., Minh B.Q. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 2015; 32(1): 268–74. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>
19. Kalyaanamoorthy S., Minh B.Q., Wong T.K.F., von Haeseler A., Jermini L.S. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nat. Methods.* 2017; 14(6): 587–9. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4285>
20. Letunic I., Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res.* 2021; 49(W1): W293–6. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab301>
21. Suyama M., Torrents D., Bork P. PAL2NAL: robust conversion of protein sequence alignments into the corresponding codon alignments. *Nucleic Acids Res.* 2006; 34(Web Server issue): W609–12. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl315>
22. Martin D.P., Murrell B., Golden M., Khoosal A., Muhire B. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evol.* 2015; 1(1): vev003. <https://doi.org/10.1093/ve/vev003>
23. Mollentze N., Babayan S.A., Streicker D.G. Identifying and prioritizing potential human-infecting viruses from their genome sequences. *PLoS Biol.* 2021; 19(9): e3001390. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001390>
24. Wolfardt M., Kiulia N.M., Mwenda J.M., Taylor M.B. Evidence of a recombinant wild-type human astrovirus strain from a Kenyan child with gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49(2): 728–31. <https://doi.org/10.1128/JCM.01093-10>
25. Wohlgenuth N., Honce R., Schultz-Cherry S. Astrovirus evolution and emergence. *Infect. Genet. Evol.* 2019; 69: 30–7. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.01.009>
26. Worobey M., Holmes E.C. Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses. *J. Gen. Virol.* 1999; 80(Pt. 10): 2535–43. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-10-2535>
27. van Dijk E.L., Auger H., Jaszczyszyn Y., Thermes C. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet.* 2014; 30(9): 418–26. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2014.07.001>
28. Kiselev D., Matsvay A., Abramov I., Dedkov V., Shipulin G., Khafizov K. Current trends in diagnostics of viral infections of unknown etiology. *Viruses.* 2020; 12(2): 211. <https://doi.org/10.3390/v12020211>
29. Radford A.D., Chapman D., Dixon L., Chantrey J., Darby A.C., Hall N. Application of next-generation sequencing technologies in virology. *J. Gen. Virol.* 2012; 93(Pt. 9): 1853–68. <https://doi.org/10.1099/vir.0.043182-0>
30. Bassi C., Guerriero P., Pierantoni M., Callegari E., Sabbioni S. Novel virus identification through metagenomics: a systematic review. *Life (Basel).* 2022; 12(12): 2048. <https://doi.org/10.3390/life12122048>
31. Li W., Shi Z., Yu M., Ren W., Smith C., Epstein J.H., et al. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science.* 2005; 310(5748): 676–9. <https://doi.org/10.1126/science.1118391>

Информация об авторах:

Роев Герман Викторович – биоинформатик лаборатории геномных исследований ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия. E-mail: roevherman@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-2353-5222>

Борисова Надежда Ивановна – младший научный сотрудник лаборатории геномных исследований ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия. E-mail: borisova@cmd.su; <https://orcid.org/0000-0002-9672-0648>

Чистякова Надежда Владимировна – инженер лаборатории сравнительной этологии и биокommunikации ИПЭЭ РАН им. А.Н. Северцова, Москва, Россия. E-mail: lanche@mail.ru; <https://orcid.org/0009-0002-6034-1408>

Выходцева Анастасия Владимировна – технолог лаборатории геномных исследований ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия. E-mail: vihodceva@cmd.su; <https://orcid.org/0009-0005-1911-9620>

Акимкин Василий Геннадьевич – д-р мед. наук, профессор, директор ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия. E-mail: vgakimkin@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0003-4228-9044>

Хафизов Камиль Фаридович – канд. биол. наук, заведующий лабораторией геномных исследований, ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия. E-mail: khafizov@cmd.su; <https://orcid.org/0000-0001-5524-0296>

Участие авторов: Роев Г.В. – концепция исследования, биоинформатический анализ, интерпретация данных, подготовка текста; Борисова Н.И. – проведение экспериментов, подготовка текста; Чистякова Н.В. – сбор материала; Выходцева А.В. – подготовка текста; Акимкин В.Г. – концепция исследования, администрирование; Хафизов К.Ф. – концепция исследования, интерпретация данных, подготовка текста, получение финансирования, администрирование.

Поступила 14.09.2023
Принята в печать 01.11.2023
Опубликована 29.12.2023

Information about the authors:

German V. Roev – Bioinformatician of Laboratory for Genomics Research of the Central Research Institute for Epidemiology of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Moscow, Russia. E-mail: roevherman@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-2353-5222>

Nadezhda I. Borisova – Junior researcher of Laboratory for Genomics Research of the Central Research Institute for Epidemiology of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Moscow, Russia. E-mail: borisova@cmd.su; <https://orcid.org/0000-0002-9672-0648>

Nadezhda V. Chistyakova – Engineer of Laboratory of comparative etology and biocommunication of A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution of the Russian Academy of Sciences, Russia, Moscow, Russia. E-mail: lanche@mail.ru; <https://orcid.org/0009-0002-6034-1408>,

Anastasia V. Vyhodtseva – Technologist of Laboratory for Genomics Research of the Central Research Institute for Epidemiology of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Moscow, Russia. E-mail: vihodceva@cmd.su; <https://orcid.org/0009-0005-1911-9620>

Vasily G. Akimkin – Doctor of Medicine, Professor, Director of Central Research Institute for Epidemiology of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Moscow, Russia. E-mail: vgakimkin@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0003-4228-9044>

Kamil F. Khafizov – PhD (Biol.), Head of Laboratory for Genomics Research of the Central Research Institute for Epidemiology of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Moscow, Russia. E-mail: khafizov@cmd.su; <https://orcid.org/0000-0001-5524-0296>

Contribution: Roev G.V. – the study concept, bioinformatic analysis, interpretation of the data, preparing the text; Borisova N.I. – conducting of the experiments, preparing the text; Chistyakova N.V. – collection of the material; Vyhodtseva A.V. – preparing the text; Akimkin V.G. – the study concept, administration; Khafizov K.F. – the study concept, interpretation of the data, preparing the text, funding acquisition, administration.

Received 14 September 2023
Accepted 01 November 2023
Published 29 December 2023

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-202>

© ТУЫСКАНОВА М.С., ЖУГУНИСОВ К.Д., OZASLAN M., МЫРЗАХМЕТОВА Б.Ш., КУТУМБЕТОВ Л.Б., 2023



Клинические симптомы/признаки у хомяков при экспериментальном заражении вирусом SARS-CoV-2 (Coronaviridae: *Betacoronavirus*)

Туысканова М.С.^{1,2✉}, Жугунисов К.Д.¹, Ozaslan M.³, Мырзахметова Б.Ш.¹, Кутумбетов Л.Б.¹¹РГП «Научный исследовательский институт проблем биологической безопасности» КН МЗ РК, 080409, пгт. Гвардейский, Казахстан;²НАО «Казахский национальный университет имени Аль-Фараби», 050040, г. Алматы, Казахстан;³Кафедра биологии Газиантепского университета, 27310, г. Газиантеп, Турция

Резюме

Введение. В начале декабря 2019 г. человечество столкнулось с новой проблемой, вызванной коронавирусом. В срединной китайской провинции Хубэй стали развиваться эпидемические события, способные вызывать у людей тяжелые первичные вирусные пневмонии. Изолированный этиологический агент был идентифицирован как представитель *Coronaviridae*. Глобальная пандемия, связанная с коронавирусом тяжелого острого респираторного синдрома 2-го типа (*Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*, SARS-CoV-2), стала вызовом для человечества.

Цель работы. В настоящей работе оценивали репликативную способность и патогенез вируса SARS-CoV-2 у хомяков.

Материалы и методы. В эксперименте были использованы сирийские хомяки ($n=16$) случайно разделенные на две группы. Первую группу заражали интраназально, вирусом SARS-CoV-2, штамм SARS-CoV-2/human/KAZ/KZ_Aلماتy/2020, депонированном в GenBank под номером MZ379258.1. Вторая группа осталась контрольной. В течение 14 суток наблюдали за клиническими проявлениями болезни у хомяков. Отбирали пробы на 3, 5, 7, 9, 12, 14-е сутки. Отобранные пробы проверяли на вирусывыделение в культуре клеток, проводили гистологическое исследование и анализ вирусной РНК в ПЦР РВ.

Результаты. Изоляты SARS-CoV-2 показали эффективную репликацию в легких хомяков, вызывая патологические поражения легких при интраназальном заражении. Клинические проявления болезни у хомяков при заражении SARS-CoV-2 характеризовались снижением температуры и массы тела, увлажнением и взъерошенностью шерсти, частым поглаживанием носового зеркала. Кроме того, в группе зараженных животных интраназально при вирусывыделении в культуре клеток из назальных, оральных смывов и легких были обнаружены вирусы с высокими титрами. Также по результатам патологоанатомического вскрытия были замечены патологические изменения в легких. Установлена передача вируса воздушно-капельным путем при совместном содержании здорового хомяка с группой животных, зараженных интраназальным методом.

Заключение. Результаты проведенной работы показывают, что модель сирийского хомяка может быть полезна при изучении патогенеза SARS-CoV-2, а также для тестирования вакцин-кандидатов против острого респираторного синдрома 2-го типа.

Ключевые слова: SARS-CoV-2; патогенность; биологическая модель; сирийский хомяк

Для цитирования: Туысканова М.С., Жугунисов К.Д., Ozaslan M., Мырзахметова Б.Ш., Кутумбетов Л.Б. Клинические симптомы/признаки у хомяков при экспериментальном заражении вирусом SARS-CoV-2 (Coronaviridae: *Betacoronavirus*). *Вопросы вирусологии*. 2023; 68(6): 513–525. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-202> EDN: <https://elibrary.ru/kivlek>

Благодарности. Авторы выражают благодарность руководству и сотрудникам НИИПББ МЗ РК за оказанную помощь в проведении данных исследований.

Источник финансирования. Работа была выполнена в рамках научно-технической программы на тему «Разработка вакцины против коронавирусной инфекции COVID-19» (ИРН № 64356/ПЦФ-МОН-РК-ОТ-20) по целевому финансированию на 2020–2022 гг. при поддержке Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан.

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

Этическое утверждение. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus author guidelines for animal use (IAVES 23 July 2010). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности Министерства здравоохранения Республики Казахстан (Протокол № 4 от 14.04.2021).

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-202>

Clinical symptoms and signs in hamsters during experimental infection with the SARS-CoV-2 virus (Coronaviridae: *Betacoronavirus*)

Moldir S. Tuyskanova^{1,2✉}, Kuandyk D. Zhugunissov¹, Mehmet Ozaslan³, Balzhan Sh. Myrzakhmetova¹, Lespek B. Kutumbetov¹

¹Research Institute for Biological Safety Problems, 080409, Gvardeyskiy, Republic of Kazakhstan;

²Al-Farabi Kazakh National University, 050040, Almaty, Republic of Kazakhstan;

³Department of Biology, Gaziantep University, 27310, Gaziantep, Turkey

Abstract

Introduction. At the beginning of December 2019, humanity has faced a new problem caused by coronavirus. In Hubei province of central China, epidemic events associated with severe primary viral pneumonia in humans began to develop. The isolated etiological agent was identified as a representative of *Coronaviridae* family. The global pandemic associated with the new coronavirus infection, acute respiratory syndrome type 2 (Severe acute respiratory syndrome 2, SARS-CoV-2), has become a challenge for humanity.

Objective. In our work, we assessed the replicative ability and pathogenesis of the SARS-CoV-2 virus in hamsters.

Materials and methods. Syrian hamsters ($n=16$) randomly divided into two groups were used in experiment. The first group was infected intranasally with the SARS-CoV-2 virus, strain SARS-CoV-2/human/KAZ/KZ_Almaly/2020 deposited in GenBank under number MZ379258.1. The second group remained as a control group. Clinical manifestations of the disease in hamsters were observed within 14 days. Samples were collected on days 3, 5, 7, 9, 12, and 14 postinfection. The obtained samples were tested for viral isolation in cell culture, histological examination and analysis of viral RNA by RT-PCR.

Results. SARS-CoV-2 virus isolates showed efficient replication in the lungs of hamsters, causing pathological lung lesions in animals infected intranasally. Clinical manifestations of the disease in hamsters infected with this virus were characterized by a decrease in temperature and body weight, wetness and ruffled fur, and frequent stroking of the nasal planum. High virus titers were observed following the virus isolation in cell cultures from nasal, oral swabs and lungs of animals infected intranasally. Pathological autopsy demonstrated pathological changes in the lungs. Moreover, transmission by airborne droplets has been established when a healthy hamster was kept together with animals infected using the intranasal method.

Conclusion. In conclusion, our study showed that the Syrian hamster model is a useful tool for studying the SARS-CoV-2 pathogenesis, as well as testing vaccine candidates against acute respiratory syndrome type 2.

Keywords: SARS-CoV-2; pathogenicity; biological model; Syrian hamster

For citation: Tuyskanova M.S., Zhugunissov K.D., Ozaslan M., Myrzakhmetova B.Sh., Kutumbetov L.B.

Clinical symptoms/signs in hamsters during experimental infection with the SARS-CoV-2 virus (Coronaviridae: *Betacoronavirus*). *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2023; 68(6): 513–525 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-202> EDN: <https://elibrary.ru/kivlek>

Acknowledgment. The authors express their gratitude to the management and staff of the Research Institute for Biological Safety Problems for their assistance in conducting these studies.

Funding. The work was carried out within the framework of the scientific and technical program on the topic “Development of a vaccine against coronavirus infection COVID-19” (IRN No. 64356/PTsF-MON-RK-OT-20) with targeted funding for 2020–2022. with the support of the Science Committee of the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan.

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

Ethics approval. Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with Consensus author guidelines for animal use (IAVES 23 July 2010). The research protocol was approved by the Ethics Committee «Research Institute for Biological Safety Problems» of the Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan (Protocol No. 4 dated 14.04.2021).

Введение

В первой половине прошлого века были открыты первые представители семейства *Coronaviridae* [1, 2]. Коронавирус представлял серьезную проблему в ветеринарии, однако научное сообщество не относило его к особо опасным для человека эпидемическим вирусам. Коронавирусы стали проблемой для человека в 2002 г., когда коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома (*Severe acute respiratory syn-*

drome-related coronavirus, SARS-CoV) был обнаружен в популяции людей [3–6]. Природным резервуаром этого коронавируса являлись летучие мыши (*Chiroptera*, *Microchiroptera*) [3, 7, 8], переносящие вирус инаппарантно, но выделяющие его со слюной, мочой и фекалиями [9]. Таким образом они заражали мелких млекопитающих, которые широко используются в пищу в странах Юго-Восточной Азии [9]. При эпидемии, вызванной SARS-CoV, летальность среди за-

болевших по всему миру составляла 9,6% [3–6, 10].

В начале декабря 2019 г. человечество столкнулось с новой проблемой, вызванной коронавирусом. В срединной китайской провинции Хубэй стали развиваться эпидемические события, способные вызывать в человеческой популяции тяжелые первичные вирусные пневмонии [11]. Изолированный этиологический агент был идентифицирован как представитель *Coronaviridae* [12]. Геном этого агента оказался гомологичен MERS-CoV на 50%, SARS-CoV на 79%, BtRCoV на 88%. Впоследствии, учитывая особенности структуры генома, ему дали название коронавируса тяжелого острого респираторного синдрома 2-го типа (*Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*, SARS-CoV-2) [9, 13]. SARS-CoV-2 вызывает инфекционное заболевание, получившее название новая коронавирусная инфекция (COronaVirus Disease 2019, COVID-19). Клиническое проявление вируса довольно широкое. COVID-19 на сегодняшний момент распространился на все страны мира и является глобальной пандемией с высоким уровнем летальных исходов. Пандемия нанесла колоссальный вред мировому здравоохранению и экономике [14–16]. В мире активно разрабатываются вакцины против коронавирусной инфекции 2-го типа [17]. Для проведения доклинических испытаний вакцины требуется подходящая биологическая модель животных, которые могут обеспечить последовательные и воспроизводимые результаты [18]. И, поскольку идеальная животная модель должна отражать клинические признаки, вирусную репликацию и патологию, наблюдаемую у человека, наличие и распределение вирусных рецепторов у нее должны быть сходными с таковыми у человека. Вирус должен воспроизводиться в отобранных видах животных, и должна существовать корреляция между вирусным титром и тяжестью болезни [19]. В связи с этим, с учетом анализа литературных источников, в настоящей работе использовали хомяков, поскольку именно эти животные являются одним из объектов исследования по SARS-CoV. В ряде публикаций сообщалось о поддержании репликации хомяков с коронавирусной инфекцией 1-го типа [20, 21]. Также результаты ранее проведенных исследований по SARS-CoV-2 показали [18], что исследуемый вирус способен к репликации в легких животного с высоким титром и сопутствующей патологией.

Цель исследования – изучить потенциальную животную модель для новой коронавирусной инфекции, с целью возможности дальнейшего использования в доклинических испытаниях разрабатываемых вакцин.

Материалы и методы

Вирус. Изучали эпидемический штамм SARS-CoV-2/KZ_Almaty/04.2020 вируса SARS-CoV-2, выделенный из клинического образца и депонированный в республиканском депозитории коллекции микроорганизмов РГП НИИПББ КН МОН РК [22]. Вирус был выделен в культуре клеток Vero (4-й пассаж). Титр вируса составил $4,50 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$. Штамм SARS-CoV-2/human/KAZ/KZ_Almaty/2020 был секвенирован, и полная последовательность генома была депонирована в Gen-

Bank под номером MZ379258.1. Нуклеотидная последовательность генома штамма SARS-CoV 2/human/KAZ/KZ_Almaty/2020 была на 100% идентична изоляту Wuhan-Hu-1 (NC_045512.2).

Животные. В работе были использованы сирийские хомяки в количестве 16 голов. Перед работой всем животным проводили термометрию, после чего у них отбирали сыворотку крови для определения вируснейтрализующих антител в организме к изучаемому вирусу. Далее животные рандомизированным методом были разделены на 2 группы: 1-я группа (8 животных) являлась контрольной; животным 2-й группы (8 особей; интраназальная группа) вводили интраназально инфекционный материал (по 0,2 мл в ноздри).

При заражении хомяков титр вируса составил $4,50 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$ ($31\,000 \text{ТЦД}$), инфекционный материал применяли в цельном виде без дополнительных разведений. После заражения животных помещали в клетки и оставляли в автономно вентилируемом шкафу для содержания животных. На каждую клетку навешивали этикетки с указанием вируса, количества и номеров зараженных животных, даты заражения. В рабочем журнале записывали название вируса, его количество и характеристику зараженных животных, их маркировку, метод введения и дозу вируса.

За животными устанавливали наблюдение, обращали внимание на их внешний вид, подвижность, прием корма и фиксировали внешние клинические признаки заболевания (общее состояние, температура, подвижность, аппетит, взъерошенность шерсти) в течение 14 сут. Во время опыта у всех животных на 3, 5, 7, 9, 12 и 14-е сутки проводили забор крови, смывов носовой и ротовой полости для выявления вируса. Из двух групп на 7-е сутки для контрольных гистологических исследований отобрали 4 животных, которых подвергли эвтаназии путем цервикальной дислокации. Также использовали хомяков, павших во время опыта. У всех извлекли легкие. Наличие вируса в материале подтверждали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и вирусологических исследований. При этом следует отметить, что для установления передачи инфекции во время исследования один хомяк был перемещен из контрольной группы в зараженную вместо павшего хомяка. Оставшихся в живых хомяков на 14-е сутки после инфицирования подвергли эвтаназии методом цервикальной дислокации с последующим отбором пробы крови, смывов носовой и ротовой полости и легких для дальнейшего исследования вышеуказанными методами.

Подопытных животных содержали на стандартном рационе с достаточным количеством воды, согласно ветеринарному законодательству и в соответствии с требованиями по гуманному содержанию и использованию животных в экспериментальных исследованиях. 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 Этическим комитетом

Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности Министерства здравоохранения Республики Казахстан (Протокол № 4 от 14.04.2021)..

Заражение производили с соблюдением этических и гуманных обоснованных правил [23].

Патологоанатомические вскрытие выполняли согласно методике, описанной в работе [24].

Гистологический анализ. Для проведения гистологических исследований были взяты биоматериалы из тканей легких. Проводку и заливку материала осуществляли с применением общепринятых в патоморфологии методов, по руководству Г.А. Меркулова (1969). Материал фиксировали в 10% водном растворе нейтрального формалина. Уплотняли патматериал в парафине, также применяли замораживающий микротом.

После этого готовили 54-серийные парафиновые срезы толщиной 5 и 6 мкм. Ультратонкие срезы изготавливали на полуавтоматическом микротоме НЕОТОН ERM 3100 и на микротоме МС-2. Срезы окрашивали общепринятыми и некоторыми особыми гистологическими методами с использованием гематоксилина и эозина на процессоре для окраски срезов Leica №S4040/№000000358.

Гистологические микропрепараты изучали с помощью бинокулярного микроскопа МБИ-6 под разным увеличением.

Выделение РНК. РНК была извлечена из патологических материалов с помощью набора для вирусного выделения QIAamp viral RNA mini kit (QIAGEN, Германия) согласно инструкции производителя.

Анализ вирусной РНК. Для амплификации гена *N* вируса SARS-CoV-2 были использованы следующие праймеры и зонд: N_Sarbeco_F (cacattggcaccscgaatc), N_Sarbeco_R (gaggaacgagaagaggcttg) и N_Sarbeco_P (fam-acttcctcaaggaacaattgccca-bbq) [25]. Вирусный геном оценивали с помощью количественной ПЦР в реальном времени с использованием набора SuperScript III Platinum One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, США) согласно инструкции изготовителя. Реакции проводили в термоциклере Rotor-Gene 6000 Series (Qiagen, Германия) по следующей программе: 1 цикл обратной транскрипции при 50 °С в течение 20 мин, 1 цикл при 95 °С в течение 3 мин, затем 45 циклов при 95 °С в течение 15 с и 58 °С в течение 30 с.

Выделение вируса в культуре клеток. Выделение вируса проводили из образцов легких, в которых обнаружили вирусную РНК методом ПЦР. С этой целью готовили 20% органо-тканевую суспензию из легких хомяков с использованием общепринятой методики. Ткани легких хомяков гомогенизировали в фосфатно-солевом буфере (PBS) для получения 20% (масса/объем) суспензии, которую центрифугировали при 3000g в течение 20 мин при 4 °С. Супернатант фильтровали через фильтр 0,2 мкм (mMillexGV; Millipore, США). Далее полученным супернатантом заражали культуры клеток в стерильном боксе в лаборатории УББ-3. Перед заражением все матрасы с культурой клеток микроскопировали и отбирали матрасы только с хорошим, типичным монослоем. На моно-

слой культуры клеток Vero после удаления питательной среды наносили приготовленную 20% суспензию в объеме 0,5 мл и выдерживали в течение 60 мин при температуре 37 °С. Затем инокулят удаляли, монослой промывали в трех сменах раствором PBS, вносили поддерживающую среду DMEM с фетальной сывороткой крови и продолжали культивирование при температуре 37 °С с ежедневной микроскопией монослоя культуры клеток. Наличие вируса устанавливали по цитопатогенному действию в зараженных культурах клеток сравнительно с контрольной незараженной культурой клеток. В случае отсутствия цитопатического действия в культуре клеток Vero, зараженной образцами биоматериалов, проводили «слепое» пассирование в течение не менее трех генераций.

Статистическая обработка экспериментальных данных. Все исследования проводили с числом повторностей, обеспечивающих получение достоверных результатов. Полученные результаты исследования обрабатывали математически. Подсчет среднего арифметического значения (X) и средней квадратической ошибки (m) осуществляли с помощью программы GraphPad Prism8. Достоверность различий между показателями ($p < 0,05$) определяли с применением критерия Стьюдента.

Результаты

Интраназальное заражение. На 2-е и 3-и сутки у всех инфицированных животных отмечали стрессовое состояние, пассивность, взъерошенность шерсти и поглаживание, растирание конечностями носового зеркала. Было выявлено также снижение живой массы и температуры тела. Животные находились в клинически угнетенном состоянии (угнетение, поглаживание носового зеркала). У некоторых хомяков температура тела составила 32,4 °С (**рис. 1**), после чего спустя 2 ч животные пали. Для установления способа инфицированности вирусом во время совместного содержания животных один хомяк из контрольной группы был перемещен в группу, зараженную интраназальным методом, вместо павшего хомяка. В остальные дни (с 4-х по 14-е сутки) у зараженных хомяков группы сохранялись проявленные клинические признаки заболевания, такие как общее угнетение и частое поглаживание носового зеркала. У 20% хомяков были зафиксированы эритемные высыпания красного цвета на коже. Эти водянистые эритемные высыпания красного цвета на коже вокруг хвоста превращались в мелкие пузырьки с серозно-геморрагическим содержанием на 7-е сутки после заражения. С 8-х суток формировались корочки грануляционной ткани в местах кожных эритем в каудальной части тела. Пик заболевания приходился на 5–8-е сутки после заражения. В это же время у животных зараженной группы температура тела имела достоверные отличия от контрольной группы ($p \leq 0,05$).

Контрольная группа. В контрольной группе абсолютно не отмечались какие-либо признаки заболевания на протяжении всего срока наблюдения. Животные контрольной группы в конце опыта подверглись эвтаназии путем цервикальной дислокации, как и за-

раженные животные. Были отобраны патологические материалы для сравнительных исследований.

Гистопатологическое исследование легких хомяков

При интраназальном заражении. Вскрытие грудной полости хомяков показало неравномерную окраску легких, были обнаружены многочисленные точечные кровоизлияния под серозной оболочкой. Бронхиальные и средостенные лимфатические узлы были увеличены. Остальные внутренние органы брюшной полости хомяков анатомически располагали правильно и были без видимых патологических изменений.

Гистологическое исследование пробы хомяка из группы интраназального заражения, отобранной на 3-и сутки, выявило патогистологические изменения легкого, соответствующие повреждениям начальной экссудативной фазы острого респираторного дистресс-синдрома. Были зарегистрированы обширное диффузное альвеолярное повреждение, атрофия и коллапс альвеол, десквамация атипичных пневмоцитов. Наблюдалась лишь малая часть альвеол, сохранивших нормальные микроструктуры (рис. 2).

На 7-е сутки от начала заражения отмечали интенсивное окрашивание микроструктур легкого хомяка, что объяснялось переходом острого респираторного

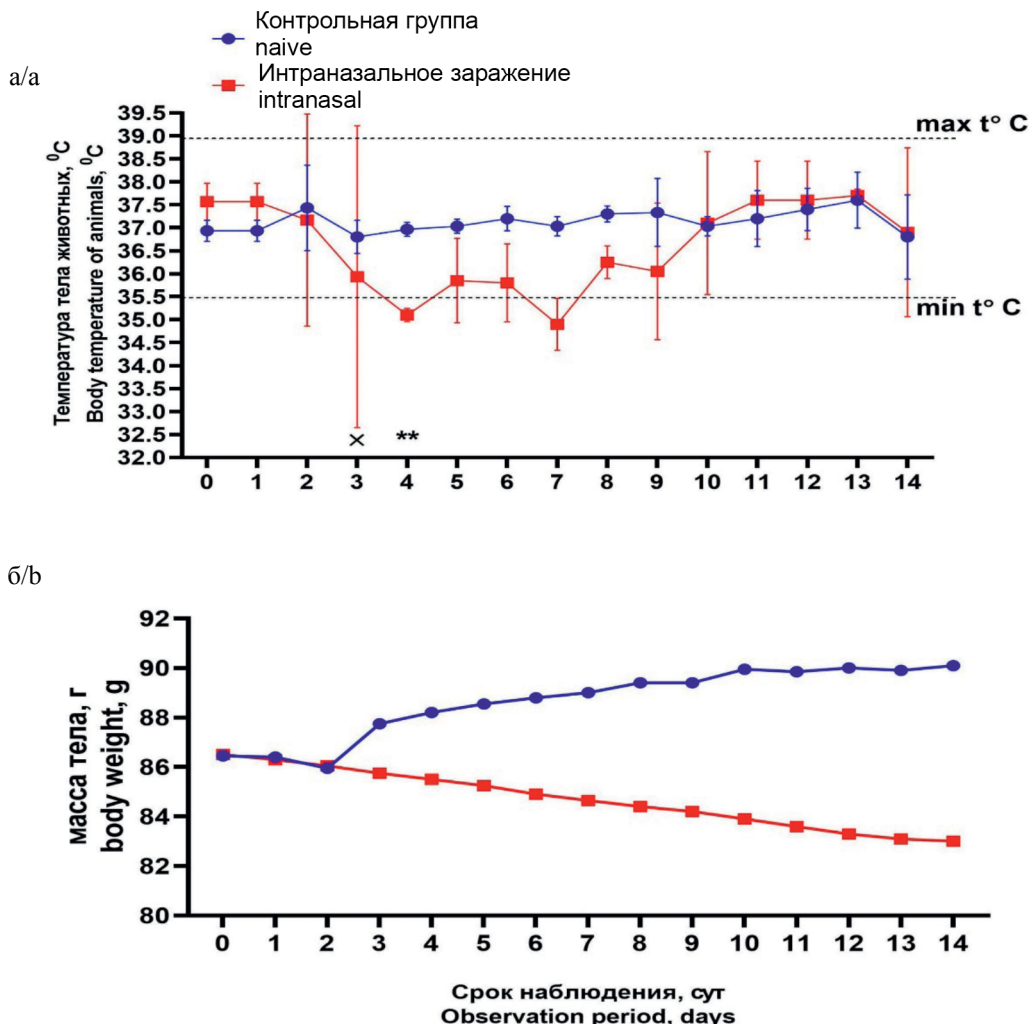


Рис. 1. Параметры термометрии и измерения массы тела зараженных интраназально животных.

а – результаты измерения температуры тела хомяков, зараженных интраназально: max t °C, min t °C – максимальный и минимальный предел нормальной температуры тела; «х» – на 3-и сутки пал один хомяк, зараженный интраназальным методом; ** – для установления инфицированности вирусом один хомяк из контрольной группы перемещен в группу зараженных животных вместо павшего хомяка; б – результаты измерения живой массы тела хомяков.

Fig. 1. Indicators of thermometry and body weight measurements of infected animals.

а – results of body temperature measurements in hamsters infected intranasally: max t °C, min t °C – maximum and minimum limits of normal body temperature for hamsters; «х» – on the third day, one hamster infected by the intranasal method died; ** – to establish infection with the virus during the joint keeping of animals, one hamster was transferred from the control group to the group of animals infected by the intranasal method instead of the dead hamster; б – results of the measurements of live body weight of hamsters.

дистресс-синдрома во 2-ю пролиферативную фазу. Визуализировалось уменьшение белково-фибринового экссудата в просветах альвеол. Микроструктура отдельных бронхов среднего и большого калибров начинала восстанавливаться, а диффузное повреждение альвеол перешло на очаговое воспаление. Повсеместно были выявлены восстановленные альвеолы с характерной нормальной дыхательной мембраной (рис. 3).

На 14-е сутки после заражения доминирующая часть микроструктурных элементов паренхимы легкого уже была восстановлена. Альвеолы имели характерные тонкие дыхательные мембраны. Пневмоциты I и II типов различались без труда, а атипичные пневмоциты в таких восстановленных участках не наблюдались. Многие бронхиолы и сосуды начали функционировать нормально. Участки паренхимы легкого с кровоизлияниями бы-

ли редуцированы. Однако значительная часть легкого находилась в поврежденном состоянии. Отмечались гиперемия и стаз в ряде сосудов, и только в единичных бронхиолах были видны кровоизлияния (рис. 4).

В контрольной группе. При вскрытии брюшной полости контрольных животных было установлено, что все внутренние органы анатомически правильно расположены. Брюшина была бледно-розового цвета, гладкая, блестящая. Видимых изменений не было выявлено (рис. 5).

Исследование ПЦР в реальном времени. Для подтверждения наличия коронавирусной инфекции выделяли РНК из клинических образцов и патологических материалов, полученных от экспериментально инфицированных животных, с помощью коммерческого набора согласно инструкции производителя. Данные

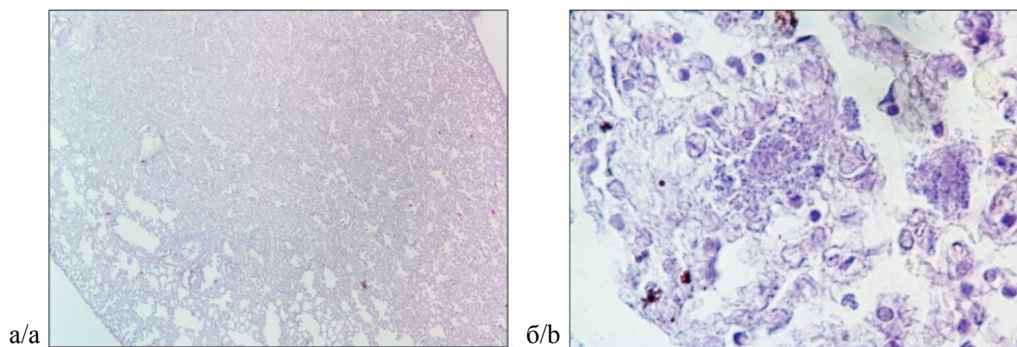


Рис. 2. Парафиновые срезы легких хомяка. Патогистологическая картина легкого на 3-и сутки после заражения вирусом SARS-CoV-2.

а – микрорисунок легкого с диффузным повреждением альвеол, эмфиземами вблизи плевры и незначительным количеством нормально функционирующих альвеол; б – очаговое скопление микроорганизмов (указано стрелкой) с контактирующими единичными нейтрофилами. Окраска гематоксилином и эозином. ОК. $\times 10$, об. $\times 4$ (а); ОК. $\times 10$, об. $\times 100$ (под иммерсионной системой) (б).

Fig. 2. Paraffin sections of hamster lungs. Pathohistological picture of the lung on the 3rd day after infection with SARS-CoV-2 virus.

а – micrograph of the lung with diffuse damage to the alveoli, emphysema near the pleura and a small number of normally functioning alveoli; б – focal accumulation of microorganisms (indicated by an arrow) with contacting single neutrophils. Hematoxylin and eosin staining. Oc. $\times 10$, lens $\times 4$ (a); Oc. $\times 10$, lens $\times 100$ (under the immersion system) (b).

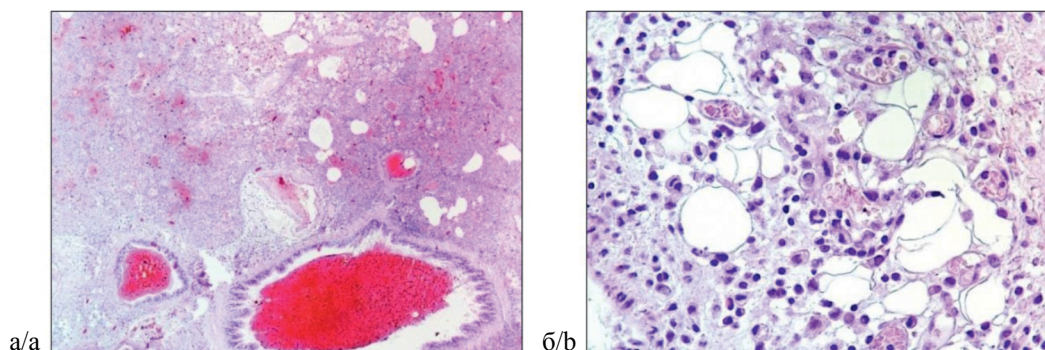


Рис. 3. Парафиновые срезы легких хомяка. Патогистологическая картина легкого на 7-е сутки после заражения вирусом SARS-CoV-2.

