



Д.И.ИВАНОВСКИЙ

ВОПРОСЫ ВИРУСОЛОГИИ

PROBLEMS OF VIROLOGY

2

Том 69 • 2024

Volume 69 • Issue 2 • 2024

Издатель:
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
www.crie.ru

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

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

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

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

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

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

1.5.10 Вирусология (медицинские и биологические науки)

3.2.2 Эпидемиология (медицинские и биологические науки)

3.1.22 Инфекционные болезни (медицинские и биологические науки)

3.3.6 Фармакология, клиническая фармакология (медицинские и биологические науки)

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

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

1.5.10 Virology (medical and biological sciences)

3.2.2 Epidemiology (medical and biological sciences)

3.1.22 Infectious diseases (medical and biological sciences)

3.3.6 Pharmacology, clinical pharmacology (medical and biological sciences)

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

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

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

Журнал открытого доступа,
не берущий плату за публикации.

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

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

Полные тексты статей журнала
доступны на сайтах:

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

ИЗДАТЕЛЬ:

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

РЕДАКЦИЯ:

Редакция расположена по адресу
Издателя

E-mail: vopr.virusol@crie.ru

Начальник редакционно-
издательского отдела:
Осокина Ольга Владимировна

Заведующая редакцией:
Неверова Анна Леонидовна

Редакция не несёт ответственности за
содержание рекламных материалов.

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

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

Подписано в печать 30.04.2023.
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, 2024

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.

2

Том 69 · 2024

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)

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

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

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

Иванов А.И. (Хабаровск, Россия)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Нетёсов 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)

Яшкуллов 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, MSc;
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 Str.,
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 Str.,
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 April 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, 2024

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

2

Volume 69 · 2024

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, 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

РЕДАКЦИОННАЯ КОНЦЕПЦИЯ

Жирнов О.П., Львов Д.К.

Птичий грипп: «По ком звонит колокол»?* 101

ОБЗОРЫ

Попадюк Е.Е., Сизикова Т.Е., Хмелев А.Л., Тимофеев М.А., Лебедев В.Н., Борисевич С.В.

Применение иммуноглобулинов и моноклональных антител в отношении COVID-19 119

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ioukou P.J., Voumba A.L.M., Pouki F.S., Massengo N.R.B., Takale R.P., Moukassa D., Ennaji M.M.Профилирование экспрессии генов *p53* и *c-myc* у HTLV-1-инфицированных доноров крови в Конго* 127**Юрлов К.И., Якушина С.А., Федорова Н.Е., Кистенева Л.Б., Келли Е.И., Каниболоцкий А.А.,
Ивкин Е.Н., Антипят Н.А., Тюрин И.Н., Ларичев В.Ф., Демидова Н.А., Леснова Е.И.,
Климова Р.Р., Масалова О.В., Куц А.А.**Обнаружение и высокое содержание ДНК герпесвирусов (*Orthoherpesviridae*)
в аутопсийных материалах пациентов с летальным исходом COVID-19* 134**Карташов М.Ю., Кривошеина Е.И., Курушина В.Ю., Мошкин А.Б., Ханхареев С.С., Биче-оол Ч.Р.,
Пелёвина О.Н., Попов Н.В., Богомазова О.Л., Терновой В.А.**Встречаемость и генетическое разнообразие вируса Алонгшан (*Flaviviridae*), выявленного в клещах
на юге Восточной Сибири 151**Краснов Я.М., Найденова Е.В., Гусева Н.П., Полунина Т.А., Шарапова Н.А., Соседова Е.А.,
Котова Н.В., Захаров К.С., Казанцев А.В., Доманина И.В., Чекашов В.Н., Шилов М.М.,
Кондратьев Е.Н., Осина Н.А., Кутырев В.В.**Филогенетический анализ вариантов генома вируса Пуумала (*Hantaviridae: Orthohantavirus*),
выделенных на территории Саратовской области* 162**Латышев О.Е., Зайкова О.Н., Елисеева О.В., Савочкина Т.Е., Чернорыж Я.Ю., Сыроешкин А.В.,
Петров Г.В., Воркунова Г.К., Ларичев В.Ф., Федякина И.Т., Черепушкин С.А., Цибецов В.В.,
Южакова К.А., Куликова Н.Ю., Лебедева В.В., Якунин Д.Ю., Козлова А.А., Баранец М.С.,
Юрлов К.И., Леснова Е.И., Гребенникова Т.В.**Разработка, получение и характеристика вирусоподобных частиц SARS-CoV-2
(*Coronaviridae: Orthocoronavirinae: Betacoronavirus: Sarbecovirus*)* 175

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Jalil M.B., Mohammed Ali M.N., Alabadi H.I.Серопревалентность вируса простого герпеса 1-го типа (*Herpesviridae: Simplexvirus:*
Human alphaherpesvirus 1) у курильщиков* 187

ЮБИЛЕЙНЫЕ ДАТЫ

К юбилею Жданова 193

ИНФОРМАЦИЯ

Календарь событий Центрального научно-исследовательского
института эпидемиологии Роспотребнадзора 195

CONTENTS

EDITORIAL

Zhirnov O.P., Lvov D.K.

Avian flu: «For whom the bell tolls»?* 101

REVIEWS

Popadyuk E.E., Sizikova T.E., Khmelev A.L., Timofeev M.A., Lebedev V.N., Borisevich S.V.

The use of immunoglobulins and monoclonal antibodies against COVID-19 119

ORIGINAL RESEARCHES

Iloukou P.J., Boumba A.L.M., Pouki F.S., Massengo N.R.B., Takale R.P., Moukassa D., Ennaji M.M.Gene expression profiling of *p53* and *c-myc* in HTLV-1 positive blood donors in Congo* 127**Yurlov K.I., Yakushina S.A., Fedorova N.E., Kisteneva L.B., Kelly E.I., Kanibolotsky A.A., Ivkin Ye.N., Antipiat N.A., Turin I.N., Larichev V.F., Demidova N.A., Lesnova E.I., Klimova R.R., Masalova O.V., Kushch A.A.**Detection rates and high concentration of herpesvirus (*Orthoherpesviridae*) DNA in autopsy materials from patients COVID-19 fatal outcome 134**Kartashov M.Yu., Krivosheina E.I., Kurushina V.Yu., Moshkin A.B., Khankhareev S.S., Biche-ool C.R., Pelevina O.N., Popov N.V., Bogomazova O.L., Ternovoi V.A.**Prevalence and genetic diversity of the Alongshan virus (*Flaviviridae*) circulating in ticks in the south of Eastern Siberia 151**Krasnov Ya.M., Naidenova E.V., Guseva N.P., Polunina T.A., Sharapova N.A., Sosedova E.A., Kotova N.V., Zakharov K.S., Kazantsev A.V., Domanina I.V., Chekashov V.N., Shilov M.M., Kondratiev E.N., Osina N.A., Kuttyrev V.V.**Phylogenetic analysis of the genome variants of the Puumala virus (*Hantaviridae: Orthohantavirus*) isolated in the Saratov region* 162**Latyshev O.E., Zaykova O.N., Eliseeva O.V., Savochkina T.E., Chernoryzh Ya.Yu., Syroeshkin A.V., Petrov G.V., Vorkunova G.K., Larichev V.F., Fediakina I.T., Cherepushkin S.A., Tsibezov V.V., Yuzhakova K.A., Kulikova N.Y., Lebedeva V.V., Yakunin D.Yu., Kozlova A.A., Baranets M.S., Yurlov K.I., Lesnova E.I., Grebennikova T.V.**Development, production and characterization of SARS-CoV-2 virus-like particles (*Coronaviridae: Orthocoronavirinae: Betacoronavirus: Sarbecovirus*)* 175

SHORT COMMUNICATIONS

Jalil M.B., Mohammed Ali M.N., Alabadi H.I.Seroprevalence of Herpes simplex virus type 1 (*Herpesviridae: Simplexvirus: Human alphaherpesvirus 1*) in smokers* 187

ANNIVERSARY DATES

To the anniversary of Zhdanov 193

INFORMATION

Calendar of events of the Central Research Institute for Epidemiology of the Federal Service for Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing 195

*The article is published in Russian and English on the journal's website: <https://virusjour.crie.ru>

РЕДАКЦИОННАЯ КОНЦЕПЦИЯ



НАУЧНЫЙ ОБЗОР

DOI: <https://doi.org/10.36233/10.36233/0507-4088-213>

© ЖИРНОВ О.П., ЛЬВОВ Д.К., 2024

Птичий грипп: «По ком звонит колокол»?

Жирнов О.П.^{1,2✉}, Львов Д.К.¹¹Институт вирусологии имени Д.И. Ивановского ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи», Минздрава России, 123098, г. Москва, Россия;²Русско-немецкая академия медико-социальных и биотехнологических наук, Инновационный центр Сколково, 109029, г. Москва, Россия

Резюме

Семейство *Orthomyxoviridae* состоит из 9 родов, включая *Alphainfluenza viruses*, куда входят вирусы гриппа птиц. У двух субтипов – H5 и H7 – помимо обычных низковирулентных штаммов описана особая разновидность высоковирулентного вируса птиц, способного вызывать заболеваемость у птиц с летальностью выше 60%. Эти и ряд других разновидностей вируса гриппа, тесно связанных с птицами, принято обозначать термином «птичий вирус гриппа». Различие высоко- (HPAI) и низковирулентных (LPAI) вирусов гриппа обусловлено структурой аргининсодержащего сайта протеолитической активации в белке HA. Вирус высоковирулентного птичьего гриппа H5 выявлен около 100 лет назад и на протяжении этого времени вызывает эпизоотии среди диких и домашних птиц, и лишь несколько локальных эпизодов болезни зарегистрированы среди людей с начала XXI в. В последние годы зафиксирован резкий подъем заболеваемости птиц высоковирулентным вирусом H5N1 (клайд h2.3.4.4b) на всех континентах планеты, сопровождающийся переходом вируса на разные виды млекопитающих. Регистрируемая глобальная смертность среди домашних и сельскохозяйственных птиц от данного субтипа приближается к уровню 1 млрд особей. Опасным эпидемиологическим фактором становятся участвовавшие вспышки птичьего гриппа с высокой летальностью среди млекопитающих, в частности морских львов и тюленей в Северной и Южной Америке, норки и пушных зверей в Испании и Финляндии, домашних и уличных кошек в Польше. Изолированные от млекопитающих штаммы птичьего гриппа H5N1 клайда h2.3.4.4b имеют признаки частичной адаптации к организму человека в генах *PB2*, *NP*, *HA*, *NA*, играющих главную роль в регуляции аэрозольной трансмиссии и круга хозяев вируса. Создавшаяся ситуация представляет реальную угрозу преадаптации вируса в организме млекопитающих как промежуточных хозяев с последующим переходом преадаптированного вируса в популяцию людей и формированием пандемии с катастрофическими последствиями.

Ключевые слова: ортомиксовирусы; грипп птиц; вирулентность; круг хозяев; пандемия; популяционный генофонд вирусов

Для цитирования: Жирнов О.П., Львов Д.К. Птичий грипп: «По ком звонит колокол»? *Вопросы вирусологии*. 2024; 69(2): 101–118. DOI: <https://doi.org/10.36233/10.36233/0507-4088-213> EDN: <https://elibrary.ru/gtekdx>

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.

*Фраза «По ком звонит колокол» заимствована из романа Эрнеста Хемингуэя, имеющего в английском оригинале название «*For whom the bell tolls*».

Примечание: Работа была представлена на международном конгрессе «Молекулярная диагностика и биобезопасность – 2024» (Москва, 16–17 апреля 2024 г.); Жирнов О.П., Львов Д.К. Угроза пандемии птичьего гриппа: механизмы формирования популяционного генофонда вируса. Сборник тезисов под ред. акад. РАН В.Г. Акимкина, М., 2024, стр. 69–70.

REVIEW

DOI: <https://doi.org/10.36233/10.36233/0507-4088-213>

Avian flu: «For whom the bell tolls?»*

Oleg P. Zhirnov^{1,2} ✉, Dmitry K. Lvov¹¹The D.I. Ivaovsky Institute of Virology, The N.F. Gamaleya Research Center of Epidemiology and Microbiology, The Russian Ministry of Health, 123098, Moscow Russia;²The Russian-German Academy of Medical-Social and Biotechnological Sciences, Skolkovo Innovation Center, 109029, Moscow, Russia**Abstract**

The family *Orthomyxoviridae* consists of 9 genera, including *Alphainfluenza virus*, which contains avian influenza viruses. In two subtypes H5 and H7 besides common low-virulent strains, a specific type of highly virulent avian virus have been described to cause more than 60% mortality among domestic birds. These variants of influenza virus are usually referred to as «avian influenza virus». The difference between high (HPAI) and low (LPAI) virulent influenza viruses is due to the structure of the arginine-containing proteolytic activation site in the hemagglutinin (HA) protein. The highly virulent avian influenza virus H5 was identified more than 100 years ago and during this time they cause outbreaks among wild and domestic birds on all continents and only a few local episodes of the disease in humans have been identified in XXI century. Currently, a sharp increase in the incidence of highly virulent virus of the H5N1 subtype (clade h2.3.4.4b) has been registered in birds on all continents, accompanied by the transmission of the virus to various species of mammals. The recorded global mortality rate among wild, domestic and agricultural birds from H5 subtype is approaching to the level of 1 billion cases. A dangerous epidemic factor is becoming more frequent outbreaks of avian influenza with high mortality among mammals, in particular seals and marine lions in North and South America, minks and fur-bearing animals in Spain and Finland, domestic and street cats in Poland. H5N1 avian influenza clade h2.3.4.4b strains isolated from mammals have genetic signatures of partial adaptation to the human body in the *PB2*, *NP*, *HA*, *NA* genes, which play a major role in regulating the aerosol transmission and the host range of the virus. The current situation poses a real threat of pre-adaptation of the virus in mammals as intermediate hosts, followed by the transition of the pre-adapted virus into the human population with catastrophic consequences.

Keywords: *orthomyxoviridae*; *avian influenza*; *virulence*; *host range*; *virus pandemic*; *populational gene pools***For citation:** Zhirnov O.P., Lvov D.K. Avian flu: «For whom the bell tolls»? *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2024; 69(2): 101–118. DOI: <https://doi.org/10.36233/10.36233/0507-4088-213> EDN: <https://elibrary.ru/gtekdX>**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.

Рост связанных с гриппом птиц неблагоприятных и угрожающих событий в мире определяет необходимость вновь вернуться к обсуждению данной проблемы.

Общая характеристика семейства *Orthomyxoviridae*

Семейство *Orthomyxoviridae* согласно современной классификации подразделяется на 9 родов: *Alpha-*, *Beta-*, *Delta-*, *Gamma-*, *Thogoto-*, *Quaranta-*, *Mycis-*, *Sardino-* и *Isainfluenza viruses* (табл. 1) [1]. В *Orthomyxoviridae* входят вирусы, имеющие наружную липопротеидную оболочку (оболочечные вирусы), одноцепочечную РНК негативной полярности в форме 7 или 8 сегментов (у разных родов), кодирующих до 16 уникальных белков [2]. Ортомиксовирусы имеют широкий ареал на планете во всех трех средах (водной, воздушной и на земле) и обладают тропиз-

мом к широкому кругу организмов – членистоногих, рыб, птиц и млекопитающих, включая человека (табл. 1) [3]. В популяциях птиц – основного природного резервуара вирусов гриппа А, инфицирование протекает фекально-оральным путем.

Особенностью ортомиксовирусов является их высокая изменчивость, которая обусловлена функциональными свойствами вирусной РНК-полимеразы и сегментированной структурой вирусного генома. Вирусная РНК-полимераза обеспечивает синтез и репликацию вирусного генома, которые она осуществляет с большим количеством случайных ошибок, составляющим около одной мутации на 10^4 нуклеотидов генома за одно прочтение. Для сравнения отметим, что ДНК-зависимая РНК-полимераза II человека допускает ошибочность в одну мутацию лишь при полимеризации 10^8 нуклеотидов в моле-

*The original phrase «For Whom the Bell Tolls» is a title of the novel by Ernest Hemingway.

Note: The work was presented at the international Congress «Molecular Diagnostics and Biosafety – 2024» (Moscow, April 16–17, 2024): Zhirnov O.P., Lvov D.K. Threat of an avian influenza pandemic: formation mechanisms of the population gene pool of the virus. Congress theses, edited by Academician of the Russian Academy of Sciences V.G. Akimkin, Moscow, 2024, pp. 69–70.

Таблица 1. Классификация семейства *Orthomyxoviridae*Table 1. Classification of the family *Orthomyxoviridae*

Номер рода вирусов Virus genus number	Наименование рода Genus name	Спектр хозяев вируса Host spectrum of the virus
1.	Genus: Alphainfluenzavirus (Flu A)	Птицы/Birds (Aves), Человек/Human (Homo sapiens), Млекопитающие/Mammals (Mammalia)
2.	Genus: Betainfluenzavirus (Flu B)	
3.	Genus: Deltainfluenzavirus (Flu C)	
4.	Genus: Gammainfluenzavirus (Flu D)	
5.	Genus: Thogotovirus	Членистоногие/Arthropods (Arthropoda): Клещи иксодовые/Ticks (Ixodidae), Клещи аргасовые/Argasid mites (Argasidae)
6.	Genus: Quarantivirus	
7.	Genus Mykissvirus	Рыбы/Fishes (Ichthya)
8.	Genus: Sardinivirus	
9.	Genus: Isavirus	

Примечание. Классификация семейства *Orthomyxoviridae* в соответствии с рекомендациями ICTV-2022 [1].

Note. Classification of the family *Orthomyxoviridae* in accordance with the recommendations of ICTV-2022 [1].

куле синтезированной матричной РНК (мРНК) [4]. Высокая ошибочность вирусной полимеразы порождает высокую изменчивость вируса и образование большого количества вирусных вариантов, так называемых вирусных квазивидов, в вирусном потомстве. Генетическое разнообразие вирусной популяции позволяет вирусу реализовать транстаксонный переход к новому хозяину. Данный механизм постепенного накопления мутаций адапционного характера получил название «вирусного дрейфа». Важно отметить, что в основе дрейфа лежит двоякий механизм, регулирующий, во-первых, приспособление вируса к факторам организма-хозяина и, во-вторых, ускользание от его иммунного ответа. В результате взаимодействия на молекулярно-генетическом уровне популяций вируса и хозяина происходит формирование популяционного генофонда вируса [5]. Период его формирования составляет миллионы лет, на протяжении которых вирус тесно взаимодействует с элементами биосферы в меняющихся условиях обитания.

Второй механизм, обеспечивающий высокую природную вариабельность ортомиксовирусов, заключается в обмене (реассортации) сегментов геномной РНК между вирусами, адаптированными к разным видам животных [6, 7]. Скрещивание таких вирусных вариантов-адаптантов лежит в основе явления «генетического шифта», ведущего к появлению кардинально новых вирусных реассортантов и уникальных антигенных и функциональных разновидностей вируса гриппа, имеющих потенциал транстаксонного перехода вируса с одного вида макроорганизма на другой и смены круга хозяев и формирования новых пандемических вариантов.

Два уровня вирулентности вирусов гриппа А (род *Alphainfluenzavirus*)

Высокая изменчивость вируса гриппа А обуславливает формирование богатого популяционного генофонда и распространение в природе широкого спектра вирусных вариантов, обладающих выраженным разнообразием вирулентных и антигенных свойств [8–10]. Род *Alphainfluenzavirus* (вирусы гриппа А)

состоит из 18 антигенных субтипов гемагглютинина (НА), имеющих нумерацию Н1–Н18, и 11 субтипов белка нейраминидазы (НА), имеющих нумерацию N1–N11. Согласно такой нумерации в названии варианта (штамма) вирусов гриппа указывают антигенный субтип НА и NA [11–13].

Среди 18 известных субтипов рода *Alphavirus* особое место занимают вирусы субтипов Н5 и Н7. Популяции данных вирусных субтипов состоят из двух биологических видов вирусов, обладающих низкой (LPAI) и высокой (HPAI) вирулентностью для макроорганизмов-хозяев [13, 14]. Вирусы с низкой вирулентностью вызывают локальный инфекционный процесс, как правило, респираторного или кишечного трактов хозяина, часто без клинически выраженных симптомов, с уровнем популяционной смертности не более 1% [15]. Высоковирулентные вирусы субтипов Н5 и Н7, получившие первоначальное историческое название в конце XIX столетия «куриная чума» или «куриный тиф», вызывают у большинства чувствительных животных, как правило домашних и сельскохозяйственных (с/х) видов, массивную вирусемию, обуславливая диссеминацию вируса в организме с развитием генерализованной (пантропной) формы инфекции с высокой летальностью, близкой к 100% [16]. В популяциях птиц, являющихся основным природным резервуаром вируса гриппа А, инфицирование происходит фекально-оральным путем. Биологическая система «вирус гриппа А – птицы», вероятно, функционирует в биосфере более 100 млн лет – с мелового периода мезозойской эры [5]. Кроме того, птицы являются ареной рекомбинантных процессов в результате межпопуляционных контактов, возникающих в периоды миграции, особенно в миграционных хабах, где скапливаются в огромных количествах популяции птиц из разных районов ареала [17–20]. Среди птиц главными резервентами вирусов гриппа А в природе служат виды отряда гусеобразных (*Anseriformes*), семейства утиных (*Anatidae*), отряда ржанкообразных (*Charadriiformes*), семейства куликов (*Scolopatiidae*), чайковых (*Laridae*) и др. В природе вирусы гриппа А изолированы от более 100 видов птиц (12 отрядов, 25 семейств, более 50 родов)

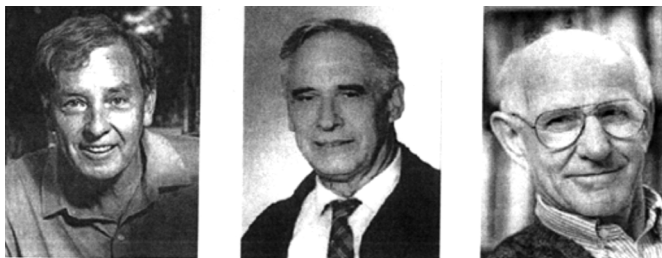


Рис. 1. Основоположники концепции природной очаговости вируса гриппа А (Orthomyxoviridae: *Influenza A virus*).

На фото слева направо: Грэм Лавер (Австралия), Дмитрий Львов (СССР), Роберт Вебстер (США) [8, 22, 26, 27].

Fig. 1. Founders of the concept of natural focality of the *Influenza A virus* (Orthomyxoviridae: *Influenza A virus*).

Pictured from left to right: Graham Laver (Australia), Dmitry Lvov (USSR), Robert Webster (USA) [8, 22, 26, 27].

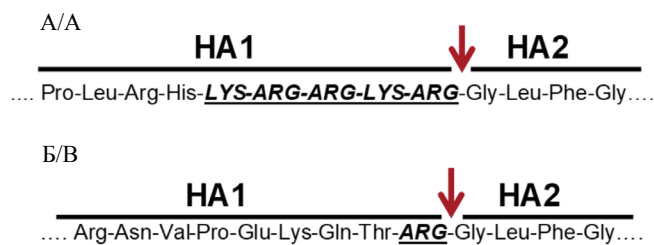


Рис. 2. Структура сайта протеолитической активации белка гемагглютинаина (HA) вирусов гриппа А.

Показан участок белка HA в зоне соединения субъединиц HA1 (55 кДа) и HA2 (20 кДа), формирующихся после расщепления молекулы-предшественника HA0 (75 кДа). Слабопатогенные вирусы субтипов H1–H18 содержат единственный остаток аргинина (Arg) (панель А), тогда как у высокопатогенных субтипов H5 и H7 в участке протеолиза присутствуют несколько остатков аргинина и лизина (Lys), так называемый полиаргининовый сайт протеолиза (панель Б). Полиаргининовый сайт имеет высокую чувствительность к широкому спектру клеточных протеаз и легко расщепляется в подавляющем большинстве типов клеток-мишеней [16, 33, 35–37].

Fig. 2. Structure of the proteolytic activation site of the influenza A virus hemagglutinin (HA) protein.

The HA protein site in the junction zone of HA1 (55 kDa) and HA2 (20 kDa) subunits formed after cleavage of the precursor molecule, HA0 (75 kDa), is shown. Low pathogenic viruses of subtypes H1–H18 contain a single arginine (Arg) residue (panel A), whereas highly pathogenic subtypes H5 and H7 have several arginine and lysine (Lys) residues present in the proteolysis site, the so-called polyarginine site of proteolysis (panel B). The polyarginine site is highly sensitive to a wide range of cellular proteases and is readily cleaved in the vast majority of target cell types [16, 33, 35–37].

[5, 21–23]. Первый высоковирулентный вирус гриппа субтипа H5 был изолирован в Шотландии в 1959 г. от цыплят – штамм A/chicken/Scotland/1959 (H5N1) [24], затем в ЮАР в период эпизоотии среди мигрирующих арктических крачек *Sterna macrura* – штамм A/tern/South Africa/61 (H5N3) [25]. В 70-х годах сформировалась концепция о природной очаговости вируса гриппа А (рис. 1) [5, 8, 18, 21, 22, 26–29]. Следует иметь в виду, что птицы являются главным носителем и резервуаром в природе высоковирулентной разновидности представителей субтипа H5N1 рода *Alphainfluenza-virus* [28].

Молекулярную основу кардинального различия вирулентных свойств вируса гриппа А определяет структура участка (т.н. протеолитического сайта) вирусного гемагглютинаина HA0 (м.м. 75 кДа), в котором происходит протеолитическое разрезание на две субъединицы: HA1 (55 кДа) и HA2 (20 кДа), сохраняющие после разрезания между собой дисульфидную связь (рис. 2). Такое расщепление белка вирусного гемагглютинаина активирует его функцию слияния липидных мембран (функция образования симпластов), делает вирион инфекционным и способным заражать новые клетки-мишени [30–33]. Феномен усиления вирулентности вируса гриппа посредством протеолиза HA0 на HA1+HA2 получил название протеолитической активации вируса [33, 34].

У вирусов с низкой вирулентностью протеолитический сайт HA состоит из одного остатка аргинина (Arg) – так называемый «моноаргининовый сайт», тогда как у высоковирулентных вирусов гриппа он состоит из нескольких остатков аргинина и, возможно, лизина (Lys) – так называемый «полиаргининовый сайт». Разрезание моноаргининового HA0 осуществляется трипсиноподобными протеазами и, как правило, происходит посттрансляционно на клеточной плазматической мембране при выходе вириона из инфицированной клетки. Эффективность такого расщепления в инфицированных клетках составляла около 30–40% молекул синтезированного белка HA0 [35, 36]. У высоковирулентных вирусов субтипов H5 и H7 расщепление HA0→HA1+HA2 происходит уже внутри инфицированных клеток котрансляционно в процессе синтеза молекулы HA0, и вирус выходит из клетки в инфекционной форме с расщепленным белком HA1+HA2. Разрезание HA0 таких вирусов осуществляется внутриклеточными убиквитарными протеазами фуринового ряда на мембранах аппарата Гольджи с высокой эффективностью, близкой к 100% молекул HA0 [37]. В результате интенсивного протеолиза HA0→HA1+HA2 синтезированные высоковирулентные вирусы легко проходят через межклеточные контакты и базальные мембраны в первичном инфекционном очаге респираторного и/или кишечного трактов, проникают в кровяное русло и вызывают генерализованную пантропную инфекцию макроорганизма [16, 33]. Низковирулентные вирусы с моноаргининовым сайтом в белке HA0 в силу расщепления только части молекул в инфицированной клетке и не столь эффективной активации инфекционности и фузионных свойств вирионов обладают низкой способностью преодоления защитных клеточных барьеров в организме-хозяине. Как правило, такие вирусные штаммы, к которым относятся низковирулентные вирусы гриппа птиц и сезонного гриппа людей, индуцируют локальный патологический процесс в первичном органе и не вызывают полиорганную диссеминацию вируса и генерализованную форму инфекционного процесса в пораженном организме [33, 37–39].