а – гиперемия, стаз и геморрагический некроз в сосудах и бронхиолах паренхимы органа; б – микрокартина восстановления дыхательной мембраны, гиперемия и вазодилатация капилляров, инфильтрация воспалительными клетками. Окраска гематоксилином и эозином. ОК. $\times 10$, об. $\times 10$ (а); ОК. $\times 10$, об. $\times 40$ (б).

Fig. 3. Paraffin sections of hamster lungs. Pathohistological picture of the lung on the 7th day after infection with SARS-CoV-2 virus.

а – hyperemia, stasis and hemorrhagic necrosis in the vessels and bronchioles of the organ parenchyma; б – micropicture of restoration of the respiratory membrane, hyperemia and vasodilation of capillaries, infiltration by inflammatory cells. Hematoxylin and eosin staining. Oc. $\times 10$, lens $\times 10$ (a); Oc. $\times 10$, lens $\times 40$ (b).

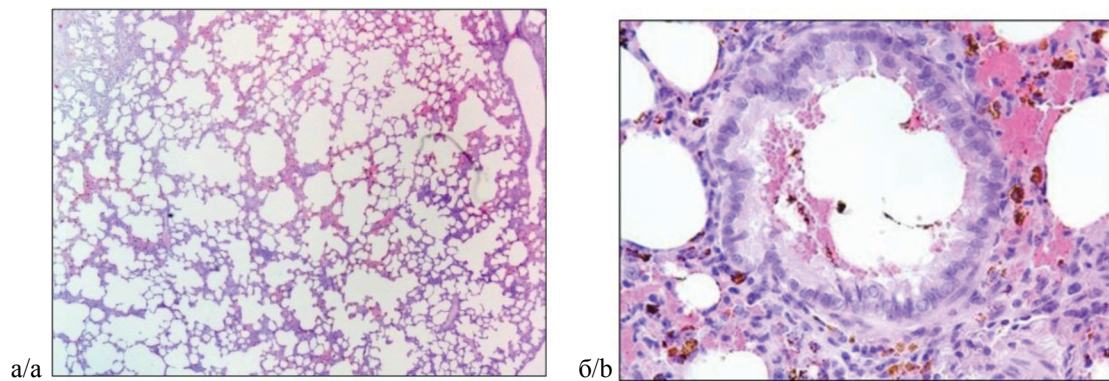


Рис. 4. Парафиновые срезы легких хомяка. Патогистологическая картина легкого на 14-е сутки после заражения вирусами SARS-CoV-2.

а – заметное увеличение восстанавливающихся зон паренхимы легкого; б – бронхиола в состоянии восстановления с внутренним содержанием эритроцитов, микротромбы, геморрагический некроз и диффузная инфильтрация лимфоидной ткани. Окраска гематоксилином и эозином. ОК. $\times 10$, об. $\times 4$ (а); ОК. $\times 10$, об. $\times 40$ (б).

Fig. 4. Paraffin sections of hamster lungs. Pathohistological picture of the lung on the 14th day after infection with SARS-CoV-2 virus.

а – noticeable increase in the reducing zones of the lung parenchyma; б – bronchiole in a state of recovery with an internal content of red blood cells, microthrombi, hemorrhagic necrosis and diffuse infiltration of lymphoid tissue. Hematoxylin and eosin staining. Oc. $\times 10$, lens $\times 4$ (а); Oc. $\times 10$, lens $\times 40$ (б).

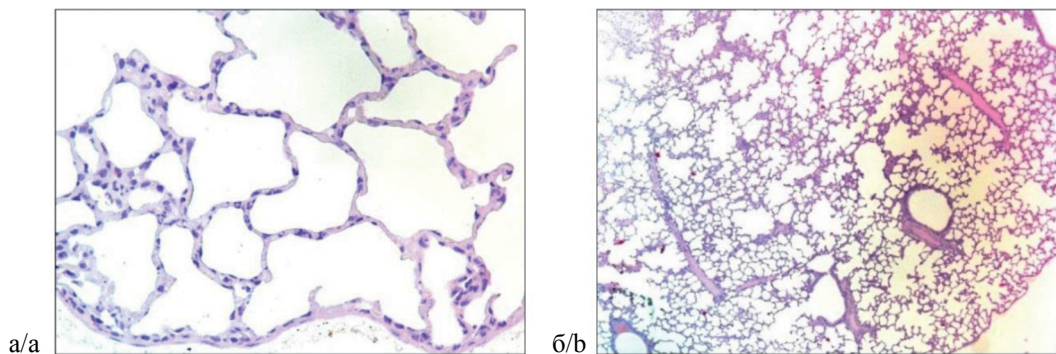


Рис. 5. Парафиновые срезы легких хомяка. Патогистологическая картина легкого хомяка контрольной группы.

а – на 7-е сутки после начала опыта; б – на 14-е сутки после начала опыта. Окраска гематоксилином и эозином. ОК. $\times 10$, об. $\times 4$ (а); ОК. $\times 10$, об. $\times 40$ (б).

Fig. 5. Paraffin sections of hamster lungs. Pathohistological picture of the lungs of hamsters from the control group.

а – on the 7th day after the start of the experiment; б – on the 14th day after the start of the experiment; Hematoxylin and eosin staining. Oc. $\times 10$, lens $\times 4$ (а); Oc. $\times 10$, lens $\times 40$ (б).

о результатах исследований по выявлению РНК вируса SARS-CoV-2 из клинических и патологических материалов в ПЦР представлены на **рис. 6**.

Как видно из рис. 6, во всех пробах (оральные и назальные смывы и ткани легких), полученных от зараженных животных, была обнаружена РНК вируса SARS-CoV-2. Для окончательного установления репликации вируса в дыхательных органах хомяков далее было проведено вирусовыделение на культуре клеток.

Выделение вируса в культуре клеток. Выделение вирусов проводили из всех клинических и патологических материалов, в которых обнаружили вирусную РНК методом ПЦР в реальном времени. Результаты исследований всех клинических образцов (за исключением животных контрольной группы), отобранных на 3, 5 и 7-

сутки после инфицирования, показали наличие вируса в культуре клеток с титрами в пределах от $0,54 \pm 0,10$ до $1,41 \pm 0,20$ lg ТЦД₅₀/мл. При этом следует отметить, что вирусовыделение было обнаружено во всех носовых и оральных пробах, полученных от хомяков, зараженных интраназальным методом, в течение 14 сут.

Результаты исследования вирусовыделения из ткани легких, проведенное на 7-е и 14-е сутки (**рис. 7**), выявило у зараженных интраназальным методом хомяков содержание вируса с титром $3,66 \pm 0,41$ lg ТЦД₅₀/мл (на 7-е сутки) и $1,04 \pm 0,19$ lg ТЦД₅₀/мл (на 14-е сутки).

Обсуждение

Пандемия, связанная с новой коронавирусной инфекцией (COVID-19), нанесла колоссальный вред

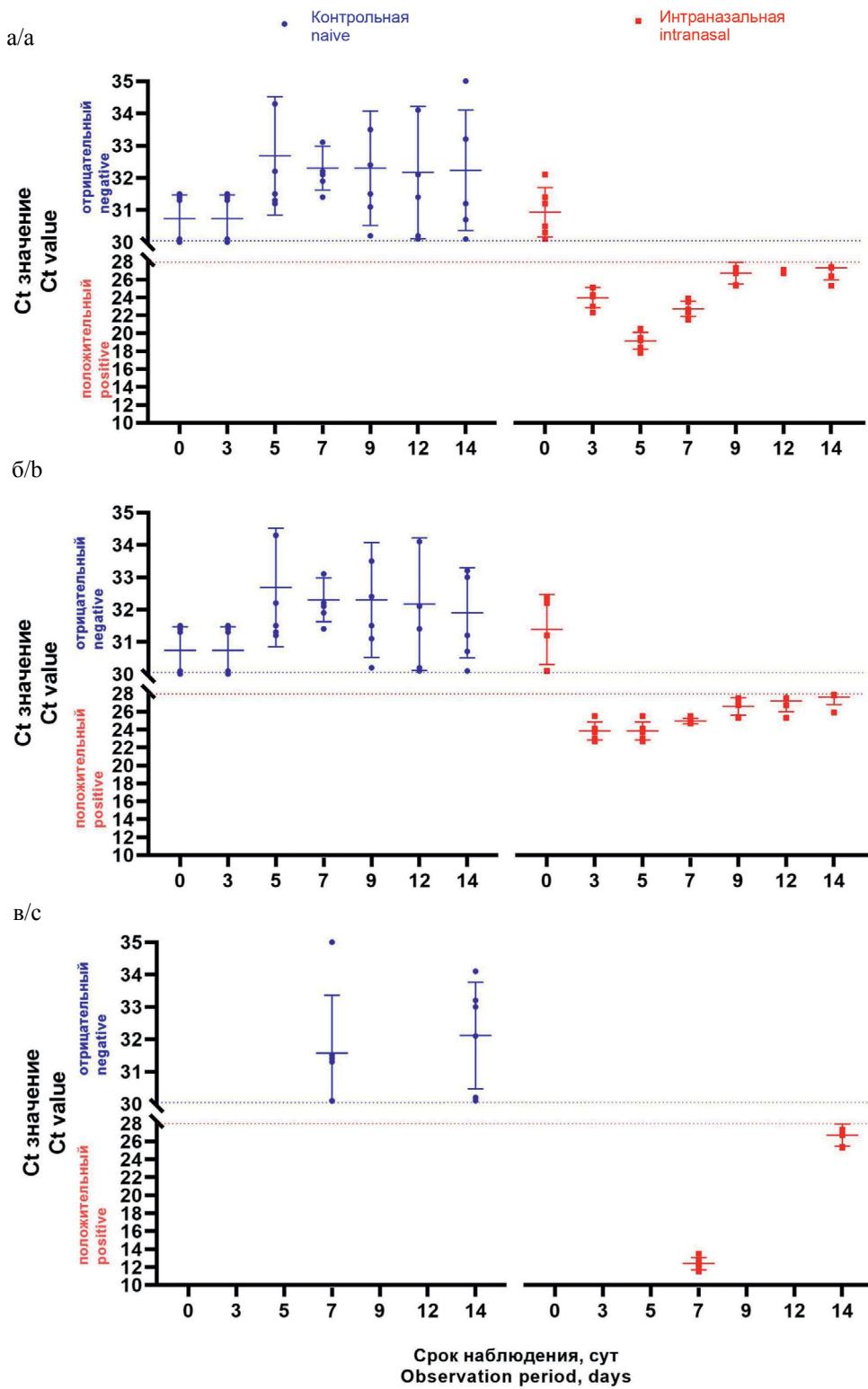


Рис. 6. Результаты ПЦР-исследований клинических и патологических материалов, выделенных от хомяков контрольной группы и животных, зараженных вирусом SARS-CoV-2.

а – назальные смывы; б – оральные смывы; в – ткани легких.

Fig. 6. Results of PCR testing of clinical and pathological materials from hamsters of the control group and those infected with the SARS-CoV-2 virus.

a – nasal washes; b – oral washes; c – lung tissue.

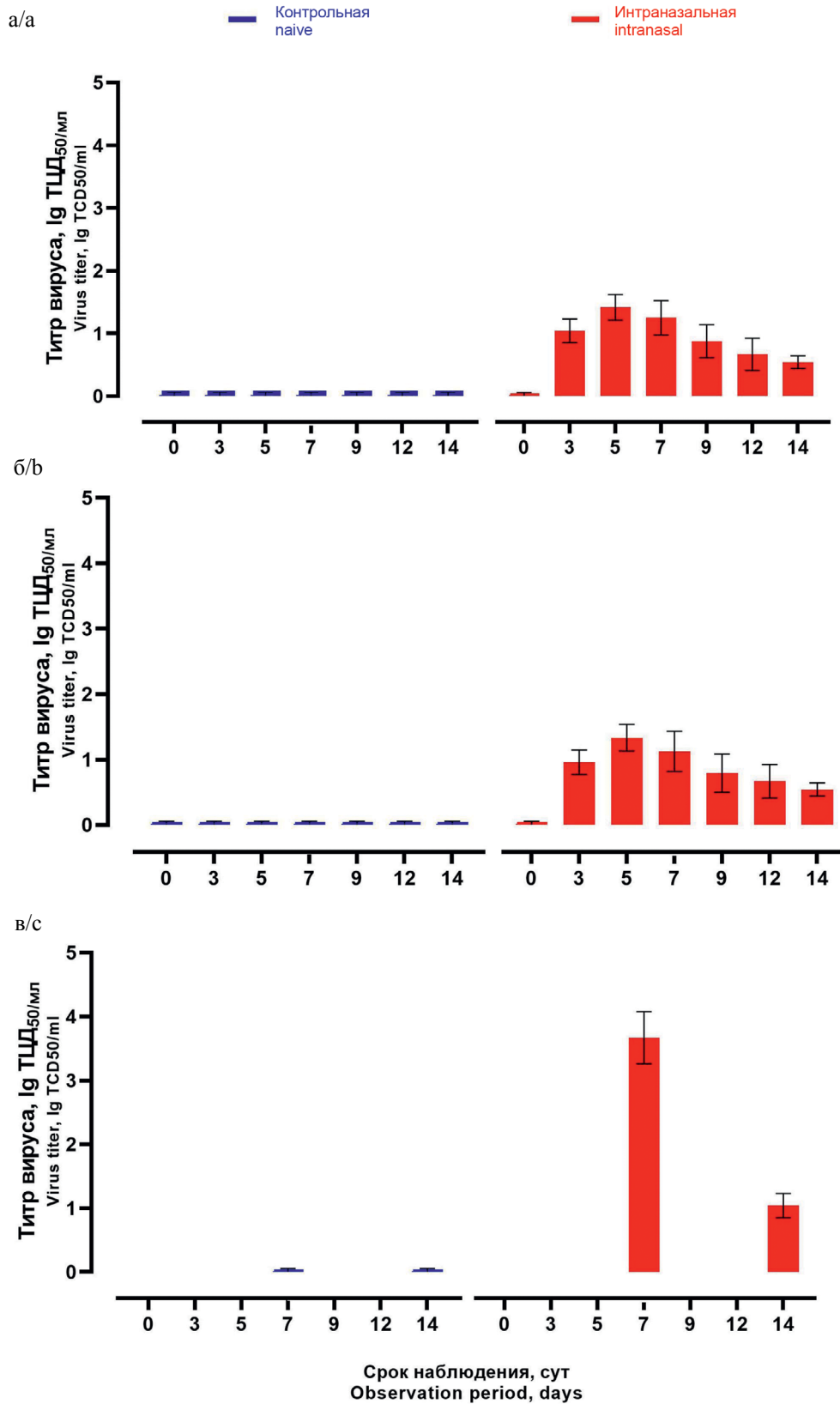


Рис. 7. Вирусовыделение из клинических и патологических материалов от хомячков, зараженных разными методами вирусом SARS-CoV-2.

а – назальные смывы; б – оральные смывы; в – ткани легких.

Fig. 7. Virus isolation from clinical and pathological materials from hamsters infected by various methods with the SARS-CoV-2 virus.

a – nasal washes; b – oral washes; c – lung tissue.

экономике во всем мире. Вполне вероятно, что коронавирусы продолжат появляться и вызывать вспышки среди популяции людей и животных за счет своей высокой контагиозности и способности к мутации [11]. В рамках будущих исследований по коронавирусам будет продолжено изучение многих аспектов репликации вирусов и патогенеза [25, 26]. На сегодняшний день ученые всего мира активно разрабатывают вакцины против коронавиральной инфекции. Доклинические испытания вакцин-кандидатов проводят на животных моделях. При этом основной упор делают на выяснение патогенеза, а животная модель должна полностью воспроизводить ключевые аспекты заболевания. Также модели животных должны быть тщательно оценены и отобраны для достижения экспериментальных целей [18].

Сирийский хомяк является широко используемой экспериментальной моделью животных и, как сообщалось, поддерживает репликацию вируса SARS-CoV [20, 21]. Недавнее исследование [18] показало, что хомяк может быть рекомендован в качестве биологической модели для изучения вируса SARS-CoV-2. Во всех вышеперечисленных исследованиях, в том числе и в настоящей работе, заражение животных производили интраназальным путем. При этом инфицирующая доза вируса составила $4,50 \text{ TCID}_{50}/\text{мл}$. Клинические признаки при интраназальном заражении ярко выражены и проявляются как общее угнетенное состояние, частое поглаживание носового зеркала и снижение температуры от физиологической нормы у хомяков. На 3-и сутки после заражения погибло одно инфицированное животное. В экспериментах, проведенных нами на хомяках, была предпринята попытка определить возможность передачи вируса от зараженного животного здоровому воздушно-капельным путем. При этом для установления пути инфицирования вирусом одного хомяка из контрольной группы переместили в группу, зараженную интраназальным методом. В результате было выявлено, что у здорового животного обнаруживались общие клинические симптомы, такие как потеря аппетита, частое поглаживание ноздри, диарея и снижение температуры и массы тела. Проведенные исследования по изучению механизма передачи вируса при совместном содержании неинфицированного животного с инфицированными подтвердили результаты аналогичных исследований других авторов [18]. Возможным клиническим проявлением у хомяков могут быть также красные эритемные высыпания, которые были проявлены у некоторых хомяков, зараженных интраназальным методом, в настоящем эксперименте. Другие авторы, проводившие исследования на хомяках, не описывали подобные случаи. Однако имеются работы, в которых сообщается о кожных проявлениях при COVID-19 у человека [30]. Контроль температуры тела хомяков показал снижение температуры у группы зараженных интраназальным методом. Также вследствие такого клинического признака, как потеря аппетита, в группе инфицированных хомяков, отмечалась постоянная потеря массы тела. Для изучения патогенности виру-

са на внутренних органах в настоящем исследовании было проведено патологоанатомическое вскрытие, результаты которого показали точечные кровоизлияния и увеличение бронхиальных и стеночных лимфатических узлов. Полученные данные свидетельствуют о возникновении патологических изменений при заражении. Отмеченные клинические симптомы у хомяков являются общими для респираторных заболеваний, поэтому для дальнейшего изучения действия вируса и его идентификации были проведены дополнительные исследования. Изучение использования ACE2 человека в качестве входного рецептора SARS-CoV и SARS-CoV-2 в ранних исследованиях показало значительную репликацию в клетках Calu3 (легких), что соответствует способности этих коронавирусов вызывать инфекции нижних дыхательных путей [27, 28]. В настоящем эксперименте патологоанатомическое вскрытие выявило патологию легких животного, что подтвердило результаты ранее проведенных работ. Гистологические исследования у авторов [29], изучавших клинические и патологические проявления COVID-19 на модели сирийских хомяков, продемонстрировали наличие в легочной ткани инфицированных животных воспалительных инфильтратов, характерных для легкой формы течения COVID-19 [29]. Аналогичные результаты были получены и в настоящем исследовании.

В настоящей работе с помощью методов молекулярно-генетического анализа было проведено ПЦР-исследование на выявление вирусных РНК в образцах, полученных от подопытных животных. ПЦР-исследование в реальном времени показало наличие вирусных РНК в образцах, взятых из носовых и оральных смывов на 3-и и 14-е сутки, а также из тканей легких, отобранных на 7-е и 14-е сутки. Полученные ПЦР-результаты указывают на успешную репликацию вируса на данных моделях в эксперименте, что согласуется с сообщениями других исследователей [18].

Для достоверности данных о содержании способных к репликации вирусов в настоящей работе в эксперименте также было использовано вирусыведение в культуре клеток. Выделение вирусных патогенов в клеточных культурах является классическим методом вирусологии. Несмотря на то что данный метод достаточно медленный и требует значительных технических знаний, на протяжении десятилетий он считался «золотым стандартом» лабораторной диагностики вирусных заболеваний. Нами были проведены опыты по выделению вируса из клинических и патологических материалов от экспериментально инфицированных животных путем заражения в культуре клеток Vero. Вирусыведение из клинических образцов легких, смывов зараженных животных показало высокий титр вируса на 5-е сутки, а вирусыведение из клинических образцов легких – на 7-е сутки.

Заключение

По результатам проведенных исследований было установлено, что хомяки восприимчивы к вирусу SARS-CoV-2 и показывают аналогичное с человеком

развитие пневмонии при заражении. Клинические проявления болезни у хомяков были ярко выражены. Признаками клинических проявлений являлись понижение температуры тела, обеспокоенность, пассивность. Также при наблюдении в течение 2 нед отмечали значительное снижение массы тела у зараженных хомяков. Возможным проявленным клиническим признаком болезни могут быть эритемные высыпания красного цвета на коже вокруг хвоста, выступившие у некоторых хомяков. При этом показана низкая летальность среди зараженных хомяков. Вирус быстро реплицируется в клетках дыхательных путей. В настоящей работе показана воздушно-капельная передача вируса при контактном содержании здоровыми хомяка с зараженными животными. Полученные результаты подтверждают, что хомяки могут быть полезными в создании биологической модели для оценки вакцин-кандидатов к COVID-19, поскольку картина патогенеза и клинических проявлений у этого животного близка к проявлениям вируса у человека.

ЛИТЕРАТУРА

- Schalk A.F., Hawn M.C. An apparently new respiratory disease of baby chicks. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1931; 78: 413–23.
- Almeida J.D., Berry D.M., Cunningham C.H., Hamre D., Hofstad M.S., Mallucci L., et al. Virology: Coronaviruses. *Nature.* 1968; 220: 650. <https://doi.org/10.1038/220650b0>
- Львов Д.К., ред. *Вирусы и вирусные инфекции человека и животных. Руководство по вирусологии.* М.: МИА; 2013. <https://elibrary.ru/tlzmhf>
- Чучалин А.Г. Тяжелый острый респираторный синдром. *Терапевтический архив.* 2004; 76(3): 5–11. <https://elibrary.ru/ojztgl>
- Щелканов М.Ю., Колобухина Л.В., Львов Д.К. Коронавирусы человека (Nidovirales, Coronaviridae): возросший уровень эпидемической опасности. *Лечащий врач.* 2013; (10): 49–54. <https://elibrary.ru/takhvr>
- WHO. Summary of probable SARS cases with onset of illness from 1 November 2002 to 31 July 2003 (based on data as of the 31 December 2003). Available at: <https://www.who.int/publications/m/item/summary-of-probable-sars-cases-with-onset-of-illness-from-1-november-2002-to-31-july-2003>
- Li W., Shi Z., Yu M., Ren W., Smith C., Epstein J.H., et al. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science.* 2005; 310(5748): 676–9. <https://doi.org/10.1126/science.1118391>
- Menachery V.D., Yount B.L. Jr, Debbink K., Agnihothram S., Gralinski L.E., Plante J.A., et al. A SARS-like cluster of circulating bat coronaviruses shows potential for human emergence. *Nat. Med.* 2015; 21(12): 1508–13. <https://doi.org/10.1038/nm.3985>
- Щелканов М.Ю., Попова А.Ю., Дедков В.Г., Акимкин В.Г., Малеев В.В. История изучения и современная классификация коронавирусов (Nidovirales: Coronaviridae). *Инфекция и иммунитет.* 2020; 10(2): 221–46. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-NOI-1412> <https://elibrary.ru/kziwrq>
- Чучалин А.Г., ред. *Пульмонология: национальное руководство.* М.: ГЭОТАР-Медиа; 2016.
- Ryu S., Chun B.C. An interim review of the epidemiological characteristics of 2019 novel coronavirus. *Epidemiol. Health.* 2020; 42: e2020006. <https://doi.org/10.4178/epih.e2020006>
- Wu F., Zhao S., Yu B., Chen Y.M., Wang W., Song Z.G., et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature.* 2020; 579(7798): 265–9. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2008-3>
- Gorbalenya A.E., Baker S.C., Baric R.S., de Groot R.J., Drosten C., Gulyaeva A.A., et al. Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: the species and its viruses – a statement of the Coronavirus Study Group. *bioRxiv.* 2020. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2020.02.07.937862>
- Li Q., Guan X., Wu P., Wang X., Zhou L., Tong Y., et al. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia. *N. Engl. J. Med.* 2020; 382(13): 1199–207. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2001316>
- Wu Z., McGoogan J.M. Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: summary of a report of 72314 CASES FROM the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA.* 2020; 323(13): 1239–42. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.2648>
- Wu J.T., Leung K., Bushman M., Kishore N., Niehus R., de Salazar P.M., et al. Estimating clinical severity of COVID-19 from the transmission dynamics in Wuhan, China. *Nat. Med.* 2020; 26(4): 506–10. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0822-7>
- WHO. COVID-19 vaccine tracker and landscape. Available at: <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>
- Sia S.F., Yan L.M., Chin A.W.H., Fung K., Choy K.T., Wong A.Y.L., et al. Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden hamsters. *Nature.* 2020; 583(7818): 834–8. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2342-5>
- Bolles M., Deming D., Long K., Agnihothram S., Whitmore A., Ferris M., et al. A double-inactivated severe acute respiratory syndrome coronavirus vaccine provides incomplete protection in mice and induces increased eosinophilic proinflammatory pulmonary response upon challenge. *J. Virol.* 2011; 85(23): 12201–15. <https://doi.org/10.1128/jvi.06048-11>
- Roberts A., Lamirande E.W., Vogel L., Jackson J.P., Paddock C.D., Guarner J., et al. Animal models and vaccines for SARS-CoV infection. *Virus Res.* 2008; 133(1): 20–32. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.03.025>
- Roberts A., Vogel L., Guarner J., Hayes N., Murphy B., Zaki S., et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection of golden Syrian hamsters. *J. Virol.* 2005; 79(1): 503–11. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.1.503-511.2005>
- Касенов М.М., Орынбаев М.Б., Закарья К., Керимбаев А.А., Жугунисов К.Д., Султанкулова К.Т. и др. Штамм «SARS-CoV-2/KZ_Almaly/04.2020» вируса коронавирусной инфекции COVID-19, используемый для приготовления средств специфической профилактики, лабораторной диагностики и оценки эффективности биологической защиты вакцин против коронавирусной инфекции COVID-19. Патент РК № 34762; 2020.
- Белозерцева И.В., Блинов Д.В., Красильщикова М.С., ред. *Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных.* СПб.; 2014.
- Боль Б.К. *Патологоанатомическое вскрытие сельскохозяйственных животных.* М.: Сельхозгиз; 1950.
- Gretebeck L.M., Subbarao K. Animal models for SARS and MERS coronaviruses. *Curr. Opin. Virol.* 2015; 13: 123–9. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.06.009>
- Fehr A.R., Perlman S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods Mol. Biol.* 2015; 1282: 1–23. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2438-7_1
- Lau S.K.P., Lau C.C.Y., Chan K.H., Li C.P.Y., Chen H., Jin D.Y., et al. Delayed induction of proinflammatory cytokines and suppression of innate antiviral response by the novel Middle East respiratory syndrome coronavirus: implications for pathogenesis and treatment. *J. Gen. Virol.* 2013; 94(Pt. 12): 2679–90. <https://doi.org/10.1099/vir.0.055533-0>
- Chu H., Chan J.F., Yuen T.T., Shuai H., Yuan S., Wang Y., et al. Comparative tropism, replication kinetics, and cell damage profiling of SARS-CoV-2 and SARS-CoV with implications for clinical manifestations, transmissibility, and laboratory studies of COVID-19: an observational study. *Lancet Microbe.* 2020; 1(1): e14–23. [https://doi.org/10.1016/s2666-5247\(20\)30004-5](https://doi.org/10.1016/s2666-5247(20)30004-5)
- Chan J.F., Zhang A.J., Yuan S., Poon V.K., Chan C.C., Lee A.C., et al. Simulation of the clinical and pathological manifestations of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in golden Syrian hamster model: implications for disease pathogenesis and transmissibility. *Clin. Infect. Dis.* 2020; 71(9): 2428–46. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa325>
- Galván Casas C., Català A., Carretero Hernández G., Rodríguez-Jiménez P., Fernández-Nieto D., Rodríguez-Villa Lario A., et al. Classification of the cutaneous manifestations of COVID-19: a rapid prospective nationwide consensus study in Spain with 375 cases. *Br. J. Dermatol.* 2020; 183(1): 71–7. <https://doi.org/10.1111/bjd.19163>

REFERENCES

- Schalk A.F., Hawn M.C. An apparently new respiratory disease of baby chicks. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1931; 78: 413–23.
- Almeida J.D., Berry D.M., Cunningham C.H., Hamre D., Hofstad M.S., Mallucci L., et al. Virology: Coronaviruses. *Nature*. 1968; 220: 650. <https://doi.org/10.1038/220650b0>
- Lvov D.K., ed. *Viruses and Viral Infections of Humans and Animals. Handbook of Virology [Virusy i virusnye infektsii cheloveka i zhivotnykh. Rukovodstvo po virusologii]*. Moscow: MIA; 2013. <https://elibrary.ru/tlzmhf> (in Russian)
- Chuchalin A.G. Severe acute respiratory syndrome (SARS). *Terapevticheskiy arkhiv*. 2004; 76(3): 5–11. <https://elibrary.ru/ojztgl> (in Russian)
- Shchelkanov M.Yu., Kolobukhina L.V., Lvov D.K. Human coronaviruses (Nidovirales, Coronaviridae): increased level of epidemic threat. *Lechashchiy vrach*. 2013; (10): 49–54. <https://elibrary.ru/takhrv> (in Russian)
- WHO. Summary of probable SARS cases with onset of illness from 1 November 2002 to 31 July 2003 (based on data as of the 31 December 2003). Available at: <https://www.who.int/publications/m/item/summary-of-probable-sars-cases-with-onset-of-illness-from-1-november-2002-to-31-july-2003>
- Li W., Shi Z., Yu M., Ren W., Smith C., Epstein J.H., et al. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science*. 2005; 310(5748): 676–9. <https://doi.org/10.1126/science.1118391>
- Menachery V.D., Yount B.L. Jr, Debink K., Agnihothram S., Gralinski L.E., Plante J.A., et al. A SARS-like cluster of circulating bat coronaviruses shows potential for human emergence. *Nat. Med.* 2015; 21(12): 1508–13. <https://doi.org/10.1038/nm.3985>
- Shchelkanov M.Yu., Popova A.Yu., Dedkov V.G., Akimkin V.G., Maleev V.V. History of investigation and current classification of coronaviruses (Nidovirales: Coronaviridae). *Infektsiya i immunitet*. 2020; 10(2): 221–46. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-HOI-1412> <https://elibrary.ru/kziwrq> (in Russian)
- Chuchalin A.G., ed. *Pulmonology: National Guide [Pul'monologiya: natsional'noe rukovodstvo]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2016. (in Russian)
- Ryu S., Chun B.C. An interim review of the epidemiological characteristics of 2019 novel coronavirus. *Epidemiol. Health*. 2020; 42: e2020006. <https://doi.org/10.4178/epih.e2020006>
- Wu F., Zhao S., Yu B., Chen Y.M., Wang W., Song Z.G., et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*. 2020; 579(7798): 265–9. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2008-3>
- Gorbalenya A.E., Baker S.C., Baric R.S., de Groot R.J., Drosten C., Gulyaeva A.A., et al. Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: the species and its viruses – a statement of the Coronavirus Study Group. *bioRxiv*. 2020. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2020.02.07.937862>
- Li Q., Guan X., Wu P., Wang X., Zhou L., Tong Y., et al. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia. *N. Engl. J. Med.* 2020; 382(13): 1199–207. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2001316>
- Wu Z., McGoogan J.M. Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: summary of a report of 72314 CASES FROM the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA*. 2020; 323(13): 1239–42. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.2648>
- Wu J.T., Leung K., Bushman M., Kishore N., Niehus R., de Salazar P.M., et al. Estimating clinical severity of COVID-19 from the transmission dynamics in Wuhan, China. *Nat. Med.* 2020; 26(4): 506–10. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0822-7>
- WHO. COVID-19 vaccine tracker and landscape. Available at: <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>
- Sia S.F., Yan L.M., Chin A.W.H., Fung K., Choy K.T., Wong A.Y.L., et al. Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden hamsters. *Nature*. 2020; 583(7818): 834–8. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2342-5>
- Bolles M., Deming D., Long K., Agnihothram S., Whitmore A., Ferris M., et al. A double-inactivated severe acute respiratory syndrome coronavirus vaccine provides incomplete protection in mice and induces increased eosinophilic proinflammatory pulmonary response upon challenge. *J. Virol.* 2011; 85(23): 12201–15. <https://doi.org/10.1128/jvi.06048-11>
- Roberts A., Lamirande E.W., Vogel L., Jackson J.P., Paddock C.D., Guarner J., et al. Animal models and vaccines for SARS-CoV infection. *Virus Res*. 2008; 133(1): 20–32. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.03.025>
- Roberts A., Vogel L., Guarner J., Hayes N., Murphy B., Zaki S., et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection of golden Syrian hamsters. *J. Virol.* 2005; 79(1): 503–11. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.1.503-511.2005>
- Kasenov M.M., Orynbaev M.B., Zakar'ya K., Kerimbaev A.A., Zhugunisov K.D., Sultankulova K.T., et al. The strain “SARS-CoV-2/KZ_Almalyk/04.2020” of the COVID-19 coronavirus infection virus, used for the preparation of specific prophylaxis, laboratory diagnostics and evaluation of the effectiveness of biological protection of vaccines against COVID-19 coronavirus infection. Patent RK № 34762; 2020. (in Russian)
- Belozertseva I.V., Blinov D.V., Krasil'shchikova M.S., eds. *Guidelines for the Keeping and Use of Laboratory Animals [Rukovodstvo po soderzhaniiyu i ispol'zovaniyu laboratornykh zhivotnykh]*. St. Petersburg; 2014. (in Russian)
- Bol' B.K. *Pathoanatomical Autopsy of Farm Animals [Patologo-anatomicheskoe vskrytie sel'skokhozyaystvennykh zhivotnykh]*. Moscow: Sel'khozgiz; 1950. (in Russian)
- Gretebeck L.M., Subbarao K. Animal models for SARS and MERS coronaviruses. *Curr. Opin. Virol.* 2015; 13: 123–9. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.06.009>
- Fehr A.R., Perlman S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods Mol. Biol.* 2015; 1282: 1–23. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2438-7_1
- Lau S.K.P., Lau C.C.Y., Chan K.H., Li C.P.Y., Chen H., Jin D.Y., et al. Delayed induction of proinflammatory cytokines and suppression of innate antiviral response by the novel Middle East respiratory syndrome coronavirus: implications for pathogenesis and treatment. *J. Gen. Virol.* 2013; 94(Pt. 12): 2679–90. <https://doi.org/10.1099/vir.0.055533-0>
- Chu H., Chan J.F., Yuen T.T., Shuai H., Yuan S., Wang Y., et al. Comparative tropism, replication kinetics, and cell damage profiling of SARS-CoV-2 and SARS-CoV with implications for clinical manifestations, transmissibility, and laboratory studies of COVID-19: an observational study. *Lancet Microbe*. 2020; 1(1): e14–23. [https://doi.org/10.1016/s2666-5247\(20\)30004-5](https://doi.org/10.1016/s2666-5247(20)30004-5)
- Chan J.F., Zhang A.J., Yuan S., Poon V.K., Chan C.C., Lee A.C., et al. Simulation of the clinical and pathological manifestations of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in golden Syrian hamster model: implications for disease pathogenesis and transmissibility. *Clin. Infect. Dis.* 2020; 71(9): 2428–46. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa325>
- Galván Casas C., Català A., Carretero Hernández G., Rodríguez-Jiménez P., Fernández-Nieto D., Rodríguez-Villa Lario A., et al. Classification of the cutaneous manifestations of COVID-19: a rapid prospective nationwide consensus study in Spain with 375 cases. *Br. J. Dermatol.* 2020; 183(1): 71–7. <https://doi.org/10.1111/bjd.19163>

Информация об авторах:

Туысканова Молдир Сержанкызы ✉ – магистр педагогических наук по специальности биология, младший научный сотрудник РГП «Научный исследовательский институт проблем биологической безопасности» КН МЗ РК, пгт. Гвардейский, Казахстан; Казахский национальный университет имени Аль-Фараби, Алматы, Казахстан. E-mail: monica_94@list.ru; <https://orcid.org/0000-0001-6565-082X>

Жугунисов Куандык Даулетбаевич – PhD, заведующий лабораторией «Коллекция микроорганизмов» РГП «Научный исследовательский институт проблем биологической безопасности» КН МЗ РК, пгт. Гвардейский, Казахстан. E-mail: kuandyk_83@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-4238-5116>

Ozaslan Mehmet – профессор, преподаватель Газиантепского университета, Газиантеп, Турция. E-mail: ozaslanmd@yahoo.com; <https://orcid.org/0000-0001-9380-4902>

Мырзахметова Балжан Шайзадаевна – канд. ветеринар. наук, заведующая лабораторией «Особо опасные инфекционные заболевания» РГП «Научный исследовательский институт проблем биологической безопасности» КН МЗ РК, пгт. Гвардейский, Казахстан. E-mail: balzhan.msh@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-4141-7174>

Кутумбетов Леспек Бекболатович – профессор, главный научный сотрудник РГП «Научный исследовательский институт проблем биологической безопасности» КН МЗ РК, пгт. Гвардейский, Казахстан. E-mail: lespek.k@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0001-8481-0673>

Участие авторов: Туысканова М.С. – проведение экспериментов, статистическая обработка результатов; оформление статьи; Жугунисов К.Д. – планирование исследования, статистическая обработка результатов; Ozaslan M. – статистическая обработка результатов, помощь в оформлении статьи; Мырзахметова Б.Ш. – планирование исследования, проведение экспериментов; Кутумбетов Л.Б. – планирование исследования, проведение экспериментов.

Поступила 27.10.2023

Принята в печать 14.12.2023

Опубликована 29.12.2023

Information about the authors:

Moldir S. Tuyskanova ✉ – Master of Pedagogical Sciences, majoring in biology, junior researcher, Research Institute of Biological Safety Problems, Gvardeyskiy, Republic of Kazakhstan; Institute of the Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan, Almaty, Republic of Kazakhstan. E-mail: monica_94@list.ru; <https://orcid.org/0000-0001-6565-082X>

Kuandyk D. Zhugunisov – PhD, head of the laboratory Collection of microorganisms, Research Institute of Biological Safety Problems, Gvardeyskiy, Republic of Kazakhstan. E-mail: kuandyk_83@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-4238-5116>

Mehmet Ozaslan – professor, lecturer, Gaziantep University, Gaziantep, Turkey. E-mail: ozaslanmd@yahoo.com; <https://orcid.org/0000-0001-9380-4902>

Balzhan Sh. Myrzakhmetova – Candidate of Veterinary Sciences, Head of the Laboratory Especially Dangerous Infectious Diseases, Research Institute of Biological Safety Problems, Gvardeyskiy, Republic of Kazakhstan. E-mail: balzhan.msh@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-4141-7174>

Lespek B. Kutumbetov – professor, chief researcher, Research Institute of Biological Safety Problems, Gvardeyskiy, Republic of Kazakhstan. E-mail: lespek.k@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0001-8481-0673>

Contribution: Tuyskanova M.S. – conducting experiments, statistical processing of results, article design; Zhugunisov K.D. – study planning, statistical processing of results; Ozaslan M. – statistical processing of results, assistance in design of the article; Myrzakhmetova B.Sh. – planning the study, conducting experiments; Kutumbetov L.B. – planning the study, conducting experiments.

Received 27 October 2023

Accepted 14 December 2023

Published 29 December 2023

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-203>

© ИВАНОВ П.А., ЛЯШКО А.В., КОСТ В.Ю., ЛОМАКИНА Н.Ф., РТИЩЕВ А.А., БУНЬКОВА Н.И., ТИМОФЕЕВА Т.А., БАЛАНОВА М.А., ИОНОВ С.А., ГОРИКОВ Д.В., МАРКУШИН С.Г., 2023



Определение активности полимеразы холодоадаптированного вируса гриппа (Orthomyxoviridae: *Alphainfluenzavirus*) методом минигенома с флуоресцентным белком

Иванов П.А.¹, Ляшко А.В.¹, Кост В.Ю.², Ломакина Н.Ф.^{1✉}, Ртищев А.А.³, Бунькова Н.И.¹, Тимофеева Т.А.¹, Баланова М.А.¹, Ионов С.А.^{1,4}, Гориков Д.В.^{1,4}, Маркушин С.Г.³

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

²ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, 117997, г. Москва, Россия;

³ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 105064, г. Москва, Россия;

⁴ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева», 125047, г. Москва, Россия

Резюме

Введение. Ранее было показано, что полимеразные белки PB1 и PB2 определяют холодоадаптированный фенотип вируса гриппа A/Краснодар/101/35/59 (H2N2).

Цель работы. Создать репортерные конструкции и определить активность вирусной полимеразы при 33 и 37 °С методом минигенома.

Материалы и методы. Совместная трансфекция клеток Cos-1 плазмидами pHW2000, экспрессирующими белки вирусной полимеразы PB1, PB2, PA, NP (минигеном) и репортерную конструкцию.

Результаты. На основе сегмента 8 созданы две репортерные конструкции, которые содержат прямую или инвертированную последовательность NS1-GFP-NS2 для экспрессии белков NS2 и NS1, трансляционно слитных с зелёным флуоресцентным белком (GFP), которые позволили оценить транскрипционную и/или репликативную функции вирусной полимеразы.

Заключение. Полимераза вируса A/Краснодар/101/35/59 (H2N2) обладает более высокой репликативной и транскрипционной активностью при 33 °С, чем при 37 °С. Её транскрипционная активность в большей степени зависит от температуры, чем репликативная. Репликативная и транскрипционная активности полимеразы вируса A/Puerto Rico/8/34 (H1N1, вариант Mount Sinai) не имеют существенных различий и не зависят от температуры.

Ключевые слова: обратная генетика; вирус гриппа А; полимеразы вируса гриппа; минигеном вируса гриппа; зелёный флуоресцентный белок; холодоадаптированный вирус гриппа

Для цитирования: Иванов П.А., Ляшко А.В., Кост В.Ю., Ломакина Н.Ф., Ртищев А.А., Бунькова Н.И., Тимофеева Т.А., Баланова М.А., Ионов С.А., Гориков Д.В., Маркушин С.Г. Определение активности полимеразы холодоадаптированного вируса гриппа (Orthomyxoviridae: *Alphainfluenzavirus*) методом минигенома с флуоресцентным белком. *Вопросы вирусологии*. 2023; 68(6): 526–535. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-203> EDN: <https://elibrary.ru/lxvxzf>

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

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

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-203>

Determination of cold-adapted influenza virus (Orthomyxoviridae: *Alphainfluenzavirus*) polymerase activity by the minigenome method with a fluorescent protein

Pavel A. Ivanov¹, Aleksandr V. Lyashko¹, Vladimir Yu. Kost², Natalia F. Lomakina¹✉, Artyom A. Rtishchev³, Nataliya I. Bunkova¹, Tatiana A. Timofeeva¹, Marina A. Balanova¹, Stepan A. Ionov^{1,4}, Dmitry V. Gorikov^{1,4}, Stanislav G. Markushin³

¹N.F. Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology, the Russian Ministry of Health, 123098, Moscow, Russia;

²Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, 117997, Moscow, Russia;

³Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, 105064, Moscow, Russia;

⁴Mendeleev University of Chemical Technology, 125047, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. Polymerase proteins PB1 and PB2 determine the cold-adapted phenotype of the influenza virus A/Krasnodar/101/35/59 (H2N2), as was shown earlier.

Objective. The development of the reporter construct to determine the activity of viral polymerase at 33 and 37 °C using the minigenome method.

Materials and methods. Co-transfection of Cos-1 cells with pHW2000 plasmids expressing viral polymerase proteins PB1, PB2, PA, NP (minigenome) and reporter construct.

Results. Based on segment 8, two reporter constructs were created that contain a direct or inverted NS1-GFP-NS2 sequence for the expression of NS2 and NS1 proteins translationally fused with green fluorescent protein (GFP), which allowed the evaluation the transcriptional and/or replicative activity of viral polymerase.

Conclusion. Polymerase of virus A/Krasnodar/101/35/59 (H2N2) has higher replicative and transcriptional activity at 33 °C than at 37 °C. Its transcriptional activity is more temperature-dependent than its replicative activity. The replicative and transcriptional activity of polymerase A/Puerto Rico/8/34 virus (H1N1, Mount Sinai variant) have no significant differences and do not depend on temperature.

Keywords: reverse genetics; influenza A virus; influenza virus polymerase; influenza virus minigenome; green fluorescent protein; cold-adapted influenza virus

For citation: Ivanov P.A., Lyashko A.V., Kost V.Yu., Lomakina N.F., Rtishchev A.A., Bunkova N.I., Timofeeva T.A., Balanova M.A., Ionov S.A., Gorikov D.V., Markushin S.G. Determination of cold-adapted influenza virus (Orthomyxoviridae: *Alphainfluenzavirus*) polymerase activity by the minigenome method with a fluorescent protein. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2023; 68(6): 526–535. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-203> EDN: <https://elibrary.ru/lxvxzf>

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

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

Введение

Вирус гриппа А, представитель семейства *Orthomyxoviridae*, имеет сегментированный геном из однонитчатой «минус»-цепи РНК. Каждый из 8 сегментов кодирует 1–2 и более вирусных белков и упакован в виде рибонуклеопротеида (РНП). В состав последнего входят вирионная «минус»-цепь РНК (вирусная геномная РНК, vRNA), покрытая, как бусами, молекулами вирусного белка NP, и одна копия вирусной полимеразы в виде гетеротримера из белков PB1, PB2, PA. С этой структуры в ядре инфицированной клетки вирусная полимеразы осуществляет сначала транскрипцию, а позднее репликацию вирусной РНК. Сегмент 8 кодирует два белка – NS1 и NEP/NS2, из которых последний транслируется со сплайсированной матричной РНК (mRNA) и принимает участие в транспорте вновь

образованных РНП из ядра к клеточной мембране для сборки новых вирионов. Сегменты 4 и 6 кодируют поверхностные гликопротеиды HA и NA, которые служат основными антигенными детерминантами, провоцирующими развитие иммунного ответа в инфицированном организме [1]. HA обеспечивает взаимодействие вириона с рецепторами и проникновение вирусного генома в клетку, а NA способствует выходу вирусного потомства из клетки.

Вирус гриппа сопровождает человечество на протяжении столетий и наиболее громко напоминает о себе во время сезонных эпидемий гриппа, которые в ряде случаев характеризуются высокой смертностью. Одной из действенных превентивных мер против гриппа остается вакцинация. На сегодняшний день существует огромное разнообразие противогриппозных вакцин, созданных на основе различных технологий

[1]. Среди цельновирионных вакцин, к которым относятся инактивированные и живые аттенуированные вакцины, наиболее эффективными считаются вторые. Принцип их действия основан на том, что вакцинный штамм способен размножаться при пониженной температуре (25–33 °С), которая соответствует температуре в носовых ходах человека. В нижних дыхательных путях, где температура превышает 37 °С, вирус утрачивает способность размножаться и элиминируется из организма, не вызывая заболевания. Контакт с вакцинным вирусом активизирует гуморальный и клеточный иммунитет, который защищает организм от тяжелого заболевания при встрече с диким вирусом. В свое время в качестве живой вакцины против вирусов гриппа А H2N2 применяли аттенуированные холодадаптированные штаммы A/Leningrad/134/17/57 в России и A/Ann Arbor/6/60 в США [2–4]. Позднее эти штаммы использовали в качестве доноров аттенуации при получении реассортантных вакцинных штаммов, в которых гены поверхностных белков HA и NA были заменены на гены циркулирующих актуальных штаммов [5–7].

Существенный прогресс в создании противогриппозных вакцин был достигнут благодаря методу обратной генетики. Суть его заключается в том, что каждый из восьми сегментов генома вируса гриппа А клонирован в плазмиде. Из этих плазмид, как из конструктора, можно собирать вирус с заданными свойствами [8–10].

Одним из вирусов, реконструированных плазмидной технологией, был вирус A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), обладающий высокой репродуктивной способностью в куриных эмбрионах (КЭ). Его предполагалось использовать в качестве донора генов внутренних белков при создании инактивированных рекомбинантных вакцин, в частности, против вируса H5N1 [11].

В США в настоящее время лицензионно одобрено применение метода обратной генетики в производстве противогриппозных вакцин, включая живую вакцину FluMist против сезонного гриппа (<http://www.flu.org.cn/en/news-11930.html>) [5].

Обратная генетика широко используется в исследовании функции вирусных белков и механизмов их взаимодействия с клеточными факторами хозяина, а также для выяснения роли определенных участков генома и точечных мутаций в изменении фенотипа.

Применение плазмидной технологии позволяет проводить исследование без сборки полноценного вируса. Например, для выяснения активности вирусной полимеразы достаточно собрать конструкцию из плазмид, экспрессирующих белки PB1, PB2, PA и NP, – так называемый минигеном. Чтобы по флуоресцентному или люминесцентному свечению оценить экспрессию минигенома в трансфицированных клетках, в конструкцию дополнительно вводят репортерный ген, экспрессирующий зеленый флуоресцентный белок (green fluorescent protein, GFP), или люциферазу [12, 13].

Совершенствование технологии обратной генетики применительно к вирусу гриппа заключается в кон-

струировании плазмид под конкретные цели, упрощении синтеза копий вирусных генов в виде кДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и способа их встраивания в плазмиды для клонирования. Первые системы для полноценной сборки вируса включали 12 плазмид, в последующем их число удалось сократить до 8 и менее. Конструкция двухцепочечной плазмиды rHW2000 с двумя промоторами позволила с одного встроенного фрагмента ДНК на одной цепи синтезировать mRNA для трансляции вирусного белка, а в противоположном направлении, на комплементарной цепи, получить vRNA, которая впоследствии входит в состав РНП зрелых вирионов. При этом для синтеза mRNA используется сильный цитомегаловирусный промотор (CMV), который узнается клеточной РНК-полимеразой II; для синтеза vRNA используется клеточный промотор для РНК-полимеразы I [9, 10].

Исследования на молекулярном уровне холодадаптированных штаммов показали, что большинство мутаций, ответственных за ts-, sa-, att¹-фенотип, локализованы в генах полимеразного комплекса. Так, для штамма A/Ann Arbor/6/60 выявлены точечные мутации в PB2 (N265S), PB1 (K391E, D581G и A661T) и NP (D34G) [14, 15], для штамма A/Leningrad/134/57 мутации обнаружены в генах PB2 (V478L), PB1 (K265N, V591I) и NEP (M100I) [16]. Введение этих мутаций в соответствующие сегменты различных штаммов вируса гриппа методом обратной генетики приводило к проявлению признаков ts-, sa- и att-фенотипа в разной степени в зависимости от штамма вируса, в который были внесены мутации. Один из возможных механизмов аттенуации и холодадаптации может быть связан с нарушением транскрипционной и/или репликативной активности полимеразы при повышенной температуре. В работе L. Rodriguez и соавт. [15], где применяли метод минигенома, было показано, что введение соответствующих мутаций в сегменты полимеразы штамма A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) приводило к существенному уменьшению ее активности при повышении температуры до 37 и 39 °С.

При поисках новых доноров аттенуации в России был получен холодадаптированный штамм A/Краснодар/101/35/59 (H2N2), который отличался от своего дикого прародителя мутациями в семи сегментах за исключением сегмента 8 [17, 18]. Две одиночные мутации присутствовали в полимеразных белках PB1 (I147T) и PB2 (V290L). Для выяснения их роли в формировании ts-фенотипа методом обратной генетики аналогичные замены были внесены в вирус A/WSN/33 (H1N1), вследствие чего получили варианты вируса, которые отличались от исходного штамма единственной заменой в PB1 (I147T) либо в PB2 (V290L). Мутантные варианты хорошо размножались в КЭ при 34 °С и хуже при повышенных температурах [19–21].

¹ts – термочувствительность (снижение репродукции при высокой температуре); sa – адаптация к росту при пониженной температуре; att – аттенуация.

Целью настоящей работы было освоение методики получения минигенома вирусов гриппа и репортерной конструкции с флуоресцентным белком, с целью их использования в разработке репортерных конструкций для исследования функции вирусных полимераз в процессах транскрипции и репликации при разном температурном режиме. Для сравнения были взяты гены полимеразных белков (*PB1*, *PB2*, *PA*) и *NP* от холодоадаптированного штамма А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) и штамма А/Puerto Rico/8/34 (H1N1, вариант Mount Sinai).

Материалы и методы

Клонирование генов *PB1*, *PB2*, *PA* и *NP*

Вирус гриппа человека А/Puerto Rico/8/34 (H1N1), вариант Mount Sinai, был получен из коллекции НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского.

Вирусную РНК выделяли из аллантоисной жидкости инфицированных КЭ с помощью набора QIAamp Viral RNA mini kit (#52904; Qiagen, Германия) в соответствии с инструкцией производителя. Обратную транскрипцию проводили при температуре 42 °С в течение 1 ч в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 8 мкл РНК, 1 мкл праймера *uni12* с концентрацией 50 нг/мкл (13,5 нМ), 10 мкл воды, 1 мкл 10 мМ dNTP, 5 мкл 5× буфера и 100 ед. MMLV (ООО «Альфа Фермент», Москва). Полученную кДНК 3 мкл использовали в ПЦР объемом 30 мкл (94 °С – 15 с, 52 °С – 15 с, 72 °С – 1 мин, 30 циклов) со специфическими концевыми праймерами для синтеза полноразмерных сегментов генома [22] в присутствии 0,5 мкл фермента Pfu (ООО «Альфа Фермент», Москва). Амплифицированные фрагменты разделяли электрофорезом в 1,2% агарозном геле, содержащем бромистый этидий, и элюировали из геля набором Diatom DNA Elution (#D1031; ООО «Лаборатория Изоген», Россия). Очищенные сегменты были встроены в вектор pHW2000 безлигазным методом с помощью ДНК-полимеразы T4 [23]. Вектор для клонирования был любезно предоставлен доктором Р. Вебстером (Dr. R. Webster, St. Jude Children's Research Hospital, Мемфис, США).

Конструкции из 8 плазмид pHW2000, включающие сегменты генома для сборки вируса А/Краснодар/101/35/59 (H2N2), были созданы в лаборатории генетики РНК-содержащих вирусов ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова (Москва) [24], как описано ранее [19, 20].

Репортерная конструкция с геном *GFP*

Сегмент 8 вируса А/Краснодар/101/35/59 (H2N2), кодирующий белки NS1 и NS2 (в результате сплайсинга), был заменен репортерной конструкцией, созданной, как описано в работе [25]. Методами ПЦР и безлигазного клонирования [23] из этого сегмента был удален сайт сплайсинга для NS2. Далее последовательность сегмента между стоп-кодоном *NS1* и 3'UTR была заменена на последовательность, содержащую ген *GFP* и сплайсированный ген *NS2*,

разделенные последовательностью для пептида 2А, где происходит «проскок» рибосомы. Конечная конструкция включала последовательно расположенные в одной рамке считывания гены *NS1*, *GFP*, последовательность для пептида 2А и ген *NS2*. В результате трансляции mRNA данной конструкции образуются два отдельных белка: NS1, трансляционно слитный с GFP, и NS2. Конструкция была названа NS1GFPNS2 (рис. 1 а). Затем из векторной части данной конструкции с помощью методов ПЦР и безлигазного клонирования [23] был удален промотор CMV, конструкция названа dCMV (рис. 2). Аналогичным образом была получена плазмидная конструкция, в которой последовательность сегмента NS1GFPNS2 была инвертирована. Конструкция была названа dCMVrev (рис. 3).

Структура праймеров, использованных в работе, доступна по запросу. Структура всех конструкций, встроенных в плазмиды, подтверждена секвенированием.

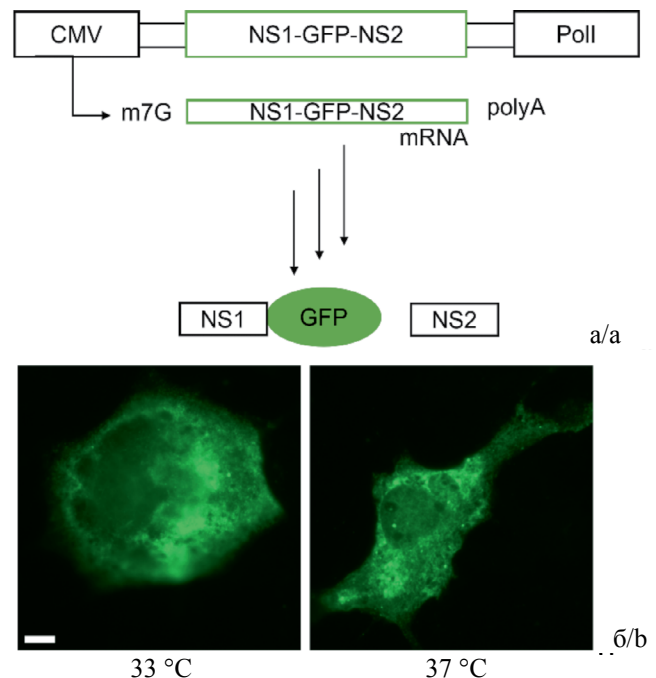


Рис. 1. Репортерная конструкция NS1GFPNS2 (контроль).

а – встроенный в плазмиду модифицированный сегмент 8 вируса гриппа А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) включает ген *NS1* (с удаленным сайтом сплайсинга для *NS2*), ген зеленого флуоресцирующего белка (*GFP*), сплайсированный ген *NS2*. Клеточная РНК-полимераза II с промотора CMV синтезирует мРНК (mRNA) конструкции NS1GFPNS2, с которой транслируются белки NS2 и NS1, трансляционно слитный с GFP; б – экспрессия слитного белка NS1-GFP в трансфицированных клетках Cos-1, культивируемых при 33 °С (слева) и 37 °С (справа). Масштабная линейка – 10 мкм.

Fig. 1. NS1GFPNS2 reporter construct (control).

а – modified segment 8 of A/Krasnodar/101/35/59 (H2N2) influenza virus is inserted in the plasmid which includes the *NS1* gene (with a removed splicing site for *NS2*), the green fluorescent protein gene (*GFP*), and spliced *NS2* gene. Cellular RNA polymerase II uses the CMV promoter of the NS1GFPNS2 reporter to synthesize mRNA (mRNA) followed by translation of NS2 and fused NS1-GFP proteins; б – expression of the fused NS1-GFP protein in transfected Cos-1 cells cultured at 33 °C (left) and 37 °C (right). The scale ruler is 10 microns.

Оценка активности минигенома вируса гриппа по экспрессии белка NS1-GFP

Перевиваемую линию клеток Cos-1 культивировали при температуре 37 °С в атмосфере 5% CO₂ в среде DMEM, содержащей 10% телячьей эмбриональной сыворотки и антибиотиков. Клетки пересеивали 1 раз в 2 дня с использованием 0,25% трипсина в растворе Версена, поддерживая конфлюэнтность 70–90%. Для трансфекции клетки высевали с конфлюэнтностью 70% в 6-луночные планшеты, на дне которых находились покровные стекла. Трансфекцию проводили с помощью липофектина-3000 (Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкции производителя. В лунку 6-луночного планшета вносили 2 мкг ДНК. После трансфекции клетки инкубировали в течение ночи при температуре 37 или 33 °С и фиксировали 3% раствором параформальдегида на фосфатном буфере (ФСБ). Далее покровные стекла с прикрепленными зафиксированными клетками промывали ФСБ и монтировали микроскопический препарат, применяя раствор, содержащий 9,1% Мовиола 4-88 и 2,3% глицерина в 100 mM Tris-HCl, pH 8,5.

Для наблюдения флуоресценции в клетках использовали микроскоп Imager M2 (Carl Zeiss, Германия) с фильтром для FITC и объективом 40×. Изображения клеток получали с помощью цифровой камеры AxioCam 503 mono и сохраняли в формате tiff с 16-битной разрядностью. Изображения обрабатывали и анализировали с помощью программы ImageJ². Перед анализом изображения из него вычитали фоновую флуоресценцию. Для этого на изображении измеряли среднее значение флуоресценции в области, где отсутствовали клетки. Полученную величину вычитали из значений флуоресценции для каждой из точек данного изображения. Чтобы исключить из анализа участки изображения вне клеток, величину порога яркости подбирали вручную. Индивидуальные клетки на изображениях выявляли с помощью команды «analyze particles». Далее для каждой клетки измеряли средний уровень флуоресценции. Было проведено три независимых эксперимента по трансфекции каждой репортерной конструкции. В каждом эксперименте было сделано от 10 до 40 измерений. Для вычисления среднего значения флуоресценции использовали суммарное количество измерений во всех независимых экспериментах для каждой конструкции.

Статистический анализ данных проводили с помощью программы Statistica (StatSoft, США). Для статистического анализа отличий в уровне флуоресценции при различных температурах инкубации трансфицированных клеток использовали критерий Манна–Уитни. Отличия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение*Минигеном и репортерная конструкция с флуоресцентным белком*

Минимальный набор плазмид, способный воспроизвести функцию полимеразы вируса гриппа в инфицированной клетке, состоит из четырех плазмид с сегментами *PB1*, *PB2*, *PA* и *NP*. В одной цепи каждого плазмидного вектора находится CMV, который распознает клеточная РНК-полимераза II и синтезирует с встроенного сегмента mRNA для последующей трансляции вирусного белка. В противоположной цепи расположен промотор для клеточной РНК-полимеразы I, способной синтезировать vRNA с того же сегмента (рис. 1 а).

Чтобы функционирование такого неполного генома (минигеном) в живой клетке можно было наблюдать под микроскопом при флуоресценции, была создана репортерная конструкция. Контролем служила плаزمиды, в которую был встроен модифицированный сегмент 8, с которого экспрессировался белок NEP/NS2 и отдельно белок NS1 с присоединенным к нему GFP. При трансфекции клеток такой одиночной плазмидой в них наблюдали зеленое свечение (рис. 1 б).

Транскрипционная активность

Репортерная плазмиды dCMV (рис. 2) с удаленным промотором CMV для клеточной РНК-полимеразы II может функционировать в живой клетке только в присутствии вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp), образующейся в результате котрансфекции репортерной плазмиды dCMV вместе с плазмидами, несущими вирусные гены *PB2*, *PB1*, *PA* и *NP*. Благодаря клеточной PolII, с одной цепи ДНК(+) встроенной двухцепочечной репортерной конструкции dCMV синтезируется vRNA(-), на которой вирусная RdRp образует mRNA для трансляции флуоресцирующего белка. Наличие флуоресценции свидетельствует о транскрипционной активности вирусной полимеразы.

Репликативная и транскрипционная активность

В случае репортерной плазмиды dCMVrev (рис. 3), в которой встроенный фрагмент NS1GFPNS2 инвертирован, в клетке за счет активности клеточной РНК-полимеразы I с комплементарной цепи ДНК(-) вставки синтезируется комплементарная сRNA(+). Затем происходит репликация, т.е. в результате активности уже вирусной РНК-полимеразы образуется vRNA(-), которая на стадии транскрипции служит матрицей для синтеза mRNA, с которой транслируется флуоресцирующий белок. Таким образом, по экспрессии белка NS1-GFP можно судить о репликативной и транскрипционной активности вирусной полимеразы RdRp.

Активность вирусной полимеразы при разных температурах

Метод минигенома использовали для исследования активности полимераз вирусов A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) и A/Краснодар/101/35/59 (H2N2) при разных температурах.

²Программа в свободном доступе, разработчик Wayne Rasband, NIH, США.

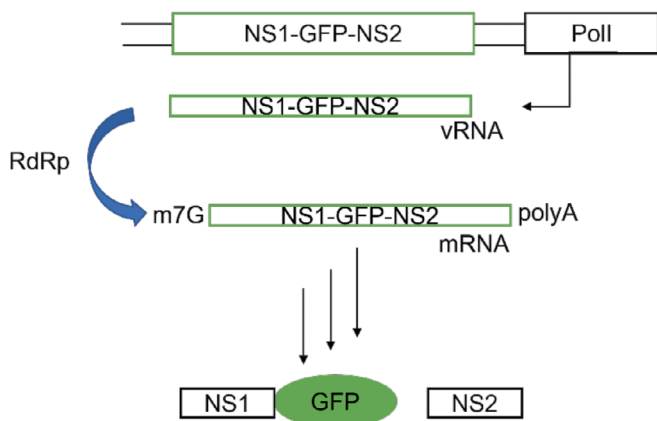


Рис. 2. Репортерная конструкция dCMV для оценки транскрипционной активности вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp).

В плазмиде с встроенной последовательностью NS1GFPNS2 удален промотор CMV. На одной цепи встроенного двухцепочечного фрагмента ДНК клеточная РНК-полимераза I (PolII) с промотора PolII синтезирует вирионную РНК (vRNA), с которой вирусная РНК-полимераза RdRp, экспрессируемая минигеномом, в результате транскрипции синтезирует mRNA для трансляции белков NS1-GFP и NS2.

Fig. 2. The dCMV reporter construct for evaluating the transcriptional activity of viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp).

The CMV promoter has been removed from a plasmid carrying inserted NS1GFPNS2 sequence. On one chain of the inserted double-stranded DNA fragment, cellular RNA polymerase I (PolII) synthesizes virion RNA (vRNA) from the PolII promoter. Then, the viral RNA polymerase RdRp, expressed by the minigenome, uses this vRNA for synthesis of mRNA that translates NS1-GFP and NS2 proteins.

Для каждого вируса был получен минигеном в культуре клеток Cos-1 при одновременной трансфекции плазмидами, экспрессирующими белки PB2, PB1, PA и NP, совместно с репортерной конструкцией dCMV или dCMVrev. Трансфецированные клетки культивировали при 33 или 37 °С. Эффективность трансфекции составляла 5–10%.

При трансфекции клеток только репортерными конструкциями (без вирусного минигенома) специфическая флуоресценция GFP отсутствовала (данные не показаны). При котрансфекции репортерных конструкций вместе с плазмидами, несущими гены *PB2*, *PB1*, *PA* и *NP* обоих вирусов, наблюдали флуоресцентное свечение в трансфецированных клетках. В случае минигенома вируса A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) не было выявлено существенной разницы в флуоресценции клеток, культивируемых при разных температурах (рис. 4, 5 верхний ряд). Однако при коэкспрессии с репортерными конструкциями полимеразы холодоадаптированного штамма A/Краснодар/101/35/59 (H2N2) флуоресценция клеток была значительно выше при пониженной температуре (33 °С) (рис. 4, 5, нижний ряд).

Количественная оценка показала, что при повышении температуры до 37 °С флуоресценция GFP досто-

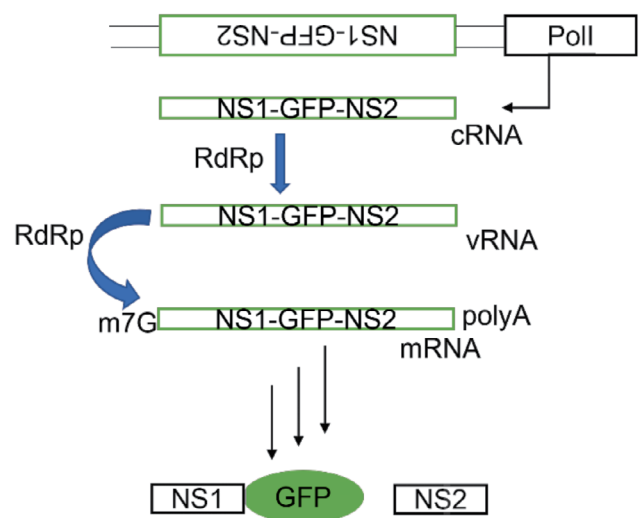


Рис. 3. Репортерная конструкция dCMVrev для оценки репликативной и транскрипционной активности вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp).

В плазмиду встроен инвертированный двухцепочечный ДНК-фрагмент NS1GFPNS2 и удален промотор CMV. Клеточная РНК-полимераза I (PolII) синтезирует комплементарную цепь NS1GFPNS2 встроенной конструкции (cRNA). Вирусная РНК-зависимая РНК-полимераза (RdRp) реплицирует с нее вирусную РНК (vRNA), на которой затем синтезирует mRNA для трансляции белков NS1-GFP и NS2.

Fig. 3. The dCMVrev reporter construct for evaluating the replicative and transcriptional activity of viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp).

An inverted double-stranded DNA fragment NS1GFPNS2 is inserted in the plasmid in which the CMV promoter is deleted. Cellular RNA polymerase I (PolII) synthesizes a complementary NS1GFPNS2 chain (cRNA) of an inserted construct. Viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) replicates viral RNA (vRNA) from cRNA. Then RdRp uses vRNA as a template for synthesis of mRNA for following translation of NS1-GFP and NS2 proteins.

верно снижается для минигенома холодоадаптированного штамма A/Краснодар/101/35/59 (H2N2) в сочетании с обеими репортерными конструкциями как dCMVrev, так и dCMV (рис. 6, серый столбец).

Критерием оценки зависимости активности полимеразы от температуры служит соотношение флуоресценции репортерной конструкции в составе соответствующего минигенома при 33 и 37 °С (Ф33/Ф37, таблица).

Для минигенома холодоадаптированного штамма A/Краснодар/101/35/59 (H2N2) флуоресценция GFP с повышением температуры уменьшается примерно в 5 раз для репортерной конструкции dCMV и примерно в 3 раза для репортерной конструкции dCMVrev (рис. 6), что указывает на повышенную полимеразную активность при 33 °С полимеразы холодоадаптированного штамма. При этом ее транскрипционная активность в большей степени зависит от температуры, чем репликативная (коэффициент 4,9 против 2,7, таблица).

Для полимеразы вируса A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) не было обнаружено существенной зависимости от температуры и достоверных различий в транскрипционной и репликативной + транскрипционной активности (рис. 6, таблица).