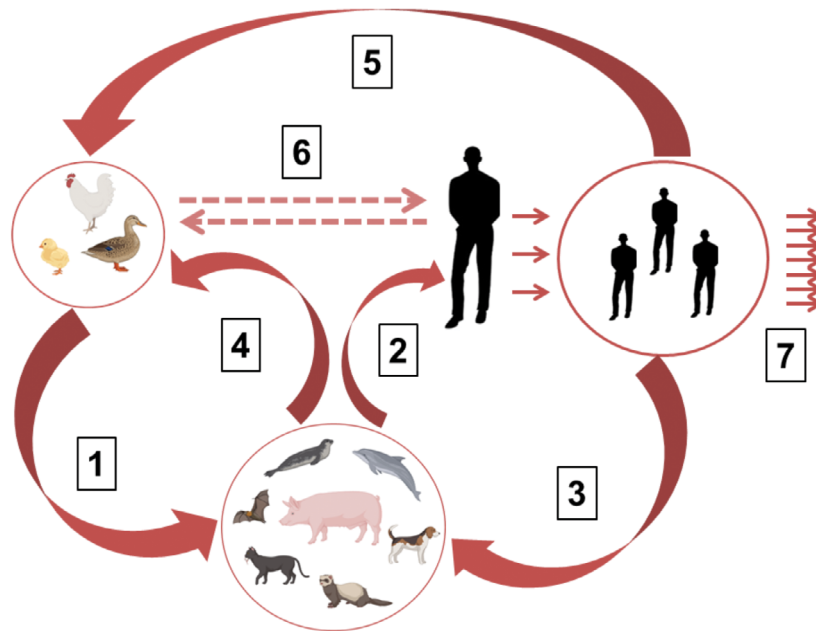


Рис. 3. Этапы адаптации вируса птичьего гриппа H5N1 и возникновения пандемического варианта вируса.

Птичий вирус гриппа H5N1 способен непосредственно переходить на человека (прямой путь передачи) или опосредованно – сначала на млекопитающих животных, таких как свиньи, пушные звери, хищные звери, тюлени и др., с последующим переходом на людей (непрямой путь передачи). В организме человека и млекопитающих животных птичий вирус претерпевает частичную адаптацию к организму человека посредством адаптационных мутаций либо реассортацией сегментов вирусной геномной РНК между вирусами гриппа птиц и человека. Частично адаптированный к человеку вирус птичьего гриппа H5N1 может возвращаться в популяцию птиц и животных и формировать природный резервуар перманентной потенциальной угрозы возникновения эпидемического вируса высокопатогенного вируса человека субтипов H5 и H7. Обозначения: 1 – первичная адаптация вируса гриппа к человеку (мутации в генах *NP*, *PB2*, *HA*, *NA* и др.); 2 – частичная адаптация вируса к человеку; 3 – поддержание межвидовой передачи вируса в биосфере; 4 – передача вируса от млекопитающих птицам; 5 – поддержание межвидовой передачи в биосфере; 6 – прямой путь передачи инфекции от птиц к человеку и обратно; 7 – развитие эпидемического процесса.

Fig. 3. Adaptation stages of the H5N1 avian influenza virus and the emergence of a pandemic variant of the human influenza plague virus.

The H5N1 avian influenza virus can be transmitted directly to humans (direct transmission route) or indirectly, first to mammals such as pigs, fur-bearing animals, animals of prey, seals, etc., followed by an indirect transmission route to humans). In the human body (with direct transmission) and mammals, the avian virus undergoes partial adaptation to the human body through adaptive mutations or reassortation of viral genomic RNA segments between avian and human influenza viruses. The H5N1 avian influenza virus, partially adapted to humans, can return to the population of birds and mammals and form a natural reservoir of a permanent potential threat of the emergence of highly pathogenic epidemic virus (HPAV) subtypes H5 and H7 and its subsequent return to the human population. Designations: 1 – Initial adaptation of influenza virus to humans (mutations in the *NP*, *PB2*, *HA*, *NA* genes and others); 2 – Partial adaptation of virus to human; 3 – Maintenance of interspecies virus transmissions in biosphere; 4 – Virus transmission from mammals to birds; 5 – Maintenance of interspecies transmissions in biosphere; 6 – Direct transmission way from birds to humans and back; 7 – Development of epidemic process.

Факторы, регулирующие круг хозяев вируса

Важной особенностью вируса гриппа А является его свойство поражать широкий круг животных, включая птиц (основной природный резервуар вируса гриппа А) и человека (рис. 3). Вирус гриппа, будучи облигатным паразитом по отношению к клетке хозяина, взаимодействует с клеточными факторами и имеет для этой цели структурные паттерны в вирусных белках, так называемые генетические штампы (genetic signatures). Для успешного размножения эти структурные домены (штампы) должны быть конкордатными клеткам определенного вида хозяина. При смене хозяина вирусу необходимо эти паттерны изменить и адаптировать к новому виду хозяина.

В процессе репликации вируса гриппа А можно выделить 7 основных точек (стадий) взаимодействия с аппаратом клетки-хозяина:

1) стадия адсорбции вируса на клеточных рецепторах, которая регулируется вирусными рецепторными белками HA и NA;

2) стадия внутриклеточных эндосом, в которой происходит рН-зависимое «раздевание» вируса расщепленным белком NA1+NA2.

3) стадия транспорта вирусного нуклеокапсида (вирусного рибонуклеопротеида, РНП) в ядро через ядерные поры в ядерной мембране клеток;

4) внутриядерная стадия синтеза вирусспецифических РНК: транскрипции и репликации вирусного генома;

5) стадия ядерного экспорта вирусных компонентов в цитоплазму инфицированных клеток;

6) транспорт (экспорт) вирусных белков и субвирусных структур РНП к плазматической клеточной мембране;

7) сборка вирусных частиц и отпочкование зрелых вирионов от клетки.

В перечисленных стадиях участвуют различные вирусные белки, которые регулируют взаимодействие с клеткой, дающей в результате новое вирусное потомство, и обуславливают развитие инфекционного процесса в пораженном организме [38].

Таблица 2. Сравнение аминокислотных паттернов белка NP у вирусов гриппа А, изолированных от млекопитающих и птиц

Table 2. Comparison of amino acid patterns of NP protein in influenza A viruses isolated from mammals and birds

Субтип и происхождение вируса (вид штампа) ¹ Subtype and origin of the virus (type of signature) ¹	Номера позиций аминокислот в генетическом штампе белка NP ² Numbers of amino acid positions in the genetic signature of the NP protein ²															Совпадения позиций в штампе NP вируса человека, % Matching positions in the human virus NP signature, %	Совпадения позиций в штампе NP вируса птиц, % Matching positions in the avian virus NP signature, %
	16	33	61	100	109	214	283	293	305	313	357	372	422	442	455		
H1N1 человека (классический) H1N1 human (classic)	D	I	L	V	V	K	P	K	K	Y	K	D	K	A	E	100	0
H5N1 норки H1N1 minks	G/D ³	I	I	R	V	R	L	R	R	F	Q	E	R	T	D	13	87
H5N1 птичий H5N1 avian	G	V	I	R	I	R	L	R	R	F	Q	E	R	T	D	0	100

Примечание. ¹ – первичные последовательности белка NP взяты из баз данных GenBank и GISAID по 10–15 штаммов для каждой группы; ² – нумерация позиций аминокислот начинается с N-концевого метионина в молекуле белка NP (70 кДа; общая протяженность 498 аминокислот); ³ – отмеченная позиция имеет гетерогенность в вирусных популяциях, в которых аминокислота D обнаруживается в 10–20% вирусных изолятов.

Note. ¹ – primary NP protein sequences were taken from GenBank and GISAID databases with 10–15 strains for each group; ² – the numbering of amino acid positions begins with the N-terminal methionine in the NP protein molecule (70 kDa; the total sequence of 498 amino acids); ³ – the marked position has heterogeneity in viral populations, in which the amino acid D is identified in 10–20% of viral isolates.

В регуляцию тропизма и контагиозности вируса к хозяину наиболее ощутимый вклад вносят белки NP, PB2, NA (табл. 2). Основной белок вирусного нуклеокапсида NP играет главную роль в преодолении врожденного иммунитета хозяина, обусловленного фактором Mx [40]. Белок NP вирусов гриппа птиц распознается ядерным фактором Mx человека, который связывает вирусный нуклеокапсид в полимерные комплексы и останавливает размножение вируса [41]. Напротив, NP вирусов человека не распознается человеческим фактором Mx; вирус ускользает от иммунного ответа человека и успешно поддерживает свою репликацию в его организме. Помимо распознавания фактора Mx, роль белка NP в регуляции круга хозяев обусловлена его взаимодействием с клеточными ядерными факторами ANP32A и ANP32B, участвующими во внутриядерном процессе ацетилирования гистонов и цитоплазматического транспорта эспированных вирусных мРНК, а также в блокировании антивирусного митохондриального белка MAVS [42–45]; альфа-импортином, регулирующим транспорт вирусного РНП через ядерную пору в инфицированной клетке [46, 47]; клеточным фактором UAP56, участвующим в сплайсинге ядерных РНК [48]. Генетические штампы белка NP вирусов человека включают ключевые аминокислоты в позициях: 16/D; 33/I; 61/L; 100/I/V; 109/V; 214/K; 283/P; 293/K; 305/K; 313/Y; 357/K; 357/K; 372/D; 422/K; 442/A; 455/E; тогда как у птичьих вирусов гриппа этот аминокислотный штамп имеет явные отличия (табл. 3) [49–54]. Следовательно, в случае перехода птичьих вирусов гриппа от птиц к человеку аминокислотный штамп должен измениться и иметь алгоритм человека для преодоления барьера Mx и успешной репликации вирусного генома в клеточном ядре.

В кооперации с белком NP функционирует полимеразный белок PB2 (табл. 3). У данного белка PB2

для адаптации к организму человека и эффективного синтеза вирусных РНК важные позиции аминокислот T271A, E627K, D701N, которые отличаются у птичьих вирусов гриппа [42]. Замены аминокислот в этих позициях у вирусов птиц повышают сродство к клеточным факторам человека, что приводит к усилению репликации таких вирусных вариантов при инфекции человека [54, 55]. Точками взаимодействия с факторами хозяина у белков NP и PB2 при выполнении своих вирусспецифических функций синтеза РНК служат стадии внутриядерной репликации генома вируса (см. выше описанные стадии 3–5).

Вторую важнейшую группу факторов адаптации к хозяину составляет тандем наружных рецепторных белков NA и NA вируса гриппа. Данные белки обуславливают устойчивость и распространение вируса во внешней среде и определяют специфичность распознавания рецепторов на поверхности эпителия на начальной стадии инфекции при инфицировании хозяина, а также клеточных гликопротеидов в зоне почкования на заключительном этапе сборки вновь синтезированных вирионов на поверхности инфицированных клеток. Данные белки функционируют в кооперации [56, 57], и существует реципрокный баланс их функций, играющий важную роль при адаптации вируса к хозяину [58, 59].

У вирусов гриппа птиц рецепторная и ферментативная гликозидазная функции белков NA и NA реализуются предпочтительно через взаимодействие с гликопротеидными рецепторами с типом связи α2-3 терминальных остатков сиаловой кислоты (СК) с остатком галактозы, которыми обогащены респираторный и кишечный тракт большинства птиц. У вирусов человека белковый тандем NA–NA имеет преимущественный аффинитет к гликопротеидам с терминальным остатком СК, связанным с галактозой связью α2-6 [60]. В такой рецепторной специализации

Таблица 3. Мутации, контролирующие круг хозяев вируса гриппа H5N1**Table 3.** Mutations that control the host range of the H5N1 influenza virus

Вирусный ген/белок Viral gene/protein	Функции вирусного белка, определяющие связь с хозяином Viral protein functions that determine association with the host	Мутации, ведущие к адаптации у млекопитающих Mutations leading to adaptation in mammals
NP	Преодолевает фактор MxA врожденного иммунитета человека Регулирует внутриядерный транспорт вирусного РНП через поры клеточного ядра Взаимодействует с ядерной РНК-хеликазой UAP56, участвующей в сплайсинге и транспорте внутриядерных про-мРНК, а также блокирует антивирусный митохондриальный белок MAVS, взаимодействует с клеточными каспазами, факторами TRIM4, TRIF3, Rab11a, eEF1D и др. Overcomes the MxA factor of human innate immunity Regulates the intranuclear transport of viral RNP through the pores of the cell nucleus Interacts with nuclear RNA helicase UAP56, which is involved in the splicing and transport of intranuclear pro-mRNAs, and also blocks the antiviral mitochondrial protein MAVS, interacts with cellular caspases, factors TRIM4, TRIF3, Rab11a, eEF1D, etc.	16/D; 33/I; 61/L; 100/I/V; 109/V; 214/K; 283/P; 293/K; 305/K; 313/Y; 357/K; 357/K; 372/D; 422/K; 442/A; 455/E
PB2	Распознает и гидролизует «экспонированные» клеточные мРНК при транскрипции вирусного генома в ядре клеток Взаимодействие с ядерными факторами ANP32A и ANP32B человека Recognizes and hydrolyzes “capped” cellular mRNAs during transcription of the viral genome in the cell nucleus Interacts with human nuclear factors ANP32A and ANP32B	271/A; 526/K 590/S; 627/K; 701/N
HA	Определяет адсорбцию на SA рецепторах 2–6-го типа клеток человека Формирует функциональный комплекс с вирусным белком NA специфического гидролиза остатков SA 2–6-го типа связи на поверхностных рецепторах клеток хозяина Регулирует контагиозность вируса Determines adsorption on SA receptors of human cell types 2–6 Forms a functional complex with the viral protein NA for the specific hydrolysis of SA residues of type 2–6 bonds on the surface receptors of host cells Regulates the contagiousness of the virus	137/A; 155/T; 160/A; 190/D; 193/R; 225/D; 226/L; 228/S
NA	Распознает и гидролизует остатки SA с типом связи α 2-6 на клеточных рецепторах и в муцине респираторного секрета Участвует в регуляции контагиозности вируса Recognizes and hydrolyzes SA residues with the α 2-6 bond type on cellular receptors and in respiratory mucin Participates in the regulation of virus contagiousness	Отсутствие делеции в ножке и 2-го рецепторного центра в NA/ No deletion in the stalk and the lack of a 2 nd receptor center in the NA; Мутации/Mutations: 46/D; 74/S; 151/D; 163/L; 204/M; 369/I; 396/M; 420/G

Примечание. Описание мутаций и соответствующие ссылки на публикации приведены в тексте статьи.

Note. Description of mutations and corresponding links to publications are given in the text of the article.

ции для организма человека ключевыми позициями в генетических штампах для вирусов субтипа H5 могут служить аминокислоты: 137/Ala, 155/Thr, 163/Ala, 190/Asp, 193/Arg, 225/Asp, 226/Leu, 228/Ser в белке HA [61, 62]. В белке NA птичьих вирусов важными аминокислотными позициями для адаптации к организму млекопитающих могут быть 46/Asp; 74/Ser; 151/Asp; 163/Leu; 204/Met; 369/Ile; 396/Met; 420/Gly [63, 64]. Дополнительно в молекуле NA вирусов гриппа птиц H5N1 идентифицирован характерный второй сайт рецепции сиаловых остатков α 2-3 (так называемый второй центр гемадсорбции), тогда как у вирусов гриппа человека такой сайт отсутствовал, что специфически усиливало аффинитет NA к рецепторам типа α 2-6 [65]. У вирусов H5N1, изолированных от норок в 2022 г., указанный центр в полноценном виде не обнаруживался, что сближало эти изоляты с вирусами человека и повышало их аффинитет к сиалорецепторам типа α 2-6 [66]. Дополнительным сайтом усиления эпидемического потенциала для человека у птичьих вирусов H5N1 может служить делеция в гене NA и укорочение ножки NA, что часто обнаруживалось как у птичьих вирусов H5N1, изолированных от чело-

века [67, 68], так и у пандемических вирусов гриппа человека [69, 70].

Отмеченные структурные и функциональные изменения в белках NP, PB2, HA, NA являются наиболее значимыми для адаптации и перехода вирусов H5 и H7 от птиц к человеку. Вместе с тем адаптивные изменения при смене хозяина могут отмечаться в других вирусных белках, таких как PB1, PA, PA-X, NS1, NEP, M1 и др. [71–76], которые можно рассматривать как дополнительные экстрагенные кофакторы, обеспечивающие смену вирусного хозяина наряду с описанными выше главными регуляторами круга хозяев вируса.

В заключении раздела следует отметить, что описанные адаптивные мутации генов вируса гриппа птиц необходимы для формирования двух главных фенотипических признаков пандемического вируса людей: (1) свойство поддерживать высокий уровень размножения возникшего нового вирусного штамма в организме человека и (2) сохранение высокой воздушно-капельной контагиозности вируса в человеческой популяции после его перехода от птиц человеку. Формирование данных признаков вируса и его эпиде-

мического потенциала для популяции людей контролируется главным образом 4 основными вирусными белками: NP, PB2, HA и NA.

Возможные пути перехода высоковирулентных вирусов H5 и H7 от птиц человеку

Возможны 2 пути перехода высоковирулентных вирусов гриппа от птиц к человеку (рис. 3). Первый путь – это прямая передача от птиц непосредственно человеку. Второй возможный путь – передача вируса через промежуточного хозяина, которым может быть организм млекопитающего.

Первый путь представляется затруднительным, поскольку еще неадаптированный птичий вирус должен приспособиться к новому организму – человеку, приобретая необходимые адаптационные мутации непосредственно в ходе самого процесса смены хозяина. Имеющиеся наблюдения нескольких эпизодов эпидемических вспышек высокопатогенного птичьего гриппа H5N1 и H7N9 согласуются с данным положением. Такие вспышки, произошедшие в Китае (1997), Гонконге (2005), Китае (2017) и ряде других районов мира, вызванные прямым вирусным заражением человека от птиц, носили локальный характер и не имели эпидемического развития [39]. Неадаптированный птичий вирус не обладал достаточной контагиозностью для людей и не вызывал процесса аэрозольной передачи инфекции от человека к человеку.

Второй возможный путь передачи вирусов субти-

пов H5 и H7 может проходить через промежуточных хозяев – популяцию млекопитающих, как правило, связанных с птицами цепочкой «хищник–жертва». В этом промежуточном организме, более близком генетически человеку, птичий вирус приобретет адаптацию к критическим механизмам организма-хозяина. Такая начальная преадаптация в организме млекопитающих может подготовить птичий вирус и значительно облегчить его переход в популяцию людей и дать начало формированию высоковирулентного гриппозного вируса субтипов H5 и H7. Важно отметить, что формирование в организме млекопитающих преадаптированного к человеку аппарата внутренних белков вируса (NP, PB2, PB1, M1, NS1), отвечающих за репликацию вируса, может дать начало не только эпидемии высоковирулентного вируса субтипов H5 и/или H7, но и способствовать возникновению нового антигенного типа эпидемии у людей, вызванной низковирулентными вирусами данных субтипов.

Предпосылки появления пандемии вирусов гриппа А

Эпидемическая ситуация последних 2–3 лет характеризуется резким ростом заболеваемости птиц и млекопитающих в природе и сельском хозяйстве высокопатогенным штаммом вируса гриппа H5N1, относящимся к клауду h2.3.4.4b [77–82]. Регистрируемый рост заболеваемости имеет три особенности.

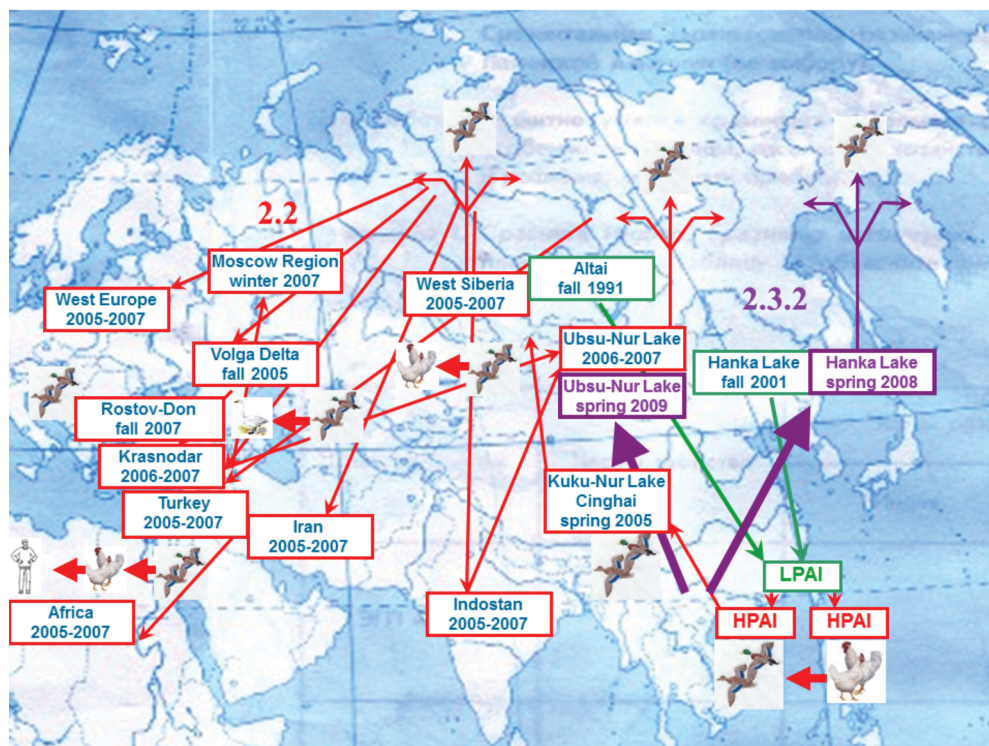


Рис. 4. Причины и последствия проникновения высоковирулентного вируса гриппа А/H5N1 в Северную Евразию (весна 2005 – весна 2008) [5].

Fig. 4. Reasons and consequences of the penetration of the highly pathogenic influenza virus A/H5N1 into Northern Eurasia (spring 2005 – spring 2008) [5].

1. Подъем заболеваемости связан с появлением генетического клэйда h2.3.4.4b высокопатогенного субтипа вируса птиц H5N1.

2. Распространение данного штамма среди домашних и диких птиц носит планетарный характер и затрагивает все континенты. За последние 2 года суммарная смертность птиц и животных от этого вируса на планете приближается к 1 млрд особей [79, 83].

Вирус субтипа H5 появился в КНР в феврале 2003 г., т.е. в начале сезона весенней миграции. Он является реассортантом вирусов гриппа А диких птиц. В 2005 г. этот вирус был занесен на территорию России дикими птицами с образованием природных очагов (рис. 4) [5, 84–86]. В последние годы в РФ вспышки, связанные с заражением диких и домашних птиц вирусами А/H5N8, А/H5N1, А/H5N5, выявлены в Северной Осетии – Алании, Краснодарском крае, Астраханской и Томской областях. В 2020 г. во время вспышек птичьего гриппа H5N8 в Астраханской области были отмечены первые случаи заражения людей этим вирусом – на птицефабрике заразились 7 сотрудников. По данным Россельхознадзора, в 2022 г. в РФ были зарегистрированы 54 вспышки птичьего гриппа, из них 5 связаны с дикими птицами, 42 – с домашними, 7 – с птицеводческими хозяйствами. Заражение птиц выявлено в Магаданской, Сахалинской областях, в Хабаровском крае, Калужской, Ивановской, Орловской, Курской, Белгородской, Самарской, Челябинской областях.

3. Подъем заболеваемости птиц высоковирулентным вирусом птиц H5N1 сопровождался участившимися и масштабными вспышками птичьего гриппа среди разных видов млекопитающих: морских львов, тюленей, норок, кошек, лис, медведей, песцов и др. (всего 26 видов млекопитающих [87, 88]). Наиболее значимые эпизоды вспышек H5N1 зарегистрированы среди тюленей в Южной и Северной Америке [89], норки в Испании [90], кошек в Польше [91], пушных зверей в Финляндии [92], морских львов в Перу [93]. Клинически вспышки сопровождалась генерализованной мультиорганный инфекцией и высокой смертностью, а масштаб вспышек охватывал десятки тысяч особей (табл. 4).

В перечисленных эпизоотиях была зарегистрирована передача вируса от животного к животному, что указывало на повышенную контагиозность вируса H5N1 для норок [87, 90, 92]. Это свойство вируса формируется как генами, обеспечивающими достаточный уровень репликации вируса в данном виде животного (или человека), так и генами, обеспечивающими рецепторную специфичность к клеточным рецепторам и стабильность вирусных частиц к факторам внешней и внутриклеточной среды. Важнейшую роль в приобретении вирионной устойчивости к таким факторам, как повышенная температура и pH внешней и внутриклеточной среды, играет конформация вирусного белка HA, и особенно структура его стеблевого домена [94–98]. Изолированные штаммы птичьего вируса H5N1 от тюленей, кошек характеризовались появлением ряда примечательных мутаций в генах NP, PB2, HA, NA. Обнаруженные мутации отражали частичную адаптацию исходного птичьего вируса к организму животных и имели сходство с генетическими штампами, характерными для вирусов гриппа человека. В частности, в полимеразном белке PB2 обнаруживались наиболее характерные мутации E627K и A701K; в белке NP – G16D, V/I100R, V/Y313F, K357Q; в белке HA была выявлена сцепленная двойная мутация 163Ala и 193Arg, которая специфична для вирусного белка HA, имеющего сродство к сиалосодержащим рецепторам с типом связи СК-α2-6-Гал [38].

В гене нейраминидазы NA вирусов H5N1, изолированных во время испанской вспышки среди норки в 2021 г., обнаруживались мутации Ser369Ile и Ile396Met во втором дополнительном сайте связывания рецепторов с типом СКα2-3 (так называемый «гемадсорбирующий центр № 2»), инактивирующий данный рецепторный центр [65]. Наличие рецепторного центра № 2 характерно только для вирусов гриппа птиц и отсутствует у вируса гриппа человека. Вполне очевидно, что утрата этого сайта в белке NA снижает аффинитет к сиалорецепторам СКα2-3 и повышает характерное для вирусов человека сродство к рецепторам СКα2-6 [38, 66]. При-

Таблица 4. Смертельные случаи среди млекопитающих при вспышках высокопатогенного птичьего гриппа H5N1 в 2021–2023 гг.

Table 4. Fatal cases among mammals during outbreaks of highly pathogenic avian influenza H5N1 occurred in 2021–2023

Регионы в мире Regions in the world	Вид погибших животных Species of dead animals	Число погибших животных Number of dead animals
Северная Америка North America	Тюлени Seals	> 121
Южная Америка South America	Морские львы Sea lions	> 634
Испания Spain	Норки Minks	51 986
Польша Poland	Кошки Cats	> 98
Финляндия Finland	Пушные с/х животные Fur-bearing farm animals	> 200 000

Примечание. В таблице суммированы данные публикаций [84–89].

Note. In the table, the data of references [84–89] are summarized.

веденные данные показывают, что высоковирулентные вирусы гриппа H5N1, вызывающие заболевания млекопитающих, приобрели ряд адаптивных мутаций, отличающих эти штаммы от вирусов птиц и сближающих с вирусом гриппа, тропного к организму человека. Таким образом, вирус птичьего гриппа H5N1 имеет смешанный (птичье-человеческий) штамп мутаций, показывающий его частичную преадаптацию к организму человека. Такая продолжающаяся преадаптация птичьего вируса в организме млекопитающих создает очевидные предпосылки его последующего облегченного перехода от млекопитающих на людей. Экспериментально показана такая возможность [95, 96].

Как отмечено выше, помимо адаптационных мутаций, переход птичьего вируса от одного вида хозяина к другому может проходить путем шифта, т.е. обмена сегментами геномных РНК с вирусами, уже адаптированными к человеку. Такой механизм возникновения пандемических вирусов гриппа А имел место ранее, в 1957, 1968 и 2009 гг., при возникновении и развитии эпидемий, вызванных вирусами H2N2, H3N2, H1N1/09pdm соответственно [11, 12]. Участвовавшие в 2020–2022 гг. вспышки птичьего гриппа H5N1 у млекопитающих создают предпосылки для реализации аналогичного процесса для данного высоковирулентного субтипа H5N1 с учетом интенсивного обмена вирусами и большого количества бессимптомных форм гриппозной инфекции у людей, имеющих контакт с животными [99, 100]. Переход высоковирулентного субтипа H5N1 на млекопитающих увеличивает вероятность совместного инфицирования данных животных вирусами гриппа птиц и человека и последующего обмена между ними сегментами РНК, отвечающими за тропизм вируса к человеку, и тем самым создает реальную возможность возникновения химерного высоковирулентного вируса, который окажется способным преодолеть межтаксонный барьер от птиц к человеку.

Глобализация распространения «птичьего гриппа» в мире

С начала XXI в. отмечен волнообразный рост заболеваемости и распространения высоковирулентных вирусов гриппа птиц среди как домашних, так и диких птиц [79]. Проведенный нами мониторинг на территории Северной Евразии выявил существование природных очагов, связанных с биоценозами водного и околоводного комплексов, 15 из известных в мире антигенных 18 субтипов гриппа А, в том числе А/Н5N1, с которым связана возникшая в 2003 г. обширная эпизоотия, а затем панзоотия среди диких и домашних птиц [19–21, 101–103]. В апреле 2005 г. во время весенней миграции птиц вирус H5N1 проник на территорию Западной Сибири с дальнейшим распространением в западном направлении. В апреле 2008 г. другая генетическая линия вируса попала на территорию Приморского края с дальнейшим охватом более северных территорий Дальнего Востока (рис. 4) [5]. Возникшие на огромных про-

странствах севера Евразии природные очаги разных вариантов вируса А/Н5N1 и других вирусов гриппа птиц продолжают активно функционировать и в настоящее время. Современные пути распространения высоковирулентных штаммов вируса птичьего гриппа H5 (клайд h.2.3.4.4b) также совпадают с установленными ранее миграционными руслами птиц [83, 88, 101, 104]. Эти наблюдения подтверждают общую концепцию формирования стойких природных очагов слабовирулентного вируса H5, наряду с другими антигенными субтипами вируса гриппа А, в Юго-Восточной Азии и Сибирском и Дальневосточном регионах России, которые служат природным пулом и источником для возникновения высоковирулентных штаммов и их последующего внутри- и межконтинентального распространения, создающего перманентную угрозу опасных пандемий среди млекопитающих и людей (рис. 4). Данная концепция сформировалась на основе обширных фундаментальных исследований экологии вирусных популяций [8, 19–21, 26–29, 101–103].