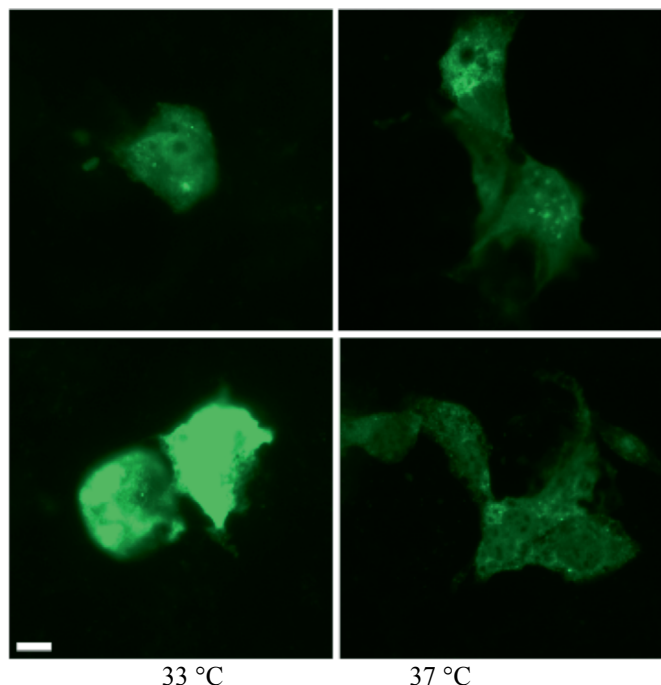


Рис. 4. Экспрессия NS1-GFP в клетках Cos-1 после трансфекции репортерной конструкции без промотора CMV (dCMV) совместно с минигеномом вируса A/Краснодар/101/35/59 (H2N2) (нижний ряд) либо A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) (верхний ряд) при 33 °C (левая колонка) и 37 °C (правая колонка).

Масштабная линейка – 10 мкм.

Fig. 4. Expression of NS1-GFP in Cos-1 cells after transfection with a reporter construct without a CMV promoter (dCMV) together with the minigenome of A/Krasnodar/101/35/59 (H2N2) virus (bottom row), or A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) (top row) at 33 °C (left column) and 37 °C (right column).

The scale ruler is 10 microns.

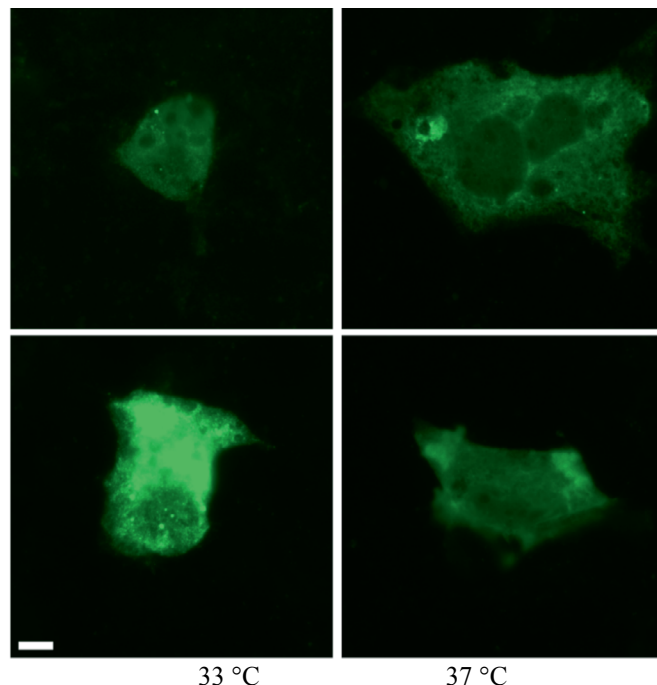


Рис. 5. Экспрессия NS1-GFP в клетках Cos-1 после трансфекции репортерной конструкции с инвертированной последовательностью NS1GFPNS2 и без промотора CMV (dCMVrev) совместно с минигеномом вируса A/Краснодар/101/35/59 (H2N2) (нижний ряд) либо A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) (верхний ряд) при 33 °C (левая колонка) и 37 °C (правая колонка).

Масштабная линейка – 10 мкм.

Fig. 5. Expression of NS1-GFP in Cos-1 cells after cotransfection with a reporter construct carrying an inverted NS1GFPNS2 sequence and deleted a CMV promoter (dCMVrev) together with the minigenome of A/Krasnodar/101/35/59 (H2N2) (bottom row) or A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) (top row) viruses at 33 °C (left column) and 37 °C (right column).

The scale ruler is 10 microns.

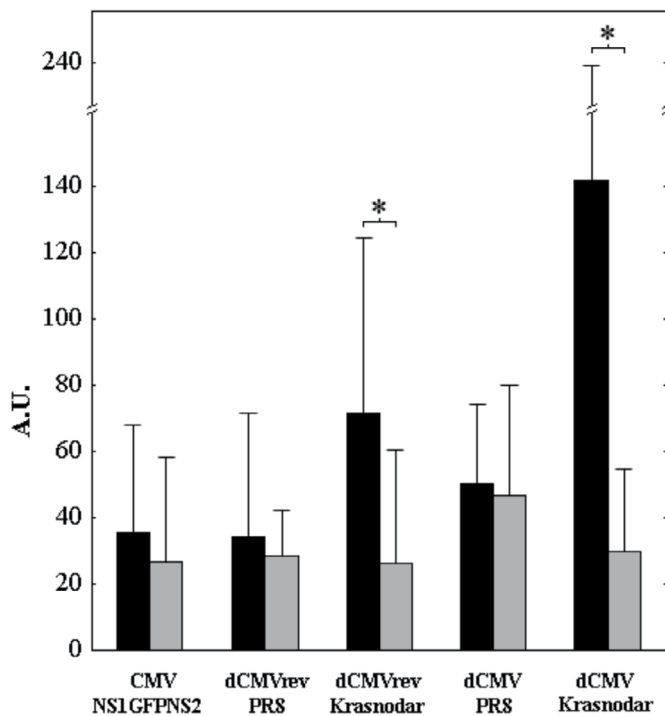


Рис. 6. Флуоресценция NS1-GFP в условных единицах (Arbitrary Units – A.U., вертикальная шкала) при температуре 33 °C (черный столбец) и 37 °C (серый столбец) в клетках Cos-1, трансфицированных репортерными конструкциями совместно с минигеномом вирусов A/Puerto Rico/8/34 (PR8) или A/Краснодар/101/35/59 (Krasnodar).

В каждом столбце приведено среднее арифметическое значение по результатам трех независимых экспериментов со среднеквадратичным отклонением. Конструкция dCMV характеризует активность полимеразы преимущественно при транскрипции, а dCMVrev – активность полимеразы при репликации и транскрипции. * – достоверное различие при $p < 0,008$. Обозначения: CMV/NS1GFPNS2 – репортерная конструкция NS1GFPNS2 с CMV промотором (контроль); dCMV – репортерная конструкция NS1GFPNS2 без промотора CMV; dCMVrev – репортерная конструкция без промотора CMV с инвертированной последовательностью NS1GFPNS2.

Fig. 6. NS1-GFP fluorescence in conventional units (Arbitrary Units – A.U., Y-axis) at a temperature of 33 °C (black column) and 37 °C (gray column) in Cos-1 cells transfected by reporter constructs together with the virus minigenome of A/Puerto Rico/8/34 (PR8) or A/Krasnodar/101/35/59 (Krasnodar).

In each column, the arithmetic mean is given according to the results of three independent experiments with a standard deviation. The dCMV construct characterizes polymerase activity mainly during transcription, and dCMVrev characterizes polymerase activity during replication and transcription. * – significant difference at $p < 0.008$. Designations: CMV/NS1GFPNS2 – NS1GFPNS2 reporter construct with CMV promoter (control); dCMV is a reporter construct of NS1GFPNS2 without a CMV promoter; dCMVrev is a reporter construct without a CMV promoter with an inverted NS1GFPNS2 sequence.

Таблица. Соотношение репликативной и транскрипционной активностей РНК-зависимой РНК-полимеразы вирусов А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) и А/Puerto Rico/8/34 (H1N1) при температуре 33 и 37 °С на основании интенсивности флуоресценции (Φ_{33}/Φ_{37}) зеленого белка, экспрессируемого репортерной конструкцией

Table. The ratio of replicative and transcriptional activities of RNA-dependent RNA polymerase of viruses A/Krasnodar/101/35/59 (H2N2) and A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) at temperatures 33 and 37 °C based on the fluorescence intensity (F33/F37) of the green protein expressed by the reporter construct

Минигеном вируса Minigenome of virus	Функция вирусной полимеразы (репортерная конструкция), значение Φ_{33}/Φ_{37} The function of viral polymerase (reporter construct), F33/F37 value	
	транскрипция transcription (dCMV)	репликация + транскрипция replication + transcription (dCMVrev)
Контроль, NS1GFPNS2 Control, NS1GFPNS2	1,3	–
А/Puerto Rico/8/34	1,1	1,2
А/Краснодар/101/35/59 A/Krasnodar/101/35/59	4,9	2,7

Примечание. Обозначения, как на рис. 6.

Note. Designation according to Fig. 6.

Заключение

Созданы две репортерные конструкции с флуоресцентным белком на основе 8-го сегмента штамма А/Краснодар/101/35/59 (H2N2), позволяющие контролировать репликативную и транскрипционную активность белков полимеразного комплекса вируса гриппа методом минигенома.

С помощью метода минигенома показано, что полимеразы холодоадаптированного вируса А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) обладает более высокой репликативной и транскрипционной активностью при температуре 33 °С, чем при 37 °С, в отличие от полимеразы вируса А/Puerto Rico/8/34 (H1N1, вариант Mount Sinai), активность которой существенно не различается при 33 и 37 °С.

Результаты настоящей работы, полученные методом минигенома, не только подтвердили выводы ранних исследований, проведенных другими методами [20, 21], о том, что ts-фенотип холодоадаптированного штамма А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) обусловлен вирусной полимеразой, но и показали, что транскрипционная активность полимеразы этого штамма в большей степени зависит от температуры, чем репликативная.

ЛИТЕРАТУРА

- Krammer F., Smith G.J.D., Fouchier R.A.M., Peiris M., Kedzierska K., Doherty P.C., et al. Influenza. *Nat. Rev. Dis. Primers*. 2018; 4(1): 3. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0002-y>
- Alexandrova G.I., Smorodintsev A.A. Obtaining of an additionally attenuated vaccinating cryophilic influenza strain. *Rev. Roum. Inframicrobiol.* 1965; 2(3): 179–86.
- Maassab H.F. Adaptation and growth characteristics of influenza virus at 25 degrees C. *Nature*. 1967; 213(76): 612–4. <https://doi.org/10.1038/213612a0>
- Maassab H.F., Bryant M.L. The development of live attenuated cold-adapted influenza virus vaccine for humans. *Rev. Med. Virol.* 1999; 9(4): 237–44. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1099-1654\(199910/12\)9:4%3C237::aid-rmv252%3E3.0.co;2-g](https://doi.org/10.1002/(sici)1099-1654(199910/12)9:4%3C237::aid-rmv252%3E3.0.co;2-g)
- Ambrose C.S., Luke C., Coelingh K. Current status of live attenuated influenza vaccine in the United States for seasonal and pandemic influenza. *Influenza Other Respir. Viruses*. 2008; 2(6): 193–202. <https://doi.org/10.1111/j.1750-2659.2008.00056.x>
- Rudenko L., Yeolekar L., Kiseleva I., Isakova-Sivak I. Development and approval of live attenuated influenza vaccines based on Russian master donor viruses: Process challenges and success stories. *Vaccine*. 2016; 34(45): 5436–41. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.08.018>
- Casparid H., Mallory R.M., Yu J., Ambrose C.S. Live-attenuated influenza vaccine effectiveness in children from 2009 to 2015–2016: a systematic review and meta-analysis. *Open Forum Infect. Dis.* 2017; 4(3): ofx111. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofx111>
- Hoffmann E., Neumann G., Kawaoka Y., Hobom G., Webster R.G. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2000; 97(11): 6108–13. <https://doi.org/10.1073/pnas.100133697>
- Hoffmann E., Krauss S., Perez D., Webby R., Webster R.G. Eight-plasmid system for rapid generation of influenza virus vaccines. *Vaccine*. 2002; 20(25–26): 3165–70. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(02\)00268-2](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(02)00268-2)
- Neumann G., Horimoto T., Kawaoka Y. Reverse genetics of influenza viruses – applications in research and vaccine design. In: Klenk H.D., Matrosovich M.N., Stech J., eds. *Avian Influenza. Volume 27*. Basel: Karger; 2008: 118–33.
- Horimoto T., Takada A., Fujii K., Goto H., Hatta M., Watanabe S., et al. The development and characterization of H5 influenza virus vaccines derived from a 2003 human isolate. *Vaccine*. 2006; 24(17): 3669–76. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.07.005>
- Kittel C., Sereinig S., Ferko B., Stasakova J., Romanova J., Wolkerstorfer A., et al. Rescue of influenza virus expressing GFP from the NS1 reading frame. *Virology*. 2004; 324(1): 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.03.035>
- Te Velthuis AJW, Long JS, Barclay WS. Assays to measure the activity of influenza virus polymerase. In: Yamauchi Y., eds. *Influenza Virus. Methods in Molecular Biology, Volume 1836*. New York: Humana Press; 2018. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8678-1_17
- Cox N.J., Kitame F., Kendal A.P., Maassab H.F., Naeve C. Identification of sequence changes in the cold-adapted, live attenuated influenza vaccine strain, A/Ann Arbor/6/60 (H2N2). *Virology*. 1988; 167(2): 554–67.
- Rodriguez L., Blanco-Lobo P., Reilly E.C., Maehigashi T., Nogales A., Smith A., et al. Comparative study of the temperature sensitive, cold adapted and attenuated mutations present in the master donor viruses of the two commercial human live attenuated influenza vaccines. *Viruses*. 2019; 11(10): 928. <https://doi.org/10.3390/v11100928>
- Isakova-Sivak I., Chen L.M., Matsuoka Y., Voeten J.T., Kiseleva I., Heldens J.G., et al. Genetic bases of the temperature-sensitive phenotype of a master donor virus used in live attenuated influenza vaccines: A/Leningrad/134/17/57 (H2N2). *Virology*. 2011; 412(2): 297–305. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.01.004>
- Гендон Ю.З., Маркушин С.Г., Цфасман Т.М., Акопова Н.К., Ахмадова Н.К., Коптяева И.Б. Новые холодоадаптированные

- штаммы-доноры аттенуации для живых вакцин против гриппа. *Вопросы вирусологии*. 2013; 58(1): 11–7. <https://elibrary.ru/pwjuoj>
18. Маркушин С.Г., Цфасман Т.М., Терехов А.В., Лисовская К.В., Аكوпова И.И. Холодоадаптированный штамм А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) – перспективный штамм-донор аттенуации для получения живых гриппозных вакцин. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2015; (5): 27–32. <https://elibrary.ru/zqjyex>
 19. Маркушин С.Г., Кост В.Ю., Аكوпова И.И., Коптяева И.Б., Лисовская К.В., Переверзев А.Д. и др. Исследование возможности использования сайт-специфического мутагенеза в конструировании живых гриппозных вакцин. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2014; (6): 100–3. <https://elibrary.ru/tenlph>
 20. Kost V., Tsfasman T., Terekhov A., Koptiaeva I., Lisovskaja K., Markushin S. Attenuation of the cold-adapted (ca) A/Krasnodar/101/35/1959 (H2N2) influenza strain: Role of the Ile147Thr mutation in the PB1 gene. *IJSRM.Human*. 2017; 6(2): 96–114.
 21. Кост В.Ю., Ртищев А.А., Минтаев Р.Р., Аكوпова И.И., Лисовская К.В., Маркушин С.Г. Изучение биологических свойств аттенуированных вариантов штамма А/WSN/33, полученных с помощью сайт-специфического мутагенеза PB2-гена. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2019; (2): 68–76. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-2-68-76> <https://elibrary.ru/wrchzu>
 22. Stech J., Stech O., Herwig A., Altmepfen H., Hundt J., Gohrbandt S., et al. Rapid and reliable universal cloning of influenza A virus genes by target-primed plasmid amplification. *Nucleic Acids Res.* 2008; 36(21): e139. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn646>
 23. Jeong J.Y., Yim H.S., Ryu J.Y., Lee H.S., Lee J.H., Seen D.S., et al. One-step sequence- and ligation-independent cloning as a rapid and versatile cloning method for functional genomics studies. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012; 78(15): 5440–3. <https://doi.org/10.1128/aem.00844-12>
 24. Терехов А.В., Цфасман Т.М., Маркушин С.Г., Коптяева И.Б., Лисовская К.В., Кост В.Ю. Изучение att-фенотипа реассортантов между вирулентным штаммом вируса гриппа А(H1N1)/WSN/33 и вакцинным холодоадаптированным штаммом вируса гриппа А(H2N2)/Краснодар/101/35/59. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2013; (5): 41–7. <https://elibrary.ru/refcof>
 25. Perez J.T., Garcia-Sastre A., Manicassamy B. Insertion of a GFP reporter gene in influenza virus. *Curr. Protoc. Microbiol.* 2013; Chapter 15: 15G4. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc15g04s29>

REFERENCES

1. Krammer F., Smith G.J.D., Fouchier R.A.M., Peiris M., Kedzierska K., Doherty P.C., et al. Influenza. *Nat. Rev. Dis. Primers*. 2018; 4(1): 3. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0002-y>
2. Alexandrova G.I., Smorodintsev A.A. Obtaining of an additionally attenuated vaccinating cryophilic influenza strain. *Rev. Roum. Inframicrobiol.* 1965; 2(3): 179–86.
3. Maassab H.F. Adaptation and growth characteristics of influenza virus at 25 degrees C. *Nature*. 1967; 213(76): 612–4. <https://doi.org/10.1038/213612a0>
4. Maassab H.F., Bryant M.L. The development of live attenuated cold-adapted influenza virus vaccine for humans. *Rev. Med. Virol.* 1999; 9(4): 237–44. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1099-1654\(199910/12\)9:4%3C237::aid-rmv252%3E3.0.co;2-g](https://doi.org/10.1002/(sici)1099-1654(199910/12)9:4%3C237::aid-rmv252%3E3.0.co;2-g)
5. Ambrose C.S., Luke C., Coelingh K. Current status of live attenuated influenza vaccine in the United States for seasonal and pandemic influenza. *Influenza Other Respir. Viruses*. 2008; 2(6): 193–202. <https://doi.org/10.1111/j.1750-2659.2008.00056.x>
6. Rudenko L., Yeolekar L., Kiseleva I., Isakova-Sivak I. Development and approval of live attenuated influenza vaccines based on Russian master donor viruses: Process challenges and success stories. *Vaccine*. 2016; 34(45): 5436–41. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.08.018>
7. Caspard H., Mallory R.M., Yu J., Ambrose C.S. Live-attenuated influenza vaccine effectiveness in children from 2009 to 2015-2016: a systematic review and meta-analysis. *Open Forum Infect. Dis.* 2017; 4(3): ofx111. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofx111>
8. Hoffmann E., Neumann G., Kawaoka Y., Hobom G., Webster R.G. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2000; 97(11): 6108–13. <https://doi.org/10.1073/pnas.100133697>
9. Hoffmann E., Krauss S., Perez D., Webby R., Webster R.G. Eight-plasmid system for rapid generation of influenza virus vaccines. *Vaccine*. 2002; 20(25-26): 3165–70. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(02\)00268-2](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(02)00268-2)
10. Neumann G., Horimoto T., Kawaoka Y. Reverse genetics of influenza viruses – applications in research and vaccine design. In: Klenk H.D., Matrosovich M.N., Stech J., eds. *Avian Influenza. Volume 27*. Basel: Karger; 2008: 118–33.
11. Horimoto T., Takada A., Fujii K., Goto H., Hatta M., Watanabe S., et al. The development and characterization of H5 influenza virus vaccines derived from a 2003 human isolate. *Vaccine*. 2006; 24(17): 3669–76. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.07.005>
12. Kittel C., Sereinig S., Ferko B., Stasakova J., Romanova J., Wolkerstorfer A., et al. Rescue of influenza virus expressing GFP from the NS1 reading frame. *Virology*. 2004; 324(1): 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.03.035>
13. Te Velthuis AJW, Long JS, Barclay WS. Assays to measure the activity of influenza virus polymerase. In: Yamauchi Y., eds. *Influenza Virus. Methods in Molecular Biology, Volume 1836*. New York: Humana Press; 2018. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8678-1_17
14. Cox N.J., Kitame F., Kendal A.P., Maassab H.F., Naeve C. Identification of sequence changes in the cold-adapted, live attenuated influenza vaccine strain, A/Ann Arbor/6/60 (H2N2). *Virology*. 1988; 167(2): 554–67.
15. Rodriguez L., Blanco-Lobo P., Reilly E.C., Maehigashi T., Nogales A., Smith A., et al. Comparative study of the temperature sensitive, cold adapted and attenuated mutations present in the master donor viruses of the two commercial human live attenuated influenza vaccines. *Viruses*. 2019; 11(10): 928. <https://doi.org/10.3390/v11100928>
16. Isakova-Sivak I., Chen L.M., Matsuoka Y., Voeten J.T., Kiseleva I., Heldens J.G., et al. Genetic bases of the temperature-sensitive phenotype of a master donor virus used in live attenuated influenza vaccines: A/Leningrad/134/17/57 (H2N2). *Virology*. 2011; 412(2): 297–305. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.01.004>
17. Ghendon Y.Z., Markushin S.G., Tsfasman T.M., Akopova I.I., Ahmatova N.K., Koptiaeva I.B. New cold-adapted donor strains for live influenza vaccine. *Voprosy virusologii*. 2013; 58(1): 11–7. <https://elibrary.ru/pwjuoj> (in Russian)
18. Markushin S.G., Tsfasman T.M., Terekhov A.V., Lisovskaya K.V., Akopova I.I. Cold-adapted A/Krasnodar/101/35/59 (H2N2) strain-a promising strain-donor of attenuation for procurement of live influenza vaccines. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2015; (5): 27–32. <https://elibrary.ru/zqjyex> (in Russian)
19. Markushin S.G., Kost V.Yu., Akopova I.I., Koptiaeva I.B., Lisovskaya K.V., Pereversev A.D., et al. The investigation of the possibility of site-specific mutagenesis using in construction of live influenza vaccines. *Epidemiologiya i vaksinosprofilaktika*. 2014; (6): 100–3. <https://elibrary.ru/tenlph> (in Russian)
20. Kost V., Tsfasman T., Terekhov A., Koptiaeva I., Lisovskaja K., Markushin S. Attenuation of the cold-adapted (ca) A/Krasnodar/101/35/1959 (H2N2) influenza strain: Role of the Ile147Thr mutation in the PB1 gene. *IJSRM.Human*. 2017; 6(2): 96–114.
21. Kost V.Yu., Rtschev A.A., Mintaev R.R., Akopova I.I., Lisovskaya K.V., Markushin S.G. Study of the biological properties of attenuated variants of the virulent A/WSN/33 strain of influenza virus, obtained by the site-specific mutagenesis of PB2-gene. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2019; (2): 68–76. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-2-68-76> <https://elibrary.ru/wrchzu> (in Russian)
22. Stech J., Stech O., Herwig A., Altmepfen H., Hundt J., Gohrbandt S., et al. Rapid and reliable universal cloning of influenza A virus genes by target-primed plasmid amplification. *Nucleic Acids Res.* 2008; 36(21): e139. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn646>
23. Jeong J.Y., Yim H.S., Ryu J.Y., Lee H.S., Lee J.H., Seen D.S., et al. One-step sequence- and ligation-independent cloning as a rapid and versatile cloning method for functional genomics studies. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012; 78(15): 5440–3. <https://doi.org/10.1128/aem.00844-12>
24. Terekhov A.V., Tsfasman T.M., Markushin S.G., Kopt'ayeva I.B., Lisovskaya K.V., Kost V.Yu. Study att-reassortant phenotype between virulent strain of influenza A(H1N1)/WSN/33 and cold-adapted vaccine strain of influenza A(H2N2)/Krasnodar/101/35/59. *Epidemiologiya i vaksinosprofilaktika*. 2013; (5): 41–7. <https://elibrary.ru/refcof> (in Russian)
25. Perez J.T., Garcia-Sastre A., Manicassamy B. Insertion of a GFP reporter gene in influenza virus. *Curr. Protoc. Microbiol.* 2013; Chapter 15: 15G4. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc15g04s29>

Информация об авторах:

Иванов Павел Александрович – канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории физиологии вирусов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: ivanovpa@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-7105-7579>

Ляшко Александр Викторович – младший научный сотрудник лаборатории физиологии вирусов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: lyaalex@bk.ru; <https://orcid.org/0000-0001-5714-9461>

Кост Владимир Юрьевич – научный сотрудник лаборатории молекулярной токсикологии, Институт биоорганической химии им. академиком М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия. E-mail: goron.dekar@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0003-1703-2685>

Ломакина Наталья Федоровна – канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории физиологии вирусов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: nflomakina@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0003-2638-4244>

Ртищев Артём Андреевич – научный сотрудник лаборатория генетики РНК-содержащих вирусов, ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия. E-mail: rtishchevartyom@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-4212-5093>

Бунькова Наталья Ивановна – канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории иммунобиотехнологии, ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: nbounkova@mail.ru; <https://orcid.org/0009-0007-8846-4633>

Тимофеева Татьяна Анатольевна – канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией физиологии вирусов, ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: timofoeva.tatyana@inbox.ru; <https://orcid.org/0000-0002-8991-8525>

Баланова Марина Анатольевна – научный сотрудник лаборатории физиологии вирусов, ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: mbalanova@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0003-2727-7221>

Ионов Степан Александрович – лаборант-исследователь лаборатории физиологии вирусов, ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия; студент, ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева», Москва, Россия. E-mail: stephan.ionov@yandex.ru; <https://orcid.org/0009-0005-3393-0399>

Гориков Дмитрий Вячеславович – лаборант-исследователь лаборатории физиологии вирусов, ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия; студент, ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева», Москва, Россия. E-mail: gorikov.dmitry@mail.ru; <https://orcid.org/0009-0002-5159-8738>

Маркушин Станислав Георгиевич – д-р мед. наук, заведующий лабораторией генетики РНК-содержащих вирусов ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия. E-mail: s.g.markushin@rambler.ru; <https://orcid.org/0000-0003-0994-5337>

Участие авторов: Иванов П.А. – концепция и дизайн исследования, конструирование репортерных плазмид, проведение экспериментов, анализ и интерпретация данных, подготовка текста; Ляшко А.В., Ртищев А.А., Ионов С.А., Гориков Д.В., Баланова М.А. – проведение экспериментов; Кост В.Ю. – конструирование плазмид с встроенными сегментами вируса, проведение экспериментов; Бунькова Н.И. – вирусологические работы; Ломакина Н.Ф. – секвенирование, интерпретация данных, подготовка текста; Тимофеева Т.А. – координация исследований, анализ и интерпретация данных; Маркушин С.Г. – концепция и дизайн исследования, одобрение окончательного варианта статьи для публикации.

Information about the authors:

Pavel A. Ivanov – PhD, senior researcher, Laboratory of Virus Physiology, the Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia. E-mail: ivanovpa@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-7105-7579>

Aleksandr V. Lyashko – junior researcher, Laboratory of Virus Physiology, the Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia. E-mail: lyaalex@bk.ru; <https://orcid.org/0000-0001-5714-9461>

Vladimir Yu. Kost – researcher, Laboratory of Molecular Toxinology, Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia. E-mail: goron.dekar@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0003-1703-2685>

Natalia F. Lomakina – PhD, senior researcher, the N.F. Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology, the Russian Ministry of Health, Moscow, Russia. E-mail: nflomakina@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0003-2638-4244>

Artyom A. Rtishchev – researcher, Laboratory of genetics of RNA viruses, Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia. E-mail: rtishchevartyom@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-4212-5093>

Nataliya I. Bunkova – PhD, senior researcher, Laboratory of Immunobiotechnology, the Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia. E-mail: nbounkova@mail.ru; <https://orcid.org/0009-0007-8846-4633>

Tatiana A. Timofeeva – PhD, leading researcher, head of Laboratory of Virus Physiology, the Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia. E-mail: timofoeva.tatyana@inbox.ru; <https://orcid.org/0000-0002-8991-8525>

Marina A. Balanova – researcher, Laboratory of Virus Physiology, the Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia. E-mail: mbalanova@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0003-2727-7221>

Stepan A. Ionov – laboratory technician, Laboratory of Virus Physiology, the Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia; student, FSBEI HE Mendeleev University of Chemical Technology, Moscow, Russia. E-mail: stephan.ionov@yandex.ru; <https://orcid.org/0009-0005-3393-0399>

Dmitry V. Gorikov – laboratory technician, Laboratory of Virus Physiology, the Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia; student, FSBEI HE Mendeleev University of Chemical Technology, Moscow, Russia. E-mail: gorikov.dmitry@mail.ru; <https://orcid.org/0009-0002-5159-8738>

Stanislav G. Markushin – DSc, head of Laboratory of genetics of RNA viruses, Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia. E-mail: s.g.markushin@rambler.ru; <https://orcid.org/0000-0003-0994-5337>

Contribution: Ivanov P.A. – concept and design of research, construction of reporter plasmids, carrying out experiments, analysis and interpretation of results, text preparation; Lyashko A.V., Rtishchev A.A., Ionov S.A., Gorikov D.V. – carrying out experiments; Kost V.Yu. – construction of plasmids with inserted virus segments, carrying out experiments; Bunkova N.I. – virological works; Lomakina N.F. – sequencing, data interpretation; text preparation, Timofeeva T.A. – research coordination, analysis and interpretation of results; Markushin S.G. – concept and design of research, approval of the final version of the article for publication.

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-204>

© НАЗАРЕНКО А.С., БИРЮКОВА Ю.К., ОРЛОВА Е.А., ТРАЧУК К.Н., ИВАНОВА А.Л., БЕЛЯКОВА А.В., ПЕСТОВ Н.Б., ВОРОВИЧ М.Ф., ИШМУХАМЕТОВ А.А., КОЛЯСНИКОВА Н.М., 2023



Исследование онколитического потенциала вакцинных штаммов вирусов желтой лихорадки и клещевого энцефалита в отношении клеточных линий глиобластом и карцином поджелудочной железы

Назаренко А.С.¹, Бирюкова Ю.К.¹✉, Орлова Е.А.¹, Трачук К.Н.¹, Иванова А.Л.¹,
Белякова А.В.¹, Пестов Н.Б.¹, Ворovich М.Ф.^{1,2}, Ишмухаметов А.А.^{1,2}, Колясникова Н.М.¹

¹ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), 108819, г. Москва, Россия;

²Институт трансляционной медицины и биотехнологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119048, г. Москва, Россия

Резюме

Введение. Флавивирусы имеют потенциал в терапии глиобластом при использовании безопасных для человека штаммов или в качестве системы доставки противоопухолевых агентов.

Цель. Исследование чувствительности клеточных линий глиобластом и карцином поджелудочной железы к вакцинным штаммам вирусов желтой лихорадки (ВЖЛ) и клещевого энцефалита (ВКЭ).

Материалы и методы. Исследовали клеточные линии глиобластомы GL-6, T98G, LN-229, карциномы поджелудочной железы MIA PaCa-2 и протоковой карциномы поджелудочной железы человека PANC-1. Использовали следующие вирусные штаммы: штамм 17D ВЖЛ, штамм Софьин ВКЭ. Количественное определение вирусов проводили методом бляшкообразования и полимеразной цепной реакции. Определение чувствительности клеток к вирусам выполняли с помощью МТТ-теста.

Результаты. Показано, что штамм 17D ВЖЛ оказывал онколитическое действие на опухолевые клетки карциномы поджелудочной железы MIA PaCa-2 и имел ограниченный эффект в отношении протоковой карциномы поджелудочной железы PANC-1. В отношении клеточных линий глиобластом (LN229, GL6, T98G) вирус не оказывал онколитического действия, концентрация вирусной РНК в культуральной среде снижалась. Штамм Софьин ВКЭ вызывал менее выраженное цитопатическое действие в культуре клеток MIA PaCa-2 и PANC-1 и не оказывал онколитического действия на клеточных линиях глиобластом (LN229, T98G и GL6), хотя репродукция вируса в этих культурах продолжалась. Для глиобластомы GL6 концентрация вирусной РНК в культуральной среде сохранялась на уровне 1×10^9 ГЭ/мл в течение 13 сут после заражения, а в случае LN229 концентрация вирусной РНК возрастала с 1×10^9 до 1×10^{10} ГЭ/мл.

Заключение. Поведение опухоли в макроорганизме сложнее, чем *in vitro*, поэтому целесообразно продолжить изучение противоопухолевых онколитических и иммуномодулирующих эффектов штаммов 17D ВЖЛ и Софьин ВКЭ на моделях *in vivo*.

Ключевые слова: онколитические вирусы; флавивирусы; вирус желтой лихорадки; вирус клещевого энцефалита; культура клеток; глиобластома; карцинома поджелудочной железы; протоковая карцинома поджелудочной железы; чувствительность к вирусам; вирусный онколиз

Для цитирования: Назаренко А.С., Бирюкова Ю.К., Орлова Е.А., Трачук К.Н., Иванова А.Л., Белякова А.В., Пестов Н.Б., Ворovich М.Ф., Ишмухаметов А.А., Колясникова Н.М. Исследование онколитического потенциала вакцинных штаммов вирусов желтой лихорадки и клещевого энцефалита в отношении клеточных линий глиобластомы и карциномы поджелудочной железы. *Вопросы вирусологии*. 2023; 68(6): 536–548. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-204> EDN: <https://elibrary.ru/laquqr>

Финансирование. Исследование выполнено за счет государственного задания Минобрнауки России «Изучение патогенного и онколитического потенциала вируса клещевого энцефалита, возбудителей других трансмиссивных инфекций и их рекомбинантных производных» FNZG-2022-0009.

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

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-204>

Investigation of oncolytic potential of vaccine strains of yellow fever and tick-borne encephalitis viruses against glioblastoma and pancreatic carcinoma cell lines

Alina S. Nazarenko¹, Yulia K. Biryukova¹✉, Ekaterina A. Orlova¹, Kirill N. Trachuk¹, Alla L. Ivanova¹, Alla V. Belyakova¹, Nikolai B. Pestov¹, Mikhail F. Vorovitch^{1,2}, Aydar A. Ishmukhametov^{1,2}, Nadezhda M. Kolyasnikova¹

¹Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), 108819, Moscow, Russia;

²I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia (Sechenov University), Institute of Translational Medicine and Biotechnology, 119048, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. Flaviviruses, possessing natural neurotropicity could be used in glioblastoma therapy using attenuated strains or as a delivery system for antitumor agents in an inactivated form.

Objective. To investigate the sensitivity of glioblastoma and pancreatic carcinoma cell lines to vaccine strains of yellow fever and tick-borne encephalitis viruses.

Materials and methods. Cell lines: glioblastoma GL-6, T98G, LN-229, pancreatic carcinoma MIA RaCa-2 and human pancreatic ductal carcinoma PANC-1. Viral strains: 17D yellow fever virus (YF), Sofjin tick-borne encephalitis virus (TBEV). Virus concentration were determined by plaque assay and quantitative PCR. Determination of cell sensitivity to viruses by MTT assay.

Results. 17D YF was effective only against pancreatic carcinoma tumor cells MIA Paca-2 and had a limited effect against PANC-1. In glioblastoma cell lines (LN229, GL6, T98G), virus had no oncolytic effect and the viral RNA concentration fell in the culture medium. Sofjin TBEV showed CPE₅₀ against MIA Paca-2 and a very limited cytotoxic effect against PANC-1. However, it had no oncolytic effect against glioblastoma cell lines (LN229, T98G and GL6), although virus reproduction continued in these cultures. For the GL6 glioblastoma cell line, the viral RNA concentration at the level with the infection dose was determined within 13 days, despite medium replacement, while in the case of the LN229 cell line, the virus concentration increased from 1×10^9 to 1×10^{10} copies/ml.