Как уже отмечалось выше, в период 2021–2023 гг. имели место масштабный подъем заболеваемости птичьим гриппом и глобальное распространение высоковирулентного вируса H5N1 (клайд h2.3.4.4b) среди птиц на всех континентах планеты [78–82, 88]. Как показывает генетический анализ вирусных геномов [105], установившийся в природе реципрокный обмен высоковирулентным вирусом H5N1 между млекопитающими и птицами привел к распространению и накоплению в природе вирусных вариантов, имеющих признаки частичной адаптации к млекопитающим, включая человека. Также вызывает тревогу и пристальное внимание тот факт, что глобальный подъем заболеваемости птиц сопровождается участвовавшими вспышками высоковирулентного птичьего гриппа H5N1 среди млекопитающих. В период 2021–2023 гг. зарегистрированы 5 масштабных эпизоотий опасного гриппа на 3 континентах: среди тюленей в Северной Америке, среди норок в Испании, среди кошек в Польше, среди пушных зверей на фермах Финляндии и морских львов в Перу [87–93]. Масштабы вспышек среди животных суммированы в табл. 4. Вирусы гриппа H5N1, изолированные от животных при этих вспышках, имели часть генетических маркеров и фенотипических признаков высокой вирулентности, характерных для вирусов гриппа человека и млекопитающих. Признаки высокой вирулентности птичьих вирусов H5N1 для млекопитающих проявлялись в тяжелом клиническом течении болезни, которая сопровождалась высокой смертностью, достигающей 50–60%, развитием первичной вирусной пневмонии, фатальных симптомов тотального геморрагического воспаления легких (т.н. легочное опеченение), поражением нервной системы с тяжелыми нарушениями моторных функций и параличами, массивного геморрагического поражения кишечника, тяжелой общей интоксикаций и т.п. [90, 92, 93].

Обнаруженное широкое распространение среди млекопитающих, имеющих тесный контакт с человеком, частично преадаптированного к человеку вируса субтипа H5N1 создает реальную угрозу его облегченного перехода на человека с эпидемическим потенциалом за счет респираторного пути передачи среди людей. Дополнительно такой преадаптированный у животных птичий вирус H5N1 может быстро усилить и окончательно сформировать свой эпидемический потенциал и контагиозность путем реассортации сегментами геномной РНК (главным образом NP, PB2, HA, NA) с вирусами гриппа человека либо уже при переходе на организм человека, либо еще в организме млекопитающих и птиц, имеющих тесный контакт с человеком (свиньи, утки и другие с/х и домашние животные). У свиней и уток инфекция, вызванная высоковирулентным вирусом птиц H5N1, может протекать в субклинической форме без выраженных симптомов, что может благоприятствовать возникновению у них смешанного инфицирования вирусами человека и птиц и реализации процесса реассортации их геномов [106–108]. По информации Avian Influenza Weekly update № 919 от 03 октября 2023 г., с января 2003 г. по настоящее время в 23 странах зарегистрировано 878 случаев заражения людей вирусом H5N1 при 50% летальности, 1568 случаев инфицирования вирусом A/H7N9 при летальности 39%, 88 и 90 случаев заражения A/H5N6 и A/H9N2 соответственно при 39% летальности, а также единичные случаи инфекции, вызванной вирусами субтипов A/H13N8, A/H7N4, A/H10N3 [88].

Меры предупреждения и готовности при угрозе «птичьего гриппа»

Возрастающая угроза человечеству вследствие резкого подъема заболеваемости и распространения высоковирулентного вируса птичьего гриппа среди животных обуславливает повышенное внимание к проблеме. В этой связи три организации: Продовольственная и сельскохозяйственная Организация Объединенных Наций (The Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO), Всемирная организация здравоохранения (The World Health Organization, WHO), Всемирная организация охраны здоровья животных (The World Organization for Animal Health, WOAH) обратились с совместным заявлением, в котором указано, что «продолжающиеся вспышки птичьего гриппа среди животных представляют опасность для человека» [87, 88]. В этом заявлении сформулирована общая повестка вопросов, требующих координации со стороны государственных органов на этапе ожидания и подготовки к возможной опасной эпидемии «птичьего гриппа». В частности, было рекомендовано обратить внимание на высоковирулентный птичий грипп как на источник риска для здоровья человека, усилить и регламентировать меры профилактики, включая меры биологической безопасности на фермерских хозяйствах и на этапах производственно-бытовой цепи птицеводства, проведение эпидемиологических расследований по фак-

там вспышек, обеспечение оперативной передачи и обмена данными о геноме вирусов и поощрение сотрудничества между секторами охраны здоровья животных и человека.

Конкретизируя меры предупреждения и необходимой готовности в условиях масштабной угрозы эпидемии «птичьего гриппа», предлагаются следующие главные направления действий:

1) разработка иммунохроматографических экспресс-тестов идентификации вирусов, пригодных для работы в полевых очагах;

2) создание компьютерных баз данных распространения и генетической эволюции вирусов (big data) на платформе метагеномной технологии и искусственного интеллекта на принципах межгосударственной кооперации;

3) создание вакцин к актуальным субтипам H5 и H7 и другим возможным субтипам (убитые, субъединичные и живые типы рекомбинантных вакцин на основе ДНК- и РНК-технологий) [8, 109–114];

4) разработка эффективных противовирусных препаратов этиотропного, патогенетического действия (host-targeted drugs) и комбинированного (virus- and host-targeted drugs combinations) типов [34, 36, 115–117];

5) повышенные меры биобезопасности и карантинные меры для с/х животных и персонала на фермах, предупреждение контактов с дикими птицами и больными животными;

6) восстановление системы мониторинга изменений вирусных генофондов в популяциях потенциально опасных вирусов в различных географических зонах [5, 29, 86, 101, 118].

Предлагаемые меры позволят прогнозировать начало опасных пандемий и их риски, а также минимизировать последствия в случае возникновения эпидемий, вызванных вирусами гриппа птиц.

Заключение

На современном этапе отмечен глобальный подъем инфицирования и заболеваемости диких и домашних птиц высоковирулентным вирусом птичьего гриппа H5N1 (клайд h2.3.4.4b) и другими вирусами гриппа А. На этом фоне участились вспышки среди млекопитающих, вызванные данным клайдом вируса, и продолжается в природе циркуляция высоковирулентного вируса гриппа H5N1 и ряда других вирусов гриппа птиц, имеющих признаки частичной адаптации к организму человека. Переход высоковирулентного вируса H5N1 на млекопитающих создает реальную угрозу его дальнейшей адаптации к организму человека и повышению его эпидемического потенциала с последующим формированием пандемической ситуации. Складывающаяся предэпидемическая ситуация обуславливает необходимость выработки стратегии предупредительных мер для минимизации последствий возможного угрожающего сценария возникновения пандемии. Для снижения рисков и последствий такого развития событий в статье указаны неотложные меры, включая формирование концепции эффективной патогенетической терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Walker P.J., Siddell S.G., Lefkowitz E.J., Mushegian A.R., Adriaenssens E.M., Alfenas-Zerbini P., et al. Recent changes to virus taxonomy ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2022). *Arch. Virol.* 2022; 167(11): 2429–40. <https://doi.org/10.1007/s00705-022-05516-5>
2. Klemm C., Boergeling Y., Ludwig S., Ehrhardt C. Immunomodulatory Nonstructural Proteins of Influenza A Viruses. *Trends Microbiol.* 2018; 26(7): 624–36. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.12.006>
3. Abdelwhab E.M., Mettenleiter T.C. Zoonotic Animal Influenza Virus and Potential Mixing Vessel Hosts. *Viruses.* 2023; 15(4): 980. <https://doi.org/10.3390/v15040980>
4. Sanjuán R., Domingo-Calap P. Mechanisms of viral mutation. *Cell Mol. Life Sci.* 2016; 73(23): 4433–48. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2299-6>
5. Львов Д.К., Гулюкин М.Ю., Забережный А.Д., Гулюкин А.М. Формирование популяционного генофонда потенциально угрожающих биобезопасности зоонозных вирусов. *Вопросы вирусологии.* 2020; 65(5): 243–58. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-5-1> <https://elibrary.ru/kprmam>
6. Brüssow H. The beginning and ending of a respiratory viral pandemic-lessons from the Spanish flu. *Microb. Biotechnol.* 2022; 15(5): 1301–17. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14053>
7. Romero-Tejeda A., Capua I. Virus-specific factors associated with zoonotic and pandemic potential. *Influenza Other Respir. Viruses.* 2013; 7(Suppl. 2): 4–14. <https://doi.org/10.1111/irv.12075>
8. Lvov D.K. Circulation of Influenza viruses in natural biocenosis. In: *Viruses and Environment.* Academic Press; 1978; 18: 351–80.
9. Lvov D.K., Zhdanov V.M. Circulation of influenza viruses genes in the biosphere. *Sov. Med. Rev. Virol.* 1987; (1): 129–52.
10. Lvov D.K. Influenza A viruses – a sum of populations with a common protected gene pool. *Sov. Med. Rev. Virol.* 1987; (2): 15–37.
11. Palese P., Shaw M.L. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In: Knipe D.M., Howley P.M., eds. *Fields Virology.* Lippincott Williams & Wilkins; 2007: 1648–89.
12. Wille M., Holmes E.C. The ecology and evolution of influenza viruses. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2020; 10(7): a038489. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a038489>
13. Suarez D.L. Evolution of avian influenza viruses. *Vet. Microbiol.* 2000; 74(1-2): 15–27. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(00\)00161-9](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(00)00161-9)
14. Swayne D.E. Changing face of avian influenza ecology and its control : from wild birds to poultry and back again. In: *Abstract Book of the 15th World Veterinary Poultry Congress.* Beijing; 2007: 98–104.
15. 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>
16. Garten W., Klenk H.D. Cleavage activation of the influenza virus hemagglutinin and its role in pathogenesis. In: Klenk H.D., Matrosovich M.N., Stech J., eds. *Avian Influenza.* Basel: Karger; 2008: 156–67.
17. Львов Д.К., Ильичев В.Д. *Миграции птиц и перенос возбудителей инфекций.* М.: Наука; 1979.
18. Львов Д.К., Жданов В.М. Персистенция генов эпидемических вирусов гриппа А в природных популяциях. *Успехи современной биологии.* 1982; 93(3): 323–37.
19. Львов Д.К., Щелканов М.Ю. Птичий грипп H5N1. В кн.: Д.К. Львов (ред.): *Вирусы и вирусные инфекции человека и животных. Руководство по вирусологии.* М.: МИА; 2013: 554–77. <https://elibrary.ru/tlzmhf>
20. Львов Д.К., Щелканов М.Ю., Алипер Т.И. Грипп диких птиц. В кн.: Львов Д.К., ред. *Вирусы и вирусные инфекции человека и животных. Руководство по вирусологии.* М.: МИА; 2013: 1086–94.
21. Lvov D.K., Kaverin N.V. Avian influenza in Northern Eurasia. In: Klenk H.D., Matrosovich M.N., eds. *Avian Influenza.* Basel: Karger; 2008: 41–58.
22. Львов Д.К. Возможное значение природных биоценозов в изменчивости вируса гриппа А. *Вопросы вирусологии.* 1974; 19(6): 740–4.
23. Stalknec D., Brown J.D. Ecology of avian influenza in wild birds. In: Swayne D.E., ed. *Avian Influenza.* Oxford: Blackwell Publ.; 2008: 43–8.
24. Pereira H.G., Tümová B., Law V.G. Avian influenza A viruses. *Bull. World Health Organ.* 1965; 32(6): 855–60.
25. Becker W.B. The isolation and classification of Tern virus: influenza A-Tern South Africa – 1961. *J. Hyg. (Lond.).* 1966; 64(3): 309–20. <https://doi.org/10.1017/s0022172400040596>
26. Laver W.G., Webster R.G. Ecology of influenza viruses in lower mammals and birds. *Br. Med. Bull.* 1979; 35(1): 29–33. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a071537>
27. Webster R.G., Laver W.G. Further evidence to support a recommendational events in the origin of new pandemic influenza virus. In: Kilbourne E., ed. *The Influenza.* NY-San-Francisco: Academic Press; 1975; (7): 299–308.
28. Львов Д.К. Популяционные взаимодействия в биологической системе: вирус гриппа а – дикие и домашние птицы – люди; причины и последствия проникновения на территорию России высоко вирулентного вируса гриппа А/H5N1. *Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунологии.* 2006; 93(3): 96–100. <https://elibrary.ru/htqbw>
29. Львов Д.К., Альховский С.Д. 55 лет отделу экологии вирусов с научно-практическим центром по экологии и эпидемиологии гриппа (Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России). *Вопросы вирусологии.* 2024; 69(1): 7–21. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-217> <https://elibrary.ru/xdikxk>
30. Böttcher-Friebertshäuser E., Garten W., Matrosovich M., Klenk H.D. The hemagglutinin: a determinant of pathogenicity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2014; 385: 3–34. https://doi.org/10.1007/82_2014_384
31. Klenk H.D., Rott R., Örllich M., Blödorn J. Activation of influenza A viruses by trypsin treatment. *Virology.* 1975; 68(2): 426–39. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(75\)90284-6](https://doi.org/10.1016/0042-6822(75)90284-6)
32. Lazarowitz S.G., Choppin P.W. Enhancement of the infectivity of influenza A and B viruses by proteolytic cleavage of the hemagglutinin polypeptide. *Virology.* 1975; 68(2): 440–54. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(75\)90285-8](https://doi.org/10.1016/0042-6822(75)90285-8)
33. Жирнов О.П. Феномен протеолитической активации миксовирусов и новая стратегия в лечении вирусных заболеваний. *Вопросы вирусологии.* 1983; 28(4): 9–21.
34. Zhirnov O.P., Klenk H.D., Wright P.F. Aprotinin and similar protease inhibitors as drugs against influenza. *Antiviral. Res.* 2011; 92(1): 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2011.07.014>
35. Zhirnov O.P., Izkizler M.R., Wright P.F. Cleavage of influenza a virus hemagglutinin in human respiratory epithelium is cell associated and sensitive to exogenous antiproteases. *J. Virol.* 2002; 76(17): 8682–9. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.17.8682-8689.2002>
36. Zhirnov O.P., Matrosovich T.Y., Matrosovich M.N., Klenk H.D. Aprotinin, a protease inhibitor, suppresses proteolytic activation of pandemic H1N1v influenza virus. *Antivir. Chem. Chemother.* 2011; 21(4): 169–74. <https://doi.org/10.3851/IMP1715>
37. Garten W., Hallenberger S., Ortman D., Schäfer W., Vey M., Angliker H., et al. Processing of viral glycoproteins by the subtilisin-like endoprotease furin and its inhibition by specific peptidylchloroalkylketones. *Biochimie.* 1994; 76(3-4): 217–25. [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(94\)90149-x](https://doi.org/10.1016/0300-9084(94)90149-x)
38. Chauhan R.P., Gordon M.L. An overview of influenza A virus genes, protein functions, and replication cycle highlighting important updates. *Virus Genes.* 2022; 58(4): 255–69. <https://doi.org/10.1007/s11262-022-01904-w>
39. Lai S., Qin Y., Cowling B.J., Ren X., Wardrop N.A., Gilbert M., et al. Global epidemiology of avian influenza A H5N1 virus infection in humans, 1997–2015: a systematic review of individual case data. *Lancet Infect. Dis.* 2016; 16(7): e108–18. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00153-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00153-5)
40. Haller O., Kochs G. Mx genes: host determinants controlling influenza virus infection and trans-species transmission. *Hum. Genet.* 2020; 139(6–7): 695–705. <https://doi.org/10.1007/s00439-019-02092-8>
41. Turan K., Mibayashi M., Sugiyama K., Saito S., Numajiri A., Nagata K. Nuclear MxA proteins form a complex with influenza virus NP and inhibit the transcription of the engineered influenza virus genome. *Nucleic. Acids Res.* 2004; 32(2): 643–52. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh192>
42. Peacock T.P., Sheppard C.M., Lister M.G., Staller E., Frise R., Swann O.C., et al. Mammalian ANP32A and ANP32B proteins drive differential polymerase adaptations in avian influenza virus. *J. Virol.* 2023; 97(5): e0021323. <https://doi.org/10.1128/jvi.00213-23>

43. Sheppard C.M., Goldhill D.H., Swann O.C., Staller E., Penn R., Platt O.K., et al. An influenza A virus can evolve to use human ANP32E through altering polymerase dimerization. *Nat. Commun.* 2023; 14(1): 6135. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-41308-4>
44. Tome-Amat J., Ramos I., Amanor F., Fernández-Sesma A., Ashour J. Influenza A virus utilizes low-affinity, high-avidity interactions with the nuclear import machinery to ensure infection and immune evasion. *J. Virol.* 2018; 93(1): e01046–18. <https://doi.org/10.1128/JVI.01046-18>
45. Zhang B., Xu S., Liu M., Wei Y., Wang Q., Shen W., et al. The nucleoprotein of influenza A virus inhibits the innate immune response by inducing mitophagy. *Autophagy.* 2023; 19(7): 1916–33. <https://doi.org/10.1080/1548627.2022.2162798>
46. Ninpan K., Suptawiwat O., Boonarkart C., Phuangphung P., Sathirareuangchai S., Uprasertkul M., et al. Expression of importin- α isoforms in human nasal mucosa: implication for adaptation of avian influenza A viruses to human host. *Virol. J.* 2016; 13: 90. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0546-y>
47. Morris A.K., Wang Z., Ivey A.L., Xie Y., Hill P.S., Schey K.L., et al. Cellular mRNA export factor UAP56 recognizes nucleic acid binding site of influenza virus NP protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2020; 525(2): 259–64. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.02.059>
48. Mänz B., Dornfeld D., Götz V., Zell R., Zimmermann P., Haller O., et al. Pandemic influenza A viruses escape from restriction by human MxA through adaptive mutations in the nucleoprotein. *PLoS Pathog.* 2013; 9(3): e1003279. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003279>
49. Zhirmov O.P. The host origin of influenza A viruses can be assessed by the intracellular cleavage of the viral nucleocapsid protein. Brief report. *Arch. Virol.* 1988; 99(3-4): 277–84. <https://doi.org/10.1007/BF01311077>
50. Zhirmov O., Bukrinskaya A.G. Nucleoproteins of animal influenza viruses, in contrast to those of human strains, are not cleaved in infected cells. *J. Gen. Virol.* 1984; 65 (Pt. 6): 1127–34. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-65-6-1127>
51. Finkelstein D.B., Mukatira S., Mehta P.K., Obenauer J.C., Su X., Webster R.G., et al. Persistent host markers in pandemic and H5N1 influenza viruses. *J. Virol.* 2007; 81(19): 10292–9. <https://doi.org/10.1128/JVI.00921-07>
52. Worobey M., Han G.Z., Rambaut A. Genesis and pathogenesis of the 1918 pandemic H1N1 influenza A virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014; 111(22): 8107–12. <https://doi.org/10.1073/pnas.1324197111>
53. Chen G.W., Gong Y.N., Shih S.R. Influenza A virus plasticity—A temporal analysis of species-associated genomic signatures. *J. Formos. Med. Assoc.* 2015; 114(5): 456–63. <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2015.01.015>
54. Long J.S., Idoko-Akoh A., Mistry B., Goldhill D., Staller E., Schreyer J., et al. Species-specific differences in use of ANP32 proteins by influenza A virus. *Elife.* 2019; 8: e45066. <https://doi.org/10.7554/eLife.45066>
55. Subbarao E.K., London W., Murphy B.R. A single amino acid in the PB2 gene of influenza A virus is a determinant of host range. *J. Virol.* 1993; 67(4): 1761–4. <https://doi.org/10.1128/jvi.67.4.1761-1764.1993>
56. Mitnaul L.J., Matrosovich M.N., Castrucci M.R., Tuzikov A.B., Bovin N.V., Kobasa D., et al. Balanced hemagglutinin and neuraminidase activities are critical for efficient replication of influenza A virus. *J. Virol.* 2000; 74(13): 6015–20. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.13.6015-6020.2000>
57. Kaverin N.V., Matrosovich M.N., Gambaryan A.S., Rudneva I.A., Shilov A.A., Varich N.L., et al. Intergenic HA-NA interactions in influenza A virus: postreassortment substitutions of charged amino acid in the hemagglutinin of different subtypes. *Virus Res.* 2000; 66(2): 123–9. [https://doi.org/10.1016/s0168-1702\(99\)00131-8](https://doi.org/10.1016/s0168-1702(99)00131-8)
58. Wagner R., Matrosovich M., Klenk H.D. Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections. *Rev. Med. Virol.* 2002; 12(3): 159–66. <https://doi.org/10.1002/rmv.352>
59. Гамбарян А.С., Матросович М.Н. Какие адаптивные изменения в гемоглиутинине и нейраминидазе необходимы для возникновения вируса пандемического гриппа из его птичьего предшественника? *Биохимия.* 2015; 80(7): 872–80. <https://doi.org/10.1134/S000629791507007X>
60. Eggink D., Spronken M., van der Woude R., Buzink J., Broszeit F., McBride R., et al. Phenotypic effects of substitutions within the receptor binding site of highly pathogenic avian influenza H5N1 virus observed during human infection. *J. Virol.* 2020; 94(13): e00195–20. <https://doi.org/10.1128/JVI.00195-20>
61. Guo H., de Vries E., McBride R., Dekkers J., Peng W., Bouwman K.M., et al. Highly pathogenic influenza A (H5Nx) viruses with altered H5 receptor-binding specificity. *Emerg. Infect. Dis.* 2017; 23(2): 220–31. <https://doi.org/10.3201/eid2302.161072>
62. Gao R., Gu M., Liu K., Li Q., Li J., Shi L., et al. T160A mutation-induced deglycosylation at site 158 in hemagglutinin is a critical determinant of the dual receptor binding properties of clade 2.3.4.4 H5NX subtype avian influenza viruses. *Vet. Microbiol.* 2018; 217: 158–66. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.03.018>
63. Leguia M., Garcia-Glaessner A., Muñoz-Saavedra B., Juárez D., Barrera P., Calvo-Mac C., et al. Highly pathogenic avian influenza A (H5N1) in marine mammals and seabirds in Peru. *Nat. Commun.* 2023; 14(1): 5489. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-41182-0>
64. Scheibner D., Salaheldin A.H., Bagato O., Zaack L.M., Mostafa A., Blohm U., et al. Phenotypic effects of mutations observed in the neuraminidase of human origin H5N1 influenza A viruses. *PLoS Pathog.* 2023; 19(2): e1011135. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011135>
65. Du W., de Vries E., van Kuppeveld F.J.M., Matrosovich M., de Haan C.A.M. Second sialic acid-binding site of influenza A virus neuraminidase: binding receptors for efficient release. *FEBS J.* 2021; 288(19): 5598–612. <https://doi.org/10.1111/febs.15668>
66. de Vries E., de Haan C.A. Letter to the editor: Highly pathogenic influenza A(H5N1) viruses in farmed mink outbreak contain a disrupted second sialic acid binding site in neuraminidase, similar to human influenza A viruses. *Euro Surveill.* 2023; 28(7): 2300085. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2023.28.7.2300085>
67. Bender C., Hall H., Huang J., Klimov A., Cox N., Hay A., et al. Characterization of the surface proteins of influenza A (H5N1) viruses isolated from humans in 1997–1998. *Virology.* 1999; 254(1): 115–23. <https://doi.org/10.1006/viro.1998.9529>
68. Zhou H., Yu Z., Hu Y., Tu J., Zou W., Peng Y., et al. The special neuraminidase stalk-motif responsible for increased virulence and pathogenesis of H5N1 influenza A virus. *PLoS One.* 2009; 4(7): e6277. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006277>
69. Zhirmov O.P., Vorobjeva I.V., Saphonova O.A., Poyarkov S.V., Ovcharenko A.V., Anhlan D., et al. Structural and evolutionary characteristics of HA, NA, NS and M genes of clinical influenza A/H3N2 viruses passaged in human and canine cells. *J. Clin. Virol.* 2009; 45(4): 322–33. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2009.05.030>
70. Young S.G., Kitchen A., Kayali G., Carrel M. Unlocking pandemic potential: prevalence and spatial patterns of key substitutions in avian influenza H5N1 in Egyptian isolates. *BMC Infect. Dis.* 2018; 18(1): 314. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3222-6>
71. Nogales A., Villamayor L., Utrilla-Trigo S., Ortego J., Martínez-Sobrido L., DeDiego M.L. Natural selection of H5N1 avian influenza A viruses with increased PA-X and NS1 shut-off activity. *Viruses.* 2021; 13(9): 1760. <https://doi.org/10.3390/v13091760>
72. Taft A.S., Ozawa M., Fitch A., Depasse J.V., Halfmann P.J., Hill-Batorski L., et al. Identification of mammalian-adapting mutations in the polymerase complex of an avian H5N1 influenza virus. *Nat. Commun.* 2015; 6: 7491. <https://doi.org/10.1038/ncomms8491>
73. Elgendy E.M., Arai Y., Kawashita N., Daidoji T., Takagi T., Ibrahim M.S., et al. Identification of polymerase gene mutations that affect viral replication in H5N1 influenza viruses isolated from pigeons. *J. Gen. Virol.* 2017; 98(1): 6–17. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000674>
74. Wang C., Qu R., Zong Y., Qin C., Liu L., Gao X., et al. Enhanced stability of M1 protein mediated by a phospho-resistant mutation promotes the replication of prevailing avian influenza virus in mammals. *PLoS Pathog.* 2022; 18(7): e1010645. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010645>
75. Cheung P.H., Lee T.T., Chan C.P., Jin D.Y. Influenza A virus PB1-F2 protein: An ambivalent innate immune modulator and virulence factor. *J. Leukoc. Biol.* 2020; 107(5): 763–71. <https://doi.org/10.1002/JLB.4MR0320-206R>
76. Rashid F., Xie Z., Li M., Xie Z., Luo S., Xie L. Roles and functions of IAV proteins in host immune evasion. *Front. Immunol.* 2023; 14: 1323560. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1323560>
77. WHO. Cumulative number of confirmed human cases for avian influenza A(H5N1) reported to WHO, 2003–2020. Available at: https://www.who.int/influenza/human_animal_interface/2020_10_07_tableH5N1.pdf