Conclusion. Tumor behavior in organism is more complex and is determined by different microenvironmental factors and immune status. In the future, it is advisable to continue studying the antitumor oncolytic and immunomodulatory effects of viral strains 17D YF and Sofjin TBEV using *in vivo* models.

Keywords: *Oncolytic viruses; flaviviruses; yellow fever virus; tick-borne encephalitis virus; glioblastoma cell; pancreatic carcinoma cell; virus sensitivity; viral oncolysis*

For citation: Nazarenko A.S., Biryukova Yu.K., Orlova E.A., Trachuk K.N., Ivanova A.L., Belyakova A.V., Pestov N.B., Vorovitch M.F., Ishmukhametov A.A., Kolyasnikova N.M. Investigation of oncolytic potential of vaccine strains of yellow fever and tick-borne encephalitis viruses against glioblastoma and pancreatic carcinoma cell lines. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 68(6): 536–548 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-204> EDN: <https://elibrary.ru/laqurr>

Funding. The research was funded by the State budget with the support of the Ministry of Education and Science of Russia «Study of pathogenic and oncolytic potential of tick-borne encephalitis virus, pathogens of other vector-borne infections and their recombinant derivatives» FNZG-2022-0009.

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

Введение

Проблема терапии злокачественных заболеваний по-прежнему остается нерешенной. Существующие терапевтические подходы способны вызывать ремиссии разной протяженности, но не обеспечивают полного выздоровления, поскольку в ответ на терапию происходит отбор устойчивых опухолевых клеток. Онколитическая виротерапия – активно развивающееся направление исследований в последние годы. На основе онколитических вирусов уже разработан ряд препаратов, зарегистрированных для терапии злокачественных заболеваний, и еще десятки находятся

на разных стадиях клинических исследований [1–3]. Развитие онколитической виротерапии в нашей стране имеет давнюю историю [4]. Лидирующее положение на территории бывшего СССР занимала исследовательская группа под руководством М.К. Ворошиловой (лаборатория иммунологии энтеровирусов, Институт полиомиелита, Москва), которая активно изучала онколитический потенциал энтеровирусов [5]. Исследователи показали, что живые энтеровирусные вакцины стимулируют клеточный иммунитет у онкологических больных и потенциально могут быть эффективными для лечения пациентов с опухолями желудочно-

кишечного тракта [6, 7]. Работа по созданию панелей препаратов на основе онколитических энтеровирусов и персонализированного подхода к пациентам с учетом молекулярно-биологических механизмов тропизма к конкретным опухолям продолжается в настоящее время группой под руководством проф. М.П. Чумакова [8–10]. Еще одним перспективным подходом для онко-виротерапии является использование рекомбинантных аденовирусов, в частности, в качестве вероятно наиболее перспективных кандидатов для виротерапии злокачественных глиобластом [11–13]. В ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» (Новосибирск) был создан противоопухолевый препарат «Канцеролизин» на основе мутантного варианта Ade12 аденовируса человека серотипа 5, который с эффективностью, близкой к вирусу дикого типа, инфицирует опухолевые клетки, дефектные по p53, а также создана клеточная линия на основе клеток 293, которая может быть использована для масштабируемого получения данного вируса [14]. В экспериментах на лабораторных животных (мыши, кролики, морские свинки) в доклинических исследованиях канцеролизина была показана его безвредность и безопасность [15, 16]. В ГНЦ «Вектор» на основе вируса осповакцины штамма L-IVP был также сконструирован онколитический вирус, обеспечивающий доставку противораковых терапевтических генов в клетки макроорганизма. В рекомбинантный вирус L-IVP_оncoM был встроен ген, кодирующий гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, и синтетический ген, кодирующий полиэпитопный иммуноген, состоящий из эпитопов антигенов, гиперэкспрессирующихся в клетках меланомы. Онколитическую эффективность полученного рекомбинантного вируса оценивали с помощью мышинной модели ксенографтов с использованием злокачественных клеток SK-Mel-28 [17].

В последние годы, помимо изучения патогенного потенциала представителей рода флавириусов, активно изучается их онколитический потенциал [18]. Вирусам свойственно заражать и лизировать клетки, причем опухолевые клетки, как правило, приобретают повышенную чувствительность к вирусам, благодаря поломкам в механизмах контроля клеточного деления и внутриклеточной противовирусной защиты. Показано, что онколитические вирусы способны также стимулировать противоопухолевый иммунитет [19]. С точки зрения иммуногенности флавириусы могут играть положительную роль в терапии опухоли и приводить к ее лизису иммуноопосредованным способом. Однако флавириусы в качестве онколитических вирусов малоизучены, хотя они имеют природную нейротропность и могут использоваться для лечения, например, глиобластом, при использовании безопасных для человека штаммов или в качестве системы доставки противоопухолевых агентов в инактивированном виде.

Род *Orthoflavivirus* [20] включает более 70 арбовирусов, которые являются трансмиссивными и переносятся комарами и клещами. Геном флавириусов представлен кэпированной одноцепочечной РНК по-

ложительной полярности длиной около 11 тыс. нуклеотидов с единственной открытой рамкой считывания. Больше всего исследований на предмет онколитической активности среди флавириусов посвящено вирусу Зика. Вирус Зика является слабопатогенным для человека, у взрослых пациентов инфекция, вызванная вирусом Зика, обычно протекает бессимптомно, лишь небольшой процент пациентов (< 20%) сообщают о легкой лихорадке, сыпи и боли в суставах в течение примерно 7 сут. В ряде работ было продемонстрировано, что вирус Зика избирательно инфицирует нервные стволовые клетки плода [2], которые имеют некоторое сходство с клетками глиобластомы. Эффективность вируса Зика в отношении глиобластом была также показана на модели *in vitro* и *in vivo* [21]. Авторы отметили, что вирус Зика избирательно заражал клетки глиобластомы, полученные от пациентов после резекции, в сравнении с нейронами и глиальными клетками. Авторы также использовали вирус Зика для терапии глиобластомы мыши GL261 и СТ-2А. В результате наблюдалось увеличение продолжительности жизни мышей C57BL/6, получавших терапию, в сравнении с контрольной группой, уменьшение объема опухоли проходило без неврологических симптомов. Кроме того, избирательность репликативной активности вируса Зика в отношении клеток глиобластомы U87 MG человека была продемонстрирована в исследовании В.А. Святченко и соавт. на модели с использованием иммунодефицитных SCID мышей с прививками подкожными ксенографтами глиобластомы U87 MG [22].

Еще один флавириус, обладающий онколитическим потенциалом, – вирус желтой лихорадки (ВЖЛ). ВЖЛ вызывает серьезное инфекционное заболевание, возбудитель которого передается при укусе комаров *Aedes aegypti* [23]. Атенуированный штамм 17D ВЖЛ полностью секвенирован, имеет хороший профиль безопасности у иммунокомпетентных детей и взрослых, вакцина на его основе используется в профилактических целях для предотвращения заболевания в эндемичных регионах [24]. Недавнее исследование на мышках при внутриопухолевой терапии подкожных опухолей меланомы и карциномы толстой кишки продемонстрировало эффективность штамма 17D ВЖЛ как иммуномодулирующего агента, приводящего к задержке роста опухолей [25]. Таким образом, штамм 17D ВЖЛ можно рассматривать в качестве потенциального онколитического агента.

Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) изучали на предмет онколитической активности только в 50-х годах прошлого столетия. Е.Н. Левкович и Л.Г. Карпович (лаборатория клещевого энцефалита, Институт полиомиелита, Москва, СССР) исследовали 25 штаммов ВКЭ и родственных ему вирусов, включая вирус шотландского энцефаломиелита овец, вирус омской геморрагической лихорадки, вирус Кьясанурской лесной болезни, вирус Лангат. Было показано, что вирусы, которые хорошо репродуцируются в организме человека, также активно размножаются в клетках HeLa, однако их цитопатогенное действие сильно варьирует [26]. В исследовании Е.Н. Левкович

и Г.И. Сергеевой было выявлено ингибирующее действие всех изученных штаммов ВКЭ на рост асцитной карциномы Эрлиха и саркомы Крокера *in vitro*. ВКЭ, а также вирус Лангат оказались способными инфицировать опухолевые клетки с последующим снижением их пролиферативной способности и задержкой роста опухоли при трансплантации клеток экспериментальным животным [27, 28]. Однако из-за высокой патогенности ВКЭ и отсутствия на тот момент возможности генетически модифицировать вирус, исследования его онколитических свойств были прекращены. На сегодняшний день ВКЭ можно рассматривать в качестве онколитического вируса при условии должных генетических модификаций, приводящих к его полной аттенуации.

Цель работы – исследование чувствительности клеточных линий глиобластомы и карциномы поджелудочной железы к вакцинным штаммам 17D ВЖЛ и Софьин ВКЭ.

Материалы и методы

Клеточные линии и условия культивирования

Перевиваемая культура клеток почечного эпителия зеленой мартышки Vero (получены из Американской коллекции клеточных культур – АТСС) и культура эмбриональной почки свиньи (СПЭВ) (из коллекции ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН») были использованы для титрования вируса методом бляшек; клеточную линию глиобластомы GL-6 (ФГБУН ИМБ РАН), клеточные линии глиобластомы T98G, LN-229 (АТСС), клеточные линии карциномы поджелудочной железы MIA PaCa-2 и протоковой карциномы поджелудочной железы человека PANC-1 (ИБХ РАН) использовали для определения чувствительности к вирусам.

Клетки культивировали в питательной (ростовой) среде DMEM (ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН»), с добавлением 2 mM L-глутамин («ПанЭко», кат. № Ф032), антибиотиков пенициллина (250 МЕ/мл) и стрептомицина (200 мкг/мл) («ПанЭко», кат. № А065п) и 5% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (FBS Gibco #2412072) в атмосфере 5% CO₂ при 37 °С. В качестве поддерживающей среды после заражения клеток вирусами использовали среду «Игла MEM» (ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН») с идентичными добавками, как и в случае с DMEM, но с добавлением 2% ЭТС.

Вирусные штаммы

В работе использовали аттенуированный вакцинный штамм 17D ВЖЛ, вакцинный штамм Софьин ВКЭ из коллекции ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН». Титры вирусов оценивали методом бляшек, концентрацию вирусной РНК в культуральной среде – методом количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Титрование вирусов методом бляшек

Титры вируса определяли методом бляшек под покрытием 1,26% метилцеллюлозы в культуре клеток Vero

(для ВЖЛ) и СПЭВ (для ВКЭ) на пластиковых 12-луночных планшетах. Клетки высевали на 12-луночные планшеты и инкубировали в течение 24 ч при 37 °С в CO₂-инкубаторе. На среде 199 с солями Эрла готовили 10-кратные разведения вирусных образцов и добавляли их к клеткам в объеме 100 мкл на лунку. Планшеты инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 1 ч при осторожном покачивании. Затем в каждую лунку вносили 1 мл 1,26% метилцеллюлозы.

Учет бляшек проводили на 8-е сутки после заражения. Титр вируса выражали в количестве бляшкообразующих единиц (БОЕ) в 1 мл вирусосодержащего материала. Титр рассчитывали по формуле:

$$\Sigma N/(d \times n \times V) = \text{БОЕ/мл},$$

где: N – количество бляшек в одной лунке для соответствующего разведения; n – количество лунок для одного разведения, шт.; V – объем пробы (дозы для заражения), мл; d – разведение (в виде 10-х).

Определение концентрации вирусной РНК в культуральной среде методом ПЦР в реальном времени

Пробу культуральной среды отбирали в объеме 1 мл, клеточный дебрис удаляли центрифугированием при 3000 об/мин в течение 5 мин. Выделение РНК вируса из полученного супернатанта проводили с помощью набора реагентов «Рибо-преп», обратную транскрипцию (получение кДНК) осуществляли с помощью набора «Реверта-Л». При проведении ПЦР для ВКЭ использовали набор реагентов «Амплиценс TBEV, *B. burgdorferi* sl, *A. phagocytophillum*, *E. chaffeensis* / *E. muris*-FL» с применением калибраторов с известной концентрацией кДНК: 1 × 10⁹, 1 × 10⁷, 1 × 10⁵ ГЭ/мл. При проведении ПЦР для ВЖЛ применяли набор реагентов «Амплиценс Yellow fever virus-FL», в качестве стандартов использовали штамм 17D ВЖЛ в титре 1 × 10⁷, 1 × 10⁵, 1 × 10³ БОЕ/мл. Производителем всех использованных наборов реагентов является ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (Москва). Количественную ПЦР в реальном времени выполняли на термическом циклере Rotor-Gene Q 6plex (Qiagen) с помощью каналов детекции (FAM, HEX) и определением цикла детекции (C_t).

Определение чувствительности клеток к вирусам

1. **Цитопатическое действие (ЦПД).** Клетки сажали на 25 см² матрасы и культивировали до образования монослоя. Заражение проводили в минимальном объеме 250 мкл вирусосодержащей жидкостью в титрах 10⁷ БОЕ/мл в течение 1 ч при 37 °С с покачиванием. Затем монослой клеток отмывали и добавляли поддерживающую среду. ЦПД наблюдали в течение 14 сут. Начиная с 3-х суток с помощью световой микроскопии оценивали ЦПД. Учет ЦПД проводили визуально по системе крестов: если изменению (по сравнению с контролем) подвергся весь монослой в матрасе, ЦПД оценивали на 4 креста (++++), если ¾ – на 3 (+++), если ½ – на 2 (++) , если на ¼ – на 1 крест (+).

2. **МТТ-тест.** 96-луночные планшеты с клетками перевиваемых опухолевых линий инфицирова-

ли 10-кратными серийными разведениями вирусов в шести повторах. Адсорбцию вируса проводили в течение 1 ч при 37 °С в CO₂ инкубаторе в объеме 30 мкл на лунку, далее удаляли вирусосодержащую жидкость, промывали клетки средой без сыворотки и культивировали в поддерживающей среде с 2% ЭТС. Через 3, 4, 5 сут определяли жизнеспособность клеток с помощью МТТ-теста, используя реагент МТТ в рабочей концентрации 5 мг/мл в фосфатном буфере рН 7,2 («ПанЭко», кат. № О104). С помощью планшетного ридера Bio-Rad iMark определяли оптическую плотность при длине волны 595/650 нм. Результат оценивали в сравнении со средней оптической плотностью в контроле (неинфицированные клетки), принимая ее за 100%.

Формирование тканевых сфероидов

Формирование тканевых сфероидов производили с помощью агарозных форм, изготовленных с применением силиконовых матриц (любезно предоставленных И.В. Зубаревым) согласно инструкции производителя (ЧУ Лаборатория биотехнологических исследований «3Д Биопринтинг Солюшенс», Россия) [29].

Микроскопия

Визуальный контроль, фотографии клеток и сфероидов производили с применением инвертированного биологического микроскопа OLYMPUS CKX53, оснащенного цифровой камерой и ПО ADFImageCapture.

Статистически анализ.

Статистическую оценку данных проводили в программе GraphPad Prism 8 с использованием диспер-

сионного анализа ANOVA для МТТ-теста, критерия Краскела–Уоллиса для ПЦР.

Результаты

Исследовали чувствительность опухолевых клеточных линий глиобластом GL6, LN-229, T98G, карциномы поджелудочной железы MIA Pasa-2 и протоковой карциномы поджелудочной железы PANC-1 к штаммам 17D ВЖЛ и Софьин ВКЭ. С целью определения минимального титра вируса, необходимого для достижения ЦПД, клеточные культуры инкубировали с серийными 10-кратными разведениями ВЖЛ и ВКЭ. Через 5 сут после заражения оценивали жизнеспособность клеток с помощью МТТ-теста. На рис. 1 (а, б) представлены результаты чувствительности исследуемых клеточных линий к штаммам 17D ВЖЛ и Софьин ВКЭ на 5-е сутки после заражения клеток. Полученные профили чувствительности указывают, что наибольший цитопатический эффект штаммы 17D ВЖЛ и Софьин ВКЭ проявляют в отношении клеточной линии MIA Pasa-2, частичный – в отношении PANC-1, полное отсутствие ЦПД наблюдается в отношении трех исследуемых культур глиобластом.

Минимальный титр ВЖЛ при заражении для достижения полной клеточной гибели в отношении MIA Pasa-2 составил 10⁶ БОЕ/мл, а ЦПД₅₀ достигалось при титре вируса 10³ БОЕ/мл. При воздействии штамма Софьин ВКЭ полного клеточного лизиса в культуре MIA Pasa-2 не происходило, ЦПД₅₀ достигалось при минимальном титре вируса 10⁴ БОЕ/мл. Оба исследуемых вирусных штамма даже при титре заражения 10⁷ БОЕ/мл не вызывали полного клеточного лизиса клеток PANC-1, при этом ЦПД₅₀ достигала

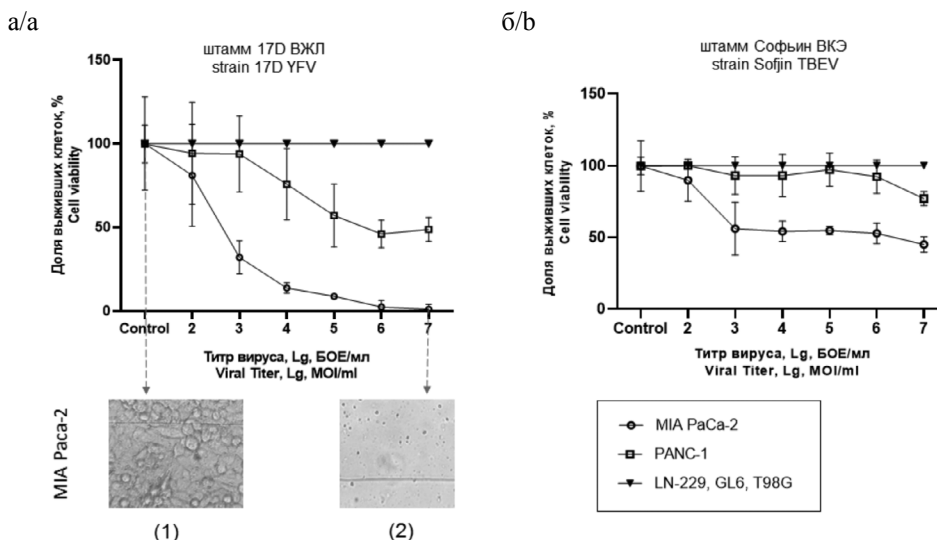


Рис. 1. Чувствительность клеточных линий глиобластом GL6, LN-229, T98G, карциномы поджелудочной железы MIA Pasa-2 и протоковой карциномы поджелудочной железы PANC-1 к штамму 17D ВЖЛ (панель а) и штамму Софьин ВКЭ (панель б) в зависимости от титра вируса при заражении по результатам оценки доли выживших клеток с помощью МТТ-теста на 5-е сутки после инфицирования.

Фотографии клеток MIA Pasa-2. Ув. ×100. а(1) – контрольной лунки, монослой сохранен; а(2) – инфицированной, полный клеточный лизис.

Fig. 1. Sensitivity of glioblastoma cells GL6, LN-229, T98G, pancreatic carcinoma MIA Pasa-2 and pancreatic ductal carcinoma PANC-1 cell to strain 17D YFV (panel a) and strain Sofjin TBEV (panel b) depending on the virus titer at the infection as assessed by the proportion of surviving cells using the MTT test at 5 days post-infection.

Photographs of MIA Pasa-2 cells. Magnification ×100. а(1) – control well, monolayer preserved; а(2) – infected well, complete cell lysis.

лось к 5-м суткам при воздействии штамма 17D ВЖЛ в титре 10^6 БОЕ/мл, а в случае штамма Софьин ВКЭ ЦПД₅₀ на клетках PANC-1 наблюдали на 3-и сутки при титре заражения 10^7 БОЕ/мл, к 5-м суткам цитопатический эффект значительно снижался (табл. 1).

Исследуемые культуры того же пассажа вели на 25 см² матрасах с последующим заражением ВЖЛ и ВКЭ с целью оценки ЦПД и отбора проб культуральной среды для определения концентрации вируса методом количественной ПЦР в режиме реального времени. Результаты оценки ЦПД для штамма 17D ВЖЛ при культивировании клеточных линий на матрасах коррелировали с данными МТТ-теста: при титре заражения 10^7 БОЕ/мл к 5-м суткам ЦПД достигало результата «4 креста» в отношении клеточной линии MIA Paca-2 и «2 креста» в отношении клеточной линии PANC-1. По данным ПЦР, при заражении штаммом 17D ВЖЛ в титре 1×10^7 БОЕ/мл (ПЦР 1×10^6 ГЭ/мл) концентрация вирусной РНК в культуральной среде возрастала, что свидетельствует о репликации вируса в данных клеточных линиях

и объясняет выраженный онколитический эффект ВЖЛ в их отношении (табл. 2). ЦПД штамма Софьин ВКЭ при заражении клеток в титре 4×10^7 БОЕ/мл к 5-м суткам в отношении клеточной линии MIA Paca-2 оценивали как «3 креста», в отношении клеточной линии PANC-1 – как «1 крест». По результатам ПЦР, концентрация вирусной РНК в культуральной среде MIA Paca-2 и PANC-1 к 5-м суткам была выше исходной (в момент заражения) – 2×10^9 ГЭ/мл, при этом в клетках MIA Paca-2 концентрация вирусной РНК ВКЭ была на порядок выше (табл. 2).

Отсутствие ЦПД наблюдали в отношении клеточных линий глиобластом LN229 и T98G при заражении штаммом 17D ВЖЛ в титре 10^7 БОЕ/мл, и лишь в отношении клеточной линии GL6 было отмечено небольшое разрушение монослоя, оцениваемое в «1 крест» (на 3-и сутки эксперимента), однако в последующем усиления ЦПД в клеточной линии GL6 не было зафиксировано вплоть до 13-х суток. Результаты МТТ-теста коррелировали с данными ЦПД, была зарегистрирована полная выживаемость исследуе-

Таблица 1. Результаты определения минимального титра заражения вирусом (штаммы 17D ВЖЛ и Софьин ВКЭ) в отношении клеточных линий карцином (MIA Paca-2, PANC-1) и глиобластом (GL6, LN-229, T98G)

Table 1. Results of determining the minimum titer of virus infection (strain 17D YFV and strain Sofjin TBEV) in carcinoma (MIA Paca-2, PANC-1) and glioblastoma (GL6, LN-229, T98G) cell lines

Минимальный титр вируса при заражении, БОЕ/мл Minimum virus titer at infection, MOI/ml	Штамм 17D ВЖЛ Strain 17D YFV		Штамм Софьин ВКЭ Strain Sofjin TBEV	
5-е сутки эксперимента 5 th day of the experiment	ЦПД ₅₀ CPE ₅₀	Полный клеточный лизис Total cell lysis	ЦПД ₅₀ CPE ₅₀	Полный клеточный лизис Total cell lysis
MIA Paca-2	10^3	10^6	10^4	–
PANC-1	10^6	–	10^{7*}	–
GL6, LN-229, T98G	–	–	–	–

Примечание. «←» – нет эффекта; * – ЦПД₅₀ – эффект наблюдается только на 3-и сутки.

Note. «←» – no effect; * – CPE₅₀ – effect observed only on day 3 at titer of 10^7 MOI/ml.

Таблица 2. Изменение концентрации вирусной РНК в культуральной среде при инфицировании (0-е сутки) карцином поджелудочной железы MIA Paca-2 и PANC-1 штаммами 17D ВЖЛ и Софьин ВКЭ на 3, 4, 5-е сутки эксперимента

Table 2. Changes in viral RNA concentration in the culture medium following infection (day 0) of pancreatic carcinomas MIA Paca-2 and PANC-1 strains 17D YFV and Sofjin TBEV on days 3, 4, 5 of the experiment

Вирус Virus	Штамм 17D ВЖЛ Strain 17D YFV				Штамм Софьин ВКЭ Strain Sofjin TBEV				
	Сутки Days								
Клеточные линии Cell Lines	0	3	4	5	0	3	4	5	
MIA Paca-2	ЦПД, БОЕ/мл CPE, MOI/ml	1×10^7	++	+++	++++	4×10^7	+	++	+++
	ПЦР, ГЭ/мл PCR, gE/ml	1×10^6	$2,3 \times 10^8$	–	$1,6 \times 10^8$	2×10^9	$1,3 \times 10^{11}$	–	$1,2 \times 10^{11}$
PANC-1	ЦПД, БОЕ/мл CPE, MOI/ml	1×10^7	отсутствует	++	++	4×10^7	отсутствует	+	+
	ПЦР, ГЭ/мл PCR, gE/ml	1×10^6	$9,6 \times 10^7$	–	$6,2 \times 10^7$	2×10^9	$6,1 \times 10^{10}$	–	$8,8 \times 10^{10}$

Примечание. «←» – не исследовалось.

Note. «←» – not investigated.

мых клеточных линий глиобластом на 5-е сутки эксперимента (рис. 1). На 5, 7, 10, 13-е сутки и в случае GL6 также и на 3-и сутки отбирали пробы для оценки концентрации 17D ВЖЛ методом количественной ПЦР в режиме реального времени, при этом на 5-е и 10-е сутки производили замену среды (3-и, 10-е сутки в случае GL6). По результатам ПЦР было выявлено снижение концентрации РНК 17D ВЖЛ в культуральной жидкости для всех исследуемых линий глиобластом (рис. 2). Полученные результаты указывают на отсутствие онколитического эффекта в отношении глиобластом для штамма 17D ВЖЛ.

При инфицировании клеточных линий штаммом Софьин ВКЭ ЦПД отсутствовало, однако результаты ПЦР-исследования культуральной жидкости показали, что ВКЭ размножается в клеточных линиях LN229 и GL6. Было проведено 2 независимых эксперимента. Первый эксперимент был более коротким – продолжительностью 5 сут, во втором, более длительном эксперименте на 5-е и 10-е сутки (3-и, 10-е сутки в случае GL6) была произведена замена культуральной среды. В культуральной жидкости клеточной линии LN229 при заражении ВКЭ в титре 1×10^7 БОЕ/мл (ПЦР 1×10^9 ГЭ/мл) концентрация РНК вируса достигла максимальной отметки к 5-м и 10-м суткам и составила $1,3 \times 10^{11}$ и 7×10^{10} ГЭ/мл соответственно. Для клеточной линии GL6 максимальная концентрация РНК ВКЭ в культуральной жидкости наблюдалась к 3-м суткам эксперимента и достигла $9,6 \times 10^{10}$ и 4×10^{10} ГЭ/мл в первом и втором экспериментах соответственно, после чего наблюдалось снижение концентрации РНК. В культуральной жидкости клеточной линии T98G концентрация РНК ВКЭ составила 10^9 ГЭ/мл и практически не менялась

в течении первых 5 сут после заражения в первом эксперименте, во втором опыте РНК ВКЭ в концентрации 10^7 ГЭ/мл определялась в культуральной жидкости вплоть до 13-х суток, однако концентрация РНК вируса была ниже в сравнении с концентрацией РНК ВКЭ в других линиях глиобластом (рис. 3).

Высокий тропизм штамма 17D ВЖЛ к карциноме поджелудочной железы MIA Pasa-2 был продемонстрирован в трехмерной культуре (сфероидах). Формирование тканевых сфероидов производили с помощью агарозных форм, приготовленных при помощи силиконовых матриц («ЗД Биопринтинг Солюшенс»). На 3-и сутки культивирования клетки MIA Pasa-2 формировались в сфероиды размером 650 мкм. После инфицирования ВЖЛ в титре 1×10^6 БОЕ/мл на после заражения 3-и сутки отмечали ЦПД и появление дефектных сфероидов в сравнении с контрольной группой (рис. 4).

Таким образом, результаты настоящего исследования показали, что ВЖЛ, обладая природной тропностью к клеткам гепатобилиарной системы, эффективен только в отношении опухолевых клеток карциномы поджелудочной железы. При высоких титрах заражения ВЖЛ оказывал сильное цитотоксическое действие на клетки карциномы поджелудочной железы (MIA Pasa-2) и имел ограниченный эффект в отношении карциномы протоков поджелудочной железы (PANC-1). В отношении исследованных клеточных линий глиобластом (LN229, GL6, T98G) вирус не оказывал онколитического действия, концентрация вирусной РНК в культуральной среде постепенно снижалась.

Штамм Софьин ВКЭ продемонстрировал ЦПД в отношении карциномы поджелудочной железы (MIA Pasa-2) и крайне ограниченный цитотоксический эффект в отношении протоковой карциномы подже-

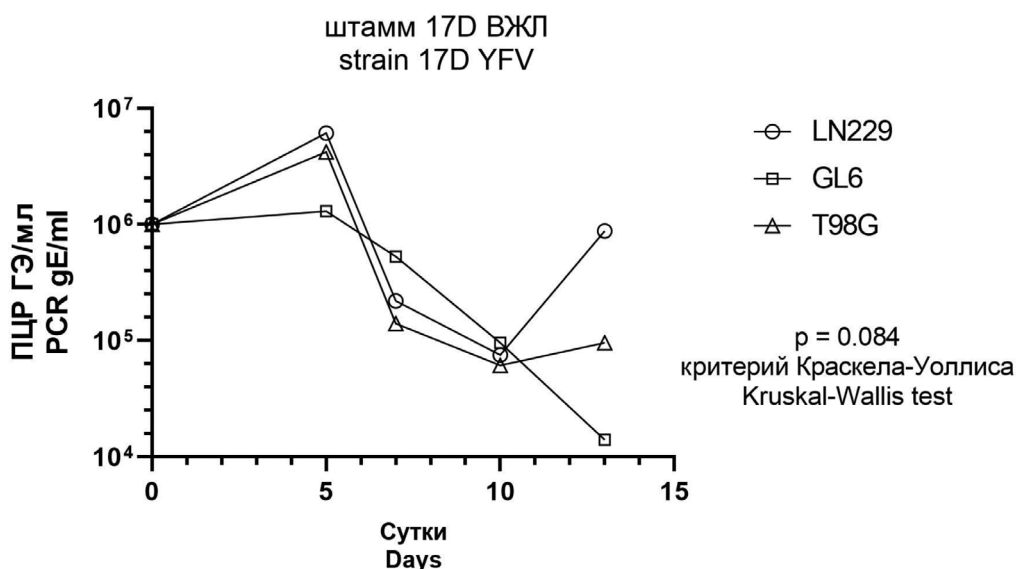


Рис. 2. Изменение концентрации вирусной РНК в культуральной среде при инфицировании (0-е сутки) глиобластом GL6, LN-229, T98G штаммом 17D ВЖЛ на 3, 5, 7, 10, 13-е сутки эксперимента.

Fig. 2. Changes in viral RNA concentration in the culture medium following infection (day 0) of GL6, LN-229, T98G glioblastomas with strain 17D YFV on days 3, 5, 7, 10, 13 of the experiment.

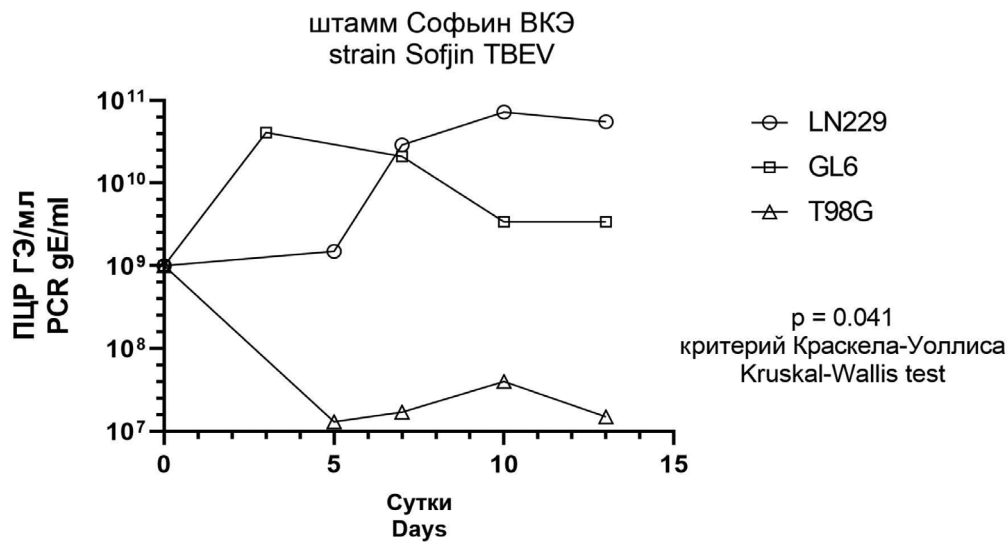
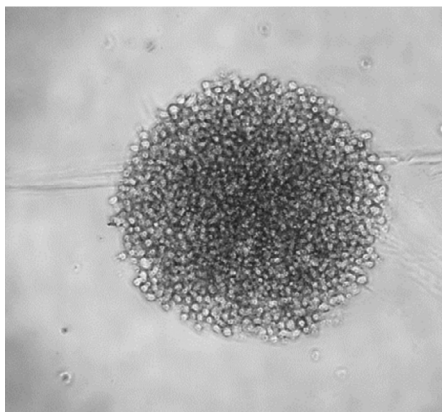


Рис. 3. Изменение концентрации вирусной РНК в культуральной среде при инфицировании (0-е сутки) глиобластомой GL6, LN-229, T98G штаммом Софьин ВКЭ на 3, 5, 7, 10, 13-е сутки эксперимента.

Fig. 3. Changes in viral RNA concentration in the culture medium following infection (day 0) of GL6, LN-229, T98G glioblastomas strain Sofjin TBEV on days 3, 5, 7, 10, 13 of the experiment.

a/a



b/b

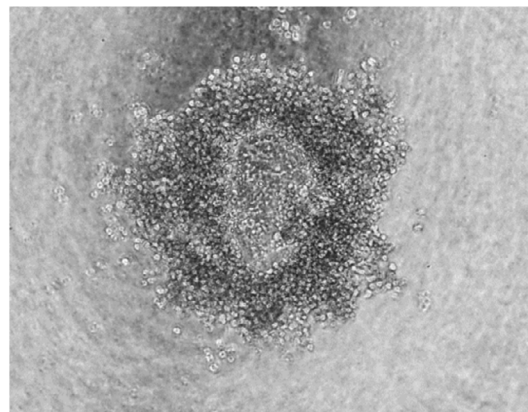


Рис. 4. Оценка ЦПД штамма 17D ВЖЛ с помощью тканевых сфероидов на культуре клеток MIA Paca-2. На фотографии вид сфероидов на 3-и сутки. Контроль – не инфицированный сфероид панель (а) и после инфицирования титром 10⁶ БОЕ/мл штаммом 17D ВЖЛ – панель (б). Ув. ×40.

Fig. 4. Assessment of the CPE of 17D YFV using tissue spheroids on MIA Paca-2 cell culture. The photo shows the view of spheroids at 3 days control – uninfected spheroid (panel a) and after infection with 10⁶ MOI/ml strain 17D YFV – (panel b). Magnification × 40.

лудочной железы (PANC-1). При этом, несмотря на природную нейротропность, вирус не оказывал онколитического эффекта в отношении клеточных линий глиобластом (LN229, T98G и GL6), хотя наблюдалась репродукция вируса в этих культурах. Так, для глиобластомы линии GL6 концентрация вирусной РНК определялась в течение 13 сут и была на уровне исходной концентрации РНК при заражении, даже при периодическом удалении культуральной среды, а в случае клеточной линии LN229 концентрация вируса увеличилась с 1×10^9 до 1×10^{10} ГЭ/мл.

Обсуждение

Исследование вакцинных штаммов 17D ВЖЛ и Софьин ВКЭ в отношении клеточных линий гли-

областом и карцином поджелудочной железы дает основание сделать вывод о наличии онколитического потенциала у исследуемых вирусов и возможности их применения в терапии злокачественных новообразований.

Безусловно, преимуществом штамма 17D ВЖЛ является его доказанная многолетними исследованиями безопасность и иммуногенность [30].

Сравнение полученных результаты *in vitro* с другими исследованиями достаточно сложно, так как в литературе представлены данные для опухолевых линий другого генеза. Например, в работе М. Aznat и соавт. [25] исследования выполнены на клеточных линиях рака толстой кишки, почечно-клеточного рака, рака молочной железы и меланомы. Штамм 17D ВЖЛ

проявлял цитопатическое действие, в то время как на нетрансформированных фибробластах человека цитотоксические эффекты отсутствовали. При прививании карциномы толстой кишки MC38 и меланомы B16OVA мышам C57BL/6 с последующим внутриопухолевым введением вируса наблюдалась задержка роста опухоли. Таким образом, штамм 17D ВЖЛ можно рассматривать в качестве потенциального онколитического агента.

Тот факт, что вакцина на основе штамма 17D ВЖЛ является широко используемым профилактическим средством для подкожной или внутримышечной вакцинации, значительно упрощает возможную клиническую разработку стратегий иммунотерапии, включающих внутриопухолевые инъекции. Дополнительно повысить эффективность терапии можно путем введения в клетку опухоли последовательностей, кодирующих гены-супрессоры опухоли, гены «смерти» или гены цитокинов, усиливающих индукцию иммунного ответа на опухолевые антигены, например, путем создания рекомбинантных векторов на основе 17D, несущих монотела с убиквитин-лигазами VHL и MDM2 для таргетного разрушения онкогенов типа K-RAS.

Вакцинный штамм Софьин ВКЭ является нейротропным, свободно преодолевает гематоэнцефалический барьер и способен вызывать энцефалопатию [31], поэтому применение его *in vivo* как противоопухолевого агента возможно только после предварительной иммунизации реципиентов инактивированной вакциной или при генетической модификации ВКЭ для улучшения его профиля безопасности. Ранее уже были проведены исследования ВКЭ-штаммов дальневосточного подтипа, к которым относится и штамм Софьин в качестве возможных онколитических агентов. Результаты показали ингибирование роста подкожных опухолей мышей различной этиологии (фибросаркома MCI, нейробластома мышцы C1300, аденокарцинома молочной железы EO 771, остеогенная саркома Ridgeway, саркомы T241 и 180), однако такие исследования проводились очень давно, в 1950-х гг. [27, 28, 32, 33]. Таким образом, штамм Софьин ВКЭ потенциально можно рассмотреть в качестве онколитического вируса при условии обеспечения безопасности его применения.

Полученные в настоящем исследовании результаты *in vitro* также подтверждают, что штаммы 17D ВЖЛ и Софьин ВКЭ имеют перспективы в онковиротерапии. Разумеется, клеточные культуры не в полной мере отражают патофизиологию опухолевых клеток в системе *in vivo*. Поведение опухоли в организме определяется как опухолевыми клетками, так и клетками стромального микроокружения, внеклеточным матриксом, влиянием гипоксии, а микроокружение опухоли характеризуется наличием большого количества воспалительных цитокинов, факторов роста и других факторов, поддерживающих рост и метастазирование опухоли [34, 35]. В связи с вышесказанным в дальнейшем планируется продолжить изучение противоопухолевых онколитических и иммуномодулиру-

ющих эффектов штаммов 17D ВЖЛ и Софьин ВКЭ на моделях *in vivo*. Поскольку акцент нами делается именно на иммунологические эффекты, планируются эксперименты на иммунокомпетентных животных с использованием сингенных моделей подкожного опухолевого роста клеток рака поджелудочной железы (PAN02) и глиомы (GL261). Исследование на иммунокомпетентных животных позволит также получить данные по усилению эффекта при предварительной иммунизации животных, а в случае ВКЭ Софьин исследование возможно только при условии предварительной иммунизации инактивированной вакциной ВКЭ.

Также в дальнейшем для понимания механизмов вирусного онкотропизма целесообразно проводить исследования с культурами клеточных опухолевых линий, полученных из опухолей (послеоперационный материал) от пациентов. Так в исследовании А.В. Липатовой и соавт. [36] был применен мультиомный анализ с целью изучения вклада интерферонзависимых противовирусных механизмов в опухолевых клетках мультиморфной глиобластомы, полученных от отдельных пациентов, на устойчивость к онколитическим вирусам, принадлежащим к разным вирусным семействам.

Заключение

Штаммы 17D ВЖЛ и Софьин ВКЭ оказывали цитопатическое действие на клеточные линии рака поджелудочной железы человека при увеличении репродукции вируса в культуральной среде. Резистентность к исследуемым вирусам клеточной линии протоковой карциномы поджелудочной железы PANC-1 была выше, чем карциномы поджелудочной железы MIA Pasa-2, что, возможно, связано с повышенной экспрессией IRF2 и IRF7, которые регулируют гены интерферона- α и - γ , в данной клеточной линии [37, 38].

Также следует отметить способность штамма 17D ВЖЛ лизировать 3D-сфероиды клеточной линии MIA Pasa-2, что, вероятно, определяет возможность вируса проникать между плотными контактами опухолевых клеток.

В настоящем исследовании штамм Софьин ВКЭ по литическому действию на опухолевые клеточные линии явно уступал штамму 17D ВЖЛ, однако способность его к репликации в клеточных линиях глиобластомы требует дальнейшего изучения *in vivo* на модели иммунокомпетентных животных с учетом проработки вопроса безопасности его применения путем дополнительной генно-инженерной модификации вируса или предварительной иммунизации животных инактивированной вакциной. Ввиду того, что флавивирсы являются высокоэффективными иммуногенами, мы предполагаем, что лизис или задержка роста опухоли могут быть достигнуты иммуноопосредованным путем благодаря репликации вируса в опухолевых тканях.

В заключение следует отметить, что применение флавивирсов для онковиротерапии опухолей может оказаться перспективным. Флавивирсы могут быть

использованы как непосредственно для лизиса опухолевых клеток, так и для иммуно-опосредованной индукции лизиса опухоли через активацию Т-клеточного звена иммунитета, способствуя преобразованию «холодных» опухолей в «горячие» для увеличения числа иммуночувствительных клеток опухоли и повышения эффективности терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Клаан Н.К., Акиншина Л.П., Пронина Т.А. Онколитические вирусы в терапии злокачественных новообразований. *Российский биотерапевтический журнал*. 2018; 17(4): 6–19. <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2018-17-4-6-19> <https://elibrary.ru/ybsnsh>
2. Li K., Zhao Y., Hu X., Jiao J., Wang W., Yao H. Advances in the clinical development of oncolytic viruses. *Am. J. Transl. Res.* 2022; 14(6): 4192–206.
3. Macedo N., Miller D.M., Haq R., Kaufman H.L. Clinical landscape of oncolytic virus research in 2020. *J. Immunother. Cancer.* 2020; 8(2): e001486. <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-001486>
4. Kolyasnikova N.M., Pestov N.B., Sanchez-Pimentel J.P., Barlev N.A., Ishmukhametov A.A. Anti-cancer virotherapy in Russia: lessons from the past, current challenges and prospects for the future. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2023; 24(2): 266–78. <https://doi.org/10.2174/1389201023666220516121813>
5. Tsyppin L.B., Voroshilova M.K., Goryunova A.G., Lavrova I.K., Koroleva G.A. The morphology of tumors of the human gastrointestinal tract in short-term organ culture and the reaction of these tumors to infection with poliovirus. *Cancer.* 1976; 38(4): 1796–806. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197610\)38:4%3C1796::aid-cn-cr2820380457%3E3.0.co;2-y](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197610)38:4%3C1796::aid-cn-cr2820380457%3E3.0.co;2-y)
6. Voroshilova M.K., Goryunova A.G., Gorbachkov E.A., Chumakov P.M., Oganian T.G., Kodkind G.H. *Studies on Cellular Immunity of Oncology Patients in the Process of Asymptomatic Enteroviral Infection*. Riga: Zinātne; 1977: 17–20.
7. Voroshilova M.K., Vaganova N.T. *Treatment of Patients with Gastro-Intestinal Tract Tumors with Live Enteroviral Vaccines*. Riga: Zinātne; 1969.
8. Соболева А.В., Липатова А.В., Кочетков Д.В., Чумаков П.М. Изменения чувствительности клеток глиобластомы человека к онколитическим энтеровирусам при пассировании в культуре. *Вестник Российского государственного медицинского университета*. 2018; (2): 40–4. <https://doi.org/10.24075/vrgmu.2018.025> <https://elibrary.ru/xttuyx>
9. Сосновцева А.О., Желтухин А.О., Липатова А.В., Чумаков П.М., Чехонин В.П. Исследование онколитической активности вакцинного штамма полиовируса 3-го типа на модели клеток глиомы крыс. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2019; 167(1): 120–4. <https://elibrary.ru/yqxlbb>
10. Желтухин А.О., Соболева А.В., Сосновцева А.О., Ле Т.Х., Ильинская Г.В., Кочетков Д.В. и др. Энтеровирусы человека проявляют избирательную онколитическую активность на модели ксенотрансплантатов мультиформной глиобластомы человека в иммунодефицитных мышах. *Вестник Российского государственного медицинского университета*. 2018; (2): 45–51. <https://doi.org/10.24075/vrgmu.2018.026> <https://elibrary.ru/xttuzf>
11. Stepanenko A.A., Sosnovtseva A.O., Valikhov M.P., Chekhonin V.P. A new insight into aggregation of oncolytic adenovirus Ad5-delta-24-RGD during CsCl gradient ultracentrifugation. *Sci. Rep.* 2021; 11(1): 16088. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94573-y>
12. Romanenko M.V., Dolgova E.V., Osipov I.D., Ritter G.S., Sizova M.S., Proskurina A.S., et al. Oncolytic effect of adenoviruses serotypes 5 and 6 against U87 glioblastoma cancer stem cells. *Anticancer Res.* 2019; 39(11): 6073–86. <https://doi.org/10.21873/anticancerres.13815>
13. Святченко В.А., Тарасова М.В., Нетесов С.В., Чумаков П.М. Онколитические аденовирусы в терапии злокачественных новообразований: современное состояние и перспективы. *Молекулярная биология*. 2012; 46(4): 556. <https://elibrary.ru/nmmprj>
14. Вдовиченко Г.В., Радаева И.Ф., Сергеев А.А., Колокольцова Т.Д., Нечаева Е.А., Ильина Т.В. и др. Создание банков перевиваемой культуры клеток 293 для производства антиракового вирусного лечебного препарата «Канцеролизин». *Биотехнология*. 2006; (1): 62–7. <https://elibrary.ru/ibpdar>
15. Вдовиченко Г.В., Петриченко В.А., Сергеев А.А., Ким И.И., Фатюхина О.Е., Шишкина Л.Н. и др. Доклинические исследования противоракового лечебного аденовирусного препарата канцеролизин. *Вопросы вирусологии*. 2006; 51(6): 39–42. <https://elibrary.ru/hylfpr>
16. Вдовиченко Г.В., Петриченко В.А., Сергеев А.А., Ким И.И., Фатюхина О.Е., Шишкина Л.Н. и др. Изучение реактогенности, безопасности и специфической активности противоракового лечебного препарата «Канцеролизин» на животных. *Биотехнология*. 2006; (2): 66–72. <https://elibrary.ru/ibpdgv>
17. Бауэр Т.В., Трегубчак Т.В., Максютов А.З., Таранов О.С., Соловьева О.И., Разумов И.А. и др. Рекомбинантный вирус осповакцины, перспективный для лечения меланомы. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2020; 38(2): 90–8. <https://doi.org/10.17116/molgen20203802190> <https://elibrary.ru/aclyje>
18. Nazarenko A.S., Vorovitch M.F., Biryukova Y.K., Pestov N.B., Orlova E.A., Barlev N.A., et al. Flaviviruses in antitumor therapy. *Viruses.* 2023; 15(10): 1973. <https://doi.org/10.3390/v15101973>
19. Lemos de Matos A., Franco L.S., McFadden G. Oncolytic viruses and the immune system: the dynamic duo. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 2020; 17: 349–58. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.01.001>
20. Postler T.S., Beer M., Blitvich B.J., Bukh J., de Lamballerie X., Drexler J.F., et al. Renaming of the genus flavivirus to orthoflavivirus and extension of binomial species names within the family flaviviridae. *Arch. Virol.* 2023; 168(9): 224. <https://doi.org/10.1007/s00705-023-05835-1>
21. Zhu Z., Gorman M.J., McKenzie L.D., Chai J.N., Hubert C.G., Prager B.C., et al. Zika virus has oncolytic activity against glioblastoma stem cells. *J. Exp. Med.* 2017; 214(10): 2843–57. <https://doi.org/10.1084/jem.20171093>
22. Святченко В.А., Разумов И.А., Протопопова Е.В., Демина А.В., Соловьева О.И., Завьялов Е.Л. и др. Вирус Зика обладает онколитической активностью в отношении клеток U87 глиобластомы человека. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2019; 22(8): 1040–5. <https://doi.org/10.18699/VJ18.448> <https://elibrary.ru/yqnnul>
23. Monath T.P., Vasconcelos P.F. Yellow fever. *J. Clin. Virol.* 2015; 64: 160–73. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.08.030>
24. Zhu X., Fan C., Xiong Z., Chen M., Li Z., Tao T., et al. Development and application of oncolytic viruses as the nemesis of tumor cells. *Front. Microbiol.* 2023; 14: 1188526. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1188526>
25. Aznar M.A., Molina C., Teijeira A., Rodriguez I., Azpilikueta A., Garasa S., et al. Repurposing the yellow fever vaccine for intratumoral immunotherapy. *EMBO Mol. Med.* 2020; 12(1): e10375. <https://doi.org/10.15252/emmm.201910375>
26. Левкович Е.Н., Карпович Л.Г. Сравнительное изучение вирусов группы клещевого энцефалита в культурах клеток HeLa. *Вопросы вирусологии*. 1960; (5): 30–9.
27. Левкович Е.Н., Сергеева Г.И. Ингибирующее действие вирусов комплекса клещевого энцефалита, обладающих различной нейровирулентностью, на опухоли мышей in vivo. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 1967; 64(8): 88–91.
28. Сергеева Г.И., Левкович Е.Н. Изучение особенностей размножения в опухолевых клетках in vitro и in vivo отдельных вирусов комплекса клещевого энцефалита, обладающих различной степенью нейровирулентности. *Вопросы вирусологии*. 1966; 11(5): 539–45.
29. Koudan E.V., Gryadunova A.A., Karalkin P.A., Korneva J.V., Meteleva N.Y., Babichenko I.I., et al. Multiparametric analysis of tissue spheroids fabricated from different types of cells. *Biotechnol. J.* 2020; 15(5): 1900217. <https://doi.org/10.1002/biot.201900217>
30. Dutta S.K., Langenburg T. A perspective on current flavivirus vaccine development: a brief review. *Viruses.* 2023; 15(4): 860. <https://doi.org/10.3390/v15040860>
31. Lindquist L., Vapalahti O. Tick-borne encephalitis. *Lancet.* 2008; 371(9627): 1861–71. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(08\)60800-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(08)60800-4)
32. Moore A.E. The destructive effect of the virus of Russian Far East encephalitis on the transplantable mouse sarcoma 180. *Cancer.* 1949; 2(3): 525–34. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(194905\)2:3%3C525::aid-cn-cr2820020317%3E3.0.co;2-o](https://doi.org/10.1002/1097-0142(194905)2:3%3C525::aid-cn-cr2820020317%3E3.0.co;2-o)
33. Moore A.E. Inhibition of growth of five transplantable mouse tumors by the virus of Russian Far East encephali-

- tis. *Cancer*. 1951; 4(2): 375–82. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(195103\)4:2%3C375::aid-cnrcr2820040227%3E3.0.co;2-a](https://doi.org/10.1002/1097-0142(195103)4:2%3C375::aid-cnrcr2820040227%3E3.0.co;2-a)
34. Chiantore M.V., Mangino G., Zangrillo M.S., Iuliano M., Affabris E., Fiorucci G., et al. Role of the Microenvironment in tumorigenesis: focus on virus-induced tumors. *Curr. Med. Chem.* 2015; 22(8): 958–74. <https://doi.org/10.2174/0929867322666141212121751>
 35. Gál P., Varinská L., Fáber L., Novák Š., Szabo P., Mitrengová P., et al. How signaling molecules regulate tumor microenvironment: parallels to wound repair. *Molecules*. 2017; 22(11): 1818. <https://doi.org/10.3390/molecules22111818>
 36. Lipatova A.V., Soboleva A.V., Gorshkov V.A., Bubis J.A., Solovyeva E.M., Krasnov G.S., et al. Multi-omics analysis of glioblastoma cells' sensitivity to oncolytic viruses. *Cancers (Basel)*. 2021; 13(21): 5268. <https://doi.org/10.3390/cancers13215268>
 37. Moerdyk-Schauwecker M., Shah N.R., Murphy A.M., Hastie E., Mukherjee P., Grdzlishvili V.Z. Resistance of pancreatic cancer cells to oncolytic vesicular stomatitis virus: role of type I interferon signaling. *Virology*. 2013; 436(1): 221–34. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.11.014>
 38. Sakai T., Mashima H., Yamada Y., Goto T., Sato W., Dohmen T., et al. The roles of interferon regulatory factors 1 and 2 in the progression of human pancreatic cancer. *Pancreas*. 2014; 43(6): 909–16. <https://doi.org/10.1097/mpa.0000000000000116>
- ### REFERENCES
1. Klaan N.K., Akin'shina L.P., Pronina T.A. Oncolytic viruses in the therapy of malignant neoplastic diseases. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal*. 2018; 17(4): 6–19. <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2018-17-4-6-19> <https://elibrary.ru/ybsnsh> (in Russian)
 2. Li K., Zhao Y., Hu X., Jiao J., Wang W., Yao H. Advances in the clinical development of oncolytic viruses. *Am. J. Transl. Res.* 2022; 14(6): 4192–206.
 3. Macedo N., Miller D.M., Haq R., Kaufman H.L. Clinical landscape of oncolytic virus research in 2020. *J. Immunother. Cancer*. 2020; 8(2): e001486. <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-001486>
 4. Kolyasnikova N.M., Pestov N.B., Sanchez-Pimentel J.P., Barlev N.A., Ishmukhametov A.A. Anti-cancer virotherapy in Russia: lessons from the past, current challenges and prospects for the future. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2023; 24(2): 266–78. <https://doi.org/10.2174/1389201023666220516121813>
 5. Tsyppin L.B., Voroshilova M.K., Goryunova A.G., Lavrova I.K., Koroleva G.A. The morphology of tumors of the human gastrointestinal tract in short-term organ culture and the reaction of these tumors to infection with poliovirus. *Cancer*. 1976; 38(4): 1796–806. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197610\)38:4%3C1796::aid-cnrcr2820380457%3E3.0.co;2-y](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197610)38:4%3C1796::aid-cnrcr2820380457%3E3.0.co;2-y)
 6. Voroshilova M.K., Goryunova A.G., Gorbachkov E.A., Chumakov P.M., Oganian T.G., Kodkind G.H. *Studies on Cellular Immunity of Oncology Patients in the Process of Asymptomatic Enteroviral Infection*. Riga: Zinātne; 1977: 17–20.
 7. Voroshilova M.K., Vaganova N.T. *Treatment of Patients with Gastro-Intestinal Tract Tumors with Live Enteroviral Vaccines*. Riga: Zinātne; 1969.
 8. Soboleva A.V., Lipatova A.V., Kochetkov D.V., Chumakov P.M. Changes in the sensitivity of human glioblastoma cells to oncolytic enteroviruses induced by passaging. *Vestnik Rossiyskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*. 2018; (2): 40–4. <https://doi.org/10.24075/brsmu.2018.025> <https://elibrary.ru/uutsjs>
 9. Sosnovtseva A.O., Chekhonin V.P., Zheltukhin A.O., Lipatova A.V., Chumakov P.M. Oncolytic activity of the vaccine strain of type 3 poliovirus on the model of rat glioma C6 cells. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2019; 167(1): 111–5. <https://doi.org/10.1007/s10517-019-04472-6> <https://elibrary.ru/rdykv>
 10. Zheltukhin A.O., Soboleva A.V., Sosnovtseva A.O., Le T.Kh., Il'inskaya G.V., Kochetkov D.V., et al. Human enteroviruses exhibit selective oncolytic activity in the model of human glioblastoma multiforme xenografts in immunodeficient mice. *Vestnik Rossiyskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*. 2018; (2): 42–8. <https://doi.org/10.24075/brsmu.2018.026> <https://elibrary.ru/xuagdz>
 11. Stepanenko A.A., Sosnovtseva A.O., Valikhov M.P., Chekhonin V.P. A new insight into aggregation of oncolytic adenovirus Ad5-delta-24-RGD during CsCl gradient ultracentrifugation. *Sci. Rep.* 2021; 11(1): 16088. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94573-y>
 12. Romanenko M.V., Dolgova E.V., Osipov I.D., Ritter G.S., Sizova M.S., Proskurina A.S., et al. Oncolytic effect of adenoviruses serotypes 5 and 6 against U87 glioblastoma cancer stem cells. *Anticancer Res.* 2019; 39(11): 6073–86. <https://doi.org/10.21873/anticancer.13815>
 13. Svyatchenko V.A., Netesov S.V., Tarasova M.V., Chumakov P.M. Oncolytic adenoviruses in anticancer therapy: current status and prospects. *Molekulyarnaya biologiya*. 2012; (4): 496–507. <https://doi.org/10.1134/S0026893312040103> <https://elibrary.ru/rgfvkf>
 14. Vdovichenko G.V., Radaeva I.F., Sergeev A.A., Kolokol'tsova T.D., Nechaeva E.A., Il'ina T.V., et al. Development of banks of a 203-cell continuous culture for manufacturing the anti-tumor therapeutic preparation cancerolysin. *Biotechnologiya*. 2006; (1): 83–9. <https://elibrary.ru/iqmqwx>
 15. Vdovichenko G.V., Petrishchenko V.A., Sergeyev A.A., Kim I.I., Fatyukhina O.Ye., Shishkina L.N., et al. Preclinical studies of the anticancer adenovirus cancerolysin. *Voprosy virusologii*. 2006; 51(6): 39–42. <https://elibrary.ru/hylfpr> (in Russian)
 16. Vdovichenko G.D., Petrishchenko V.A., Sergeev A.A., Kim I.I., Fatyukhina O.E., Shishkina L.N., et al. Study on reactogenicity, safety and specific activity of an anticancer medicinal preparation cancerolysin using test animals. *Biotechnologiya*. 2006; (2): 88–96. <https://elibrary.ru/ibjlpf>
 17. Bauer T.V., Tregubchak T.V., Maksyutov A.Z., Taranov O.S., Maksyutov R.A., Gavrilova E.V., et al. Recombinant vaccinia virus promising for melanoma treatment. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya*. 2020; 35(2): 97–104. <https://doi.org/10.3103/S0891416820020032> <https://elibrary.ru/ujwwtp>
 18. Nazarenko A.S., Vorovitch M.F., Biryukova Y.K., Pestov N.B., Orlova E.A., Barlev N.A., et al. Flaviviruses in antitumor therapy. *Viruses*. 2023; 15(10): 1973. <https://doi.org/10.3390/v15101973>
 19. Lemos de Matos A., Franco L.S., McFadden G. Oncolytic viruses and the immune system: the dynamic duo. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 2020; 17: 349–58. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.01.001>
 20. Postler T.S., Beer M., Blitvich B.J., Bukh J., de Lamballerie X., Drexler J.F., et al. Renaming of the genus flavivirus to orthoflavivirus and extension of binomial species names within the family flaviviridae. *Arch. Virol.* 2023; 168(9): 224. <https://doi.org/10.1007/s00705-023-05835-1>
 21. Zhu Z., Gorman M.J., McKenzie L.D., Chai J.N., Hubert C.G., Prager B.C., et al. Zika virus has oncolytic activity against glioblastoma stem cells. *J. Exp. Med.* 2017; 214(10): 2843–57. <https://doi.org/10.1084/jem.20171093>
 22. Svyatchenko V.A., Razumov I.A., Protopopova E.V., Demina A.M., Solovieva O.I., Zavjalov E.L., et al. Zika virus has an oncolytic activity against human glioblastoma U87 cells. *Vavilovskiy zhurnal genetiki i selektsii*. 2019; 22(8): 1040–5. <https://doi.org/10.18699/VJ18.448> <https://elibrary.ru/yqnnul> (in Russian)
 23. Monath T.P., Vasconcelos P.F. Yellow fever. *J. Clin. Virol.* 2015; 64: 160–73. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.08.030>
 24. Zhu X., Fan C., Xiong Z., Chen M., Li Z., Tao T., et al. Development and application of oncolytic viruses as the nemesis of tumor cells. *Front. Microbiol.* 2023; 14: 1188526. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1188526>
 25. Aznar M.A., Molina C., Teixeira A., Rodriguez I., Azpilikueta A., Garasa S., et al. Repurposing the yellow fever vaccine for intratumoral immunotherapy. *EMBO Mol. Med.* 2020; 12(1): e10375. <https://doi.org/10.15252/emmm.201910375>
 26. Levkovich E.N., Karpovich L.G. Comparative study of the viruses of the tick encephalitis group in HeLa cell cultures. *Voprosy virusologii*. 1960; (5): 30–9. (in Russian)
 27. Levkovich E.N., Sergeeva G.I. The inhibiting effect of tick-borne encephalitis complex viruses possessing varying neurovirulence on mouse tumors in vivo. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 1967; 64(8): 88–91. (in Russian)
 28. Sergeeva G.I., Levkovich E.N. A study of the features of reproduction in tumor cells in vitro and in vivo of different viruses of the tick-borne encephalitis complex, possessing various degrees of neurovirulence. *Voprosy virusologii*. 1966; 11(5): 539–45. (in Russian)
 29. Koudan E.V., Gryadunova A.A., Karalkin P.A., Korneva J.V., Meteleva N.Y., Babichenko I.I., et al. Multiparametric analysis of tissue spheroids fabricated from different types of cells. *Biotechnol. J.* 2020; 15(5): 1900217. <https://doi.org/10.1002/biot.201900217>
 30. Dutta S.K., Langenburg T. A perspective on current flavivirus vaccine development: a brief review. *Viruses*. 2023; 15(4): 860. <https://doi.org/10.3390/v15040860>

31. Lindquist L., Vapalahti O. Tick-borne encephalitis. *Lancet*. 2008; 371(9627): 1861–71. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(08\)60800-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(08)60800-4)
32. Moore A.E. The destructive effect of the virus of Russian Far East encephalitis on the transplantable mouse sarcoma 180. *Cancer*. 1949; 2(3): 525–34. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(194905\)2:3%3C525::aid-cnrcr2820020317%3E3.0.co;2-o](https://doi.org/10.1002/1097-0142(194905)2:3%3C525::aid-cnrcr2820020317%3E3.0.co;2-o)
33. Moore A.E. Inhibition of growth of five transplantable mouse tumors by the virus of Russian Far East encephalitis. *Cancer*. 1951; 4(2): 375–82. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(195103\)4:2%3C375::aid-cnrcr2820040227%3E3.0.co;2-a](https://doi.org/10.1002/1097-0142(195103)4:2%3C375::aid-cnrcr2820040227%3E3.0.co;2-a)
34. Chiantore M.V., Mangino G., Zangrillo M.S., Iuliano M., Affabris E., Fiorucci G., et al. Role of the Microenvironment in tumourigenesis: focus on virus-induced tumors. *Curr. Med. Chem*. 2015; 22(8): 958–74. <https://doi.org/10.2174/0929867322666141212121751>
35. Gál P., Varinská L., Fáber L., Novák Š., Szabo P., Mitréngová P., et al. How signaling molecules regulate tumor microenvironment: parallels to wound repair. *Molecules*. 2017; 22(11): 1818. <https://doi.org/10.3390/molecules22111818>
36. Lipatova A.V., Soboleva A.V., Gorshkov V.A., Bubis J.A., Solovyeva E.M., Krasnov G.S., et al. Multi-omics analysis of glioblastoma cells' sensitivity to oncolytic viruses. *Cancers (Basel)*. 2021; 13(21): 5268. <https://doi.org/10.3390/cancers13215268>
37. Moerdyk-Schauwecker M., Shah N.R., Murphy A.M., Hastie E., Mukherjee P., Grdzlishvili V.Z. Resistance of pancreatic cancer cells to oncolytic vesicular stomatitis virus: role of type I interferon signaling. *Virology*. 2013; 436(1): 221–34. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.11.014>
38. Sakai T., Mashima H., Yamada Y., Goto T., Sato W., Dohmen T., et al. The roles of interferon regulatory factors 1 and 2 in the progression of human pancreatic cancer. *Pancreas*. 2014; 43(6): 909–16. <https://doi.org/10.1097/mpa.000000000000116>

Информация об авторах:

Назаренко Алина Сергеевна – младший научный сотрудник лаборатории клещевых энцефалитов и других вирусных энцефалитов ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), Москва, Россия. E-mail: nazarenko_as@chumakovs.ru; <https://orcid.org/0000-0002-7322-8730>

Бирюкова Юлия Константиновна – канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории клещевых энцефалитов и других вирусных энцефалитов ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), Москва, Россия. E-mail: biryukova_jk@chumakovs.ru; <https://orcid.org/0000-0002-5804-4001>

Орлова Екатерина Андреевна – младший научный сотрудник лаборатории клещевых энцефалитов и других вирусных энцефалитов ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), Москва, Россия. E-mail: orlova_ea@chumakovs.ru; <https://orcid.org/0009-0009-4175-0493>

Трачук Кирилл Николаевич – младший научный сотрудник лаборатории клещевых энцефалитов и других вирусных энцефалитов ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), Москва, Россия. E-mail: trachuk_kn@chumakovs.ru; <https://orcid.org/0000-0002-2061-0274>

Иванова Алла Леонидовна – канд. биол. наук, микробиолог отделения энцефалитной вакцины ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), Москва, Россия. E-mail: ivanova_al@chumakovs.ru; <https://orcid.org/0009-0002-3086-0581>

Белякова Алла Владимировна – канд. биол. наук, ученый секретарь ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), Москва, Россия. E-mail: belyakova_av@chumakovs.ru; <https://orcid.org/0000-0003-4363-6394>

Пестов Николай Борисович – канд. хим. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клещевых энцефалитов и других вирусных энцефалитов ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), Москва, Россия. E-mail: pestov_nb@chumakovs.ru; <https://orcid.org/0000-0002-9973-0120>

Ворович Михаил Фридрихович – канд. биол. наук, заведующий отделением энцефалитной вакцины и ведущий научный сотрудник лаборатории клещевых энцефалитов и других вирусных энцефалитов ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), Москва, Россия. E-mail: vorovich_mf@chumakovs.ru; <https://orcid.org/0000-0002-7367-6357>

Ишмухаметов Айдар Айратович – академик РАН, генеральный директор ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), Москва, Россия. E-mail: ishmukhametov@chumakovs.ru; <https://orcid.org/0000-0001-6130-4145>

Колясникова Надежда Михайловна – д-р мед. наук, заведующая лабораторией клещевых энцефалитов и других вирусных энцефалитов ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), Москва, Россия. E-mail: kolyasnikova_nm@chumakovs.ru; <https://orcid.org/0000-0002-9934-2582>

Участие авторов: Назаренко А.С., Бирюкова Ю.К. – концепция и дизайн исследования, проведение экспериментов, сбор, анализ и интерпретация данных, подготовка текста и графиков; Орлова Е.А. – проведение экспериментов; Трачук К.Н. – оформление, статистический анализ; Иванова А.Л. – проведение экспериментов; Белякова А.В. – оформление, экспертиза на открытие опубликование; Пестов Н.Б., Ворович М.Ф. – концепция и дизайн исследования, анализ данных, проверка предварительного варианта статьи; Ишмухаметов А.А. – одобрение окончательного варианта статьи для публикации; Колясникова Н.М. – концепция и дизайн исследования, проверка финальной версии.

Поступила 02.11.2023
Принята в печать 21.12.2023
Опубликована 29.12.2023

Information about the authors:

Alina S. Nazarenko - Junior researcher of the Laboratory of Tick-Borne Encephalitis and Other Viral Encephalitides, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russia. E-mail: nazarenko_as@chumakovs.ru; <https://orcid.org/0000-0002-7322-8730>

Yulia K. Biryukova – Ph. D., Researcher of the Laboratory of Tick-Borne Encephalitis and Other Viral Encephalitides, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), 108819, Russian Federation, Moscow, Russia. E-mail: biryukova_jk@chumakovs.ru; <https://orcid.org/0000-0002-5804-4001>

Ekaterina A. Orlova - Junior researcher of the Laboratory of Tick-Borne Encephalitis and Other Viral Encephalitides, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russia. E-mail: orlova_ea@chumakovs.ru; <https://orcid.org/0009-0009-4175-0493>

Kirill N. Trachuk - Junior researcher of the Laboratory of Tick-Borne Encephalitis and Other Viral Encephalitides, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russia. E-mail: trachuk_kn@chumakovs.su; <https://orcid.org/0000-0002-2061-0274>

Alla L. Ivanova – Ph. D., Microbiologist, Encephalitis Vaccine department, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russia. E-mail: ivanova_al@chumakovs.su; <https://orcid.org/0009-0002-3086-0581>

Alla V. Belyakova - Ph. D., Scientific secretary, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russia. E-mail: belyakova_av@chumakovs.su; <https://orcid.org/0000-0003-4363-6394>

Nikolai B. Pestov - Ph. D., Senior Researcher of the Laboratory of Tick-Borne Encephalitis and Other Viral Encephalitides, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russia. E-mail: pestov_nb@chumakovs.su; <https://orcid.org/0000-0002-9973-0120>

Mikhail F. Vorovitch – Ph. D., Head of Encephalitis Vaccine Department and Senior Researcher of the Laboratory of Tick-Borne Encephalitis and Other Viral Encephalitides, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russia. E-mail: vorovich_mf@chumakovs.su; <https://orcid.org/0000-0002-7367-6357>

Aydar A. Ishmukhametov - Academician of the Russian Academy of Sciences, CEO, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russia. E-mail: ishmukhametov@chumakovs.su; <https://orcid.org/0000-0001-6130-4145>

Nadezhda M. Kolyasnikova – D.M.S, Head of the Laboratory of Tick-Borne Encephalitis and Other Viral Encephalitides, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russia. E-mail: kolyasnikova_nm@chumakovs.su; <https://orcid.org/0000-0002-9934-2582>

Contribution: Nazarenko A.S., Biryukova Yu.K. – conception and design of the study, carrying out experiments, collection, analysis and interpretation of data, preparation of text and graphs; Orlova E.A. – carrying out experiments; Trachuk K.N. – design, statistical analysis; Ivanova A.L. – conducting experiments; Belyakova A.V. – design, examination for open publication; Pestov N.B., Vorovich M.F. – concept and design of the study, data analysis, verification of the preliminary version of the article; Ishmukhametov A.A. – approval of the final version of the article for publication; Kolyasnikova N.M. – concept and design of the study, verification of the final version.