78. Lewis N.S., Banyard A.C., Whittard E., Karibayev T., Al Kafagi T., Chvala I., et al. Emergence and spread of novel H5N8, H5N5 and H5N1 clade 2.3.4.4 highly pathogenic avian influenza in 2020. *Emerg. Microbes. Infect.* 2021; 10(1): 148–51. <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1872355>
79. Shi J., Zeng X., Cui P., Yan C., Chen H. Alarming situation of emerging H5 and H7 avian influenza and effective control strategies. *Emerg. Microbes. Infect.* 2023; 12(1): 2155072. <https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2155072>
80. Sobolev I., Sharshov K., Dubovitskiy N., Kurskaya O., Alekseev A., Leonov S., et al. Highly pathogenic avian influenza A(H5N8) virus clade 2.3.4.4b, Western Siberia, Russia, 2020. *Emerg. Infect. Dis.* 2021; 27(8): 2224–7. <https://doi.org/10.3201/eid2708.204969>
81. Tian J., Bai X., Li M., Zeng X., Xu J., Li P., et al. Highly Pathogenic Avian Influenza Virus (H5N1) Clade 2.3.4.4b Introduced by Wild Birds, China, 2021. *Emerg. Infect. Dis.* 2023; 29(7): 1367–75. <https://doi.org/10.3201/eid2907.221149>
82. Isoda N., Onuma M., Hiono T., Sobolev I., Lim H.Y., Nabeshima K., et al. Detection of new H5N1 high pathogenicity avian influenza viruses in winter 2021–2022 in the Far East, which are genetically close to those in Europe. *Viruses*. 2022; 14(10): 2168. <https://doi.org/10.3390/v14102168>
83. Adlhoch C., Fusaro A., Gonzales J.L., Kuiken T., Mirinavičiūtė G., Niqueux É., et al. Avian influenza overview June–September 2023. *EFSA J.* 2023; 21(10): e08328. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.8328>
84. WHO (Western Pacific Ocean Region). Human infection with avian influenza A/H5 viruses. Human infection with avian influenza A(H5N1) virus. *Wkly Update Number*. 852; 2022.
85. WHO (Western Pacific Ocean Region). Human infection with avian influenza A(H5) viruses. Human infection with avian influenza A(H5N1) virus. *Avian Infl. Wkly Update Number*. 921 (Pt. 1); 2023.
86. Львов Д.К., Борисевич С.В., Альховский С.В., Бурцева Е.И. Актуальные подходы к анализу вирусных геномов в интересах биобезопасности. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2019; 8(2): 96–101. <https://doi.org/10.24411/2305-3496-2019-12012> <https://elibrary.ru/xbkmp1>
87. WHO: Ongoing avian influenza outbreaks in animals pose risk to humans; 2023. Available at: <https://who.int/news/item/12-07-2023-ongoing-avian-influenza-outbreaks-in-animals-pose-risk-to-humans>
88. Adlhoch C., Fusaro A., Gonzales J.L., Kuiken T., Marangon S., Mirinavičiūtė G., et al. Avian influenza overview December 2022 – March 2023. *EFSA J.* 2023; 21(3): e07917. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.7917>
89. Puryear W., Sawatzki K., Hill N., Foss A., Stone J.J., Doughty L., et al. Highly pathogenic avian influenza A(H5N1) virus outbreak in New England Seals, United States. *Emerg. Infect. Dis.* 2023; 29(4): 786–91. <https://doi.org/10.3201/eid2904.221538>
90. Agüero M., Monne I., Sánchez A., Zecchin B., Fusaro A., Ruano M.J., et al. Highly pathogenic avian influenza A(H5N1) virus infection in farmed minks, Spain, October 2022. *Euro Surveill.* 2023; 28(3): 2300001. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2023.28.3.2300001>
91. Rabalski L., Milewska A., Pohlmann A., Gackowska K., Lepionka T., Szczepaniak K., et al. Emergence and potential transmission route of avian influenza A (H5N1) virus in domestic cats in Poland, June 2023. *Euro. Surveill.* 2023; 28(31): 2300390. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2023.28.31.2300390>
92. Lindh E., Lounela H., Ikonen N., Kantala T., Savolainen-Kopra C., Kauppinen A., et al. Highly pathogenic avian influenza A(H5N1) virus infection on multiple fur farms in the South and Central Ostrobothnia regions of Finland, July 2023. *Euro. Surveill.* 2023; 28(31): 2300400. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2023.28.31.2300400>
93. Gamarra-Toledo V., Plaza P.I., Gutiérrez R., Inga-Díaz G., Saravia-Guevara P., Pereyra-Meza O., et al. Mass mortality of sea lions caused by highly pathogenic avian influenza A(H5N1) virus. *Emerg. Infect. Dis.* 2023; 29(12): 2553–6. <https://doi.org/10.3201/eid2912.230192>
94. Russier M., Yang G., Rehg J.E., Wong S.S., Mostafa H.H., Fabrizio T.P., et al. Molecular requirements for a pandemic influenza virus: An acid-stable hemagglutinin protein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2016; 113(6): 1636–41. <https://doi.org/10.1073/pnas.1524384113>
95. Herfst S., Schrauwen E.J., Linster M., Chutinimitkul S., de Wit E., Munster V.J., et al. Airborne transmission of influenza A/H5N1 virus between ferrets. *Science*. 2012; 336(6088): 1534–41. <https://doi.org/10.1126/science.1213362>
96. Imai M., Watanabe T., Hatta M., Das S.C., Ozawa M., Shinya K., et al. Experimental adaptation of an influenza H5 HA confers respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets. *Nature*. 2012; 486(7403): 420–8. <https://doi.org/10.1038/nature10831>
97. Tosheva I.I., Saygan K.S., Mijnhardt S.M., Russell C.J., Fraaij P., Herfst S. Hemagglutinin stability as a key determinant of influenza A virus transmission via air. *Curr. Opin. Virol.* 2023; 61: 101335. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2023.101335>
98. Richard M., Fouchier R.A. Influenza A virus transmission via respiratory aerosols or droplets as it relates to pandemic potential. *FEMS Microbiol. Rev.* 2016; 40(1): 68–85. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv039>
99. Furuya-Kanamori L., Cox M., Milinovich G.J., Magalhaes R.J., Mackay I.M., Yakob L. Heterogeneous and dynamic prevalence of asymptomatic influenza virus infections. *Emerg. Infect. Dis.* 2016; 22(6): 1052–6. <https://doi.org/10.3201/eid2206.151080>
100. Nguyen T.T.K., Ngo T.T., Tran P.M., Pham T.T.T., Vu H.T.T., Nguyen N.T.H., et al. Respiratory viruses in individuals with a high frequency of animal exposure in southern and highland Vietnam. *J. Med. Virol.* 2020; 92(8): 971–81. <https://doi.org/10.1002/jmv.25640>
101. Lvov D.K., Shchelkanov M.Y., Alkhovskiy S.V., Deryabin P.G. *Zoonotic Viruses of northern Eurasia: Taxonomy and Ecology*. London: Academic Press, Elsevier; 2015.
102. Lvov D.K., Shchelkanov M.Y., Prilipov A.G., Vlasov N.A., Fedyakina I.T., Deryabin P.G., et al. Evolution of highly pathogenic avian influenza H5N1 virus in natural ecosystems of northern Eurasia (2005–08). *Avian. Dis.* 2010; 54(1 Suppl.): 483–95. <https://doi.org/10.1637/8893-042509-Review.1>
103. Alexander D.J. Summary of avian influenza activity in Europe, Asia, Africa, and Australasia, 2002–2006. *Avian. Dis.* 2007; 51(1 Suppl.): 161–6. <https://doi.org/10.1637/7602-041306R.1>
104. Yang Q., Wang B., Lemey P., Dong L., Mu T., Wiebe R.A., et al. Synchrony of bird migration with avian influenza global spread; implications for vulnerable bird orders. *bioRxiv*. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2023.05.22.541648>
105. Huang P., Sun L., Li J., Wu Q., Rezaei N., Jiang S., et al. Potential cross-species transmission of highly pathogenic avian influenza H5 subtype (HPAI H5) viruses to humans calls for the development of H5-specific and universal influenza vaccines. *Cell Discov.* 2023; 9(1): 58. <https://doi.org/10.1038/s41421-023-00571-x>
106. Soda K., Tomioka Y., Usui T., Ozaki H., Ito H., Nagai Y., et al. Susceptibility of common dabbling and diving duck species to clade 2.3.2.1 H5N1 high pathogenicity avian influenza virus: an experimental infection study. *J. Vet. Med. Sci.* 2023; 85(9): 942–9. <https://doi.org/10.1292/jvms.23-0122>
107. Lee S.H., Lee J., Noh J.Y., Jeong J.H., Kim J.B., Kwon J.H., et al. Age is a determinant factor in the susceptibility of domestic ducks to H5 clade 2.3.2.1c and 2.3.4.4e high pathogenicity avian influenza viruses. *Front. Vet. Sci.* 2023; 10: 1207289. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1207289>
108. Graaf A., Piesche R., Sehl-Ewert J., Grund C., Pohlmann A., Beer M., et al. Low susceptibility of pigs against experimental infection with HPAI virus H5N1 Clade h2.3.4.4b. *Emerg. Infect. Dis.* 2023; 29(7): 1492–5. <https://doi.org/10.3201/eid2907.230296>
109. Subbiah J., Oh J., Kim K.H., Shin C.H., Park B.R., Bhatnagar N., et al. A chimeric thermostable M2e and H3 stalk-based universal influenza A virus vaccine. *NPJ Vaccines*. 2022; 7(1): 68. <https://doi.org/10.1038/s41541-022-00498-6>
110. He X., Zhang T., Huan S., Yang Y. Novel influenza vaccines: from Research and Development (R&D) challenges to regulatory responses. *Vaccines (Basel)*. 2023; 11(10): 1573. <https://doi.org/10.3390/vaccines11101573>
111. Misplon J.A., Lo C.Y., Crabbs T.A., Price G.E., Epstein S.L. Adenoviral-vectored universal influenza vaccines administered intranasally reduce lung inflammatory responses upon viral challenge 15 months post-vaccination. *J. Virol.* 2023; 97(10): e0067423. <https://doi.org/10.1128/jvi.00674-23>
112. Tripp R.A. Understanding immunity to influenza: implications for future vaccine development. *Expert. Rev. Vaccines*. 2023; 22(1): 871–5. <https://doi.org/10.1080/14760584.2023.2266033>
113. WHO. Antigenic and genetic characteristics of zoonotic influenza viruses and development of candidate vaccine viruses for pandemic


- preparedness. Available at: <https://who.int/influenza/vaccines/virus/characteristicsvirusvaccines/en>
114. WHO. Antigenic and genetic characteristics of zoonotic influenza A viruses and development of candidate vaccine viruses for pandemic preparedness in the 2024 southern hemisphere influenza season. Available at: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/influenza/who-influenza-recommendations/vcm-southern-hemisphere-recommendation-2024/202309_zoonotic_vaccinivirusupdate.pdf?sfvrsn=e78676a0_5
 115. Ludwig S., Pleschka S., Planz O. MEK inhibitors as novel host-targeted antivirals with a dual-benefit mode of action against hyperinflammatory respiratory viral diseases. *Curr. Opin. Virol.* 2023; 59: 101304. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2023.101304>
 116. Chakraborty S., Chauhan A. Fighting the flu: a brief review on anti-influenza agents. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 2023; 1–52. <https://doi.org/10.1080/02648725.2023.2191081>
 117. Blake M.E., Kleinpeter A.B., Jureka A.S., Petit C.M. Structural Investigations of Interactions between the Influenza A Virus NS1 and Host Cellular Proteins. *Viruses.* 2023; 15(10): 2063. <https://doi.org/10.3390/v15102063>
 118. Львов Д.К., Альховский С.Д., Жирнов О.П. 130 лет вирусологии. *Вопросы вирусологии.* 2022; 67(5): 357–84. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-140> <https://elibrary.ru/qhembl>
- ### REFERENCES
1. Walker P.J., Siddell S.G., Lefkowitz E.J., Mushegian A.R., Adriaenssens E.M., Alfenas-Zerbini P., et al. Recent changes to virus taxonomy ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2022). *Arch. Virol.* 2022; 167(11): 2429–40. <https://doi.org/10.1007/s00705-022-05516-5>
 2. Klemm C., Boergeling Y., Ludwig S., Ehrhardt C. Immunomodulatory Nonstructural Proteins of Influenza A Viruses. *Trends Microbiol.* 2018; 26(7): 624–36. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.12.006>
 3. Abdelwhab E.M., Mettenleiter T.C. Zoonotic Animal Influenza Virus and Potential Mixing Vessel Hosts. *Viruses.* 2023; 15(4): 980. <https://doi.org/10.3390/v15040980>
 4. Sanjuán R., Domingo-Calap P. Mechanisms of viral mutation. *Cell Mol. Life Sci.* 2016; 73(23): 4433–48. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2299-6>
 5. L'vov D.K., Gulyukin M.Yu., Zaberezhnyy A.D., Gulyukin A.M. Formation of population gene pools of zoonotic viruses, potentially threatening biosafety. *Voprosy virusologii.* 2020; 65(5): 243–58. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-5-1> <https://elibrary.ru/kprmm> (in Russian)
 6. Brüßow H. The beginning and ending of a respiratory viral pandemic—lessons from the Spanish flu. *Microb. Biotechnol.* 2022; 15(5): 1301–17. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14053>
 7. Romero-Tejeda A., Capua I. Virus-specific factors associated with zoonotic and pandemic potential. *Influenza Other Respir. Viruses.* 2013; 7(Suppl. 2): 4–14. <https://doi.org/10.1111/irv.12075>
 8. Lvov D.K. Circulation of Influenza viruses in natural biocenosis. In: *Viruses and Environment*. Academic Press; 1978; 18: 351–80.
 9. Lvov D.K., Zhdanov V.M. Circulation of influenza viruses genes in the biosphere. *Sov. Med. Rev. Virol.* 1987; (1): 129–52.
 10. Lvov D.K. Influenza A viruses – a sum of populations with a common protected gene pool. *Sov. Med. Rev. Virol.* 1987; (2): 15–37.
 11. Palese P., Shaw M.L. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In: Knipe D.M., Howley P.M., eds. *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins; 2007: 1648–89.
 12. Wille M., Holmes E.C. The ecology and evolution of influenza viruses. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2020; 10(7): a038489. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a038489>
 13. Suarez D.L. Evolution of avian influenza viruses. *Vet. Microbiol.* 2000; 74(1-2): 15–27. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(00\)00161-9](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(00)00161-9)
 14. Swayne D.E. Changing face of avian influenza ecology and its control : from wild birds to poultry and back again. In: *Abstract Book of the 15th World Veterinary Poultry Congress*. Beijing; 2007: 98–104.
 15. 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>
 16. Garten W., Klenk H.D. Cleavage activation of the influenza virus hemagglutinin and its role in pathogenesis. In: Klenk H.D., Matrosovich M.N., Stech J., eds. *Avian Influenza*. Basel: Karger; 2008: 156–67.
 17. L'vov D.K., Il'ichev V.D. *Migrations of Birds and Transfer of Infectious Agents [Migratsii ptits i perenos vozбудiteley infektsiy]*. Moscow: Nauka; 1979. (in Russian)
 18. L'vov D.K., Zhdanov V.M. Persistence of genes of epidemic influenza A viruses in natural populations. *Uspekhi sovremennoy biologii.* 1982; 93(3): 323–37. (in Russian)
 19. L'vov D.K., Shchelkanov M.Yu. Avian influenza H5N1. In: L'vov 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: 554–77. <https://elibrary.ru/tlzmhf> (in Russian)
 20. L'vov D.K., Shchelkanov M.Yu., Aliper T.I. Flu of wild birds. In: L'vov 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: 1086–94. (in Russian)
 21. Lvov D.K., Kaverin N.V. Avian influenza in Northern Eurasia. In: Klenk H.D., Matrosovich M.N., eds. *Avian Influenza*. Basel: Karger; 2008: 41–58.
 22. L'vov D.K. Possible significance of natural biocenoses in the variability of influenza A viruses. *Voprosy virusologii.* 1974; 19(6): 740–4. (in Russian)
 23. Stallknecht D., Brown J.D. Ecology of avian influenza in wild birds. In: Swayne D.E., ed. *Avian Influenza*. Oxford: Blackwell Publ.; 2008: 43–8.
 24. Pereira H.G., Tümová B., Law V.G. Avian influenza A viruses. *Bull. World Health Organ.* 1965; 32(6): 855–60.
 25. Becker W.B. The isolation and classification of Tern virus: influenza A-Tern South Africa – 1961. *J. Hyg. (Lond.)* 1966; 64(3): 309–20. <https://doi.org/10.1017/s0022172400040596>
 26. Laver W.G., Webster R.G. Ecology of influenza viruses in lower mammals and birds. *Br. Med. Bull.* 1979; 35(1): 29–33. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a071537>
 27. Webster R.G., Laver W.G. Further evidence to support a recombinational events in the origin of new pandemic influenza viruses. In: Kilbourne E., ed. *The Influenza*. NY-San-Francisco: Academic Press; 1975; (7): 299–308.
 28. L'vov D.K. Population interactions in biological system: influenza virus a – wild and domestic animals- human; reasons and consequences of introduction high pathogenic influenza virus A/H5N1 on Russian territory. *Zhurnal mikrobiologii epidemiologii i immunobiologii.* 2006; 93(3): 96–100. <https://elibrary.ru/htqbw> (in Russian)
 29. L'vov D.K., Al'khovskiy S.D. To the 55th anniversary of the Department of Virus Ecology with the Scientific and Practical Center for the Ecology and Epidemiology of Influenza (D.I. Ivanovsky Institute of Virology of the N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology of the Ministry of Health of Russian Federation). *Voprosy virusologii.* 2024; 69(1): 7–21. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-217> <https://elibrary.ru/xdikxk> (in Russian)
 30. Böttcher-Friebertshäuser E., Garten W., Matrosovich M., Klenk H.D. The hemagglutinin: a determinant of pathogenicity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2014; 385: 3–34. https://doi.org/10.1007/82_2014_384
 31. Klenk H.D., Rott R., Örllich M., Blödmern J. Activation of influenza A viruses by trypsin treatment. *Virology.* 1975; 68(2): 426–39. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(75\)90284-6](https://doi.org/10.1016/0042-6822(75)90284-6)
 32. Lazarowitz S.G., Choppin P.W. Enhancement of the infectivity of influenza A and B viruses by proteolytic cleavage of the hemagglutinin polypeptide. *Virology.* 1975; 68(2): 440–54. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(75\)90285-8](https://doi.org/10.1016/0042-6822(75)90285-8)
 33. Zhirnov O.P. The phenomenon of proteolytic activation of myxoviruses and a new strategy for treating viral diseases. *Voprosy virusologii.* 1983; 28(4): 9–21. (Russian)
 34. Zhirnov O.P., Klenk H.D., Wright P.F. Aprotinin and similar protease inhibitors as drugs against influenza. *Antiviral. Res.* 2011; 92(1): 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2011.07.014>
 35. Zhirnov O.P., Ikizler M.R., Wright P.F. Cleavage of influenza a virus hemagglutinin in human respiratory epithelium is cell associated and sensitive to exogenous antiproteases. *J. Virol.* 2002; 76(17): 8682–9. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.17.8682-8689.2002>

36. Zhirnov O.P., Matrosovich T.Y., Matrosovich M.N., Klenk H.D. Aprotinin, a protease inhibitor, suppresses proteolytic activation of pandemic H1N1v influenza virus. *Antivir. Chem. Chemother.* 2011; 21(4): 169–74. <https://doi.org/10.3851/IMP1715>
37. Garten W., Hallenberger S., Ortman D., Schäfer W., Vey M., Angliker H., et al. Processing of viral glycoproteins by the subtilisin-like endoprotease furin and its inhibition by specific peptidylchloroalkylketones. *Biochimie.* 1994; 76(3-4): 217–25. [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(94\)90149-x](https://doi.org/10.1016/0300-9084(94)90149-x)
38. Chauhan R.P., Gordon M.L. An overview of influenza A virus genes, protein functions, and replication cycle highlighting important updates. *Virus Genes.* 2022; 58(4): 255–69. <https://doi.org/10.1007/s11262-022-01904-w>
39. Lai S., Qin Y., Cowling B.J., Ren X., Wardrop N.A., Gilbert M., et al. Global epidemiology of avian influenza A H5N1 virus infection in humans, 1997–2015: a systematic review of individual case data. *Lancet Infect. Dis.* 2016; 16(7): e108–18. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00153-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00153-5)
40. Haller O., Kochs G. Mx genes: host determinants controlling influenza virus infection and trans-species transmission. *Hum. Genet.* 2020; 139(6–7): 695–705. <https://doi.org/10.1007/s00439-019-02092-8>
41. Turan K., Mibayashi M., Sugiyama K., Saito S., Numajiri A., Nagata K. Nuclear MxA proteins form a complex with influenza virus NP and inhibit the transcription of the engineered influenza virus genome. *Nucleic Acids Res.* 2004; 32(2): 643–52. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh192>
42. Peacock T.P., Sheppard C.M., Lister M.G., Staller E., Frise R., Swann O.C., et al. Mammalian ANP32A and ANP32B proteins drive differential polymerase adaptations in avian influenza virus. *J. Virol.* 2023; 97(5): e0021323. <https://doi.org/10.1128/jvi.00213-23>
43. Sheppard C.M., Goldhill D.H., Swann O.C., Staller E., Penn R., Platt O.K., et al. An influenza A virus can evolve to use human ANP32E through altering polymerase dimerization. *Nat. Commun.* 2023; 14(1): 6135. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-41308-4>
44. Tome-Amat J., Ramos I., Amanor F., Fernández-Sesma A., Ashour J. Influenza A virus utilizes low-affinity, high-avidity interactions with the nuclear import machinery to ensure infection and immune evasion. *J. Virol.* 2018; 93(1): e01046–18. <https://doi.org/10.1128/JVI.01046-18>
45. Zhang B., Xu S., Liu M., Wei Y., Wang Q., Shen W., et al. The nucleoprotein of influenza A virus inhibits the innate immune response by inducing mitophagy. *Autophagy.* 2023; 19(7): 1916–33. <https://doi.org/10.1080/15548627.2022.2162798>
46. Ninpan K., Suptawit O., Boonarkart C., Phuangphung P., Sathirareuangchai S., Uprasertkul M., et al. Expression of importin- α isoforms in human nasal mucosa: implication for adaptation of avian influenza A viruses to human host. *Virol. J.* 2016; 13: 90. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0546-y>
47. Morris A.K., Wang Z., Ivey A.L., Xie Y., Hill P.S., Schey K.L., et al. Cellular mRNA export factor UAP56 recognizes nucleic acid binding site of influenza virus NP protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2020; 525(2): 259–64. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.02.059>
48. Mänz B., Dornfeld D., Götz V., Zell R., Zimmermann P., Haller O., et al. Pandemic influenza A viruses escape from restriction by human MxA through adaptive mutations in the nucleoprotein. *PLoS Pathog.* 2013; 9(3): e1003279. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003279>
49. Zhirnov O.P. The host origin of influenza A viruses can be assessed by the intracellular cleavage of the viral nucleocapsid protein. Brief report. *Arch. Virol.* 1988; 99(3-4): 277–84. <https://doi.org/10.1007/BF01311077>
50. Zhirnov O., Bukrinskaya A.G. Nucleoproteins of animal influenza viruses, in contrast to those of human strains, are not cleaved in infected cells. *J. Gen. Virol.* 1984; 65 (Pt. 6): 1127–34. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-65-6-1127>
51. Finkelstein D.B., Mukatira S., Mehta P.K., Obenauer J.C., Su X., Webster R.G., et al. Persistent host markers in pandemic and H5N1 influenza viruses. *J. Virol.* 2007; 81(19): 10292–9. <https://doi.org/10.1128/JVI.00921-07>
52. Worobey M., Han G.Z., Rambaut A. Genesis and pathogenesis of the 1918 pandemic H1N1 influenza A virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014; 111(22): 8107–12. <https://doi.org/10.1073/pnas.1324197111>
53. Chen G.W., Gong Y.N., Shih S.R. Influenza A virus plasticity-A temporal analysis of species-associated genomic signatures. *J. Formos. Med. Assoc.* 2015; 114(5): 456–63. <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2015.01.015>
54. Long J.S., Idoko-Akoh A., Mistry B., Goldhill D., Staller E., Schreyer J., et al. Species-specific differences in use of ANP32 proteins by influenza A virus. *Elife.* 2019; 8: e45066. <https://doi.org/10.7554/eLife.45066>
55. Subbarao E.K., London W., Murphy B.R. A single amino acid in the PB2 gene of influenza A virus is a determinant of host range. *J. Virol.* 1993; 67(4): 1761–4. <https://doi.org/10.1128/jvi.67.4.1761-1764.1993>
56. Mitnaul L.J., Matrosovich M.N., Castrucci M.R., Tuzikov A.B., Bovin N.V., Kobasa D., et al. Balanced hemagglutinin and neuraminidase activities are critical for efficient replication of influenza A virus. *J. Virol.* 2000; 74(13): 6015–20. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.13.6015-6020.2000>
57. Kaverin N.V., Matrosovich M.N., Gambaryan A.S., Rudneva I.A., Shilov A.A., Varich N.L., et al. Intergenic HA-NA interactions in influenza A virus: postreassortment substitutions of charged amino acid in the hemagglutinin of different subtypes. *Virus Res.* 2000; 66(2): 123–9. [https://doi.org/10.1016/s0168-1702\(99\)00131-8](https://doi.org/10.1016/s0168-1702(99)00131-8)
58. Wagner N., Matrosovich M., Klenk H.D. Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections. *Rev. Med. Virol.* 2002; 12(3): 159–66. <https://doi.org/10.1002/rmv.352>
59. Gambaryan A.S., Matrosovich M.N. What adaptive changes in hemagglutinin and neuraminidase are necessary for emergence of pandemic influenza virus from its avian precursor? *Biokhimiya.* 2015; 80(7): 872–80. <https://doi.org/10.1134/S000629791507007X> (in Russian)
60. Eggink D., Spronken M., van der Woude R., Buzink J., Broszeit F., McBride R., et al. Phenotypic effects of substitutions within the receptor binding site of highly pathogenic avian influenza H5N1 virus observed during human infection. *J. Virol.* 2020; 94(13): e00195–20. <https://doi.org/10.1128/JVI.00195-20>
61. Guo H., de Vries E., McBride R., Dekkers J., Peng W., Bouwman K.M., et al. Highly pathogenic influenza A (H5Nx) viruses with altered H5 receptor-binding specificity. *Emerg. Infect. Dis.* 2017; 23(2): 220–31. <https://doi.org/10.3201/eid2302.161072>
62. Gao R., Gu M., Liu K., Li Q., Li J., Shi L., et al. T160A mutation-induced deglycosylation at site 158 in hemagglutinin is a critical determinant of the dual receptor binding properties of clade 2.3.4.4 H5NX subtype avian influenza viruses. *Vet. Microbiol.* 2018; 217: 158–66. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.03.018>
63. Leguia M., Garcia-Glaessner A., Muñoz-Saavedra B., Juárez D., Barrera P., Calvo-Mac C., et al. Highly pathogenic avian influenza A (H5N1) in marine mammals and seabirds in Peru. *Nat. Commun.* 2023; 14(1): 5489. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-41182-0>
64. Scheibner D., Salaheldin A.H., Bagato O., Zaack L.M., Mostafa A., Blohm U., et al. Phenotypic effects of mutations observed in the neuraminidase of human origin H5N1 influenza A viruses. *PLoS Pathog.* 2023; 19(2): e1011135. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011135>
65. Du W., de Vries E., van Kuppeveld F.J.M., Matrosovich M., de Haan C.A.M. Second sialic acid-binding site of influenza A virus neuraminidase: binding receptors for efficient release. *FEBS J.* 2021; 288(19): 5598–612. <https://doi.org/10.1111/febs.15668>
66. de Vries E., de Haan C.A. Letter to the editor: Highly pathogenic influenza A(H5N1) viruses in farmed mink outbreak contain a disrupted second sialic acid binding site in neuraminidase, similar to human influenza A viruses. *Euro Surveill.* 2023; 28(7): 2300085. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2023.28.7.2300085>
67. Bender C., Hall H., Huang J., Klimov A., Cox N., Hay A., et al. Characterization of the surface proteins of influenza A (H5N1) viruses isolated from humans in 1997–1998. *Virology.* 1999; 254(1): 115–23. <https://doi.org/10.1006/viro.1998.9529>
68. Zhou H., Yu Z., Hu Y., Tu J., Zou W., Peng Y., et al. The special neuraminidase stalk-motif responsible for increased virulence and pathogenesis of H5N1 influenza A virus. *PLoS One.* 2009; 4(7): e6277. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006277>
69. Zhirnov O.P., Vorobjeva I.V., Saphonova O.A., Poyarkov S.V., Ovcharenko A.V., Anhlan D., et al. Structural and evolutionary characteristics of HA, NA, NS and M genes of clinical influenza A/H3N2 viruses passaged in human and canine cells. *J. Clin. Virol.* 2009; 45(4): 322–33. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2009.05.030>