Received 02 November 2023

Accepted 21 December 2023

Published 29 December 2023

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-206>

© КИЧАТОВА В.С., ПОТЕМКИН И.А., АСАДИ МОБАРХАН Ф.А., РУМЯНЦЕВА Т.Д., СЕМЕНОВ С.И., КЮРЕГЯН К.К., МИХАЙЛОВ М.И., 2023



Выявление антител к вирусу гепатита E у домашних северных оленей (*Rangifer tarandus*) в Республике Саха (Якутия)

Кичатова В.С.^{1-3✉}, Потемкин И.А.¹⁻³, Асади Мобархан Ф.А.^{1,2}, Румянцева Т.Д.⁴, Семенов С.И.⁵, Кюрегян К.К.^{1,2}, Михайлов М.И.^{1,2}

¹ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, 111123, г. Москва, Россия;

²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 105064, г. Москва, Россия;

³ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, 125993, г. Москва, Россия;

⁴ФГБОУ ВО «Арктический государственный агротехнологический университет», 677008, г. Якутск, Республика Саха (Якутия), Россия;

⁵ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова», 677010, г. Якутск, Республика Саха (Якутия), Россия

Резюме

Введение. Несмотря на то что домашние и дикие свиньи являются основным резервуаром зоонозных генотипов вируса гепатита E (ВГЕ) в странах умеренного климата, наличие антител к ВГЕ (анти-ВГЕ) у коренного населения приполярных территорий, т.е. за пределами ареала обитания диких и домашних свиней, указывает на наличие альтернативного резервуара вируса. Потенциальным резервуаром ВГЕ в приполярных регионах могут являться северные олени (*Rangifer tarandus*).

Целью исследования являлось определение распространенности анти-ВГЕ среди домашних северных оленей на территории Республики Саха (Якутия).

Материалы и методы. Образцы сыворотки крови от 497 домашних оленей из Оймяконского ($n = 425$) и Усть-Янского районов ($n = 72$) Республики Саха (Якутия) были исследованы на анти-ВГЕ методом иммуноферментного анализа с помощью коммерческого набора реагентов «ДС-ИФА-АНТИ-ВГЕ-G» (ООО «Диагностические системы-Столица», Россия) по протоколу производителя, однако вместо человеческого специфического конъюгата из набора использовали кроличьи поликлональные антитела против IgG оленя, меченные пероксидазой хрена (KPL, США) в разведении 1 : 100 в фосфатно-солевом буфере.

Результаты. В среднем частота выявления анти-ВГЕ в сыворотках северных оленей составила 15,5% (95% ДИ 12,6–19,0%). Частота выявления анти-ВГЕ достоверно увеличивалась с возрастом: с 3,5% (95% ДИ 1,1–9,0%) у оленят в возрасте 3–6 мес до 25,0% (95% ДИ 1,6–36,5%) у оленей в возрасте 2–4 года ($p < 0,0001$), и начиная с этого возраста выходили на плато, не различаясь достоверно между более старшими возрастными группами ($p > 0,05$). В целом частота выявления анти-ВГЕ среди оленей в возрасте 2 года и старше составила 19,0% (95% ДИ 15,3–23,4%). Статистически значимые различия по частоте выявления анти-ВГЕ между самками и самцами северных оленей отсутствовали как среди взрослых животных, так и среди оленят.

Заключение. Полученные результаты выявления анти-ВГЕ среди домашних северных оленей в Республике Саха (Якутия) свидетельствуют о широком распространении среди этих животных инфекции, вызываемой ВГЕ или антигенно сходным вирусом. Выявленная динамика накопления антител в популяции северных оленей свидетельствует о том, что инфицирование, по-видимому, происходит в первые 2 года жизни животного.

Ключевые слова: вирус гепатита E; антитела; северный олень

Для цитирования: Кичатова В.С., Потемкин И.А., Асади Мобархан Ф.А., Румянцева Т.Д., Семенов С.И., Кюрегян К.К., Михайлов М.И. Выявление антител к вирусу гепатита E у домашних северных оленей (*Rangifer tarandus*) в Республике Саха (Якутия). *Вопросы вирусологии*. 2023; 68(6): 549–556. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-206> EDN: <https://elibrary.ru/lifzfnu>

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 22-25-00549).
Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Этическое утверждение. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова» (протокол № 34 от 30.03.2022). Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus author guidelines for animal use» (IAVES 23 July 2010).

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-206>

Detection of antibodies to the hepatitis E virus in domestic reindeer (*Rangifer tarandus*) in the Republic of Sakha (Yakutia)

Vera S. Kichatova¹⁻³✉, Ilya A. Potemkin¹⁻³, Fedor A. Asadi Mobarkhan^{1,2},
Tatyana D. Rummyantseva⁴, Sergey I. Semenov⁵, Karen K. Kyuregyan^{1,2}, Mikhail I. Mikhailov^{1,2}

¹Central Research Institute of Epidemiology, 111123, Moscow, Russia;

²Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, 105064, Moscow, Russia;

³Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, 125993, Moscow, Russia;

⁴Arctic State Agrotechnological University, 677008, Yakutsk, Republic of Sakha (Yakutia), Russia;

⁵North-Eastern Federal University named after. M.K. Ammosov, 677010, Yakutsk, Republic of Sakha (Yakutia), Russia

Abstract

Introduction. Although domestic pigs and wild boars are the main reservoir of zoonotic hepatitis E virus (HEV) genotypes in temperate countries, the presence of antibodies to HEV (anti-HEV) in the indigenous population of circumpolar territories, i.e. outside the habitat of wild and domestic pigs, indicates the presence of an alternative reservoir of the virus. Reindeer (*Rangifer tarandus*) may be a potential reservoir for HEV in the polar regions. The purpose of the study was to determine the prevalence of anti-HEV among domestic reindeer in the Republic of Sakha (Yakutia).

Materials and methods. Sera from 497 domestic reindeer from the Oymyakon ($n = 425$) and Ust-Yansky districts ($n = 72$) of the Republic of Sakha (Yakutia) were tested for anti-HEV. A commercial ELISA kit DS-ELISA-ANTI-HEV-G (Diagnostic Systems-Stolitsa LLC, Russia) was used for detection of anti-HEV IgG, but a rabbit polyclonal antibody against deer IgG labeled with horseradish peroxidase (KPL, USA) at a dilution of 1 : 100 in phosphate-buffered saline were used instead of the human specific conjugate from the kit.

Results. The average detection rate of anti-HEV in reindeer sera was 15.5% (95% CI: 12.6–19.0%). The detection rate of anti-HEV significantly increased with age, from 3.5% (95% CI: 1.1–9.0%) in calves aged 3–6 months to 25.0% (95% CI: 1.6–36.5%) in deer aged 2–4 years ($p < 0.0001$). From this age group, anti-HEV detection rates reached a plateau, not differing significantly between older age groups ($p > 0.05$). The average anti-HEV detection rate among reindeer 2 years of age and older was 19.0% (95% CI: 15.3–23.4%). There were no statistically significant differences in the frequency of anti-HEV detection between female and male reindeer, both among adult animals and among calves.

Conclusion. The observed anti-HEV detection rates among domestic reindeer in the Republic of Sakha (Yakutia) indicate that infection caused by HEV or an antigenically similar virus is common in these animals. The dynamics of antibody accumulation in the reindeer population indicates that infection apparently occurs during the first two years of life.

Keywords: hepatitis E virus; antibodies; reindeer

For citation: Kichatova V.S., Potemkin I.A., Asadi Mobarkhan F.A., Rummyantseva N.D., Semenov S.I., Kyuregyan K.K., Mikhailov M.I. Detection of antibodies to the hepatitis E virus in domestic reindeer (*Rangifer tarandus*) in the Republic of Sakha (Yakutia). *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2023; 68(6): 549–556. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-206> EDN: <https://elibrary.ru/ifzfnu>

Funding. The research was funded by the Grant of Russian Scientific Foundation (project № 22-25-00549).

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

Ethics approval. The research protocol was approved by the Ethics Committee of North-Eastern Federal University named after. M.K. Ammosov (Protocol No. 34 dated 30.03.2022). 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).

Введение

Вирус гепатита E (ВГЕ), или *Paslahepevirus bayani* (семейство *Hepeviridae*, род *Paslahepevirus*) в соответствии с номенклатурой ICTV, представляет собой РНК-содержащий вирус, вызывающий острый, а у пациентов с иммуносупрессией – хронический гепатит [1]. Кроме того, для этого вируса характерна тропность не только к гепатоцитам, но и к широкому спектру других тканей, что обуславливает часто регистрируемые внепеченочные проявления инфекции, в том числе неврологические [2]. ВГЕ ежегодно вы-

зывает в мире не менее 20 млн случаев заражения, из которых около 3,3 млн сопровождаются развитием симптомов заболевания, с уровнем смертности 0,2–4,0%, и является наиболее распространенной причиной острого вирусного гепатита [3]. Ранее считалось, что эта инфекция актуальна для тропических стран с низким уровнем санитарного благополучия, но в последние годы благодаря повышению осведомленности, увеличению надзора за ВГЕ и охвата диагностикой, стало понятно, что ВГЕ-инфекция широко распространена и в индустриальных странах [4].

Результаты последних исследований показывают, что для России также характерны широкая распространенность ВГЕ и особенности эпидемиологии инфекции, наблюдаемые в индустриальных странах умеренного климата [5].

Эпидемиология и, очевидно, патогенность ВГЕ-инфекции во многом зависят от генотипа ВГЕ. В настоящее время известно 8 генотипов ВГЕ [6]. Генотипы 1 и 2 являются строго антропонозными и вызывают вспышки и спорадические случаи в развивающихся странах [7]. Другие генотипы вируса способны инфицировать разные виды млекопитающих: диких кабанов (генотипы 3, 5 и 6), домашних свиней (генотипы 3 и 4), оленей (генотипы 3 и 4), кроликов (генотип 3га) и верблюдов (генотипы 7 и 8) [8]. С генотипами 3 и 4 связаны все незавозные (автохтонные) случаи заражения человека ВГЕ в индустриальных странах, при этом домашние свиньи признаны основным источником инфекции. Согласно консолидированному мнению экспертов, ВГЕ занимает 6-е место среди вирусов с высоким риском зоонозной передачи, что подчеркивает его зоонозный потенциал [9]. Кроме собственно ВГЕ, ряд других представителей семейства *Hepeviridae*, в первую очередь циркулирующий среди крыс *Rocahepevirus ratti*, также способны вызывать заболевание у человека [10].

Несмотря на то что свиньи, домашние и дикие, являются основным зоонозным резервуаром ВГЕ генотипов 3 и 4 в странах умеренного климата, наличие антител к ВГЕ (анти-ВГЕ) у коренного населения приполярных территорий [11], т.е. за пределами ареала обитания диких и домашних свиней, указывает на наличие альтернативного резервуара вируса. Потенциальным резервуаром ВГЕ в приполярных регионах могут являться северные олени (*Rangifer tarandus*). Северный олень является главным сельскохозяйственным животным на огромных приполярных территориях и основным источником мяса для населения этих территорий, в том числе для коренного населения Севера. Известно, что помимо свиней, ВГЕ генотипов 3 и 4 выявляются у разных видов европейских и азиатских оленей [12]. Кроме того, у лосей был идентифицирован вирус *Paslahepevirus alci*, наиболее филогенетически близкий к ВГЕ из всех гепевирусов [13]. Однако, несмотря на несколько сообщений о выявлении анти-ВГЕ у северных оленей [14–16], сам вирус от этого вида животных до сих пор не выделен.

Ранее нами были описаны случаи выявления анти-ВГЕ как у оленеводов, так и у домашних северных оленей на территории Республики Саха (Якутия) [17]. **Целью** настоящего исследования являлось определение распространенности анти-ВГЕ у северных оленей в Якутии на расширенной выборке, включающей в себя оленей разных возрастов: от оленят моложе одного года до животных старше 10 лет.

Материалы и методы

Всего в летне-осенние периоды 2022–2023 гг. были собраны 497 образцов сыворотки крови от домашних оленей на территориях Оймяконского (n

= 425) и Усть-Янского районов ($n = 72$) Республики Саха (Якутия). В Усть-Янском районе были собраны преимущественно образцы сыворотки крови от оленят в возрасте до 4 мес ($n = 60$), тогда как в Оймяконском районе – образцы от животных всех возрастных групп: от оленят в возрасте до 6 мес до оленей старше 10 лет. Распределение образцов по регионам исследования и в общей выборке в зависимости от пола и возраста животных приведено в **табл. 1**. Для 21 образца пол и точный возраст животного не были известны, однако они были получены от животных 2 лет и старше, в связи с чем их учитывали при расчете среднего значения частоты выявления анти-ВГЕ и среднего значения коэффициента позитивности (КП), но исключали из дальнейшего анализа распределения показателей серопозитивности в зависимости от пола и возраста животных.

Сбор образцов крови проводили в рамках планового ветеринарного контроля с соблюдением институциональных и национальных стандартов по этичному обращению с животными. Протокол исследования был одобрен Этическим комитетом ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова» (протокол № 34 от 30.03.2022).

Образцы крови собирали из яремной вены животного в пробирки для крови (BD Vacutainer; BD, Великобритания) с использованием ветеринарной иглы Боброва («МИЗ-Ворсма», Россия) для оленей в возрасте 2 года и старше или иглы инъекционной (KDM, KD-FINE 18G × 1,5”, Германия) для оленят в возрасте до года. Отделение сыворотки проводили путем естественного отстаивания в течение 24 ч при температуре 18–20 °С. Образцы сыворотки крови переносили в стерильные полипропиленовые пробирки и хранили при 2–8 °С не более 2 сут, затем замораживали при температурном режиме от –18 до –20 °С и транспортировали с соблюдением холодовой цепи в лабораторию, где хранили при –70 °С до тестирования.

Анти-ВГЕ класса IgG определяли с помощью коммерческого набора реагентов «ДС-ИФА-АНТИ-ВГЕ-G» (ООО «Диагностические системы-Столица», Россия) по протоколу производителя, однако вместо человеческого специфического конъюгата из набора использовали кроличьи поликлональные антитела против IgG оленя, меченные пероксидазой хрена (KPL, США) в разведении 1 : 100 в фосфатно-солевом буфере. Применявшийся набор основан на рекомбинантном антигене капсидного белка ВГЕ, высококонсервативном у разных генотипов ВГЕ, и имеет чувствительность 1000 мМЕ/мл [18]. Оптическую плотность (ОП) измеряли спектрофотометрически при длине волны 450 нм. ВГЕ-положительные и отрицательные контрольные образцы, поставляемые с набором, использовали в качестве положительного и отрицательного контроля в каждой планшете соответственно. Анти-ВГЕ-реактивную сыворотку крови оленей, полученную в предыдущем исследовании [17], также использовали для мониторинга воспроизводимости результатов между постановками. Образцы со значениями ОП, превышающие пороги-

Таблица 1. Распределение образцов сыворотки крови северных оленей в зависимости от пола и возраста животных

Table 1. Distribution of blood serum samples of reindeer depending on sex and age of animals

Возраст Age	Пол Sex	Оймяконский район Oymyakonsky District	Усть-Янский район Ust-Yansky District	Всего Total
До 6 мес Less than 6 months	Самки Female	44	28	72
	Самцы Male	9	32	41
	Всего Total	53	60	113
2–4 года 2–4 years	Самки Female	38	6	44
	Самцы Male	20	4	24
	Всего Total	58	10	68
5–6 лет 5–6 years	Самки Female	139	1	140
	Самцы Male	16	1	17
	Всего Total	155	2	157
7–8 лет 7–8 years	Самки Female	89	0	89
	Самцы Male	4	0	4
	Всего Total	93	0	93
Старше 9 лет Over 9 years	Самки Female	41	0	41
	Самцы Male	4	0	4
	Всего Total	45	0	45
Не установлен Undetermined	Не установлен Undetermined	21	0	21

вое значение (0,20 плюс средняя ОП отрицательных контролей), считали реактивными. Для каждого реактивного образца рассчитывали КП как отношение ОП образца к пороговому значению ОП.

Статистический анализ результатов выполняли с использованием программного обеспечения GraphPad 10.0.2 (<https://www.graphpad.com/>). Статистическая обработка данных включала: определение средних показателей величин, расчет 95% доверительного интервала (95% ДИ), выявление достоверности различий средних значений показателей в сравниваемых группах с использованием критерия Фишера (для относительных показателей) и непарного критерия Стьюдента (для количественных показателей). Различия оценивались как статистически значимые при $p \leq 0,05$.

Результаты

В среднем частота выявления анти-ВГЕ в сыворотке крови северных оленей составила 15,5% (77/497; 95% ДИ 12,6–19,0%). В образцах от оле-

ней из Оймяконского района частота выявления анти-ВГЕ составила 16,5% (70/425; 95% ДИ 13,2–20,3%), а в образцах из Усть-Янского района – 9,7% (7/72; 95% ДИ 4,5–19,0%), при этом различия между районами не были статистически значимы ($p = 0,1618$). В связи с этим для дальнейшего анализа две выборки были объединены. Результаты выявления анти-ВГЕ в разных возрастных группах оленей приведены на рисунке. Частота выявления анти-ВГЕ достоверно увеличивалась с 3,5% (4/113; 95% ДИ 1,1–9,0%) у оленей в возрасте 3–6 мес до 25,0% (17/68; 95% ДИ 16,1–36,5%) у оленей в возрасте 2–4 года ($p < 0,0001$), и начиная с этого возраста выходила на плато, не различаясь достоверно между более старшими возрастными группами ($p > 0,05$). В целом частота выявления анти-ВГЕ среди оленей в возрасте 2 года и старше составила 19,0% (69/363; 95% ДИ 15,3–23,4%), что достоверно превышало аналогичный показатель среди оленей в возрасте не старше 6 мес ($p = 0,0002$).

Показатели частоты выявления анти-ВГЕ в зависимости от пола животных приведены в табл. 2. Ста-

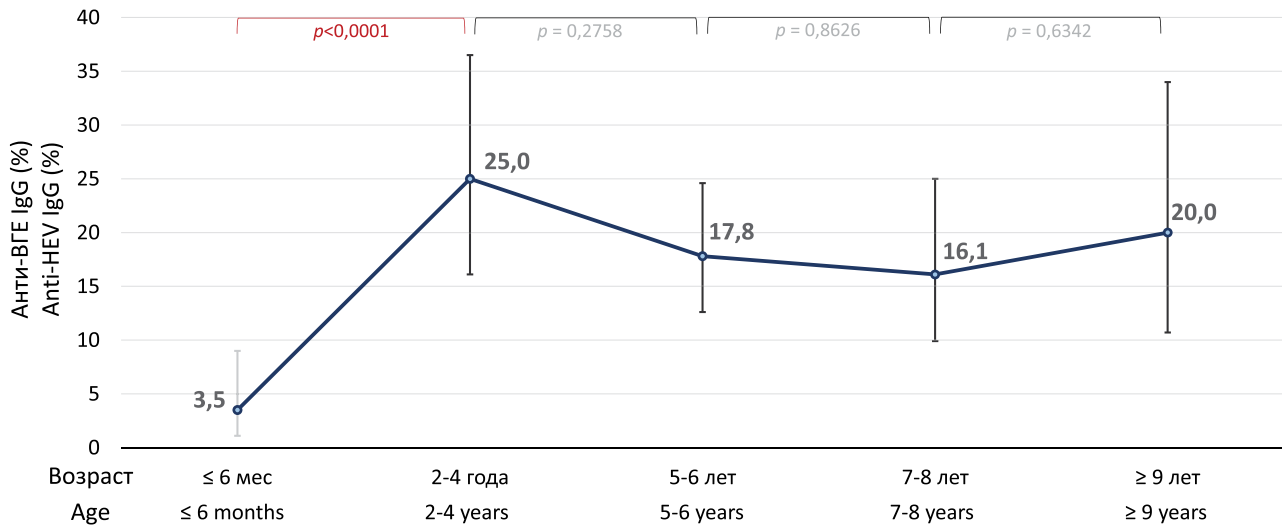


Рисунок. Показатели частоты выявления анти-ВГЕ в разных возрастных группах северных оленей.

Figure. Frequency rates of anti-HEV detection in different age groups of reindeer.

Таблица 2. Показатели частоты выявления анти-ВГЕ у самцов и самок северных оленей

Table 2. Frequency rates of anti-HEV detection in male and female reindeer

Возрастная группа / Age group	Анти-ВГЕ, n реактивных/N обследованных животных (%) / Anti-HEV, n reactive/N animals examined (%)		p*
	самцы / males	самки / females	
Оленята, 4–6 мес / Calves, 4–6 months	2/39 (5,1%)	2/70 (2,9%)	0,6202
Взрослые олени, 2 года и старше / Adult reindeer, 2 years and older	12/37 (32,4%)	57/257 (22,2%)	0,3272

Примечание. *Значения p получены при сравнении между двумя группами животных с использованием критерия Фишера.

Note. *p values were obtained when comparing between two groups of reindeer using Fisher’s exact test.

статистически значимые различия по частоте выявления анти-ВГЕ между самками и самцами северных оленей отсутствовали как среди взрослых животных, так и среди оленят.

Среднее значение КП реактивных по анти-ВГЕ образцов сыворотки крови северных оленей (\pm SD) составило $4,03 \pm 3,54$; 57,1% (44/77) реактивных по анти-ВГЕ образцов имели $KP \geq 2$. Средние значения КП реактивных сывороток в зависимости от возраста животных приведены в **табл. 3**. Статистически значимые различия между показателями средней величины КП в зависимости от возраста животных выявлены не были.

Обсуждение

Полученные результаты свидетельствуют о широком распространении инфекции, вызываемой ВГЕ или антигенно сходным вирусом, среди поголовья домашних северных оленей в Якутии. Выявление анти-ВГЕ у северных оленей в настоящем исследовании не обязательно свидетельствует о циркуляции среди этих животных именно вируса вида *Paslahepevirus balayani*, поскольку для капсидных белков разных представителей семейства *Hepeviridae* продемонстрирована перекрестная антигенная

реактивность [19–21]. Именно антитела к капсидному белку ВГЕ являются, как правило, мишенью для серологических тестов, используемых для диагностики гепатита E, в том числе для тест-системы, применявшейся в настоящем исследовании. Таким образом, реактивность сыворотки крови северных оленей в нашем исследовании может свидетельствовать о наличии антител к ВГЕ или другим ВГЕ-подобным вирусам. Косвенным свидетельством специфичности выявления анти-ВГЕ в нашем исследовании является величина КП, превышающая показатель 1,5, в 71,4% реактивных образцов.

Средняя частота выявления анти-ВГЕ в настоящем исследовании (15,5%) оказалась сходной с долей серопозитивных полудомашних северных оленей в Норвегии (15,7%) [16], но значительно выше, чем в Канаде (8,8%) [14]. Сравнение с ранее полученными нами результатами выявления анти-ВГЕ в меньшей выборке северных оленей из Оймяконского и Анабарского районов Якутии (12,0%; 23/191) [17] продемонстрировало отсутствие достоверных различий ($p = 0,2783$). Как и во всех упомянутых выше исследованиях, доля серопозитивных самцов и самок в настоящем исследовании оказалась сходной. В то же время нами впервые продемонстрировано достоверное уве-

Таблица 3. Средние значения коэффициента позитивности реактивных по анти-ВГЕ сывороток северных оленей в разных возрастных группах животных**Table 3.** Mean values of the cut-off index of anti-HEV reactive sera of reindeer in different age groups of animals

Возрастная группа Age group	Среднее значение КП ± SD Average COI value ± SD	<i>p</i> *
4–6 мес 4–6 months	3,77 ± 3,23	
2–4 года 2–4 years	3,98 ± 2,85	0,8959
5–6 лет 5–6 years	4,41 ± 4,32	0,7775
7–8 лет 7–8 years	3,81 ± 3,51	0,9844
9 лет и старше 9 years and older	3,71 ± 2,86	0,9747
Все возрастные группы All age groups	4,03 ± 3,54	0,8822

Примечание. *Значения *p* при сравнении с данными для группы оленят с использованием непарного критерия Стьюдента.

Note. **p* values when compared to the data for the reindeer calves using unpaired Student's test.

личение частоты выявления анти-ВГЕ по мере взросления животных – по сравнению с оленятами в возрасте 4–6 мес, распространенность анти-ВГЕ возрастала среди животных, достигших 2 лет, и сохранялась примерно на одном уровне в более старших возрастных группах. В обследованных в Норвегии группах северных оленей анти-ВГЕ несколько чаще встречались среди взрослых животных по сравнению с оленятами, однако эти различия не были статистически значимыми [16], вероятно, из-за небольших размеров выборки в каждом обследованном регионе страны.

Следует отметить, что поиск ВГЕ у северных оленей до настоящего времени не проводили систематически. Несколько исследований, в которых для детекции РНК ВГЕ использовали праймеры, специфичные для *Paslahepevirus balayani*, дали отрицательный результат [14, 17]. Не были выявлены последовательности гепевирусов и при использовании метагеномного подхода для анализа образцов сыворотки крови и ректальных мазков от диких и домашних северных оленей из Фенноскандии и Якутии [22]. Причинами неудачи при поиске РНК ВГЕ у этих животных могли быть, в случае использования ВГЕ-специфичных праймеров, значительное генетическое различие между ВГЕ северного оленя и известными штаммами вида *Paslahepevirus balayani*, а также тот факт, что поиск ВГЕ проводили в основном среди взрослых животных. Среди домашних свиней большинство случаев заражения ВГЕ происходит у поросят в возрасте 2–4 мес, поскольку они становятся восприимчивыми к вирусу после исчезновения материнских антител [23]. Аналогичным образом, большинство случаев заражения ВГЕ у северных оленей также может возникать в раннем возрасте, на что указывают полученные нами результаты выявления анти-ВГЕ у животных разного возраста. Выявленная динамика накопления антител в популяции северных

оленей свидетельствует о том, что инфицирование, по-видимому, происходит в первые 2 года жизни, после чего у животных сохраняется гуморальный иммунитет. Таким образом, дальнейший поиск последовательностей гепевирусов у северных оленей целесообразно проводить среди молодых животных, с использованием метагеномных методов или более универсальных праймеров, если применяется метод полимеразной цепной реакции.

Заключение

Полученные результаты выявления анти-ВГЕ среди домашних северных оленей в Республике Саха (Якутия) свидетельствует о широком распространении среди этих животных инфекции, вызываемой ВГЕ или антигенно сходным вирусом. Динамика накопления анти-ВГЕ в популяции северных оленей косвенно свидетельствует об особенностях эпидемиологии инфекции, похожей на наблюдаемую среди поголовья свиней, – встреча с вирусом происходит, как правило, у молодых животных с последующей сероконверсией и формированием иммунитета. Аналогично ситуации, наблюдаемой в свиноводстве, риск инфицирования для человека, вероятно, является наибольшим при контакте с оленятами, поскольку для них выше вероятность наличия репликации вируса, сопровождаемой вирусемией и выделением вируса.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Purdy M.A., Drexler J.F., Meng X.J., Norder H., Okamoto H., Van der Poel W.H.M., et al. ICTV virus taxonomy profile: Hepeviridae 2022. *J. Gen. Virol.* 2022; 103(9). <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001778>
2. Pischke S., Hartl J., Pas S.D., Lohse A.W., Jacobs B.C., Van der Eijk A.A. Hepatitis E virus: Infection beyond the liver? *J. Hepatol.* 2017; 66(5): 1082–95. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.11.016>.
3. WHO. Hepatitis E: Fact Sheet; 2020. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-e>
4. Kamar N., Izopet J., Pavio N., Aggarwal R., Labrique A., Wedemeyer H., et al. Hepatitis E virus infection. *Nat. Rev. Dis. Primers.*

- 2017; 3: 17086. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.86>
5. Mikhailov M.I., Karlsen A.A., Potemkin I.A., Isaeva O.V., Kichatova V.S., Malinnikova E.Y., et al. Geographic and temporal variability of hepatitis E virus circulation in the Russian Federation. *Viruses*. 2022; 15(1): 37. <https://doi.org/10.3390/v15010037>
 6. Smith D.B., Izopet J., Nicot F., Simmonds P., Jameel S., Meng X.J., et al. Update: proposed reference sequences for subtypes of hepatitis E virus (species Orthohepevirus A). *J. Gen. Virol.* 2020; 101(7): 692–8. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001435>
 7. Nelson K.E., Labrique A.B., Kmush B.L. Epidemiology of genotype 1 and 2 hepatitis E virus infections. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2019; 9(6): a031732. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a031732>
 8. Pallerla S.R., Harms D., Johne R., Todt D., Steinmann E., Schemmerer M., et al. Hepatitis E virus infection: circulation, molecular epidemiology, and impact on global health. *Pathogens*. 2020; 9(10): 856. <https://doi.org/10.3390/pathogens9100856>
 9. Grange Z.L., Goldstein T., Johnson C.K., Anthony S., Gilardi K., Daszak P., et al. Ranking the risk of animal-to-human spillover for newly discovered viruses. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2021; 118(15): e2002324118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2002324118>
 10. Reuter G., Boros Á., Pankovics P. Review of hepatitis E virus in rats: evident risk of species Orthohepevirus C to human zoonotic infection and disease. *Viruses*. 2020; 12(10): 1148. <https://doi.org/10.3390/v12101148>
 11. Minuk G.Y., Sun A., Sun D.F., Uhanova J., Nicolle L.E., Larke B., et al. Serological evidence of hepatitis E virus infection in an indigenous North American population. *Can. J. Gastroenterol.* 2007; 21(7): 439–42. <https://doi.org/10.1155/2007/289059>
 12. Di Profio F., Sarchese V., Palombieri A., Fruci P., Lanave G., Robertto S., et al. Current knowledge of Hepatitis E Virus (HEV) epidemiology in ruminants. *Pathogens*. 2022; 11(10): 1124. <https://doi.org/10.3390/pathogens11101124>
 13. Lin J., Karlsson M., Olofson A.S., Belák S., Malmsten J., Dalin A.M., et al. High prevalence of hepatitis e virus in Swedish moose – a phylogenetic characterization and comparison of the virus from different regions. *PLoS One*. 2015; 10(4): e0122102. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122102>
 14. Weger S., Elkin B., Lindsay R., Bollinger T., Crichton V., Andonov A. Hepatitis E virus seroprevalence in free-ranging deer in Canada. *Transbound. Emerg. Dis.* 2017; 64(3): 1008–11. <https://doi.org/10.1111/tbed.12462>
 15. Sacristán C., Madslie K., Sacristán I., Klevar S., das Neves C.G. Seroprevalence of hepatitis E virus in moose (*Alces alces*), reindeer (*Rangifer tarandus*), red deer (*Cervus elaphus*), roe deer (*Capreolus capreolus*), and muskoxen (*Ovibos moschatus*) from Norway. *Viruses*. 2021; 13(2): 224. <https://doi.org/10.3390/v13020224>
 16. Rinaldo C.H., Nymo I.H., Sánchez Romano J., Breines E.M., Murguzur F.J.A., Tryland M. Serological evidence of hepatitis E virus infection in semi-domesticated Eurasian tundra reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*) in Norway. *Pathogens*. 2021; 10(12): 1542. <https://doi.org/10.3390/pathogens10121542>
 17. Slukina O.S., Kyuregyan K.K., Karlsen A.A., Potemkin I.A., Kichatova V.S., Semenov S.I., et al. Serological evidence of hepatitis E virus circulation among reindeer and reindeer herders. *Vector. Borne Zoonotic Dis.* 2021; 21(7): 546–51. <https://doi.org/10.1089/vbz.2020.2727>
 18. Kodani M., Kamili N.A., Tejada-Strop A., Poe A., Denniston M.M., Drobeniuc J., et al. Variability in the performance characteristics of IgG anti-HEV assays and its impact on reliability of seroprevalence rates of hepatitis E. *J. Med. Virol.* 2017; 89(6): 1055–61. <https://doi.org/10.1002/jmv.24741>
 19. Haqshenas G., Huang F.F., Fenaux M., Guenette D.K., Pierson F.W., Larsen C.T., et al. The putative capsid protein of the newly identified avian hepatitis E virus shares antigenic epitopes with that of swine and human hepatitis E viruses and chicken big liver and spleen disease virus. *J. Gen. Virol.* 2002; 83(Pt. 9): 2201–9. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-9-2201>
 20. Zhou X., Kataoka M., Liu Z., Takeda N., Wakita T., Li T.C. Characterization of self-assembled virus-like particles of dromedary camel hepatitis E virus generated by recombinant baculoviruses. *Virus Res.* 2015; 210: 8–17. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.06.022>
 21. Kubickova B., Schenk J.A., Ramm F., Markušienė K., Reetz J., Dremsek P., et al. A broadly cross-reactive monoclonal antibody against hepatitis E virus capsid antigen. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2021; 105(12): 4957–73. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11342-7>
 22. Sánchez Romano J., Omazic A., Leijon M., Hagström Å., Tryland M., Kantanen J., et al. Screening of Eurasian tundra reindeer for viral sequences by next-generation sequencing. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2021; 18(12): 6561. <https://doi.org/10.3390/ijerph18126561>
 23. Feng R., Zhao C., Li M., Harrison T.J., Qiao Z., Feng Y., et al. Infection dynamics of hepatitis E virus in naturally infected pigs in a Chinese farrow-to-finish farm. *Infect. Genet. Evol.* 2011; 11(7): 127–31. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.07.009>

Информация об авторах:

Кичатова Вера Сергеевна ✉ – канд. мед. наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии вирусных гепатитов ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора; научный сотрудник лаборатории вирусных гепатитов ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова; старший научный сотрудник отдела социально значимых вирусных инфекций ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: vera_kichatova@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-7838-6965>

Потемкин Илья Александрович – канд. мед. наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии вирусных гепатитов ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора; научный сотрудник лаборатории вирусных гепатитов ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова; старший научный сотрудник отдела социально значимых вирусных инфекций ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: axioma@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-7559-4219>

Асади Мобархан Федор Алиевич – научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии вирусных гепатитов ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора; младший научный сотрудник лаборатории вирусных гепатитов ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия. E-mail: 1amfa@bk.ru; <https://orcid.org/0000-0002-1838-8037>

Румянцева Татьяна Дмитриевна – ведущий научный сотрудник Научно-исследовательской части ФГБОУ ВО «Арктический государственный агротехнологический университет», Якутск, Россия. E-mail: tanya_rum@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-0997-5499>

Семенов Сергей Иннокентьевич – д-р мед. наук, ведущий научный сотрудник НИЦ Медицинского института ФГАОУ ВО СВФУ им. М.К. Аммосова, Якутск, Россия. E-mail: insemenov@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0001-8099-2270>

Кюрегян Карен Каренович – д-р биол. наук, профессор РАН, заведующий лабораторией молекулярной эпидемиологии вирусных гепатитов ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора; ведущий научный сотрудник лаборатории вирусных гепатитов ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия. E-mail: karen-kyuregyan@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-3599-117X>

Михайлов Михаил Иванович – д-р мед. наук, чл.-корр. РАН, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии вирусных гепатитов ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора; заведующий лабораторией вирусных гепатитов ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия. E-mail: michmich2@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-6636-6801>

Участие авторов: Кичатова В.С. – сбор и обработка биологического материала, анализ полученных результатов, оформление рисунков; Потемкин И.А. – постановка иммуноферментного анализа; Асади Мобархан Ф.А. – сбор и обработка биологического материала; Румянцева Т.Д. – сбор биологического материала; Семенов С.И. – сбор биологического материала; Кюрегян К.К. – дизайн исследования, анализ полученных результатов, написание рукописи; Михайлов М.И. – идея исследования, редактирование рукописи.