70. Young S.G., Kitchen A., Kayali G., Carrel M. Unlocking pandemic potential: prevalence and spatial patterns of key substitutions in avian influenza H5N1 in Egyptian isolates. *BMC Infect. Dis.* 2018; 18(1): 314. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3222-6>
71. Nogales A., Villamayor L., Utrilla-Trigo S., Ortego J., Martinez-Sobrido L., DeDiego M.L. Natural selection of H5N1 avian influenza A viruses with increased PA-X and NS1 shutoff activity. *Viruses.* 2021; 13(9): 1760. <https://doi.org/10.3390/v13091760>
72. Taft A.S., Ozawa M., Fitch A., Depasse J.V., Halfmann P.J., Hill-Batorski L., et al. Identification of mammalian-adapting mutations in the polymerase complex of an avian H5N1 influenza virus. *Nat. Commun.* 2015; 6: 7491. <https://doi.org/10.1038/ncomms8491>
73. Elgendy E.M., Arai Y., Kawashita N., Daidoji T., Takagi T., Ibrahim M.S., et al. Identification of polymerase gene mutations that affect viral replication in H5N1 influenza viruses isolated from pigeons. *J. Gen. Virol.* 2017; 98(1): 6–17. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000674>
74. Wang C., Qu R., Zong Y., Qin C., Liu L., Gao X., et al. Enhanced stability of M1 protein mediated by a phospho-resistant mutation promotes the replication of prevailing avian influenza virus in mammals. *PLoS Pathog.* 2022; 18(7): e1010645. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010645>
75. Cheung P.H., Lee T.T., Chan C.P., Jin D.Y. Influenza A virus PB1-F2 protein: An ambivalent innate immune modulator and virulence factor. *J. Leukoc. Biol.* 2020; 107(5): 763–71. <https://doi.org/10.1002/JLB.4MR0320-206R>
76. Rashid F., Xie Z., Li M., Xie Z., Luo S., Xie L. Roles and functions of IAV proteins in host immune evasion. *Front. Immunol.* 2023; 14: 1323560. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1323560>
77. WHO. Cumulative number of confirmed human cases for avian influenza A(H5N1) reported to WHO, 2003–2020. Available at: https://www.who.int/influenza/human_animal_interface/2020_10_07_tableH5N1.pdf
78. Lewis N.S., Banyard A.C., Whittard E., Karibayev T., Al Kafagi T., Chvala I., et al. Emergence and spread of novel H5N8, H5N5 and H5N1 clade 2.3.4.4 highly pathogenic avian influenza in 2020. *Emerg. Microbes. Infect.* 2021; 10(1): 148–51. <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1872355>
79. Shi J., Zeng X., Cui P., Yan C., Chen H. Alarming situation of emerging H5 and H7 avian influenza and effective control strategies. *Emerg. Microbes. Infect.* 2023; 12(1): 2155072. <https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2155072>
80. Sobolev I., Sharshov K., Dubovitskiy N., Kurskaya O., Alekseev A., Leonov S., et al. Highly pathogenic avian influenza A(H5N8) virus clade 2.3.4.4b, Western Siberia, Russia, 2020. *Emerg. Infect. Dis.* 2021; 27(8): 2224–7. <https://doi.org/10.3201/eid2708.204969>
81. Tian J., Bai X., Li M., Zeng X., Xu J., Li P., et al. Highly Pathogenic Avian Influenza Virus (H5N1) Clade 2.3.4.4b Introduced by Wild Birds, China, 2021. *Emerg. Infect. Dis.* 2023; 29(7): 1367–75. <https://doi.org/10.3201/eid2907.221149>
82. Isoda N., Onuma M., Hiono T., Sobolev I., Lim H.Y., Nabeshima K., et al. Detection of new H5N1 high pathogenicity avian influenza viruses in winter 2021–2022 in the Far East, which are genetically close to those in Europe. *Viruses.* 2022; 14(10): 2168. <https://doi.org/10.3390/v14102168>
83. Adlhoeh C., Fusaro A., Gonzales J.L., Kuiken T., Mirinavičiūtė G., Niqueux É., et al. Avian influenza overview June–September 2023. *EFSA J.* 2023; 21(10): e08328. <https://doi.org/10.2903/j.efs.2023.8328>
84. WHO (Western Pacific Ocean Region). Human infection with avian influenza A/H5 viruses. Human infection with avian influenza A(H5N1) virus. *Wkly Update Number.* 852; 2022.
85. WHO (Western Pacific Ocean Region). Human infection with avian influenza A(H5) viruses. Human infection with avian influenza A(H5N1) virus. *Avian Infl. Wkly Update Number.* 921 (Pt. 1); 2023.
86. Lvov D.K., Borisevich S.V., Al'khovskiy S.V., Burtseva E.I. Relevant approaches to analysis of viral genomes for biosafety. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie.* 2019; 8(2): 96–101. <https://doi.org/10.24411/2305-3496-2019-12012> <https://elibrary.ru/xbkmp1> (in Russian)
87. WHO: Ongoing avian influenza outbreaks in animals pose risk to humans; 2023. Available at: <https://who.int/news/item/12-07-2023-ongoing-avian-influenza-outbreaks-in-animals-pose-risk-to-humans>
88. Adlhoeh C., Fusaro A., Gonzales J.L., Kuiken T., Marangon S., Mirinavičiūtė G., et al. Avian influenza overview December 2022 – March 2023. *EFSA J.* 2023; 21(3): e07917. <https://doi.org/10.2903/j.efs.2023.7917>
89. Puryear W., Sawatzki K., Hill N., Foss A., Stone J.J., Doughty L., et al. Highly pathogenic avian influenza A(H5N1) virus outbreak in New England Seals, United States. *Emerg. Infect. Dis.* 2023; 29(4): 786–91. <https://doi.org/10.3201/eid2904.221538>
90. Agüero M., Monne I., Sánchez A., Zecchin B., Fusaro A., Ruano M.J., et al. Highly pathogenic avian influenza A(H5N1) virus infection in farmed minks, Spain, October 2022. *Euro Surveill.* 2023; 28(3): 2300001. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2023.28.3.2300001>
91. Rabalski L., Milewska A., Pohlmann A., Gackowska K., Lepionka T., Szczepaniak K., et al. Emergence and potential transmission route of avian influenza A (H5N1) virus in domestic cats in Poland, June 2023. *Euro. Surveill.* 2023; 28(31): 2300390. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2023.28.31.2300390>
92. Lindh E., Lounela H., Ikonen N., Kantala T., Savolainen-Kopra C., Kauppinen A., et al. Highly pathogenic avian influenza A(H5N1) virus infection on multiple fur farms in the South and Central Ostrobothnia regions of Finland, July 2023. *Euro. Surveill.* 2023; 28(31): 2300400. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2023.28.31.2300400>
93. Gamarra-Toledo V., Plaza P.I., Gutiérrez R., Inga-Díaz G., Saravia-Guevara P., Pereyra-Meza O., et al. Mass mortality of sea lions caused by highly pathogenic avian influenza A(H5N1) virus. *Emerg. Infect. Dis.* 2023; 29(12): 2553–6. <https://doi.org/10.3201/eid2912.230192>
94. Russier M., Yang G., Rehg J.E., Wong S.S., Mostafa H.H., Fabrizio T.P., et al. Molecular requirements for a pandemic influenza virus: An acid-stable hemagglutinin protein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2016; 113(6): 1636–41. <https://doi.org/10.1073/pnas.1524384113>
95. Herfst S., Schrauwen E.J., Linster M., Chutinimitkul S., de Wit E., Munster V.J., et al. Airborne transmission of influenza A/H5N1 virus between ferrets. *Science.* 2012; 336(6088): 1534–41. <https://doi.org/10.1126/science.1213362>
96. Imai M., Watanabe T., Hatta M., Das S.C., Ozawa M., Shinya K., et al. Experimental adaptation of an influenza H5 HA confers respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets. *Nature.* 2012; 486(7403): 420–8. <https://doi.org/10.1038/nature10831>
97. Tosheva I.I., Saygan K.S., Mijnhardt S.M., Russell C.J., Fraaij P., Herfst S. Hemagglutinin stability as a key determinant of influenza A virus transmission via air. *Curr. Opin. Virol.* 2023; 61: 101335. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2023.101335>
98. Richard M., Fouchier R.A. Influenza A virus transmission via respiratory aerosols or droplets as it relates to pandemic potential. *FEMS Microbiol. Rev.* 2016; 40(1): 68–85. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv039>
99. Furuya-Kanamori L., Cox M., Milinovich G.J., Magalhaes R.J., Mackay I.M., Yakob L. Heterogeneous and dynamic prevalence of asymptomatic influenza virus infections. *Emerg. Infect. Dis.* 2016; 22(6): 1052–6. <https://doi.org/10.3201/eid2206.151080>
100. Nguyen T.T.K., Ngo T.T., Tran P.M., Pham T.T.T., Vu H.T.T., Nguyen N.T.H., et al. Respiratory viruses in individuals with a high frequency of animal exposure in southern and highland Vietnam. *J. Med. Virol.* 2020; 92(8): 971–81. <https://doi.org/10.1002/jmv.25640>
101. Lvov D.K., Shchelkanov M.Y., Alkhovskiy S.V., Deryabin P.G. *Zoonotic Viruses of northern Eurasia: Taxonomy and Ecology.* London: Academic Press, Elsevier; 2015.
102. Lvov D.K., Shchelkanov M.Y., Prilipov A.G., Vlasov N.A., Fedyakina I.T., Deryabin P.G., et al. Evolution of highly pathogenic avian influenza H5N1 virus in natural ecosystems of northern Eurasia (2005–08). *Avian Dis.* 2010; 54(1 Suppl.): 483–95. <https://doi.org/10.1637/8893-042509-Review.1>
103. Alexander D.J. Summary of avian influenza activity in Europe, Asia, Africa, and Australasia, 2002–2006. *Avian Dis.* 2007; 51(1 Suppl.): 161–6. <https://doi.org/10.1637/7602-041306R.1>
104. Yang Q., Wang B., Lemey P., Dong L., Mu T., Wiebe R.A., et al. Synchrony of bird migration with avian influenza global spread; implications for vulnerable bird orders. *bioRxiv.* Preprint. <https://doi.org/10.1101/2023.05.22.541648>
105. Huang P., Sun L., Li J., Wu Q., Rezaei N., Jiang S., et al. Potential cross-species transmission of highly pathogenic avian influenza H5 subtype (HPAI H5) viruses to humans calls for the development of H5-specific and universal influenza vaccines. *Cell Discov.* 2023; 9(1): 58. <https://doi.org/10.1038/s41421-023-00571-x>

106. Soda K., Tomioka Y., Usui T., Ozaki H., Ito H., Nagai Y., et al. Susceptibility of common dabbling and diving duck species to clade 2.3.2.1 H5N1 high pathogenicity avian influenza virus: an experimental infection study. *J. Vet. Med. Sci.* 2023; 85(9): 942–9. <https://doi.org/10.1292/jvms.23-0122>
107. Lee S.H., Lee J., Noh J.Y., Jeong J.H., Kim J.B., Kwon J.H., et al. Age is a determinant factor in the susceptibility of domestic ducks to H5 clade 2.3.2.1c and 2.3.4.4e high pathogenicity avian influenza viruses. *Front. Vet. Sci.* 2023; 10: 1207289. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1207289>
108. Graaf A., Piesche R., Sehl-Ewert J., Grund C., Pohlmann A., Beer M., et al. Low susceptibility of pigs against experimental infection with HPAI virus H5N1 Clade h2.3.4.4b. *Emerg. Infect. Dis.* 2023; 29(7): 1492–5. <https://doi.org/10.3201/eid2907.230296>
109. Subbiah J., Oh J., Kim K.H., Shin C.H., Park B.R., Bhatnagar N., et al. A chimeric thermostable M2e and H3 stalk-based universal influenza A virus vaccine. *NPJ Vaccines.* 2022; 7(1): 68. <https://doi.org/10.1038/s41541-022-00498-6>
110. He X., Zhang T., Huan S., Yang Y. Novel influenza vaccines: from Research and Development (R&D) challenges to regulatory responses. *Vaccines (Basel).* 2023; 11(10): 1573. <https://doi.org/10.3390/vaccines11101573>
111. Mispion J.A., Lo C.Y., Crabbs T.A., Price G.E., Epstein S.L. Adenoviral-vectored universal influenza vaccines administered intranasally reduce lung inflammatory responses upon viral challenge 15 months post-vaccination. *J. Virol.* 2023; 97(10): e0067423. <https://doi.org/10.1128/jvi.00674-23>
112. Tripp R.A. Understanding immunity to influenza: implications for future vaccine development. *Expert. Rev. Vaccines.* 2023; 22(1): 871–5. <https://doi.org/10.1080/14760584.2023.2266033>
113. WHO. Antigenic and genetic characteristics of zoonotic influenza viruses and development of candidate vaccine viruses for pandemic preparedness. Available at: <https://who.int/influenza/vaccines/virus/characteristicsvirusvaccines/en>
114. WHO. Antigenic and genetic characteristics of zoonotic influenza A viruses and development of candidate vaccine viruses for pandemic preparedness in the 2024 southern hemisphere influenza season. Available at: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/influenza/who-influenza-recommendations/vcm-southern-hemisphere-recommendation-2024/202309_zoonotic_vaccinivirusupdate.pdf?sfvrsn=e78676a0_5
115. Ludwig S., Pleschka S., Planz O. MEK inhibitors as novel host-targeted antivirals with a dual-benefit mode of action against hyperinflammatory respiratory viral diseases. *Curr. Opin. Virol.* 2023; 59: 101304. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2023.101304>
116. Chakraborty S., Chauhan A. Fighting the flu: a brief review on anti-influenza agents. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 2023; 1–52. <https://doi.org/10.1080/02648725.2023.2191081>
117. Blake M.E., Kleinpeter A.B., Jureka A.S., Petit C.M. Structural Investigations of Interactions between the Influenza A Virus NS1 and Host Cellular Proteins. *Viruses.* 2023; 15(10): 2063. <https://doi.org/10.3390/v15102063>
118. L'vov D.K., Al'khovskiy S.D., Zhirnov O.P. 130th anniversary of virology. *Voprosy virusologii.* 2022; 67(5): 357–84. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-140> <https://elibrary.ru/qhemb1>

Информация об авторах:


Жирнов Олег Петрович  – чл.-корр. РАН, д-р биол. наук, профессор, руководитель лаборатории вирусного патогенеза Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: zhirnov@inbox.ru; <https://orcid.org/0000-0002-3192-8405>

Львов Дмитрий Константинович – академик РАН, д-р мед. наук, профессор, главный научный сотрудник Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: dk_lvov@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-8176-6582>

Участие авторов: Жирнов О.П. – формирование концепции статьи, анализ данных и обобщение экспериментального материала, написание и редактирование статьи; Львов Д.К. – теоретическая разработка концепции и ее экспериментальная проверка, написание и редактирование статьи.

Поступила 11.01.2024
Принята в печать 11.03.2024
Опубликована 27.04.2024

Information about the authors:

Oleg P. Zhirnov  – Academician of the Russian Academy of Sciences, Professor, Dr Sci (Biology), Head of the Laboratory of Viral Pathogenesis of D.I. Ivanovsky Institute of Virology of N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology of Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia. E-mail: zhirnov@inbox.ru; <https://orcid.org/0000-0002-3192-8405>

Dmitry K. Lvov – Academician of the Russian Academy of Sciences, Professor, Dr Sci (Medicine), Chief Researcher of D.I. Ivanovsky Institute of Virology of N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology of Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia. E-mail: dk_lvov@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-8176-6582>

Contribution: Zhirnov O.P. – formation of the concept of the article, data analysis and summarizing of experimental material, writing and editing the article; Lvov D.K. – theoretical development of the concept and its experimental verification, writing and editing the article.

Received 11 January 2024
Accepted 11 March 2024
Published 27 April 2024

ОБЗОРЫ



НАУЧНЫЙ ОБЗОР

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-225>

© ПОПАДЮК Е.Е., СИЗИКОВА Т.Е., ХМЕЛЕВ А.Л., ТИМОФЕЕВ М.А., ЛЕБЕДЕВ В.Н., БОРИСЕВИЧ С.В., 2024

Применение иммуноглобулинов и моноклональных антител в отношении COVID-19

Попадюк Е.Е.¹, Сизикова Т.Е.¹, Хмелев А.Л.^{1✉}, Тимофеев М.А.², Лебедев В.Н.¹, Борисевич С.В.¹

¹ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Минобороны России, 141306, г. Сергиев Посад-6, Россия;

²Управление начальника Войск радиационной, химической и биологической защиты Вооруженных Сил Российской Федерации, 119160, г. Москва, Россия

Резюме

Введение. При возникновении нового заболевания одним из наиболее доступных средств с установленной и доказанной терапевтической эффективностью в первую очередь являются препараты, содержащие специфические антитела к данному инфекционному агенту. Введение таких препаратов направлено на снижение количества возбудителя в макроорганизме и, как следствие, уменьшение тяжести симптомов заболевания либо выздоровление.

Целью настоящего обзора является анализ опыта использования иммуноглобулинов и моноклональных антител при лечении больных COVID-19 в ходе пандемии.

Результаты и заключение. Двумя основными группами медицинских средств защиты, блокирующих проникновение вируса SARS-CoV-2 в перmissive клетки, являются препараты, получаемые из плазмы крови реконвалесцентов (иммуноглобулин), и человеческие моноклональные антитела. В первой группе препаратов при лечении больных COVID-19 ведущее место занимает плазма крови реконвалесцентов. Данный препарат с успехом может быть использован для проведения экстренной профилактики на ранних стадиях заболевания. Основным недостатком терапии при использовании плазмы крови реконвалесцентов является трудность стандартизации ввиду значительного варьирования содержания специфических антител у доноров. Другим недостатком терапии при использовании препаратов первой группы являются нежелательные побочные реакции у реципиентов, возникающие при их введении. Альтернативным подходом при проведении терапии COVID-19 является использование гуманизированных и генно-инженерных человеческих моноклональных антител против определенных эпитопов вируса SARS-CoV-2, в частности, рецептор-связывающего домена S-белка, способных предотвратить проникновение вируса в перmissive клетки и прервать развитие манифестной инфекции. Преимуществами данных препаратов является их безопасность, высокая специфическая активность, возможность стандартизации, однако сложность их производства и высокая стоимость делают их малодоступными для массового использования в практической медицине.

Ключевые слова: COVID-19; вирус SARS-CoV-2; иммуноглобулины; моноклональные антитела; экстренная профилактика; лечение; обзор

Для цитирования: Попадюк Е.Е., Сизикова Т.Е., Хмелев А.Л., Тимофеев М.А., Лебедев В.Н., Борисевич С.В. Применение иммуноглобулинов и моноклональных антител в отношении COVID-19. *Вопросы вирусологии*. 2024; 69(2): 119–126 DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-225> EDN: <https://elibrary.ru/iiqxtn>

Финансирование. ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Минобороны России.

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

REVIEW

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-225>

The use of immunoglobulins and monoclonal antibodies against COVID-19

Elena E. Popadyuk¹, Tatyana E. Sizikova¹, Aleksey L. Khmelev¹✉, Mikhail A. Timofeev², Vitaliy N. Lebedev¹, Sergey V. Borisevich¹

¹48 Central Research Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation, 141306, Sergiev Posad, Russia;

²Directorate of the Chief of the Radiation, Chemical and Biological Protection Troops of the Armed Forces of the Russian Federation, 119160, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. When a new disease occurs, one of the most affordable remedies is drugs containing specific antibodies to this infectious agent. The use of such drugs is aimed at reducing the amount of the pathogen in the macroorganism and the associated reduction in the severity of the symptoms of the disease or recovery.

The **purpose** of this review is to analyze the experience of using immunoglobulins and monoclonal antibodies in the treatment of COVID-19 patients during the pandemic.

Results and conclusion. The two main groups of medical protective agents that block the penetration of the SARS-CoV-2 virus into permissive cells are drugs obtained from blood plasma of convalescents (immunoglobulin) and human monoclonal antibodies. The first group of drugs in the treatment of COVID-19 includes blood plasma of convalescents, which can be successfully used for emergency prevention. The main disadvantage of using blood plasma convalescents is the difficulty of standardization due to the different content of specific antibodies in donors. Another disadvantage is the undesirable side effects in recipients that occur after plasma administration. An alternative approach to COVID-19 therapy is the use of humanized and genetically engineered human monoclonal antibodies against certain epitopes of the SARS-CoV-2 virus. For example, monoclonal antibodies against receptor-binding domain of the S-protein, which prevents the virus from entering permissive cells and interrupts the development of infection. The advantages of these drugs are their safety, high specific activity, and the possibility of standardization. However, the complexity of their production and high cost make them inaccessible for mass use in practical medicine.

Keywords: COVID-19; SARS-CoV-2 virus; immunoglobulin; monoclonal antibodies; emergency prevention; treatment; review

For citation: Popadyuk E.E., Sizikova T.E., Khmelev A.L., Timofeev M.A., Lebedev V.N., Borisevich S.V. The use of immunoglobulins and monoclonal antibodies against COVID-19. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2024; 69(2): 119–126. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-225> EDN: <https://elibrary.ru/iqxtn>

Funding. Federal State Budgetary Establishment «48 Central Scientific Research Institute» of Ministry of Defence of the Russia Federation.

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

Введение

Пандемия COVID-19 стала третьей в XXI в. вспышкой коронавирусной инфекции. В отличие от двух предыдущих заболеваний (SARS и MERS), COVID-19 получил повсеместное распространение и затронул практически все страны [1].

В ходе пандемии COVID-19 (в значительной мере в зависимости от геноварианта вируса SARS-CoV-2) был отмечен очень широкий спектр клинических проявлений: от легкого респираторного заболевания до тяжелой пневмонии с острым респираторным дистресс-синдромом (ОРДС). Последний обусловлен развитием т.н. «цитокинового шторма», вызванного неконтролируемой секрецией цитокинов в ходе генерализации инфекции. В сыворотке крови больного при этом значительно возрастает концентрация цитокинов (IFN- γ , IL-1, IL-6, IL-12, и TGF- β , CCL2, CXCL10, CXCL9, IL-8). У больных развиваются лихорадка, сухой кашель, нарастание дыхательной недостаточности, переходящей в ОРДС, появляются признаки нефропатии, а усиливающиеся гемодина-

мические нарушения и явления коагулопатии сопровождаются формированием синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания [2–4].

Для предотвращения развития «цитокинового шторма» на практике используют две основные стратегии:

- противовоспалительное лечение стероидными и нестероидными препаратами;
- этиотропную терапию, направленную на элиминацию вируса, которая включает проведение терапии антителосодержащими препаратами, полученными из крови реконвалесцентов, или моноклональными антителами (МкАт).

Целью настоящего обзора является анализ опыта использования иммуноглобулинов и моноклональных антител при лечении больных COVID-19 в ходе пандемии.

Результаты

S-белок вируса SARS-CoV-2 является основной мишенью для вируснейтрализующих антител (ВНА), поэтому использование сыворотки крови реконва-

лесцентом, содержащих ВНА против вируса SARS-CoV-2, – относительно быстрый способ получения лечебного препарата для лечения больных COVID-19. Применение данных препаратов стало возможным уже на первых этапах пандемии [5].

Ранее было установлено, что применение плазмы реконвалесцентом при лечении больных с тяжелыми формами респираторных вирусных инфекций приводит к значительному сокращению продолжительности пребывания таких пациентов в стационаре [6].

С нашей точки зрения, более эффективным и в то же время более безопасным средством лечения COVID-19, по сравнению с плазмой реконвалесцентом, является приготовленный из нее иммуноглобулин.

Гомологичный иммуноглобулин против COVID-19 изготавливают из пула плазмы крови доноров, содержащей антитела против SARS-CoV-2. Каждый компонент пула индивидуально проверяют на отсутствие РНК вирусов SARS-CoV-2, гепатита С, ВИЧ и ДНК вируса гепатита В (методом полимеразной цепной реакции) и/или антигена вируса гепатита В (HBsAg), антигена р24 ВИЧ-1, антител к вирусам гепатита С, ВИЧ-1 и ВИЧ-2 и сифилиса (методом твердофазного иммуноферментного анализа).

Действующим началом иммуноглобулина человека против COVID-19 являются иммуноглобулины класса G (IgG), обладающие нейтрализующей активностью по отношению к вирусу SARS-CoV-2.

При внутривенном введении специфические антитела против вируса SARS-CoV-2 сразу же попадают в системный кровоток, при этом биодоступность их близка к 100%. После введения в макроорганизме происходит перераспределение IgG к вирусу SARS-CoV-2 между плазмой и внесосудистым пространством, с последующей утилизацией свободно циркулирующих IgG и иммунных комплексов клетками ретикулоэндотелиальной системы. Среднее время элиминации IgG к вирусу SARS-CoV-2 из плазмы крови составляет около 11 сут [7].

Как следует из данных, полученных при проведении II–III фаз клинических испытаний (табл. 1), применение иммуноглобулина из плазмы крови реконвалесцентом обеспечивает значимый терапевтический эффект. Снижение частоты COVID-19 при однократном введении больным иммуноглобулина в дозе 1 г на 1 кг массы тела составляло 85%, при введении в дозе 0,5 г на 1 кг массы тела в течение 5 сут – более 95%.

Определенным недостатком препаратов, получен-

Таблица 1. Результаты использования иммуноглобулинов при проведении клинических исследований препаратов на больных COVID-19
Table 1. Results of the use of immunoglobulins in clinical trials of drugs in patients with COVID-19

Разработчик Developer	Стадия КИ Stage of CT	Схема введения Administration scheme	Число испытуемых Number of subjects	Результат Result	Источ- ник Source
Микроген НПО АО, Россия Microgen NPO JSC, Russia	I	Внутривенно однократ- но в дозе 1 г на 1 кг массы тела Intravenously once at a dose of 1 g per 1 kg of body weight	8	Период полувыведения IgG к SARS-CoV-2 составляет в среднем 11 сут The half-life of IgG SARS-CoV-2 averages 11 days	[8]
Микроген НПО АО, Россия Microgen NPO JSC, Russia	II–III	То же The same scheme	32	Концентрация нейтрализующих SARS-CoV-2 антител увеличилась в $9,4 \pm 1,4$ раза по сравнению с плазмой человека Отмечено снижение частоты симптоматического COVID-19 на 85% The concentration of neutralizing SARS-CoV-2 antibodies increased by 9.4 ± 1.4 times compared to the human plasma 85% reduction in the frequency of symptomatic COVID-19	[2]
Университет медицин- ских наук, Пакистан Dow University of Health Sciences Pakistan	II–III	–	155	Снижение частоты симптоматического COVID-19 на 90% 90% reduction in the frequency of symptomatic COVID-19	[3]
Китайская академия наук, КНР Chinese Academy of Science, China	I	0,2–0,4 г на 1 кг массы тела в течение 5 сут 0.2–0.4 g per 1kg of body weight for 5 days	63	Н.д. N.d.	[9]
Китайская академия наук, КНР Chinese Academy of Science, China	II–III	0,5 г на 1 кг массы тела в течение 5 сут 0.5 g per 1 kg body weight for 5 days	94	Терапевтический эффект у 100% больных Therapeutic effect in 100% of patients	[10]
Нью-Йоркский центр крови, США New York Blood Center, USA	II–III	0,5 г на 1 кг массы тела в течение 5 сут 0.5 g per 1 kg body weight for 5 days	67	Терапевтический эффект у 95% больных Therapeutic effect in 95% of patients	[11]

ных из крови реконвалесцентов (независимо от перенесенной нозологической формы), являются возможные нежелательные реакции после введения лекарственного средства [12].

Нежелательные реакции, как правило, наблюдаются в случае высокой скорости введения иммуноглобулина, а также у лиц с недостаточностью иммуноглобулина класса А либо у пациентов, которые получают внутривенную инфузию иммуноглобулина человека впервые. В этой связи подобные препараты применяют только в условиях стационара под контролем врача и при наличии средств для купирования реакции гиперчувствительности немедленного типа.

Положительным моментом является и то, что иммуноглобулин человека против COVID-19 может применяться в комплексной терапии заболевания в сочетании с другими лекарственными средствами.

Следует отметить, что возможности применения препаратов из крови реконвалесцентов на первых этапах пандемии COVID-19 были достаточно ограниченными. В дальнейшем вследствие значительного расширения круга переболевших ситуация изменилась и кровь реконвалесцентов стала наиболее доступным исходным материалом для получения лечебных препаратов на основе ВНА.

Во время пандемии COVID-19 одним из наиболее перспективных направлений этиотропной терапии стало применение МкАт. Это связано с высокой специфичностью, безопасностью, технологичностью промышленного производства МкАт, секретируемых клеточными продуцентами, и возможностью получения высокоочищенных препаратов при использовании методов аффинной хроматографии. Получаемые при этом МкАт характеризовались отсутствием феномена антителозависимого усиления инфекции (англ. antibody-dependent enhancement, ADE) [13].

Использование препаратов на основе МкАт рекомендуется в стационарных условиях, а также в условиях дневного стационара в срок не позднее 7 сут от начала болезни [19].

Рекомбинантные МкАт человека класса IgG1, связываясь с эпитопами рецептор-связывающего домена S-белка, блокируют взаимодействие S-белка SARS-CoV-2 с ангиотензинпревращающим ферментом 2 (АПФ2), что приводит к подавлению инфицирования клеток хозяина и останавливает репликацию вируса [14].

S-белок содержит две субъединицы (S_1 и S_2). Субъединица S_1 содержит 4 домена, основную роль во взаимодействии с клеткой хозяина играют N-концевой домен (NTD) и рецептор-связывающий домен (RBD) [15]. Связывание S-белка МкАт блокирует его взаимодействие с рецепторами клетки-хозяина (например, ACE2) и/или ингибирует проникновение вируса в клетку. Препараты, обладающие данными свойствами, определяют как нейтрализующие МкАт [14, 16].

При исследовании механизмов эффективности препаратов МкАт следует обратить внимание на роль Fc-опосредованной эффекторной активности. Установлено, что МкАт с немодифицированным Fc-фраг-

ментом более эффективны для лечения COVID-19, чем препараты с модифицированным Fc-фрагментом [17]. Модификацию Fc-фрагмента проводят с целью снижения эффекторной активности для удлинения периода полувыведения [18].

При терапии COVID-19 на практике используют как однокомпонентные (Сотровимаб, Регданвимаб), так и комбинированные (Бамланвивимаб + Этесевимаб; Касиривимаб + Имдевимаб) препараты [19].

Уже в начале пандемии COVID-19 в клинических исследованиях было установлено, что смеси нейтрализующих МкАт, нацеленных на сайт RBD вируса SARS-CoV-2, могут быть более эффективны для лечения и профилактики заболевания, чем индивидуальные МкАт [20].

В зависимости от показаний к применению, препараты на основе МкАт, используемые для профилактики и лечения COVID-19, можно разделить на 3 группы:

– Первая группа представлена препаратами для профилактики заражения COVID-19. К данной группе относятся разработанные компанией AstraZeneca МкАт с Fc-фрагментом, модифицированным методом мутаций (МкАт AZD8895 – Тиксагевимаб и AZD1061 – Цилгавимаб). Модификация Fc-фрагмента позволяет удлинить период полувыведения препарата. Предполагаемый компанией-разработчиком срок эффективной защиты от заражения составляет 6–12 мес. Ввиду этого данные препараты могут быть использованы в качестве альтернативных вакцин средствами профилактики для лиц, имеющих противопоказания для вакцинации [21].

– Вторая группа представлена препаратами для постконтактной профилактики и лечения. К этой группе относятся Касиривимаб и Имдевимаб, представляющие собой нейтрализующие человеческие IgG1 МкАт к вирусу SARS-CoV-2.

Использование препарата REGN-COV2 (комбинация Казиривимаба и Имдевимаба, по 1,2 г каждого МкАт) вызывало уменьшение уровня заражения на 50% при снижении тяжести заболевания у 100% добровольцев [22, 23].

– К третьей группе относятся препараты, предназначенные для лечения больных с высоким риском прогрессирования тяжести заболевания, для которых альтернативные варианты лечения по тем или иным причинам неприемлемы. К данной группе относятся Сотровимаб, Беттеловимаб (для использования в качестве монопрепаратов) а также комбинации «Бамланвивимаб + Этесевимаб» и «Казиривимаб + Имдевимаб».

Беттеловимаб (МкАт LY-CoV1404, LY3853113) представляет собой человеческие МкАт к S-белку вируса SARS-CoV-2, выделенные от пациента, выздоровевшего после COVID-19 [24].

Бамланвивимаб (МкАт LY3819253 или LY-CoV555) и Этесевимаб (МкАт LY3832479 или LY-CoV016) представляют собой МкАт, блокирующие S-белок, которые были разработаны на основе исходных специфических иммуноглобулинов, продуцируемых В-лимфоцитами, полученными от двух

Таблица 2. Результаты клинических испытаний препаратов человеческих МкАт к S-белку вируса SARS-CoV-2 на больных COVID-19
Table 2. Results of clinical trials of preparations of human McAb to the S-protein of the SARS-CoV-2 virus in COVID-19 patients

Препарат Medicatio	Разработчик Developer	МкАт McAb	Стадия КИ Stage of CT	Схема введения Ad- ministration scheme	Число испытуемых Number of subjects	Результат Result	Источник Source
Эвусхелд Evusheld	АстраЗенека AstraZeneca	Тикса- гевимаб AZD8895 Tixagevimab	III	Внутримышечное введение одно- кратной дозы 150 мг Тиксаге- вимаба и 150 мг Цилгавимаба Intramuscular administration of a single dose of 150 mg of Tixagevimab and 150 mg of Cilgavimab	5000	Снижение частоты симптоматического COVID-19 на 77% Reduction in the frequency of symptomatic COVID-19 by 77%	[21]
	АстраЗенека AstraZeneca	Цилгавимаб AZD1061 Cilgavimab					[21]
Бектеловимаб Bebtelovimab	Центр исследо- вания вакцин Национального института аллерги- и инфекцион- ных заболеваний, США Vaccine Research Center of the National Institute of Allergy and In- fectious Diseases	LY-CoV1404, LY3853113	I-II	Внутривенное вве- дение однократ- ной дозы 175 мг Intravenous administration of the single dose of 175 mg	380	Лечение Бектеловимабом привело к сокращению вре- мени до устойчивого устраи- яния симптомов COVID-19 по сравнению с плацебо у более 77% пациентов Treatment with Bebtelovimab led to a reduction in the time to sustained elimination of COVID-19 symptoms com- pared with placebo in more than 77%	[28]
Бамланивимаб Bamlanivimab, Этесевимаб Etesevimab	Eli Lilly &C	LY3819253 или LY-CoV555	I-II	700 мг Бамлани- вимаба и 1400 мг Этесевимаба 700 mg Bam- lanivimab and 1400 mg Etesevimab	450	Бамланивимаб в комбинации с Этесевимабом значимо снижает вирусную нагрузку по сравнению с плацебо* Bamlanivimab in combination with Etesevimab significantly reduces viral load compared to placebo*	[24]
	Eli Lilly &C	LY3832479 или LY-CoV016	I-II				[24]
Сотровимаб Sotrovimab	GlaxoSmith- Kline and Vir Biotechnology, Inc	VIR-783	II	Внутривенное вве- дение однократ- ной дозы 500 мг Intravenous admin- istration of a single dose 500 mg	291	Введение Сотровимаба на 85% снижает количество случаев госпитализации и летального исхода у больных COVID-19 Administration of Sotro- vimab reduced the number hospitalization and deaths in COVID-19 patients by 85%	[26]
Регданвимаб Regdanvimab	Целтрон, Респу- блика Корея Celltron, Incheon, Republic of Korea	CT-P59	III	40 мг/кг 40 mg/kg	Н.д. N.d.	Снижает риск госпитализа- ции и смертности на 70% по сравнению с плацебо Reduces the risk of hospi- talization and deaths by 70% compared to placebo	[29]
Ronaprvе/ REGN-COV2	Regeneron Phar- maceuticals	Казири- вимаб Casirivimab Имдеви- маб Imdevimab	II	Внутривенное введение по 1200 мг Казири- вимаба и Имдеви- маба Intravenous admin- istration at 1200 mg Casirivimab and Imdevimab	799	Снижение вирусной нагруз- ки по сравнению с плацебо Reduce viral load compared to placebo	[30]

Примечание. * – монотерапия Бамланивимабом и Этесевимабом является неэффективной [23].

Note. * – monotherapy Bamlanivimab and Etesevimab is not effective [23].

разных пациентов, переболевших COVID-19. Комбинирование этих двух препаратов при клиническом применении может способствовать снижению вирусной нагрузки и уменьшению вероятности об-

разования резистентных вариантов, появляющихся при лечении [24].

Сотровимаб (МкАт VIR-7831) представляет собой МкАт с модификацией Fc-фрагмента (мутации LS).

Указанная модификация позволяет увеличить период полувыведения при сохранении эффекторной функции. МкАт VIR-7831 связываются с высококонсервативным эпитопом S-белка вируса SARS-CoV-2 за пределами RBD-е [25].

Установлено, что своевременное введение Сотровимаба на 85% снижало число случаев госпитализации и летального исхода у больных COVID-19 [26].

Результаты использования МкАт при проведении клинических исследований коммерческих препаратов, представленные в **табл. 2**, свидетельствуют о том, что использование человеческих МкАт к S-белку вируса SARS-CoV-2 может быть эффективным средством при лечении больных COVID-19. Несомненным преимуществом препаратов МкАт перед препаратами на основе плазмы реконвалесцентов является введениекратно меньшего количества гетерологичного белка в макроорганизм.

В то же время применение препаратов МкАт для лечения COVID-19 может привести к ухудшению состояния госпитализированных пациентов. В частности, это было продемонстрировано при клиническом исследовании препарата Беттеловимаб [25, 27]. Кроме того, при появлении новых геновариантов вируса SARS-CoV-2 всегда возникает вопрос о возможном снижении эффективности препаратов на основе МкАт, как, в частности, это было установлено для препарата Беттеловимаб в отношении заболеваний, вызываемых геновариантами «Омикрон».

Таким образом, возможность успешной борьбы с эпидемией вновь возникшего инфекционного заболевания напрямую зависит от обеспечения лекарственными средствами для его лечения и профилактики.

В начале пандемии COVID-19 остро ощущался недостаток эффективных средств профилактики и лечения, что при высокой contagiousности заболевания, вызванного вирусом SARS-CoV-2, особенно геновариантом «Дельта», предопределило быстрое глобальное распространение инфекции, значительно опережающее скорость разработки вакцин [31].

Среди средств и методов лечения на первых этапах пандемии одним из приоритетных направлений стал метод терапии с использованием препаратов из крови реконвалесцентов [6]. В основе этого метода лежит принцип пассивной иммунизации, т.е. введение в организм реципиента специфических к возбудителю антител с целью нейтрализации возбудителя и последующей его элиминации.

В дальнейшем для проведения терапии в ходе пандемии COVID-19 в качестве лекарственных препаратов использовали иммуноглобулины, полученные из плазмы крови реконвалесцентов [32], а также генно-инженерные МкАт к антигенным детерминантам вируса SARS-CoV-2 [33].

Заключение

Результаты доступных лабораторных и клинических испытаний свидетельствуют о том, что в ходе распространения нового инфекционного заболевания препараты МкАт, полученные в ходе генно-инженерных ис-

следований, были более эффективными и в то же время безопасными средствами экстренной профилактики и лечения. При этом максимальный эффект от проведения терапии достигается при возможно более раннем от момента инфицирования введении препарата.

ЛИТЕРАТУРА

1. WHO. Coronavirus disease (COVID-19). Situation reports. Available at: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports>
2. Huang X., Wei F., Hu L., Wen L., Chen K. Epidemiology and clinical characteristics of COVID-19. *Arch. Iran. Med.* 2020; 23(4): 268–71. <https://doi.org/10.34172/aim.2020.09>
3. Yin S., Huang M., Li D., Tang N. Difference of coagulation features between severe pneumonia induced by SARS-CoV2 and non-SARS-CoV2. *J. Thromb. Thrombolysis.* 2021; 51(4): 1107–10. <https://doi.org/10.1007/s11239-020-02105-8>
4. Zhang W., Zhao Y., Zhang F., Wang Q., Li T., Liu Z., et al. The use of anti-inflammatory drugs in the treatment of people with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19): The Perspectives of clinical immunologists from China. *Clin. Immunol.* 2020; 214: 108393. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2020.108393>
5. Liu L., Wei Q., Nishiura K., Peng J., Wang H., Midkiff C., et al. Spatiotemporal interplay of severe acute respiratory syndrome coronavirus and respiratory mucosal cells drives viral dissemination in rhesus macaques. *Mucosal Immunol.* 2016; 9(4): 1089–101. <https://doi.org/10.1038/mi.2015.127>
6. Mair-Jenkins J., Saavedra-Campos M., Baillie J.K., Cleary P., Khaw F.M., Lim W.S., et al. The effectiveness of convalescent plasma and hyperimmune immunoglobulin for the treatment of severe acute respiratory infections of viral etiology: a systematic review and exploratory meta-analysis. *J. Infect. Dis.* 2015; 211(1): 80–90. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu396>
7. Chai K.L., Valk S.J., Piechotta V., Kimber C., Monsef I., Doree C., et al. Convalescent plasma or hyperimmune immunoglobulin for people with COVID-19: a living systematic review. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2020; 10: CD013600. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD013600.pub3>
8. Смолянова Т.И., Багаева Н.С., Колганова М.А., Шохин И.Е., Николаева А.М., Вязникова Т.В. и др. Изучение фармакокинетики препарата «КОВИД-глобулин» (специфический иммуноглобулин человека против COVID-19) (АО «Нацимбио», Россия) в рамках фазы I клинического исследования. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2022; 11(2): 180–6. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-180-186> <https://elibrary.ru/eetors>
9. Casadevall A., Pirofski L.A. The convalescent sera option for containing COVID-19. *J. Clin. Invest.* 2020; 130(4): 1545–8. <https://doi.org/10.1172/JCI138003>
10. Tu Y.F., Chien C.S., Yarmishyn A.A., Lin Y.Y., Luo Y.H., Lin Y.T., et al. A review of SARS-CoV-2 and the ongoing clinical trials. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21(7): 2657. <https://doi.org/10.3390/ijms21072657>
11. Liu C., Zhou Q., Li Y., Garner L.V., Watkins S.P., Carter L.J., et al. Research and development on therapeutic agents and vaccines for COVID-19 and related human coronavirus diseases. *ACS Cent. Sci.* 2020; 6(3): 315–31. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.0c00272>
12. Государственный реестр лекарственных средств. Available at: <https://grls.pharm-portal.ru/>
13. Tetro J.A. Is COVID-19 receiving ADE from other coronaviruses? *Microbes Infect.* 2020; 22(2): 72–3. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2020.02.006>
14. Zhou G., Zhao Q. Perspectives on therapeutic neutralizing antibodies against the Novel Coronavirus SARS-CoV-2. *Int. J. Biol. Sci.* 2020; 16(10): 1718–23. <https://doi.org/10.7150/ijbs.45123>
15. Walls A.C., Park Y.J., Tortorici M.A., Wall A., McGuire A.T., Veesler D. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell.* 2020; 181(2): 281–92.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>
16. Wong S.K., Li W., Moore M.J., Choe H., Farzan M. A 193-amino acid fragment of the SARS coronavirus S protein efficiently binds angiotensin-converting enzyme 2. *J. Biol. Chem.* 2004; 279(5): 3197–201. <https://doi.org/10.1074/jbc.C300520200>
17. Winkler E.S., Gilchuk P., Yu J., Bailey A.L., Chen R.E., Chong Z., et al. Human neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 require intact

- Fc effector functions for optimal therapeutic protection. *Cell*. 2021; 184(7): 1804–20.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.02.026>
18. Lempp F.A., Soriaga L.B., Montiel-Ruiz M., Benigni F., Noack J., Park Y.J., et al. Lectins enhance SARS-CoV-2 infection and influence neutralizing antibodies. *Nature*. 2021; 598(7880): 342–7. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03925-1>
 19. Коронавирусная инфекция COVID-19: Клинические рекомендации РФ; 2022. Available at: <https://diseases.medelement.com/disease/коронавирусная-инфекция-covid-19-версия-16-кр-рф-2022/17264>
 20. FDA. Fact sheet for health care providers emergency use authorization (EUA) of Bamlanivimab and Etesevimab (Revoked). Available at: <https://fda.gov/media/145802/download>
 21. AstraZeneca. AZD7442 request for emergency use authorization for COVID-19 prophylaxis filed in US. Available at: <https://www.astrazeneca.com/media-centre/press-releases/2021/azd7442-request-for-emergency-use-authorization-for-covid-19-prophylaxis-filed-in-us.html>
 22. Weinreich D.M., Sivapalasingam S., Norton T., Ali S., Gao H., Bhore R., et al. REGN-COV2, a neutralizing antibody cocktail, in outpatients with COVID-19. *N. Engl. J. Med.* 2021; 384(3): 238–51. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2035002>
 23. McMahan K., Yu J., Mercado N.B., Loos C., Tostanoski L.H., Chandrashekar A., et al. Correlates of protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. *Nature*. 2021; 590(7847): 630–4. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-03041-6>
 24. Gottlieb R.L., Nirula A., Chen P., Boscia J., Heller B., Morris J., et al. Effect of Bamlanivimab as monotherapy or in combination with Etesevimab on viral load in patients with mild to moderate COVID-19: A randomized clinical trial. *JAMA*. 2021; 325(7): 632–44. <https://doi.org/10.1001/jama.2021.0202>
 25. ACTIV-3/Therapeutics for Inpatients with COVID-19 (TICO) Study Group. Efficacy and safety of two neutralising monoclonal antibody therapies, sotrovimab and BRII-196 plus BRII-198, for adults hospitalised with COVID-19 (TICO): a randomised controlled trial. *Lancet Infect. Dis.* 2022; 22(5): 622–35. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(21\)00751-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(21)00751-9)
 26. Gupta A., Gonzalez-Rojas Y., Juarez E., Crespo Casal M., Moya J., Falci D.R., et al. Early treatment for COVID-19 with SARS-CoV-2 neutralizing antibody Sotrovimab. *N. Engl. J. Med.* 2021; 385(21): 1941–50. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2107934>
 27. ACTIV-3/Therapeutics for Inpatients with COVID-19 (TICO) Study Group. Efficacy and safety of two neutralising monoclonal antibody therapies, sotrovimab and BRII-196 plus BRII-198, for adults hospitalised with COVID-19 (TICO): a randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis.* 2022; 22(5): 622–35. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(21\)00751-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(21)00751-9)
 28. Medum. Бетеловимаб. Available at: <https://medum.ru/betelovimab>
 29. Маркина У.А., Фомина Д.С., Лебединка М.С., Круглова Т.С., Чернов А.А., Загребина А.И. и др. Эффективность и безопасность регданвимаба у пациентов с легким/среднетяжелым течением COVID-19 и высоким риском прогрессирования заболевания: ретроспективное исследование в условиях стационара кратковременного пребывания. *Терапевтический архив*. 2022; 94(5): 675–82. <https://doi.org/10.26442/00403660.2022.05.201690> <https://elibrary.ru/zxhuje>
 30. Deeks E.D. Casirivimab/Imdevimab: First Approval. *Drugs*. 2021; 81(17): 2047–55. <https://doi.org/10.1007/s40265-021-01620-z>
 31. Zhou W.K., Wang A.L., Xia F., Xiao Y.N., Tang S.Y. Effects of media reporting on mitigating spread of COVID-19 in the early phase of the outbreak. *Math. Biosci. Eng.* 2020; 17(3): 2693–707. <https://doi.org/10.3934/mbe.2020147>
 32. Chen L., Xiong J., Bao L., Shi Y. Convalescent plasma as a potential therapy for COVID-19. *Lancet Infect. Dis.* 2020; 20(4): 398–400. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30141-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30141-9)
 33. Pelegrin M., Naranjo-Gomez M., Piechaczyk M. Antiviral monoclonal antibodies: can they be more than simple neutralizing agents? *Trends Microbiol.* 2015; 23(10): 653–65. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.07.005>
 2. Huang X., Wei F., Hu L., Wen L., Chen K. Epidemiology and clinical characteristics of COVID-19. *Arch. Iran. Med.* 2020; 23(4): 268–71. <https://doi.org/10.34172/aim.2020.09>
 3. Yin S., Huang M., Li D., Tang N. Difference of coagulation features between severe pneumonia induced by SARS-CoV2 and non-SARS-CoV2. *J. Thromb. Thrombolysis*. 2021; 51(4): 1107–10. <https://doi.org/10.1007/s11239-020-02105-8>
 4. Zhang W., Zhao Y., Zhang F., Wang Q., Li T., Liu Z., et al. The use of anti-inflammatory drugs in the treatment of people with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19): The Perspectives of clinical immunologists from China. *Clin. Immunol.* 2020; 214: 108393. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2020.108393>
 5. Liu L., Wei Q., Nishiura K., Peng J., Wang H., Midkiff C., et al. Spatiotemporal interplay of severe acute respiratory syndrome coronavirus and respiratory mucosal cells drives viral dissemination in rhesus macaques. *Mucosal Immunol.* 2016; 9(4): 1089–101. <https://doi.org/10.1038/mi.2015.127>
 6. Mair-Jenkins J., Saavedra-Campos M., Baillie J.K., Cleary P., Khaw F.M., Lim W.S., et al. The effectiveness of convalescent plasma and hyperimmune immunoglobulin for the treatment of severe acute respiratory infections of viral etiology: a systematic review and exploratory meta-analysis. *J. Infect. Dis.* 2015; 211(1): 80–90. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu396>
 7. Chai K.L., Valk S.J., Piechotta V., Kimber C., Monsef I., Doree C., et al. Convalescent plasma or hyperimmune immunoglobulin for people with COVID-19: a living systematic review. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2020; 10: CD013600. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD013600.pub3>
 8. Smolyanova T.I., Bagaeva N.S., Kolganova M.A., Shokhin I.E., Nikolaeva A.M., Vyznikova T.V., et al. Phase I pharmacokinetics study of drug «COVID-Globulin» (specific human immunoglobulin against COVID-19). *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv*. 2022; 11(2): 180–6. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-180-186> <https://elibrary.ru/eetors> (in Russian)
 9. Casadevall A., Pirofski L.A. The convalescent sera option for containing COVID-19. *J. Clin. Invest.* 2020; 130(4): 1545–8. <https://doi.org/10.1172/JCI138003>
 10. Tu Y.F., Chien C.S., Yarmishyn A.A., Lin Y.Y., Luo Y.H., Lin Y.T., et al. A review of SARS-CoV-2 and the ongoing clinical trials. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21(7): 2657. <https://doi.org/10.3390/ijms21072657>
 11. Liu C., Zhou Q., Li Y., Garner L.V., Watkins S.P., Carter L.J., et al. Research and development on therapeutic agents and vaccines for COVID-19 and related human coronavirus diseases. *ACS Cent. Sci.* 2020; 6(3): 315–31. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.0c00272>
 12. The State Register of Medicines. Available at: <https://grls.pharm-portal.ru/> (in Russian)
 13. Tetro J.A. Is COVID-19 receiving ADE from other coronaviruses? *Microbes Infect.* 2020; 22(2): 72–3. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2020.02.006>
 14. Zhou G., Zhao Q. Perspectives on therapeutic neutralizing antibodies against the Novel Coronavirus SARS-CoV-2. *Int. J. Biol. Sci.* 2020; 16(10): 1718–23. <https://doi.org/10.7150/ijbs.45123>
 15. Walls A.C., Park Y.J., Tortorici M.A., Wall A., McGuire A.T., Velesler D. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell*. 2020; 181(2): 281–92.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>
 16. Wong S.K., Li W., Moore M.J., Choe H., Farzan M. A 193-amino acid fragment of the SARS coronavirus S protein efficiently binds angiotensin-converting enzyme 2. *J. Biol. Chem.* 2004; 279(5): 3197–201. <https://doi.org/10.1074/jbc.C300520200>
 17. Winkler E.S., Gilchuk P., Yu J., Bailey A.L., Chen R.E., Chong Z., et al. Human neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 require intact Fc effector functions for optimal therapeutic protection. *Cell*. 2021; 184(7): 1804–20.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.02.026>
 18. Lempp F.A., Soriaga L.B., Montiel-Ruiz M., Benigni F., Noack J., Park Y.J., et al. Lectins enhance SARS-CoV-2 infection and influence neutralizing antibodies. *Nature*. 2021; 598(7880): 342–7. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03925-1>
 19. Coronavirus infection COVID-19: Clinical recommendations of the Russian Federation; 2022. Available at: <https://diseases.medelement.com/disease/коронавирусная-инфекция-covid-19-версия-16-кр-рф-2022/17264> (in Russian)
 20. FDA. Fact sheet for health care providers emergency use authorization (EUA) of Bamlanivimab and Etesevimab (Revoked). Available at: <https://fda.gov/media/145802/download>

REFERENCES

1. WHO. Coronavirus disease (COVID-19). Situation reports. Available at: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports>

21. AstraZeneca. AZD7442 request for emergency use authorization for COVID-19 prophylaxis filed in US. Available at: <https://www.astrazeneca.com/media-centre/press-releases/2021/azd7442-request-for-emergency-use-authorization-for-covid-19-prophylaxis-filed-in-us.html>
22. Weinreich D.M., Sivapalasingam S., Norton T., Ali S., Gao H., Bhoire R., et al. REGN-COV2, a neutralizing antibody cocktail, in outpatients with COVID-19. *N. Engl. J. Med.* 2021; 384(3): 238–51. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2035002>
23. McMahan K., Yu J., Mercado N.B., Loos C., Tostanoski L.H., Chandrashekar A., et al. Correlates of protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. *Nature.* 2021; 590(7847): 630–4. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-03041-6>
24. Gottlieb R.L., Nirula A., Chen P., Boscia J., Heller B., Morris J., et al. Effect of Bamlanivimab as monotherapy or in combination with Etesevimab on viral load in patients with mild to moderate COVID-19: A randomized clinical trial. *JAMA.* 2021; 325(7): 632–44. <https://doi.org/10.1001/jama.2021.0202>
25. ACTIV-3/Therapeutics for Inpatients with COVID-19 (TICO) Study Group. Efficacy and safety of two neutralising monoclonal antibody therapies, sotrovimab and BII-196 plus BII-198, for adults hospitalised with COVID-19 (TICO): a randomised controlled trial. *Lancet Infect. Dis.* 2022; 22(5): 622–35. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(21\)00751-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(21)00751-9)
26. Gupta A., Gonzalez-Rojas Y., Juarez E., Crespo Casal M., Moya J., Falci D.R., et al. Early treatment for COVID-19 with SARS-CoV-2 neutralizing antibody Sotrovimab. *N. Engl. J. Med.* 2021; 385(21): 1941–50. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2107934>
27. ACTIV-3/Therapeutics for Inpatients with COVID-19 (TICO) Study Group. Efficacy and safety of two neutralising monoclonal antibody therapies, sotrovimab and BII-196 plus BII-198, for adults hospitalised with COVID-19 (TICO): a randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis.* 2022; 22 (5): 622–35. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(21\)00751-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(21)00751-9)
28. Medum. Bebtelovimab. Available at: <https://medum.ru/bebtelovimab> (in Russian)
29. Markina U.A., Fomina D.S., Lebedkina M.S., Kruglova T.S., Chernov A.A., Zagrebneva A.I., et al. Efficacy and safety of Regdanvimab in patients with mild/moderate covid-19 and high risk of progression of the disease: a retrospective study in a short-term stay unit. *Terapevticheskii arkhiv.* 2022; 94(5): 675–82. <https://doi.org/10.26442/00403660.2022.05.201690> <https://elibrary.ru/zxhuje> (in Russian)
30. Deeks E.D. Casirivimab/Imdevimab: First Approval. *Drugs.* 2021; 81(17): 2047–55. <https://doi.org/10.1007/s40265-021-01620-z>
31. Zhou W.K., Wang A.L., Xia F., Xiao Y.N., Tang S.Y. Effects of media reporting on mitigating spread of COVID-19 in the early phase of the outbreak. *Math. Biosci. Eng.* 2020; 17(3): 2693–707. <https://doi.org/10.3934/mbe.2020147>
32. Chen L., Xiong J., Bao L., Shi Y. Convalescent plasma as a potential therapy for COVID-19. *Lancet Infect. Dis.* 2020; 20(4): 398–400. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30141-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30141-9)
33. Pelegrin M., Naranjo-Gomez M., Piechaczyk M. Antiviral monoclonal antibodies: can they be more than simple neutralizing agents? *Trends Microbiol.* 2015; 23(10): 653–65. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.07.005>

Информация об авторах:

Попадюк Елена Евгеньевна – научный сотрудник научно-исследовательского отдела ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России, Сергиев Посад-6, Россия. E-mail: 48cnii@mail.ru; <https://orcid.org/0009-0008-1667-7485>

Сизикова Татьяна Евгеньевна – канд. биол. наук, старший научный сотрудник научно-исследовательского отдела ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России, Сергиев Посад-6, Россия. E-mail: 48cnii@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-1817-0126>

Хмелев Алексей Леонидович [✉] канд. мед. наук, научный сотрудник научно-исследовательского отдела ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России, Сергиев Посад-6, Россия. E-mail: hmeleval@mail.ru, 48cnii@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-6686-320X>

Тимофеев Михаил Анатольевич – главный эксперт отдела биологической защиты Управления начальника Войск РХБ защиты ВС РФ, Москва, Россия. E-mail: 48cnii@mail.ru; <https://orcid.org/0009-0004-6103-5984>

Лебедев Виталий Николаевич – д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник научно-исследовательского отдела ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России, Сергиев Посад-6, Россия. E-mail: 48cnii@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-6552-4599>

Борисевич Сергей Владимирович – д-р биол. наук, профессор, академик РАН, начальник ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России, Сергиев Посад-6, Россия. E-mail: 48cnii@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-6742-3919>

Участие авторов: Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Попадюк Е.Е. – формирование концепции статьи, написание текста рукописи; Сизикова Т.Е. – критический пересмотр и коррекция текста рукописи; Хмелев А.Л. – редактирование текста рукописи; Тимофеев М.А. – составление таблиц; Лебедев В.Н. – анализ данных научной литературы по проблематике, переработка текста рукописи; Борисевич С.В. – сбор и анализ научной литературы, окончательное утверждение рукописи для публикации.