Поступила 09.11.2023

Принята в печать 21.12.2023

Опубликована 29.12.2023

Information about the authors:

Vera S. Kichatova ✉ – MD, PhD, Senior Research Fellow, Laboratory of Molecular Epidemiology of Viral Hepatitis of Central Research Institute of Epidemiology; Research Fellow, Laboratory of Viral Hepatitis of I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera; Senior Research Fellow, Laboratory of Socially Significant Viral Infections of Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Moscow, Russia. E-mail: vera_kichatova@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-7838-6965>

Ilya A. Potemkin – MD, PhD, Senior Research Fellow, Laboratory of Molecular Epidemiology of Viral Hepatitis of Central Research Institute of Epidemiology; Research Fellow, Laboratory of Viral Hepatitis of I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera; Senior Research Fellow, Laboratory of Socially Significant Viral Infections of Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Moscow, Russia. E-mail: axi0ma@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-7559-4219>

Fedor A. Asadi Mobarkhan – Research Fellow, Laboratory of Molecular Epidemiology of Viral Hepatitis of Central Research Institute of Epidemiology; Junior Research Fellow, Laboratory of Viral Hepatitis of I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia. E-mail: 1amfa@bk.ru; <https://orcid.org/0000-0002-1838-8037>

Tatyana D. Rumyantseva – Leading Researcher, Arctic State Agrotechnological University, Yakutsk, Russia. E-mail: tanya_rum@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-0997-5499>

Sergey I. Semenov – MD, PhD, Leading Researcher, Research Center of the NEFU Medical Institute of the Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education “North-Eastern Federal University named after M.K. Ammosov”, Yakutsk, Russia. E-mail: insemenov@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0001-8099-2270>

Karen K. Kyuregyan – Doctor of Biol. Sci., PhD, Professor of Russ. Acad. Sci., Head of Laboratory of Molecular Epidemiology of Viral Hepatitis of Central Research Institute of Epidemiology; Leading Research Fellow, Laboratory of Viral Hepatitis of I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia. E-mail: karen-kyuregyan@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-3599-117X>

Mikhail I. Mikhailov – MD, PhD, Corr. Member of Russ. Acad. Sci., Chief Research Fellow, Laboratory of Molecular Epidemiology of Viral Hepatitis of Central Research Institute of Epidemiology; Head of Laboratory of Viral Hepatitis of I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia. E-mail: michmich2@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-6636-6801>

Contribution: Kichatova V.S. – collection and processing of biological material, analysis of the results obtained, illustrations; Potemkin I.A. – performing enzyme immunoassay; Asadi Mobarkhan F.A. – collection and processing of biological material; Rumyantseva T.D. – collection of biological material; Semenov S.I. – collection of biological material; Kyuregyan K.K. – design of the study, analysis of the results obtained, writing the manuscript; Mikhailov M.I. – idea of the study, editing the manuscript.

Received 09 November 2023
Accepted 21 December 2023
Published 29 December 2023

Список статей, опубликованных в журнале «Вопросы вирусологии» в 2023 г.

ОБЗОРЫ

- Бобкова М.Р.** Клеточные белки – потенциальные мишени антиретровирусной терапии*. 6, 488–504
- Ковырина А.В., Сизикова Т.Е., Лебедев В.Н., Борисевич С.В., Должикова И.В., Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л.** Вакцины против болезни, вызванной вирусом Эбола: актуальные проблемы и перспективы. 5, 372–384
- Куц А.А., Иванов А.И.** Экзосомы в жизненном цикле вирусов и патогенезе вирусных инфекций. 3, 181–197
- Мищенко А.В., Мищенко В.А., Гулюкин М.И., Оганесян А.С., Алексеенкова С.В., Забережный А.Д., Гулюкин А.М.** Персистентная форма вирусной диареи крупно-рогатого скота. 6, 465–478
- Пономарева Н.В., Новикова Н.А.** Нейротропные энтеровирусы (Picornaviridae: *Enterovirus*): доминирующие типы, основы нейровирулентности*. 6, 479–487
- Рубальская Т.С., Ерохов Д.В., Жердева П.Е., Мамаева Т.А., Тихонова Н.Т.** Глобальное генетическое разнообразие вируса кори (Paramyxoviridae: *Morbillivirus: Morbillivirus hominis*): исторические аспекты и современное состояние*. 5, 361–371

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Adekola H.A., Ojo D.A., Balogun S.A., Dipeolu M.A., Mohammed M., Adejo D.S., Aliyu R.M., Abdullahi M.A., Madugu N.H.** Частота выявления IgM-антител к вирусу Зика у беременных женщин в Северной Нигерии. 2, 117–123
- Emami A., Pirbonveh N., Moattari A., Javanmardi F.** Генетическое разнообразие вируса гриппа В, циркулирующего в Иране в течение десятилетия (2010–2019 гг.): отличие от рекомендованных ВОЗ вакцинных штаммов. 5, 385–393
- Балде Т.А.Л., Останкова Ю.В., Бумбали С., Найденова Е.В., Зуева Е.Б., Серикова Е.Н., Валутите Д. Э., Щемелев А.Н., Давыденко В.С., Эсауленко Е.В., Тотолян Арег А.** Частота встречаемости мутаций лекарственной устойчивости и ускользания от иммунного ответа в геноме вируса гепатита В, выявленного у беременных в Гвинейской Республике. 3, 228–242
- Биятова 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. 4, 327–333
- 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, обнаруженного в Московской области.* 4, 283–290
- Бляхер М.С., Фёдорова И.М., Тульская Е.А., Капустин И.В., Котелева С.И., Рамазанова З.К., Одинцов Е.Е., Сандалова С.В., Новикова Л.И., Алешкин А.В., Бочкарева С.С.** Формирование и сохранение специфического Т-клеточного иммунитета после перенесённой SARS-CoV-2-инфекции или вакцинации против неё. 3, 205–214
- Власенко Н.В., Чанышев М.Д., Дубоделов Д.В., Серков А.А., Солопова Г.Г., Сацук А.В., Сницарь А.В., Семенов Т.А., Кузин С.Н., Акимкин В.Г.** Распределение частот аллелей полиморфизмов генов человека, связанных с вирусными инфекциями*. 5, 404–414
- Власова Н.Н., Черных О.Ю., Кривонос Р.А., Верховский О.А., Алипер Т.И., Аноятбекова А.М., Жуко-**

- ва Е.В., Кучерук О.Д., Южаков А.Г., Гулюкин М.И., Гулюкин А.М.** Адаптация вируса африканской чумы свиней к росту в перевиваемой культуре клеток ППК-666 методом ускоренного пассирования. 4, 334–342
- Гараев Т.М., Гребенникова Т.В., Авдеева В.В., Лебедева В.В., Ларичев В.Ф.** Противовирусные свойства синтетических производных гистидина, содержащих в своей молекуле мембранотропные объёмные карбоциклы, в отношении вируса SARS-CoV-2 *in vitro**. 1, 18–25
- Гладышева А.А., Гладышева А.В., Терновой В.А., Локтев В.Б.** Структурные мотивы и трёхмерные модели хеликазы (NS3) и РНК-зависимой РНК-полимеразы (NS5) многокомпонентного флавиподобного *Kindia tick virus* (unclassified Flaviviridae). 1, 7–17
- Джекебеков К.К., Асанжанова Н.Н., Нурпейсова А.С., Рыскельдинова Ш.Ж., Абсатова Ж.С., Абай Ж.С., Шаяхметов Е.А., Омуртай А.Д., Молдагулова С.У., Калимолда Э.Ж., Садикалиева С.О., Шораева К.А., Закарья К.Д.** Выбор эффективного режима инаktivации вируса *Pseudopestis avium* (Paramyxoviridae: *Orthoavulovirus: Avian orthoavulovirus 1*) для изготовления вакцины против болезни Ньюкасла. 2, 124–131
- Догадов Д.И., Кюрегян К.К., Гончаренко А.М., Миносян А.А., Кочконян А.А., Карлсен А.А., Вышемирский О.И., Карал-оглы Д.Д., Михайлов М.И.** Маркеры антропонозных вирусных инфекций у зеленых мартышек, поступивших из мест естественного обитания (Танзания)*. 5, 394–403
- Иванов П.А., Ляшко А.В., Кост В.Ю., Ломакина Н.Ф., Ртищев А.А., Бунькова Н.И., Тимофеева Т.А., Баланова М.А., Ионов С.А., Гориков Д.В., Маркушин С.Г.** Определение активности полимеразы холодоадаптированного вируса гриппа (Orthomyxoviridae: *Alphainfluenzavirus*) методом минигенома с флуоресцентным белком*. 6, 526–535
- Ивин Ю.Ю., Бутусова А.А., Гладнева Е.Е., Коломийцева Г.Я., Хапчаев Ю.Х., Ишмухаметов А.А.** Роль белков L и 2A вируса энцефаломиокардита 1 в ингибировании синтеза клеточных белков и накоплении вирусных белков при инфекции. 5, 428–444
- Кичатова В.С., Потемкин И.А., Асади Мобархан Ф.А., Румянцова Т.Д., Семенов С.И., Кюрегян К.К., Михайлов М.И.** Выявление антител к вирусу гепатита Е у домашних северных оленей (*Rangifer tarandus*) в Республике Саха (Якутия)*. 6, 549–556
- Костина Л.В., Филатов И.Е., Елисеева О.В., Латышев О.Е., Чернорыж Я.Ю., Юрлов К.И., Леснова Е.И., Хаметова К.М., Черепушкин С.А., Савочкина Т.А., Цибеков В.В., Крышень К.Л., Алексеева Л.И., Гребенникова Т.В.** Исследование безопасности и иммуногенности вакцины на основе VLP для профилактики ротавирусной инфекции на модели новорожденных карликовых свиней. 5, 415–428
- Кудров Г.А., Зайнутдинов С.С., Гражданцева А.А., Шиповалов А.В., Сиволобова Г.Ф., Семенова А.В., Меркульева Ю.А., Щербаков Д.Н., Таранов О.С., Зайковская А.В., Шульгина И.С., Пьянков О.В., Кочнева Г.В.** Интраназальная вакцина против COVID-19 на основе рекомбинантного варианта вируса Сендай (Paramyxoviridae: *Respirovirus*) штамма Москва. 3, 215–227
- Кузнецова А.И., Мунчак Я.М., Лебедев А.В., Туманов А.С., Ким К.В., Антонова А.А., Ожмегова Е.Н., Пронин А.Ю.,**

*Статьи опубликованы на русском и английском языках на сайте журнала: <https://virusjour.crie.ru>

*The article is published in Russian and English on the journal's website: <https://virusjour.crie.ru>

- Дробышевская Е.В., Казеннова Е.В., Бобкова М.Р. Генетическое разнообразие капсидного белка (p24) у вариантов вируса иммунодефицита первого типа (ВИЧ-1), циркулирующих в Российской Федерации. 1, 66–78
- Кузнецова Н.А., Огаркова Д.А., Гушин В.А., Антипьят Н.А., Бакалин В.В., Бургасова О.А., Васильченко Л.А., Дивисенко Е.В., Колобухина Л.В., Кружкова И.С., Никифорова М.А., Оджералов М.А., Самков А.А., Симаклова Я.В., Синявин А.Э., Ткачук А.П., Шидловская Е.В., Тюрин И.Н., Злобин В.И., Гинцбург А.Л. Оценка динамики выявления жизнеспособного SARS-CoV-2 (Coronaviridae: *Betacoronavirus: Sarbecovirus*) в биологических образцах, полученных от пациентов с COVID-19 в условиях стационара, как одного из показателей инфекционности вируса. 2, 105–116
- Леснова Е.И., Масалова О.В., Пермякова К.Ю., Демидова Н.А., Валуев-Эллистон В.Т., Иванов А.В., Куц А.А. Альтернативное действие агониста NOD1 и NOD2 полимера различается при иммунизации мышей разных инбредных линий неструктурными белками вируса гепатита С и синергетически усиливается в комбинации с агонистом TLR4 пирогеналом*. 4, 315–326
- Мухин А.Н., Алексеев К.П., Южаков А.Г., Селезнева Е.В., Москвина А.С., Верховский О.А., Алипер Т.И. Антигенная и иммуногенная активность вирусоподобных частиц на основе рекомбинантных главных капсидных белков вирусов геморрагической болезни кроликов (Caliciviridae: *Lagovirus*) генотипов G11, G12. 2, 132–141
- Назаренко А.С., Бирюкова Ю.К., Орлова Е.А., Трачук К.Н., Иванова А.Л., Белякова А.В., Пестов Н.Б., Воронич М.Ф., Ишмухаметов А.А., Колясников Н.М. Исследование онколитического потенциала вакцинных штаммов вирусов желтой лихорадки и клещевого энцефалита в отношении клеточных линий глиобластомы и карциномы поджелудочной железы. 6, 536–548
- Николаева Л.И., Стучинская М.Д., Дедова А.В., Шевченко Н.Г., Хлопова И.Н., Кружкова И.С., Меркулова Л.Н., Кистенева Л.Б., Колобухина Л.В., Мукашева Е.А., Краснослободцев К.Г., Трушакова С.В., Крепкая А.С., Куприянов В.В., Никитенко Н.А., Хадорич Е.А., Бурмистров Е.М., Тюрин И.Н., Антипьят Н.А., Буцева Е.И. Ассоциация полиморфных вариантов генов системы гемостаза с течением COVID-19. 5, 445–453
- Николаева Ю.В., Галочкина А.В., Штро А.А., Бернс С.А. Активность интерферона гамма человеческого рекомбинантного *in vitro* в отношении вируса SARS-CoV-2. 1, 26–36
- Пашков Е.А., Момот В.Ю., Пак А.В., Самойликов Р.В., Пашков Г.А., Усатова Г.Н., Кравцова Е.О., Поддубинова А.В., Нагиева Ф.Г., Сидоров А.В., Пашков Е.П., Свитич О.А., Зверев В.В. Влияние комплексов мРНК на репродукцию вируса гриппа А (Orthomyxoviridae: *Alphainfluenzavirus*) *in vivo*. 2, 95–104
- Полещук Е.М., Тагакова Д.Н., Сидоров Г.Н., Орлова Т.С., Гордейко Н.С., Кайсаров А.Ж. Случаи летальной лиссавирусной инфекции у человека после контактов с рукокрылыми на Дальнем Востоке России в 2019–2021 гг.* 1, 45–58
- Пчельников А.В., Яцентюк С.П., Красникова М.С. Изучение циркуляции вирусов герпеса крупного рогатого скота 1-го типа (Herpesviridae: *Varicellovirus*) и диареи крупного рогатого скота (Flaviviridae: *Pestivirus*) среди диких парнокопытных животных Московской области. 2, 142–151
- Роев Г.В., Борисова Н.И., Чистякова Н.В., Выходцева А.В., Акимкин В.Г., Хафизов К.Ф. Бастровирусы (Astroviridae): открытие, разнообразие и потенциальное влияние на здоровье человека и животных*. 6, 505–512
- Рубальская Т.С., Ерохов Д.В., Жердева П.Е., Милихина А.В., Гаджиева А.А., Тихонова Н.Т. Генотипирование вируса эпидемического паротита (Paramyxoviridae: *Orthorubulavirus: Mumps orthorubulavirus*) как элемент лабораторного подтверждения инфекции. 1, 59–65
- Светлова Е.В., Балацкая Н.В., Саакян С.В., Жаров А.А., Кричевская Г.И., Свирина И.В., Измайлова Н.С., Мякошина Е.Б. Частота инфицированности опухоли, жидкостных сред глаза и специфический гуморальный иммунитет к герпесвирусам у пациентов с увеальной меланомой. 1, 37–44
- 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: *Gammaherpesvirinae: Limfokriptovirus*) и другие маркеры вируса у больных раком носоглотки в двух этнически и географически отличающихся регионах России. 4, 291–301
- Смоляков Ю.Н., Кузник Б.И., Фефелова Е.В., Казанцева Л.С., Шаповалов Ю.К., Лукьянчук М.С., Лукьянов С.А., Шаповалов К.Г. Предиктивная роль эритроцитов в оценке исходов COVID-19. 3, 198–204
- 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 берцоу угля на культуре клеток Vero в отношении вируса экстремелии. 4, 277–282
- Туысканова М.С., Жугунисов К.Д., Ozaslan M., Мырзахметова Б.Ш., Кутумбетов Л.Б. Клинические симптомы/признаки у хомяков при экспериментальном заражении вирусом SARS-CoV-2 (Coronaviridae: *Betacoronavirus*). 6, 513–525
- Филатов И.Е., Цибезов В.В., Баландина М.В., Норкина С.Н., Латышев О.Е., Елисеева О.В., Черепушкин С.А., Верховский О.А., Гребенникова Т.В. Использование вирусоподобных частиц на основе рекомбинантных вирусных белков VP2/VP6 ротавируса А для оценки гуморального иммунного ответа методом ИФА. 2, 161–171
- Шиповалов А.В., Кудров Г.А., Карташов М.Ю., Драчкова И.А., Пьянков О.В., Омигов В.В., Таранов О.С., Теплякова Т.В. Противовирусная активность водного экстракта базидиального гриба *Inonotus obliquus* в отношении вируса SARS-CoV-2 (Coronaviridae: *Betacoronavirus: Sarbecovirus*) в экспериментах *in vivo* на мышах линии BALB/c. 2, 152–160
- 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 ASF/Tatarstan 20/WB-12276. 4, 302–314
- Яшина Л.Н., Иванов Л.И., Компанец Г.Г., Здановская Н.И., Карташов М.Ю. Хантавирусы (Hantaviridae: *Orthohantavirus*), циркулирующие среди насекомых на Дальнем Востоке России. 1, 79–85

ДИСКУССИЯ

Соломай Т.В., Семенов Т.А., Акимкин В.Г. Особенности саморегуляции эпидемического процесса инфекции, вызванной вирусом Эпштейна–Барр (Herpesviridae: *Lymphocryptovirus*, HHV-4)*. 4, 343–354

В ПОМОЩЬ ВИРУСОЛОГУ

Асатрян М.Н., Тимофеев Б.И., Шмыр И.С., Хачатрян К.Р., Щербинин Д.Н., Тимофеева Т.А., Герасимук Э.Р., Агасарян В.Г., Ершов И.Ф., Шашкова Т.И., Иванисенко Н.В., Кардымон О.Л., Семенов Т.А., Народицкий Б.С., Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л. Математическая модель для оценки уровня перекрестного иммунитета между штаммами вируса гриппа подтипа H₃N₂. 3, 252–264

Ушкаленко Н.Д., Ерш А.В., Филатов П.В., Полтавченко А.Г. Ускоренный метод иммуноферментного анализа для выявления ортопоксвирусов. 3, 242–251

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Карташов М.Ю., Свиринов К.А., Бекболотов А., Момушева К., Исканова Б., Солпуева А., Моторов У., Нарматова Е., Кривошеина Е.И., Гладышева А.В., Чуб Е.В., Гашникова Н.М. Анализ мутаций резистентности среди изолятов вируса гепатита С, циркулирующих в Кыргызстане. 3, 265–270

ЮБИЛЕЙНЫЕ ДАТЫ

К 90-летию Н.В. Каверина. 5, 454

Памяти выдающегося вирусолога. Юбилей Михаила Семеновича Балаяна. 2, 173–174

К 80-летию В.И. Злобина. 1, 86–87

НЕКРОЛОГИ

Наталья Николаевна Беседнова. 5, 455–456

Николай Николаевич Носик. 2, 172

Святослав Георгиевич Чешик. 1, 88

ИНФОРМАЦИЯ

Список статей, опубликованных в журнале «Вопросы вирусологии» в 2023 г. 6, 557–561

Выход книги History of Arbovirology: Memories from the Field. 5, 457

Обновленные наукометрические показатели журнала «Вопросы вирусологии». 5, 458

Index of articles published in the journal «Problems of Virology» in 2023

REVIEWS

Bobkova M.R. Cellular proteins as potential targets for antiretroviral therapy*. 6, 488–504

Kovyrshina A.V., Sizikova T.E., Lebedev V.N., Borisevich S.V., Dolzhikova I.V., Logunov D.Y., Gintsburg A.L. Vaccines to prevent Ebola virus disease: current challenges and perspectives. 5, 372–384

Kushch A.A., Ivanov A.V. Exosomes in the life cycle of viruses and the pathogenesis of viral infections. 3, 181–197

Mishchenko A.V., Mishchenko V.A., Gulyukin M.I., Oganeyan A.S., Alexeyenkova S.V., Zaberezhny A.D., Gulyukin A.M. Persistent form of bovine viral diarrhea. 6, 465–478

Ponomareva N.V., Novikova N.A. Neurotropic enteroviruses (Picornaviridae: *Enterovirus*): predominant of types, basis of neurovirulence*. 6, 479–487

Rubalskaia T.S., Erokhov D.V., Zherdeva P.E., Mamaeva T.A., Tikhonova N.T. Global genetic diversity of measles virus (Paramyxoviridae: *Morbillivirus: Morbillivirus hominis*): historical aspects and current state*. 5, 361–371

ORIGINAL RESEARCHES

Adekola H.A., Ojo D.A., Balogun S.A., Dipeolu M.A., Mohammed M., Adejo D.S., Aliyu R.M., Abdullahi M.A., Madugu N.H. The prevalence of IGM antibodies to Zika virus in pregnant women in Northern Nigeria. 2, 117–123

Balde T.A.L., Ostankova Yu.V., Boumbaly S., Naidenova E.V., Zueva E.B., Serikova E.N., Valutite D.E., Shchemelev A.N., Davydenko V.S., Esaulenko E.V., Totolian Areg A. Frequency of drug resistance and immune escape mutations in the hepatitis B virus genome detected in pregnant women in the Republic of Guinea. 3, 228–242

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. 4, 327–333

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 identified in the Moscow region*. 4, 283–290

Blyakher M.S., Fedorova I.M., Tulskaia E.A., Kapustin I.V., Koteleva S.I., Ramazanova Z.K., Odintsov E.E., Sandalova S.V., Novikova L.I., Aleshkin A.V., Bochkareva S.S. Formation and maintenance of T-cell immune against SARS-CoV-2 in the disease or vaccination. 3, 205–214

Dogadov D.I., Kyuregyan K.K., Goncharenko A.M., Minosyan A.A., Kochkonyan A.A., Karlsen A.A., Vyshemirsky O.I., Karal-Ogly D.D., Mikhailov M.I. Markers of antro-

ponotic viral infections in vernet monkeys arrived from their natural habitat (Tanzania)*. 5, 394–403

Emami A., Pirbonyeh N., Moattari A., Javanmardi F. A decade genetic diversity in Circulating Flu B virus in Iran (2010–2019): Divergence from WHO-recommended vaccine strains. 5, 385–393

Filatov I.E., Tsibezov V.V., Balandina M.V., Norkina S.N., Latyshev O.E., Eliseeva O.V., Cherepushkin S.A., Verkhovskiy O.A., Grebennikova T.V. The utilization of rotavirus A recombinant VP2/VP6 based virus-like particles for evaluation of humoral immune response in ELISA. 2, 161–171

Garaev T.M., Grebennikova T.V., Avdeeva V.V., Lebedeva V.V., Larichev V.F. Antiviral properties of synthetic histidine derivatives containing membranotropic volumetrical carbocycles in their molecule against SARS-CoV-2 virus *in vitro**. 1, 18–25

Gladysheva A.A., Gladysheva A.V., Ternovoi V.A., Loktev V.B. Structural Motifs and Spatial Structures of Helicase (NS3) and RNA-dependent RNA-polymerase (NS5) of the Multicomponent Flavi-like Kindia tick virus (unclassified *Flaviviridae*). 1, 7–17

Ivanov P.A., Lyashko A.V., Kost V.Yu., Lomakina N.F., Rtishchev A.A., Bunkova N.I., Timofeeva T.A., Balanova M.A., Ionov S.A., Gorikov D.V., Markushin S.G. Determination of cold-adapted influenza virus (Orthomyxoviridae: *Alphainfluenzavirus*) polymerase activity by the minigenome method with a fluorescent protein*. 6, 526–535

Ivin Y.Y., Butusova A.A., Gladneva E.E., Kolomijtseva G.Ya., Khapchaev Y.K., Ishmukhametov A.A. The role of the encephalomyocarditis virus type 1 proteins L and 2A in the inhibition of the synthesis of cellular proteins and the accumulation of viral proteins during infection. 5, 428–444

Jekebekov K.K., Assanzhanova N.N., Nurpeisova A.S., Ryskeldinova Sh.Zh., Absatova Zh.S., Abay Zh.S., Shakhmetov Ye.A., Omurtay A.D., Moldagulova S.U., Kalimolda E.Zh., Sadikalieva S.O., Shorayeva K.A., Zakarya K.D. Selection of conditions for effective inactivation of Pseudopestis avium virus (Paramyxoviridae: *Orthoavulovirus: Avian orthoavulovirus 1*) for the production of a Newcastle disease vaccine. 2, 124–131

Kichatova V.S., Potemkin I.A., Asadi Mobarkhan F.A., Romyantseva N.D., Semenov S.I., Kyuregyan K.K., Mikhailov M.I. Detection of antibodies to the hepatitis E virus in domestic reindeer (*Rangifer tarandus*) in the Republic of Sakha (Yakutia)*. 6, 549–556

Kostina L.V., Filatov I.E., Eliseeva O.V., Latyshev O.E., Chernoryzh Ya.Yu., Yurlov K.I., Lesnova E.I., Khametova K.M., Cherepushkin S.A., Savochkina T.E., Tsibezov V.V., Kryshen K.L., Alekseeva L.I., Grebennikova T.V. Study of the safety and immunogenicity of VLP-based vaccine for the prevention of rotavirus infection in neonatal minipig model. 5, 415–428

- Kudrov G.A., Zainutdinov S.S., Grazhdantseva A.A., Shipovalov A.V., Sivolobova G.F., Semenova A.V., Merkuleva I.A., Shcherbakov D.N., Taranov O.S., Zaykovskaya A.V., Shulgina I.S., Pyankov O.V., Kochneva G.V. Intranasal vaccine against COVID-19 based on a recombinant variant of the Sendai virus (Paramyxoviridae: Respirovirus) strain Moscow. 3, 215–227
- Kuznetsova A.I., Munchak I.A., Lebedev A.V., Tumanov A.S., Kim K.V., Antonova A.A., Ozhmegova E.N., Pronin A.Yu., Drobyshevskaya E.V., Kazennova E.V., Bobkova M.R. Genetic diversity of capsid protein (p24) in human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) variants circulating in the Russian Federation. 1, 66–78
- Kuznetsova N.A., Ogarkova D.A., Gushchin V.A., Antipyat N.A., Bacalin V.V., Burgasova O.A., Vasilchenko L.A., Divisenko E.V., Kolobukhina L.V., Kruzhkova I.S., Nikiforova M.A., Odnoralov M.A., Samkov A.A., Simakova Ya.V., Siniavin A.E., Tkachuk A.P., Shidlovskaya E.V., Tyurin I.N., Zlobin V.I., Gintsburg A.L. Evaluation of the dynamics of detection of viable SARS-CoV-2 (Coronaviridae: *Betacoronavirus: Sarbecovirus*) in biological samples obtained from patients with COVID-19 in a health care setting, as one of the indicators of the infectivity of the virus. 2, 105–116
- 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 proteins and is synergistically enhanced when administered in combination with pyrogenalium, a TLR4 agonist. 4, 315–326
- Mukhin A.N., Alekseev K.P., Yuzhakov A.G., Selezneva E.V., Moskvina A.S., Verkhovsky O.A., Aliper T.I. Antigenic and immunogenic activity of virus-like particles based on rabbit hemorrhagic disease virus (Caliciviridae: *Lagovirus*) genotypes G11 and G12 recombinant major capsid proteins. 2, 132–141
- Nazarenko A.S., Biryukova Y.K., Orlova E.A., Trachuk K.N., Ivanova A.L., Belyakova A.V., Pestov N.B., Vorovitch M.F., Ishmukhametov A.A., Kolyasnikova N.M. Investigation of oncolytic potential of vaccine strains of yellow fever and tick-borne encephalitis viruses against glioblastoma and pancreatic carcinoma cell lines. 6, 536–548
- Nikolaeva L.I., Stuchinskaya M.D., Dedova A.V., Shevchenko N.G., Khlopova I.N., Kruzhkova I.S., Merkulova L.N., Kisteneva L.B., Kolobukhina L.V., Mukasheva E.A., Krasnoslobodtsev K.G., Trushakova S.V., Krepkaya A.S., Kuprianov V.V., Nikitenko N.A., Hadorich E.A., Burmistrov E.M., Tyurin I.N., Antipyat N.A., Burtseva E.I. Association of polymorphic variants of hemostatic system genes with the course of COVID-19. 5, 445–453
- Nikolaeva Yu.V., Galochkina A.V., Shtro A.A., Berns S.A. *In vitro* activity of human recombinant interferon gamma against the SARS-CoV-2 virus. 1, 26–36
- Pashkov E.A., Momot V.Yu., Pak A.V., Samoilkov R.V., Pashkov G.A., Usatova G.N., Kravtsova E.O., Poddubikov A.V., Nagieva F.G., Sidorov A.V., Pashkov E.P., Svitich O.A., Zverev V.V. Influence of siRNA complexes on the reproduction of influenza A virus (Orthomyxoviridae: *Alphainfluenzavirus*) *in vivo*. 2, 95–104
- Pchel'nikov A.V., Yatsentyuk S.P., Krasnikova M.S. Circulation of bovine herpesvirus type 1 (Herpesviridae: Varicellovirus) and bovine viral diarrhea virus (Flaviviridae: Pestivirus) among wild artiodactyls of the Moscow region. 2, 142–151
- Poleshchuk E.M., Tagakova D.N., Sidorov G.N., Orlova T.S., Gordeiko N.S., Kaisarov A.Zh. Lethal cases of lyssavirus encephalitis after contact with bats in the Russian Far East in 2019–2021*. 1, 45–58
- Roev G.V., Borisova N.I., Chistyakova N.V., Vyhodtseva A.V., Akimkin V.G., Khafizov K.F. Bastroviruses (Astroviridae): genetic diversity and potential impact on human and animal health*. 6, 505–512
- Rubalskaia T.S., Erokhov D.V., Zherdeva P.E., Milikhina A.V., Gadzhieva A.A., Tikhonova N.T. Mumps virus (Paramyxoviridae: *Orthorubulavirus: Mumps orthorubulavirus*) genotyping as a component of laboratory confirmation of infection. 1, 59–65
- Shipovalov A.V., Kudrov G.A., Kartashov M.Y., Drachkova I.A., Pyankov O.V., Omigov V.V., Taranov O.S., Teplyakova T.V. Antiviral activity of basidial fungus *Inonotus obliquus* aqueous extract against SARS-CoV-2 virus (Coronaviridae: *Betacoronavirus: Sarbecovirus*) *in vivo* in BALB/c mice model. 2, 152–160
- 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 isolate ASF/Tatarstan 20/WB-12276. 4, 302–314
- Smirnova K.V., Lubenskaya A.K., Senyuta N.B., Dushenkin T.E., Gurtsevitch V.E. Epstein-Barr virus (Herpesviridae: *Gammaherpesvirinae: Limfokriptovirus*) types 1 and 2 and other viral markers in nasopharyngeal carcinoma patients in two geographically and ethnically different regions of Russia. 4, 291–301
- Smolyakov Yu.N., Kuznik B.I., Fefelova E.V., Kazantseva L.S., Shapovalov Yu.K., Lukyanchuk M.S., Lukyanov S.A., Shapovalov K.G. Predictive role of erythrocytes in assessment of COVID-19 outcomes. 3, 198–204
- Svetlova E.V., Balatskaya N.V., Saakyan S.V., Zharov A.A., Krichevskaya G.I., Svirina I.V., Izmailova N.S., Myakoshina E.B. The incidence of infection in tumor and eye fluid system, and specific humoral immunity to herpes viruses in patients with uveal melanoma. 1, 37–44
- 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. 4, 277–282
- Tuyskanova M.S., Zhugunissof K.D., Ozaslan M., Myrzakhmetova B.Sh., Kutumbetov L.B. Clinical symptoms/signs in hamsters during experimental infection with the SARS-CoV-2 virus (Coronaviridae: *Betacoronavirus*). 6, 513–525
- Vlasenko N.V., Chany'shev M.D., Dubodelov D.V., Serkov A.A., Solopova G.G., Saczuk A.V., Sniczar' A.V., Semenenko T.A., Kuzin S.N., Akimkin V.G. Distribution of human gene polymorphisms allele frequencies associated with viral infections*. 5, 404–414
- 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 to growth in the continuous culture PPK-66b cells by the method of accelerated passaging. 4, 334–342
- Yashina L.N., Ivanov L.I., Kompanets G.G., Zdanovskaya N.I., Kartashov M.Yu. Shrew-borne hantaviruses (Hantaviridae: *Orthohantavirus*) in the Far East of Russia. 1, 79–85

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*)*. 4, 343–354

TO HELP THE VIROLOGIST

Asatryan M.N., Timofeev B.I., Shmyr I.S., Khachatryan K.R., Shcherbinin D.N., Timofeeva T.A., Gerasimuk E.R., Agasaryan V.G., Ershov I.F., Shashkova T.I., Ivanisenko N.V., Kardymon O.L., Semenenko T.A., Naroditsky B.S., Logunov D.Yu., Gintsburg A.L. Mathematical model for assessing the level of cross-immunity between strains of influenza virus subtype H₃N₂. 3, 252–264

Ushkalenko N.D., Ersh A.V., Filatov P.V., Poltavchenko A.G.
The rapid ELISA method for detection of orthopoxviruses. 3,
242–251

SHORT COMMUNICATIONS

**Kartashov M.Yu., Svirin K.A., Bekbolotov A., Momusheva K.,
Iskanova B., Solpueva A., Motorov U., Narmatova E., Kri-
vosheina E.I., Gladysheva A.V., Chub E.V., Gashnikova
N.M.** Analysis of resistance-associated substitutions resis-
tance analysis in hepatitis C virus sequences from Kyrgyz-
stan. 3, 265–270

ANNIVERSARY DATES

To the 90th anniversary of N.V. Kaverin. 5, 454
In memory of an outstanding virologist. Anniversary of M.S. Ba-
layan. 2, 173–174

To the 80th anniversary of Vladimir I. Zlobin. 1, 173–174

OBITUARY

Natalia N. Besednova. 5, 455–456
Nikolai N. Nosik. 2, 172
Sviatoslav G. Cheshik. 1, 88

INFORMATION

Index of articles published in the journal «Problems of Virology»
in 2023. 6, 557–561
Release of the book «History of Arbovirology: Memories from the
Field». 5, 457
Updated scientometric indicators of the journal «Problems of Vi-
rology». 5, 458

Problems
of Virology

Voprosy
Virusologii