Поступила 07.02.2024
Принята в печать 01.04.2024
Опубликована 27.04.2024

Information about the authors:

Elena E. Popadyuk – Researcher at the Research Department of the Federal State Budgetary Institution «48 Central Research Institute» of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Sergiev Posad-6, Russia. E-mail: 48cnii@mail.ru; <https://orcid.org/0009-0008-1667-7485>

Tatyana E. Sizikova – Ph.D. (Biol.), Senior Researcher at the Research Department of the Federal State Budgetary Institution «48 Central Research Institute» of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Sergiev Posad-6, Russia. E-mail: 48cnii@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-1817-0126>

Aleksey L. Khmelev [✉] – Ph.D. (Med.) Researcher at the Research Department of the Federal State Budgetary Institution «48 Central Research Institute» of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Sergiev Posad-6, Russia. E-mail: hmeleval@mail.ru, 48cnii@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-6686-320X>

Mikhail A. Timofeev – Chief expert of the Department of Biological protection of the Department of the Chief of the Armed Forces of the Russian Armed Forces, Moscow, Russia. E-mail: 48cnii@mail.ru; <https://orcid.org/0009-0004-6103-5984>

Vitaliy N. Lebedev – Dr. Sci. (Biol.), Leading Researcher at the Research Department of the Federal State Budgetary Institution «48 Central Research Institute» of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Sergiev Posad-6, Russia. E-mail: 48cnii@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-6552-4599>

Sergey V. Borisevich – Academician of Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biol.), Professor, Head of Federal State Budgetary Establishment «48 Central Scientific Research Institute» of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Sergiev Posad, Russia. E-mail: 48cnii@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-6742-3919>

Contribution: All the authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) criteria for authorship. Popadyuk E.E. – conceptualised the study, drafted the manuscript; Sizikova T.E. – critically reviewed and corrected the manuscript; Khmelev A.L. – edited the manuscript; Timofeev M.A. – prepared the tables; Lebedev V.N. – analysed scientific literature and revised the manuscript; Borisevich S.V. – collected and analysed scientific literature and approved the final version of the manuscript for publication.

Received 07 February 2024
Accepted 01 April 2024
Published 27 April 2024

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

**ORIGINAL STUDY ARTICLE**DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-199>

© ILOUKOU P.J., BOUMBA A.L.M., POUKI F.S., MASSENGO N.R.B., TAKALE R.P., MOUKASSA D., ENNAJI M.M., 2024

Gene expression profiling of *p53* and *c-myc* in HTLV-1 positive blood donors in Congo

Patrina J. Iloukou^{1,2}, Anicet L.M. Boumba^{2,3}, Freddy S. Pouki², Norvi R.B. Massengo², Ragive P. Takale², Donatien Moukassa², Moulay M. Ennaji¹✉¹Laboratory of Virology, Oncology, Biosciences, Environment and New Energy, team of virology, oncology and biotechnology, Faculty of Science and Techniques, Mohammedia, Hassan II University of Casablanca, Casablanca, Morocco;²Department of Health and Human Biology, Faculty of Health Sciences, Marien N'gouabi University, Brazzaville, Congo;³Pointe-Noire Research Zone, National institute for Research in Health Sciences (IRSSA), Brazzaville, Congo

Abstract

Objectives. The HTLV-1 infection persists for life, remaining as asymptomatic viral reservoirs in most patients, ensuring the chain of transmission, but around 4% develop adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL). HTLV-1 is an oncogenic retrovirus that transforms CD4⁺ T lymphocytes and deregulates the lymphoproliferative pathways that contribute to the development of ATLL. To achieve cell transformation, most oncogenic retroviruses use proto-oncogene capture transduction, with proviral integration disrupting the expression of tumor suppressors or proto-oncogenes.

The aim. We conducted this study on the prevalence of HTLV-1 infection in blood donors to expand the HTLV-1 database, assess the risk of transmission via blood products, as well as evaluate the risk of persistent infection or development of neoplastic diseases in HTLV-1 carriers.

Materials and methods. This is a cross-sectional study of blood donors of all categories. For this study, 265 blood donors were recruited at the Centre National de Transfusion Sanguine in Brazzaville. After testing for HTLV-1 antibodies by ELISA, proviral DNA was extracted from all ELISA-positive samples for detection by nested PCR, followed by RT qPCR using specific primers *p53* and *c-myc* for gene expression.

Results. 20/265 were positive for anti-HTLV-1 antibody, 5 donors were positive for proviral DNA. The prevalence of HTLV-1 was 1.8%. All HTLV-1-positive donors were male (1.8%), with a positive correlation ($p = 0.05$); the 1.1% of positive donors were regular, with the majority aged between 31 and 45 years (1.5%), and concubine donors were the most frequent (1.1%). All samples showed normal expression of the *p53* and *c-myc* genes.

Conclusion. The prevalence, though low, remains a serious problem. No abnormal *p53* or *c-myc* gene expression was detected in HTLV-1-positive donors, which could mean that none of the T lymphocytes in these donors had been transformed by HTLV-1.

Keywords: *c-myc*; Congo; Blood donors; Gene expression; HTLV-1; *p53*

For citation: Iloukou P.J., Boumba A.L.M., Pouki F.S., Massengo N.R.B., Takale R.P., Moukassa D., Ennaji M.M. Gene expression profiling of *p53* and *c-myc* in HTLV-1 positive blood donors in Congo. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2024; 69(2): 127–133. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-199> EDN: <https://elibrary.ru/jysjfr>

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

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

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The study was carried out in compliance with the ethical standards for research in the health sciences (NO : 62/UMNG.FSSA.V-DOY). The research protocol was approved by the Internal Committee of the National Blood Transfusion Center (CNTS).

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-199>

Профилирование экспрессии генов *p53* и *c-myc* у HTLV-1-инфицированных доноров крови в Конго

Patrina J. Iloukou^{1,2}, Anicet L.M. Boumba^{2,3}, Freddy S. Pouki², Norvi R.B. Massengo², Ragive P. Takale², Donatien Moukassa², Moulay M. Ennaji^{1✉}

¹Лаборатория вирусологии, онкологии, бионаук, окружающей среды и новой энергии, группа вирусологии, онкологии и биотехнологии, Факультет науки и техники, Мохаммеда, Университет Хасана II в Касабланке, Касабланка, Марокко;

²Кафедра здравоохранения и биологии человека, факультет наук о здоровье, Университет Мариен Нгуаби, Браззавиль, Конго;

³Исследовательская зона Пуэнт-Нуар, Национальный институт исследований в области здравоохранения (IRSSA), Браззавиль, Конго

Резюме

Введение. Инфекция HTLV-1 сохраняется в течение всей жизни человека, обуславливая бессимптомное вирусное носительство у большинства пациентов и обеспечивая цепь передачи. Однако примерно у 4% инфицированных развивается Т-клеточная лейкемия/лимфома взрослых (ATLL). HTLV-1 – это онкоретровирус, который трансформирует CD4⁺-Т-лимфоциты и дерегулирует лимфопрлиферативные пути, что способствует развитию ATLL. Для достижения трансформации клеток большинство онкогенных ретровирусов используют трансдукцию с захватом протоонкогенов, при этом провирусная интеграция нарушает экспрессию опухолевых супрессоров или протоонкогенов.

Цель исследования. Мы провели исследование по определению распространенности HTLV-1-инфекции среди доноров крови с целью расширения базы данных HTLV-1, оценки риска передачи вируса через компоненты крови, а также оценки риска персистенции инфекции или развития неопластических заболеваний у носителей HTLV-1.

Материалы и методы. Настоящая научная работа – перекрестное исследование доноров крови всех категорий. В исследовании участвовали 265 доноров крови из Национального центра переливания крови в Браззавиле. После тестирования на антитела к HTLV-1 методом ИФА во всех положительных в ИФА-образцах проводили определение провирусной ДНК методом «вложенной» ПЦР, а затем методом количественной ОТ-ПЦР с использованием специфических праймеров *p53* и *c-myc* оценивали экспрессию генов.

Результаты. Из 265 доноров 20 человек были положительны по анти-HTLV-1-антителам, у 5 доноров была выявлена провирусная ДНК. Распространенность HTLV-1 составила 1,8%. Все HTLV-1-инфицированные доноры были мужчинами (1,8%), с положительной корреляцией между наличием инфекции и мужским полом ($p = 0,05$); 1,1% положительных доноров были регулярными, большинство в возрасте от 31 до 45 лет (1,5%), и наиболее часто встречались доноры-совместители (1,1%). Во всех образцах наблюдалась нормальная экспрессия генов *p53* и *c-myc*.

Заключение. Распространенность HTLV-1, хотя и низкая, остается значительной проблемой. У HTLV-1-инфицированных доноров не было обнаружено аномальной экспрессии генов *p53* или *c-myc*, что может означать, что ни один из Т-лимфоцитов доноров не был трансформирован HTLV-1.

Ключевые слова: *c-myc*; Конго; доноры крови; экспрессия генов; HTLV-1; *p53*

Для цитирования: Iloukou M.P.J., Boumba A.L.M., Pouki F.S., Massengo N.R.B., Takale R.P., Moukassa D., Ennaji M.M. Профилирование экспрессии генов *p53* и *c-myc* у HTLV-1-инфицированных доноров крови в Конго. *Вопросы вирусологии*. 2024; 69(2): 127–133. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-199> EDN: <https://elibrary.ru/jysjfr>

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

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

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Работа проведена в соответствии с этическими стандартами исследований в области здравоохранения (N0: 62/UMNG.FSSA.V-DOY). Протокол исследования одобрен Internal Committee of the National Blood Transfusion Center (CNTS)

From the collection of a person's blood to its distribution to the recipient, there are numerous safety measures in place to validate the blood supply [1]. With the introduction of serological and molecular tests, at least in high-income countries, detecting several pathogens other than human immunodeficiency virus (HIV), hepatitis B

virus (HBV) and hepatitis C virus (HCV), transfusion-associated infections have become extremely rare. However, in the city of Congo, for untested pathogens, especially those causing emerging infectious diseases such as HTLV-1, it seems that complete control of infectious diseases has not been achieved. Transfusion safety relies

on several measures: education of donors with risk factors for infectious diseases and deferral of their donation, blood testing, interventions to reduce pathogens and patient blood management [2].

Human T lymphoid virus type 1 (HTLV-1) was the first oncogenic retrovirus discovered in humans in 1980 by Americans using CD4⁺ T cell cultures [3]. These cells were derived from the peripheral blood of a patient suffering from a hematological malignancy, initially thought to be a cutaneous T-cell lymphoma associated with leukemia [4–6]. The HTLV-1 virus is the cause of two serious diseases: adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL) and HTLV-1-associated myelopathy, also known as tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) [7].

Once contracted, HTLV-1 infection persists throughout life and remains an asymptomatic viral reservoir in most patients, ensuring the chain of transmission. But around 4% develop adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL), a highly aggressive CD4⁺ T-cell malignancy. HTLV-1 transforms CD4⁺ T lymphocytes, deregulating the lymphoproliferative pathways that contribute to ATLL development [8]. Interestingly, steady-state p53 protein expression is elevated in HTLV-1-transformed human T cells [9]. Hematological malignancies, such as adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL), frequently show overexpression of wild-type (unmutated) p53 and c-myc, as p53 is a downstream target of c-myc.

The main routes of HTLV-1 transmission are: vertical transmission, unprotected sexual intercourse, transfusion of blood or blood products, as well as needle sharing [10]. In particular, a number of factors are thought to be linked to the sexual transmission of HTLV-1 infection, such as the presence of ulcers on the genitals, unprotected sexual intercourse and high blood pressure. Sexual transmission of HTLV-1 infection occurs through ongoing contact with an HTLV-1-infected sexual partner [11, 12].

HTLV-1 is not a ubiquitous virus. It is present throughout the world, with foci of high endemicity often located close to areas where the virus is virtually absent [13, 14]. In these foci, HTLV-1 seroprevalence in adults is estimated to be at least 1–2%, but can also reach 20–40% in people aged over 50 in specific groups. According to the 2014 international estimate the prevalence was 1–2% [15], in 2018 a study reveals 0.07% in southern Italy [16].

Sub-Saharan Africa is considered one of the largest endemicity areas for HTLV-1 infection, with around 2 to 4 million individuals infected with HTLV-1.

Consequently, very few data have been reported to date for large blood donor populations in West or Central Africa [4, 17, 18]. Other studies have revealed a prevalence of 3.6% in Nigeria [19], 0.5% in Uganda [20], 0.16% in Senegal and 1.02% in Sudan [21].

In Congo, very few studies have been carried out on HTLV-1 in terms of transfusion safety, particularly in the donor community. Seven cases were described among Pointe-Noire blood donors in a previous study [22]. Although these data suggest the presence of HTLV-1 in Congo, they do not yet allow systematic screening for antibodies against HTLV-1 at the Centre National de Trans-

fusion (CNTS) in Brazzaville. However, we conducted this study with the objectives of expanding the HTLV-1 database, assessing the risk of transmission via blood products, as well as evaluating the risk of persistent infection or development of neoplastic disease in HTLV-1 carriers.

Materials and methods

– *Study sites:* The study was carried out at the Centre National de Transfusion Sanguine (CNTS) after approval by the center's director.

– *Participants:* In this cross-sectional study, the sampling method was a simple random draw among un-screened of 265 blood donors.

◦ *Inclusion criteria:*

Have given consent

Must be between 18 and 60 years of age;

Physically fit for clinical examination;

Weight greater than or equal to 55 kg;

◦ *Did not give consent*

Be on medication;

Have a chronic disease;

Have had a blood transfusion;

Sexually transmitted disease (STD) risk behavior;

Menstruating, breast-feeding or pregnant women;

We analyzed 265 samples from blood donors of both sexes and aged 18 to 60 years in accordance with national guidelines on blood donation, from the blood bank of the CNTS of Congo in Brazzaville. All donors undergo routine screening in the blood bank, including HBsAg testing, antibodies against HIV-1/2, HCV and VDRL.

1. *Serological screening:* Anti-HTLV-1 antibodies were first determined by ELISA. Four milliliters of blood were collected in additive-free tubes from the blood bag tubing at the time of collection. Results were interpreted according to the manufacturer's instructions.

2. *Genomic DNA extraction:* Only data from blood donors with a negative routine screening test were analyzed for DNA. After routine screening of the blood bank, high-molecular-weight DNA was extracted from frozen peripheral blood leukocytes of all selected, according to the manufacturer's instructions. After extraction, DNA concentration was measured to assess the quality of DNA extracts.

3. *Internal control:* A first PCR was carried out on the DNA extracts as a qualitative test, amplifying the human beta globin gene (268 Pb) GH20: 5'GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC 3' and PC04: 5' CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC 3' to check the quality of our samples. After amplification on the thermocycler, visualization was carried out on a 2% agarose gel. All our samples were positive for beta globin, so they were reliable and of good quality.

4. *HTLV-1 detection:* HTLV-1 infection was determined by nested PCR of the Pol gene (Table 1), using 2 µl of DNA in a complete volume of 25 µl containing 12.5 µl of Green Taq Mix, 6.5 µl of ultrapure water, 2 µl of sense primer and 2 µl of antisense primer.

Both reactions were performed under the following cycling conditions:

For the first nested PCR (**Nid-1: Pol EF + Pol ER**), initial denaturation at 94 °C for 3 min, followed by denaturation, 35 cycles at 94 °C-15s, hybridization at 54 °C for 20s, elongation at 72 °C for 5 min and followed by the final step which is cooling at 4 °C for an indeterminate time.

For the second nested PCR (**Nid-2: Pol IF + Pol IR**), conditions were the same, except for the hybridization step, which this time took place at 52 °C for 20s.

After amplification in a thermal cycler, they were visualized on a 2% agarose gel.

5. RNA extraction and detection of p53 and c-myc messenger RNA (mRNA) expression

One microgram of total RNA was collected from each group after extraction. Expression of p53 and c-myc mRNA, was detected by Quantitative Reverse Transcription PCR (RT-qPCR), combining the effects of reverse transcription and quantitative PCR. Human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was chosen as the internal control. The *c-myc* and *p53* genes were amplified using a one-step kit enabling reverse transcription and PCR to be performed in the same tube.

For a total volume of 20µl in each tube, the reaction mixture contained 10µl of master mix, 2µl of extracted RNA, 0.8µl of each primer (10µM), 1µl of specific probes p53 and c-myc (4µM) (**Table 2**), 4.4µl of RNase-free ddH₂O, 1µl of 20x ROX Reference Dye. Temperature conditions included a first reverse transcription (RT) step; incubation was performed at 42 °C for 30 minutes in one cycle. The second step was the PCR stage, which included an initial pre-denaturation phase at 95 °C for 5 minutes, followed by a first cycle of 45 cycles comprising denaturation at 95 °C for 10 seconds and a hybridization step at 60 °C and 62 °C for c-myc and p53 for 20 seconds. Ultrapure PCR water was included in each assay as a negative control.

Table 1. Primers

Round	Name	5'-3' oligonucleotide sequence
Nest-1 PCR	PolEF	TTTAGGTGCCCAAAGCTGGAG
Nest-1 PCR	PolER	GCAGGATATTGGAAGCCTCAG
Nest-2 PCR	PolIF	GCCCTCATGCCAGTGTTCAC
Nest-2 PCR	PolIR	CCTGGAGATGGGATCAGGTAG

Table 2. Primers and Probes

Genes	Name	5'-3' oligonucleotide sequence
<i>c-myc</i>	F	GA GGA GAC ACC GCCCAC
	R	CAA CAT CGA TTTCTT CCT CAT CTT
	Probe	FAM-CCA GCA GCG ACT CTG AGG AGG AAC A-TAMRA
<i>p53</i>	F	CTG CTC AGA TAG CCG ATG GTC TG
	R	TTG TAG TGG ATG TGG TAC AGT CA
	Probe	FAM-CCC CTC CTC AGC AT CTT ATC CGA GTG G-TAMRA
<i>GAPDH</i>	F	TCC TGC ACC ACC AAC TGC TTA G
	R	CAT CAC RCC ACA GYT TYC CAG AG
	Probe	FAM-AGG TCA TCC ATG ACA ACT TTG GYA TCG-BHQ

Calculation of gene expression fold change: For expression data, the p53 Ct target gene was normalized with GAPDH Ct. The mean Ct values of the *p53* gene and the mean Ct values of the beta-actin gene were compared. The calculation was based on the $\Delta\Delta C_t$ method. The fold change values of all donor samples were calculated relative to the reference gene and also relative to the normal sample.

6. Statistical analysis: The association between the PCR Result variable and the variables gender, age range and type of honorifics and marital status was performed using Pearson's Chi-squared test or Fisher exact test using RStudio 2023.06.0+421 «Mountain Hydrangea» Release with R version 4.2.2. The significance threshold was set at 0.05.

The study was conducted with the informed consent of the patients. The study was carried out in compliance with the ethical standards for research in the health sciences (N0 : 62/UMNG.FSSA.V-DOY). The research protocol was approved by the Internal Committee of the National Blood Transfusion Center (CNTS).

Results

Socio-demographic characteristics of donors: A socio-demographic analysis of the donors revealed a predominance of males, with a sex ratio (M/F) of 1.4. The age range 31 to 45 was the most represented. The average age was 35, with extremes ranging from 18 to 60. Voluntary donors made up the majority of the donor group. According to marital status, the most represented status was single (**Table 3**).

HTLV-1 serological results for blood donors: Of the 265 plasma samples tested by ELISA, 20 were found to be seropositive for HTLV-1.

HTLV-1 molecular detection results: Molecular amplification was performed on DNA extracted from the peripheral blood blast cells (PBBC) of 20 ELISA-positive individuals. The results showed that 5 were positive by nested PCR (for the Pol gene).

Prevalence of HTLV-1 in the study population: On the basis of the serological and molecular results, 5 individuals were considered to be infected with HTLV-1 (**Table 3**). Thus, 5 HTLV-1-infected individuals were included in the epidemiological analysis. This gives an overall prevalence of HTLV-1 infection of 1.8%.

Distribution of variables according to PCR results: All HTLV-1-positive donors were male with a positive correlation ($p = 0.05$). Among positive donor types, regular donors were the most affected, with the majority aged between 31 and 45. Living common-law donors were the most common (Table 3).

Gene expression of p53 and c-myc in positive cases: Expression of the *p53* gene and the *c-myc* gene in positive donors was performed. The Ct value of each case was normalized by the Ct value of the *GAPDH* gene. The results were compared with those of healthy donor samples, and variations in Ct compared with normal samples were obtained. A factor changes greater than 1 indicates up-regulation, and a factor change less than 1 is considered down-regulation. All samples showed normal gene expression.

Discussion

The aim of the present study was to investigate *p53* and *c-myc* gene expression profiles by real-time PCR in HTLV-1 positive blood donors, as no such study has been performed previously. The present study concluded that *p53* and *c-myc* gene expression was normal in all HTLV-1 positive blood donors.

The majority of blood donors were young people aged between 31 and 45, i.e. 47.9%, as observed in most studies carried out at the CNTS, reflecting the Congolese population. Age is unlikely to be a factor affecting the quality of the results, as our study focuses on blood donors, and blood donors are only permitted between the ages of 18 and 60.

The study population was generally made up of male donors. This male superiority, is explained by the many contraindications to blood donation in women (breast-feeding, pregnancy and menstruation). This is in line with several studies carried out at the CNTS [21–24].

The majority of blood donors in the study were volunteers. The latter are considered to represent the general population and present a high risk of transmission. In our study, bachelors made up a large proportion of the study population.

The results obtained from this study show that the prevalence of HTLV-1 was 1.8%, which is similar to that found among blood donors in Sudan, where HTLV-1 seroprevalence was 1.02% [21]. HTLV-1 seroprevalence in this study was relatively comparable to the 2014 international estimate of 1–2% [15]. However, our results are 3.6% lower than those obtained in Nigeria in 2011 [19]. And higher than the level obtained in Uganda and southern Italy, which is 0.5% and 0.07% respectively [16, 20]. This difference can be explained by the difference in the study population.

All HTLV-1-positive donors were male (1.8%), with a positive correlation ($p = 0.05$). This is inconsistent with studies showing a higher prevalence of HTLV-1 in women than in men, explained by more efficient male-to-female transmission during sexual intercourse [25]. However, it is consistent with studies also showing a higher prevalence of HTLV-1 in men than in women [21]. The high presence of HTLV-1 in male blood do-

Table 3. Distribution of variables according to PCR results

	PCR result			P-value
	N/265(%)	Négative (%)	Positive (%)	
Age				0.3
18–30	113 (42.6)	112 (42.3)	1 (0.3)	
31–45	127 (47.9)	123 (46.4)	4 (1.5)	
46–60	25 (9.5)	25 (9.5)	0 (0.0)	
Sex				0.05
Male	155 (58.5)	150 (56.7)	5 (1.8)	
Female	110 (41.5)	110 (41.5)	0 (0.0)	
Marital status				0.2
Single	141 (53.3)	140 (52.8)	1 (0.4)	
Married	43 (16.2)	42 (15.9)	1 (0.3)	
Cohabiting	81 (30.6)	78 (29.5)	3 (1.1)	
Type of donor				0.2
Voluntary	125 (47.2)	123 (46.4)	2 (0.7)	
Family replacement	59 (22.3)	59 (22.4)	0 (0.0)	
Regular	81 (30.5)	78 (29.4)	3 (1.1)	

nors, compared with female blood donors, is probably due to the higher proportion of men than women in blood collection.

The age range most affected by HTLV-1 in our study was 31 to 45 years. A study carried out in Congo also revealed a high prevalence among blood donors in the same age range [22]. This may be explained by the fact that this age range represents the most active population for blood donation in our study.

Cohabiting living donors were the most common, at 1.1%, contrary to other studies showing a high prevalence among bachelors [19–21, 26].

Among donor types, three (3) out of the 5 were regular donors, in contrast to a study showing a high prevalence among voluntary donors [20].

All PCR-positive HTLV-1 samples showed normal *p53* and *Cmyc* gene expression. This may be explained by the fact that T lymphocytes from HTLV-1-positive donors are not yet transformed by the virus. It should be noted that steady-state *p53* protein expression is elevated in HTLV-1-transformed human T lymphocytes [9].


Conclusion

Although HTLV-1 is rare in the city of Congo, according to the present and previous studies, it should not be ignored and, given its transmissibility by blood and sexual transmission, could be a major public health problem in the years to come. No abnormal *p53* or *c-myc* gene expression was detected in HTLV-1-positive donors, which could mean that none of the T cells in these donors had been transformed by HTLV-1. It was also noted that the frequency of HTLV-1 transformation is very low, estimated to be less than 5% [10].

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Seitz R., Heiden M. Quality and safety in blood supply in 2010. *Transfus. Med. Hemother.* 2010; 37(3): 112–7. <https://doi.org/10.1159/000314497>
2. Laperche S., Lefrère J.J., Morel P., Pouchol E., Pozzetto B. Blood transfusion: control of infectious risks. *Presse Med.* 2015; 44(2): 189–99. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2014.06.034> (in French)
3. Coffin J.M. The discovery of HTLV-1, the first pathogenic human retrovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2015; 112(51): 15525–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1521629112>
4. Ampofo W., Nii-Trebi N., Ansah J., Abe K., Naito H., Aidoo S., et al. Prevalence of blood-borne infectious diseases in blood donors in Ghana. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(9): 3523–5. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.9.3523-3525.2002>
5. Diop S., Calattini S., Abah-Dakou J., Thiam D., Diakhaté L., Gessain A. Seroprevalence and molecular epidemiology of human T-Cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 in blood donors from Dakar, Senegal. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44(4): 1550–4. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.4.1550-1554.2006>
6. Arisawa K., Soda M., Endo S., Kurokawa K., Katamine S., Shimokawa I., et al. Evaluation of adult T-cell leukemia/lymphoma incidence and its impact on non-Hodgkin lymphoma incidence in southwestern Japan. *Int. J. Cancer.* 2000; 85(3): 319–24. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0215\(20000201\)85:3<319::aid-ijc4>3.0.co;2-b](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0215(20000201)85:3<319::aid-ijc4>3.0.co;2-b)
7. Tamaki K., Mera H., Takeshita S., Fujioka S., Goto M., Matsumoto T., et al. A refractory human T-cell leukemia virus type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patient with lymphoma-type adult T-cell leukemia/lymphoma: A case report and review of the literature. *Medicine (Baltimore).* 2021; 100(40): e27450. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000027450>
8. Johnson J.M., Harrod R., Franchini G. Molecular biology and pathogenesis of the human T-cell leukaemia/lymphotropic virus Type-1 (HTLV-1). *Int. J. Exp. Pathol.* 2001; 82(3): 135–47. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2613.2001.00191.x>
9. Reid R.L., Lindholm P.F., Mireskandari A., Dittmer J., Brady J.N. Stabilization of wild-type p53 in human T-lymphocytes transformed by HTLV-I. *Oncogene.* 1993; 8(11): 3029–36.
10. Proietti F.A., Carneiro-Proietti A.B., Catalan-Soares B.C., Murphy E.L. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene.* 2005; 24(39): 6058–68. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208968>
11. Carneiro-Proietti A.B., Catalan-Soares B.C., Castro-Costa C.M., Murphy E.L., Sabino E.C., Hisada M., et al. HTLV in the Americas: challenges and perspectives. *Rev. Panam. Salud. Publica.* 2006; 19(1): 44–53. <https://doi.org/10.1590/s1020-49892006000100007>
12. Murphy E.L., Wilks R., Hanchard B., Cranston B., Figueroa J.P., Gibbs W.N., et al. A case-control study of risk factors for seropositivity to human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) in Jamaica. *Int. J. Epidemiol.* 1996; 25(5): 1083–9. <https://doi.org/10.1093/ije/25.5.1083>
13. Desrames A., Cassar O., Gout O., Hermine O., Taylor G.P., Afonso P.V., et al. Northern African strains of human T-lymphotropic virus type 1 arose from a recombination event. *J. Virol.* 2014; 88(17): 9782–8. <https://doi.org/10.1128/JVI.01591-14>
14. Develoux M., Dupont A., Meynard D., Delaporte E. A case of tropical spastic paraparesis associated with HTLV1 in the Niger Republic. *Med. Trop. (Mars).* 1996; 56(1): 100–1. (in French)
15. Gessain A., Cassar O. HTLV-1 world distribution and estimation of the number of asymptomatic infected carriers. *Retrovirology.* 2014; 11(Suppl. 1): O14. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-11-S1-O14>
16. Alessio L., Minichini C., Starace M., Occhiello L., Caroprese M., Di Caprio G., et al. Low prevalence of HTLV1/2 infection in a population of immigrants living in southern Italy. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2018; 12(6): e0006601. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006601>
17. Dumas M., Houinato D., Verdier M., Zohoun T., Josse R., Bonis J., et al. Seroepidemiology of human T-cell lymphotropic virus type I/II in Benin (West Africa). *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 1991; 7(5): 447–51. <https://doi.org/10.1089/aid.1991.7.447>
18. Gessain A., Fretz C., Koulibaly M. Evidence of HTLV-II infection in Guinea, West Africa. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. (1988).* 1993; 6(3): 324–5.
19. Terry A.A., Olusoga O.D., Oluremi A.S., Okanlawon B.M., Uche L.N., Muibi F.A. Seroprevalence of HTLV-I/II amongst Blood Donors in Osogbo, Nigeria. *Sudan J. Med. Sci.* 2011; 6(3): 177–82.
20. Uchenna Tweteise P., Natukunda B., Bazira J. Human T-cell lymphotropic virus types 1 and 2 seropositivity among blood donors at Mbarara regional blood bank, South Western Uganda. *Leuk. Res. Treat.* 2016; 1675326. <https://doi.org/10.1155/2016/1675326>
21. Bmt G. Human T-cell lymphotropic virus types 1 and 2 antibodies seroprevalence among blood donors at national public health blood bank, Khartoum–Sudan 2019. *J. Med. Sci. Res.* 2020; 8(3): 100–4.
22. Mayakia P., Boumba A., Malonga G., Pouki F., Donatien M., Ennaji M.M. Epidemiological profile and seroprevalence of Human T-Lymphotropic Virus type 1 among blood donors in Pointe-Noire, Congo. *Teikyo Med. J.* 2022; 45(07): 6959–66.
23. Angouanda B.M., Bokilo Dzia A., Niama F., Atipo Ibara B.I., Kobawila S.C., Ibara J.R. Évaluation de la stratégie de dépistage du virus de l'hépatite B chez les donneurs de sang à Brazzaville. *Transfusion Clinique et Biologique.* 2015; 22(4): 229. <https://doi.org/10.1016/j.tracli.2015.06.045>
24. Malonga G.A., Dienta S., Traore F.T., Maiga Z., Ba A., Faye O., et al. Human Herpesvirus 8 seroprevalence among blood donors in Mali. *J. Med. Virol.* 2022; 94(9): 4554–8. <https://doi.org/10.1002/jmv.27850>
25. de Lima W.M., Esteves F.A., Torres Mdo C., Pires E.S. Prevalence of human T-cell lymphotropic virus types 1 and 2 in blood donors of the Caruaru Blood Center (Hemope). *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2013; 35(4): 268–71. <https://doi.org/10.5581/1516-8484.20130061>
26. Urwijitaroon Y., Barusux S., Puapairoj C., Romphruk A., Khampeera P. Seroepidemiology of HTLV-I infection in northeast Thailand: a four year surveillance. *J. Med. Assoc. Thai.* 1997; 80(Suppl. 1): S102–5.

Information about the authors:

Moulay Mustapha Ennaji  – M.Sc, PhD, Full professor, Research group leader virology, oncology and biotechnology-Head of Laboratory of Virology, Oncology, Biosciences, Environment and New Energy, Faculty of Science and Technology, Mohammedia, Hassan II University of Casablanca, Casablanca, POBOX 146 Mohammedia (20650) Morocco. E-mail: m.ennaji@yahoo.fr/mymustapha.ennaji@univh2c.ma; <https://orcid.org/0000-0001-5809-0270>

Iloukou Patrina Joseph – M.Sc, Doctorante, Laboratory of Virology, Oncology, Biosciences, Environment and New Energy, Faculty of Science and Technology, Mohammedia, Hassan II University of Casablanca, Casablanca, Morocco, Department of Health and Human Biology, Faculty of Health Sciences, Marien N'gouabi University, Av. des Premiers Jeux Africains, Brazzaville, Congo. E-mail: Josephiloukou1@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-5505-2145>

Boumba Anicet Luc Magloire – M.Sc, PhD, Full professor, Director of the Health Sciences Research Zone, Pointe-Noire research zone, National Institute for Research in Health Sciences (IRSSA), 26, Avenue du Havre Zone Industrielle Route BI, Brazzaville, Congo. Teacher, Department of Health and Human Biology, Faculty of Health Sciences, Marien N'gouabi University, Av. des Premiers Jeux Africains, Brazzaville, Congo. E-mail: anicetboumba1974@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0001-7675-5133>

Freddy S. Pouki – M.Sc, Doctorant, Department of Health and Human Biology, Faculty of Health Sciences, Marien N'gouabi University, Av. des Premiers Jeux Africains, Brazzaville, Congo. E-mail: poukifreddy@gmail.com; <https://orcid.org/0009-0007-4838-2270>

Massengo Norvi Rigobert Bienvenu – M.Sc, Doctorant, Department of Health and Human Biology, Faculty of Health Sciences, Marien N'gouabi University, Av. des Premiers Jeux Africains, Brazzaville, Congo. E-mail: bienvenumassengo@gmail.com; <https://orcid.org/0009-0000-9474-7989>

Ragive Parode Takale – M.Sc, Doctorant, Department of Health and Human Biology, Faculty of Health Sciences, Marien N'gouabi University, Av. des Premiers Jeux Africains, Brazzaville, Congo. E-mail: ragivetakale@gmail.com; <https://orcid.org/0009-0009-5402-9013>

Donatien Moukassa – M.Sc, PhD, Full professor, Head of Health and Human Biology Department, Faculty of Health Sciences, Marien N'gouabi University, Av. des Premiers Jeux Africains, Brazzaville, Congo. E-mail: donatienmoukassa@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0001-6764-7122>

Received 16 February 2024

Accepted 02 April 2024

Published 27 April 2024

Информация об авторах:

Moulay Mustapha Ennaji – канд. мед. наук, профессор, руководитель исследовательской группы вирусологии, онкологии и биотехнологии, заведующий лабораторией вирусологии, онкологии, бионаук, окружающей среды и новой энергии, факультет науки и технологий, Мохаммеда, Университет Хасана II в Касабланке, Касабланка, Марокко. E-mail: m.ennaji@yahoo.fr/mymustapha.ennaji@univh2c.ma; <https://orcid.org/0000-0001-5809-0270>

Poukou Patrina Joseph – докторант, лаборатория вирусологии, онкологии, бионаук, окружающей среды и новой энергии, факультет науки и технологий, Мохаммеда, Университет Хасана II в Касабланке, Касабланка, Марокко, кафедры здравоохранения и биологии человека, факультет наук о здоровье, Университет Мариен Нгуаби, Браззавилле, Конго. E-mail: Josephiloukou1@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-5505-2145>

Boumba Anicet Luc Magloire – канд. мед. наук, профессор, директор исследовательской зоны Пуэнт-Нуар, Национальный институт исследований в области здравоохранения (IRSSA), Браззавилле, Конго; преподаватель кафедры здравоохранения и биологии человека, факультет наук о здоровье, Университет Мариен Нгуаби, Браззавиль, Конго. E-mail: anicetboumba1974@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0001-7675-5133>

Freddy S. Pouki – докторант, кафедра здравоохранения и биологии человека, факультет наук о здоровье, Университет Мариен Нгуаби, Браззавиль, Конго. E-mail: poukifreddy@gmail.com; <https://orcid.org/0009-0007-4838-2270>

Massengo Norvi Rigobert Bienvenu – докторант, кафедра здравоохранения и биологии человека, факультет наук о здоровье, Университет Мариен Нгуаби, Браззавиль, Конго. E-mail: bienvenumassengo@gmail.com; <https://orcid.org/0009-0000-9474-7989>

Ragive Parode Takale – докторант, кафедра здравоохранения и биологии человека, факультет наук о здоровье, Университет Мариен Нгуаби, Браззавиль, Конго. E-mail: ragivetakale@gmail.com; <https://orcid.org/0009-0009-5402-9013>

Donatien Moukassa – канд. мед. наук, профессор, руководитель кафедры здравоохранения и биологии человека, факультет наук о здоровье, Университет Мариен Нгуаби, Браззавиль, Конго. E-mail: donatienmoukassa@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0001-6764-7122>

Поступила 16.02.2023

Принята в печать 02.04.2024

Опубликована 27.04.2024

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-215>

© Юрлов К.И., Якушина С.А., Федорова Н.Е., Кистенева Л.Б., Келли Е.И., Каниболоцкий А.А., Ивкин Е.Н., Антипьят Н.А., Тюрин И.Н., Ларичев В.Ф., Демидова Н.А., Леснова Е.И., Климова Р.Р., Масалова О.В., Куц А.А., 2024

Обнаружение и высокое содержание ДНК герпесвирусов (*Orthoherpesviridae*) в аутопсийных материалах пациентов с летальным исходом COVID-19

Юрлов К.И.^{1✉}, Якушина С.А.^{1,2}, Федорова Н.Е.¹, Кистенева Л.Б.^{1,2}, Келли Е.И.², Каниболоцкий А.А.^{3,4}, Ивкин Е.Н.^{3,4}, Антипьят Н.А.², Тюрин И.Н.², Ларичев В.Ф.¹, Демидова Н.А.¹, Леснова Е.И.¹, Климова Р.Р.¹, Масалова О.В.¹, Куц А.А.¹

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

²ГБУЗ «Инфекционная клиническая больница № 1 ДЗМ», 125367, г. Москва, Россия;

³ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ», 129090, г. Москва, Россия;

⁴ГБУ «Научно-исследовательский институт организации здравоохранения и медицинского менеджмента ДЗМ», 115184, г. Москва, Россия

Резюме

Введение. Вирус SARS-CoV-2 вызывает нарушения иммунитета, создающие условия для реактивации герпесвирусов человека (ГВЧ). Однако влияние ГВЧ на течение и исход COVID-19 оценивается неоднозначно.

Цель исследования – изучение возможной связи между реактивацией ГВЧ у пациентов, инфицированных SARS-CoV-2, и неблагоприятным исходом COVID-19.

Материалы и методы. Посмертные клинические материалы из головного мозга, печени, селезенки, лимфоузлов и легких были получены от 59 пациентов, находившихся на лечении в ГБУЗ ИКБ № 1 ДЗ г. Москвы в 2021–2023 гг. В 1-ю группу включили материалы от 39 пациентов с летальным исходом COVID-19; во 2-ю группу – от 20 пациентов, не инфицированных SARS-CoV-2 и умерших от разных соматических заболеваний. ДНК ГВЧ и РНК SARS-CoV-2 определяли методом ПЦР.

Результаты. В аутопсийных образцах ДНК ГВЧ была обнаружена у всех пациентов в обеих группах. В 1-й группе вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ) чаще обнаруживали в лимфоузлах (94%), вирус герпеса человека 6-го типа (ВГЧ-6) – в печени (68%), цитомегаловирус (ЦМВ) – в лимфоузлах (18%), вирус простого герпеса (ВПГ) – в головном мозге (16%), вирус варицелла-зостера (ВЗВ) – в легких и селезенке (по 3%). Различия в частоте встречаемости ГВЧ между группами были статистически незначимыми. Важные различия установлены при анализе вирусной нагрузки. У 1-й группы количество проб, содержащих более 1000 копий ДНК ГВЧ на 100 тыс. клеток, составляло 52,4%, во 2-й группе – 16,6% ($p < 0,002$). Установлена ассоциация между реактивацией ВПГ и ВГЧ-6 и тяжестью поражения легких. Активация ВЭБ коррелировала с повышением уровней ферментов печени.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о реактивации ГВЧ у пациентов с летальным исходом COVID-19. Обнаружение ГВЧ ассоциировалось с тяжелыми повреждениями легких и печени, что указывает на связь реактивации ГВЧ со смертельными исходами COVID-19.

Ключевые слова: SARS-CoV-2; COVID-19; летальный исход; герпесвирусы человека; частота обнаружения и реактивация герпесвирусов; повреждения легких и печени

Для цитирования: Юрлов К.И., Якушина С.А., Федорова Н.Е., Кистенева Л.Б., Келли Е.И., Каниболоцкий А.А., Ивкин Е.Н., Антипьят Н.А., Тюрин И.Н., Ларичев В.Ф., Демидова Н.А., Леснова Е.И., Климова Р.Р., Масалова О.В., Куц А.А. Обнаружение и высокое содержание ДНК герпесвирусов (*Orthoherpesviridae*) в аутопсийных материалах пациентов с летальным исходом COVID-19. *Вопросы вирусологии*. 2024; 69(2): 134–150. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-215> EDN: <https://elibrary.ru/jxmqzh>

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

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

Этическое утверждение. Исследование проведено при добровольном информированном согласии законных представителей пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ГБУЗ «Инфекционная клиническая больница № 1 ДЗМ» (Протокол № 1 от 01 апреля 2021 г.).

ORIGINAL ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-215>

Kirill I. Yurlov^{1✉}, Sofia A. Yakushina^{1,2}, Natalya E. Fedorova¹, Lidiia B. Kisteneva², Elena I. Kelly², Alexander A. Kanibolotsky^{3,4}, Yevgeniy N. Ivkin^{3,4}, Natalia A. Antipiat², Igor N. Turin², Viktor F. Larichev¹, Natalia A. Demidova¹, Ekaterina I. Lesnova¹, Regina R. Klimova¹, Olga V. Masalova¹, Alla A. Kushch¹

Detection rates and high concentration of herpesvirus (*Orthoherpesviridae*) DNA in autopsy materials from patients with COVID-19 fatal outcome

¹National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, 123098, Moscow, Russia;

²Department of Health, Moscow Infectious Clinical Hospital No. 1, 125367, Moscow, Russia;

³Sklifosovsky Research Institute For Emergency Medicine, «Sklifosovsky Institute», 129090, Moscow, Russia;

⁴Research Institute for Healthcare and Medical Management of Moscow Healthcare Department, 115184, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. SARS-CoV-2 infection causes immune disorders that create conditions for the reactivation of human herpesviruses (HHVs). However, the estimates of the HHVs effect on the course and outcome of COVID-19 are ambiguous.

Aim – to study the possible relationship between the HHV reactivation and the adverse outcome of COVID-19.

Materials and methods. Postmortem samples from the brain, liver, spleen, lymph nodes and lungs were obtained from 59 patients treated at the Moscow Infectious Diseases Hospital No.1 in 2021–2023. The group 1 comprised 39 patients with fatal COVID-19; group 2 (comparison group) included 20 patients not infected with SARS-CoV-2 who died from various somatic diseases. HHV DNA and SARS-CoV-2 RNA were determined by PCR.

Results. HHV DNA was found in autopsy samples from all patients. In group 1, EBV was most often detected in lymph nodes (94%), HHV-6 in liver (68%), CMV in lymph nodes (18%), HSV in brain (16%), VZV in lung and spleen (3% each). The detection rates of HHVs in both groups was similar. Important differences were found in viral load. In patients with COVID-19, the number of samples containing more than 1,000 copies of HHV DNA per 100,000 cells was 52.4%, in the comparison group – 16.6% ($p < 0.002$). An association has been established between the reactivation of HSV and HHV-6 and the severity of lung damage. Reactivation of EBV correlated with increased levels of liver enzymes.

Conclusion. Reactivation of HHVs in patients with fatal COVID-19 was associated with severe lung and liver damages, which indicates a link between HHV reactivation and COVID-19 deaths.

Keywords: SARS-CoV-2; COVID-19; fatal outcome; human herpesviruses; frequency of detection and reactivation of herpesviruses; lung and liver damage

For citation: Yurlov K.I., Yakushina S.A., Fedorova N.E., Kisteneva L.B., Kelly E.I., Kanibolotsky A.A., Ivkin Ye.N., Antipiat N.A., Turin I.N., Larichev V.F., Demidova N.A., Lesnova E.I., Klimova R.R., Masalova O.V., Kushch A.A.

Detection rates and high concentration of herpesvirus (*Orthoherpesviridae*) DNA in autopsy materials from patients COVID-19 fatal outcome. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2024; 69(2): 134–150 (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-215> EDN <https://elibrary.ru/jxmqzh>

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

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

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of legal representatives of patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of Department of Health, Moscow Infectious Clinical Hospital No. 1 (Protocol No. 1 dated April 01, 2021).

Введение

Новая коронавирусная инфекция (COVID-19) – воспалительное респираторное заболевание, вызываемое коронавирусом SARS-CoV-2 (Coronaviridae: *Betacoronavirus*). По данным Всемирной организации здравоохранения, общее число летальных случаев, прямо или косвенно связанных с пандемией COVID-19, в период 2020 по 2021 г. составило при-

близительно 14,9 млн¹. Этому способствовали появление новых вариантов SARS-CoV-2 и высокая скорость передачи вируса. Формы COVID-19 различаются – от бессимптомной инфекции (около 50% случаев) до крайне тяжелых форм, при которых пациентам требуются госпитализация и проведение искусственной вентиляции легких. Показатели летальности, по разным данным, могут составлять от менее 1 до 20% (чаще – около 2%) и в значительной степени зависят от возраста пациента, сопутствующих заболеваний, а также географического региона. У пациентов в тя-

¹<https://www.who.int/news/item/05-05-2022-14.9-million-excess-deaths-were-associated-with-the-covid-19-pandemic-in-2020-and-2021>

желом и крайне тяжелом состоянии старше 75 лет летальность может достигать, по одним данным, 14,8%, по другим – 79,2% [1, 2].

В патогенезе COVID-19 ведущую роль играют многочисленные нарушения иммунитета, среди которых можно отметить следующие: 1) отсутствие координации между врожденными и адаптивными иммунными реакциями [3]; 2) значительно повышенные уровни провоспалительных цитокинов (интерлейкин (IL)-6, IL-1, фактор некроза опухоли альфа (TNF- α)) – «цитокиновый шторм» [4]; 3) нарушения продукции интерферона [5]; 4) дисбаланс между провоспалительными (M1) и противовоспалительными (M2) макрофагами в легких, приводящий к нарушениям функции макрофагов [6]; 5) лимфопения (уменьшение CD4⁺ и CD8⁺-Т клеток, NK-клеток, В-клеток) с функциональным истощением цитотоксических лимфоцитов, которое коррелирует с прогрессированием заболевания [7]; 6) увеличение количества иммуносупрессорных регуляторных Т-клеток (Трег) [8]; 7) ослабление распознавания вирусной РНК через цитоплазматический сенсор RIG-I в инфицированных клетках [9].

Нарушение регуляции иммунной системы при COVID-19, а также иммунодепрессанты (кортикостероиды и антагонисты интерлейкинов), используемые для его лечения, создают условия для развития вторичных инфекций различной природы. В качестве возбудителей оппортунистических инфекций у пациентов с COVID-19 внимание исследователей привлекают герпесвирусы – представители семейства *Orthoherpesviridae*. Герпесвирусы человека (ГВЧ, HHV) широко распространены в человеческой популяции, способны переходить в латентную форму и пожизненно персистировать в организме. При изменениях факторов внешней и внутренней среды, в том числе при заражении патогенами вирусной этиологии и риске гибели клеток, ГВЧ могут реактивироваться [10].

В многочисленных работах сообщается о реактивации ГВЧ в организме пациентов с COVID-19. ДНК ГВЧ 5-го типа – цитомегаловируса (ЦМВ), обнаруживали в клинически значимой концентрации (> 500 копий/мл) в периферической крови (ПК) у 10/218 пациентов с COVID-19 в крайне тяжелом состоянии, 7 из этих 10 пациентов скончались [11]. Описан случай коинфекции SARS-CoV-2 и ЦМВ [12]. У тяжело больного пациента с COVID-19 наблюдали симптомы нарушения функции желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). В сыворотке крови концентрация ДНК ЦМВ достигала высоких значений – 308 000 МЕ/мл. Коинфекция SARS-CoV-2 и ЦМВ проявлялась изъязвлениями слизистой оболочки толстой и подвздошной кишки с воспалительными инфильтратами и цитопатическими эффектами. Специфическое лечение ЦМВ-инфекции ганцикловиром снижало признаки поражения ЖКТ и привело к выздоровлению пациента [12].

У пациентов, инфицированных SARS-CoV-2, исследовали реактивацию ГВЧ 4-го типа – вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ). В образцах плазмы крови определяли ДНК ВЭБ и антитела к литическим генам ВЭБ. Реак-

тивацию ВЭБ выявили у 27,1% пациентов с COVID-19 и только у 12,5% пациентов без COVID-19. По мнению авторов, у пациентов с COVID-19 наблюдается более частая реактивация ВЭБ по сравнению с пациентами с отрицательным результатом на COVID-19 [13, 14].

В публикациях сообщалось об обнаружении герпесвируса человека 6-го типа (ВГЧ-6) у пациентов с COVID-19 [15]. Описан случай заболевания 2-летнего ребенка с неврологическими нарушениями и лихорадкой, у которого в мазке из носоглотки обнаружили РНК SARS-CoV-2 и в спинномозговой жидкости (СМЖ) – высокую концентрацию лимфоцитов. Анализ СМЖ методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) выявил ДНК ВГЧ-6 и антитела IgM к этому вирусу. Лечение ацикловиром в течение 2 нед значительно улучшило состояние ребенка, и он был выписан из больницы [16]. Результаты масштабного исследования, проведенного J. Katz и соавт. [17], показали, что среди 889 пациентов с подтвержденным диагнозом COVID-19 у 25 (2,81%) был установлен клинический диагноз «инфекция, вызванная вирусом простого герпеса 1-го типа» (ВПГ-1) и у 16 пациентов (1,8%) – «инфекция, вызванная вирусом варицелла-зостер» (ВЗВ). В группе сравнения (987,849 пациентов без COVID-19) ВПГ-1-инфекцию обнаружили у 0,77% и ВЗВ-инфекцию – у 0,43% пациентов, различия между группами были высокозначимыми. Авторы сделали вывод, что между реактивацией ВПГ-1, ВЗВ и SARS-CoV-2-инфекцией наблюдается сильная связь.

В 2023 г. была проведена кумулятивная оценка распространения ГВЧ среди пациентов с тяжелым течением COVID-19 на основании результатов 32 исследований [18]. Частота встречаемости ГВЧ составила: ВПГ – 38%, ЦМВ – 19%, ВЭБ – 45%, ВГЧ-6 – 18%, ВГЧ-7 – 44%, ВГЧ-8 – 19%. Авторы заключили, что установление реактивации ГВЧ у пациентов с тяжелым течением COVID-19 полезно при ведении пациентов, в том числе для профилактики осложнений.

Суммируя полученные данные, можно констатировать, что коинфекция SARS-CoV-2 и ГВЧ часто встречается у пациентов с COVID-19, особенно при тяжелом и крайне тяжелом течении заболевания. Однако ее влияние на пациентов с COVID-19 оценивается неоднозначно. Расхождения в оценках объясняются несколькими причинами. В большинстве работ обследованы небольшие группы или единичные пациенты. Используются разные показатели герпесвирусных инфекций: серологические, молекулярные, микроскопические, гистологические. Характеристики пациентов сильно различаются, лечение иммуномодуляторами и иммуносупрессорами также неодинаково. В то же время кортикостероиды и антагонисты интерлейкинов могут способствовать реактивации ГВЧ. Данные о связи между реактивацией ГВЧ и смертностью при COVID-19 противоречивы. Сведения о посмертных исследованиях ГВЧ в материалах от пациентов с COVID-19 единичны. Так, в 3 из 6 изученных аутопсийных материалов от пациентов, скончавших-

ся от COVID-19, выявили антигены ЦМВ методом иммуногистохимии в клетках легких и кишечника [19]. J.D. Haslbauer и соавт. [20] определяли ГВЧ методом гибридизации ДНК *in situ* в посмертных образцах лимфатических узлов от пациентов, умерших от COVID-19 и без COVID-19. В 4/21 (19%) образцах от пациентов, скончавшихся от COVID-19, был обнаружен ВЭБ, в 2/21 (9,5%) – ВПГ. В контрольных образцах ВЭБ был выявлен у 7% пациентов, а ВПГ не был обнаружен ($p = 0,045$).

Цель настоящего исследования – изучение возможной связи между реактивацией ГВЧ у пациентов и неблагоприятным исходом COVID-19.

Материалы и методы

Для достижения цели исследования определяли наличие ГВЧ в органах пациентов с летальным исходом COVID-19, проводили количественный анализ ДНК ГВЧ в аутопсийных образцах от пациентов с COVID-19 (1-я группа, основная) и от пациентов, скончавшихся без COVID-19 (2-я группа, сравнения), а также анализировали взаимосвязь выявления и вирусной нагрузки ГВЧ с тяжестью клинических проявлений заболевания.

Пациенты. В исследование были включены посмертные клинические материалы от 59 пациентов с летальным исходом, находившихся на лечении в ГБУЗ ИКБ № 1 ДЗ г. Москвы в 2021–2023 гг. Из них у 39 скончавшихся пациентов был подтвержден диагноз COVID-19 (1-я группа, основная). У 2 из этих 39 пациентов не удалось получить лабораторные и анамнестические данные, поэтому они не были включены в характеристику пациентов, представленную ниже, однако их результаты по наличию и вирусной нагрузке ГВЧ включены в лабораторную часть. У 20 из 59 умерших пациентов не были обнаружены маркеры SARS-CoV-2 и признаки COVID-19 (2-я группа, сравнения).

Исследование проведено при добровольном информированном согласии законных представителей пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ГБУЗ «Инфекционная клиническая больница № 1 ДЗМ» (Протокол № 1 от 01 апреля 2021 г.). Процедуры исследования на выявление ДНК герпесвирусов были одобрены на заседании Этического комитета, протокол № 6 от 27 декабря 2018 г.

Характеристики пациентов с летальным исходом COVID-19 приведены в **табл. 1**.

В группу сравнения (2-я группа) вошли 20 пациентов (7 мужчин и 13 женщин, медиана возраста – 71 год; от 36 до 87 лет), скончавшихся от следующих неинфекционных заболеваний: гипертоническая болезнь – 3 пациента, гипертоническая болезнь и ишемическая болезнь – 1 пациент, аневризма передней соединительной артерии – 1 пациент, острое поражение миокарда – 1 пациент, цереброваскулярная болезнь – 4 пациента, инфаркт миокарда – 1 пациент, инфаркт головного мозга – 5 пациентов, энцефалопатия (алкогольная) – 1 пациент, онкологические заболевания – 3 пациента.

Клинические материалы. Вскрытие тел скончавшихся пациентов проводили в соответствии с руководством по вскрытию, сбору и представлению образцов, а также с соблюдением мер биобезопасности на базе ИКБ № 1 г. Москвы. Аутопсийные материалы были получены из легких, лимфатических узлов, селезенки, печени и головного мозга, всего от пациентов обеих групп – 281 образец. Образцы сразу после вскрытия доставляли в лабораторию, замораживали и хранили при температуре $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ до исследования.

Определение ДНК ГВЧ методом ПЦР. Кусочки замороженных тканей размораживали и измельчали. Измельченные материалы делили на 2 равные части. Из одной части выделяли ДНК с использованием набора «АмплиСенс ДНК-сорб-В» («Интерлабсервис», Москва) в соответствии с инструкцией производителя. Реакцию ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени проводили, используя набор реагентов для качественного определения ДНК ВПГ («АмплиСенс HSV I, II-FL», «Интерлабсервис», Москва) и качественного определения ДНК ВЗВ («АмплиСенс VZV-FL», «Интерлабсервис», Москва). Поскольку набор для анализа ВПГ выявляет как ВПГ-1, так и ВПГ-2, в дальнейшем для этих 2 вирусов использовали общее обозначение – ВПГ. Для выявления и количественного определения ДНК ВЭБ, ЦМВ и ВГЧ-6 использовали набор («АмплиСенс EBV/CMV/HHV6-скрин-FL», «Интерлабсервис», Москва), который количественно определяет, помимо ВЭБ и ЦМВ, также ВГЧ-6А и ВГЧ-6В. В дальнейшем для ВГЧ-6А и ВГЧ-6В использовали обозначение ВГЧ-6. Ген β -глобина использовали в качестве эндогенного внутреннего контроля. Предел обнаружения составлял 1 копия/реакция. Для реакции использовали 10 мкл выделенной ДНК.

Определение РНК SARS-CoV-2 методом ПЦР. Диагноз COVID-19 был подтвержден прижизненно у пациентов в ИКБ № 1 установленными лабораторными методами, у скончавшихся пациентов РНК SARS-CoV-2 определяли в тех же аутопсийных образцах, в которых определяли ДНК ГВЧ. Использовали метод ПЦР с обратной транскрипцией. Из второй части размороженных и измельченных кусочков выделяли РНК SARS-CoV-2 и определяли вирусную РНК с использованием набора «АмплиТест SARS-CoV-2» (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, Москва) в соответствии с инструкцией производителя.

Статистическая обработка данных. Категориальные переменные, такие как пол и частота выявления различных характеристик, были проверены с использованием теста Манна–Уитни, парного теста Вилкоксона, точных тестов χ^2 и Фишера. Для проверки на нормальность распределения концентрации ДНК ГВЧ использовали тест нормальности Колмогорова. Подсчет средних и медианных значений, а также стандартных отклонений проводили с использованием пакета Statistica 12.6 (StatSoft Inc., Tulsa, США). Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Таблица 1. Демографические, клинические и серологические характеристики пациентов с COVID-19 (1-я группа)

Table 1. Demographic, clinical and serological characteristics of COVID-19 patients (group 1)

Демографические и клинические показатели Demographic and clinical indicators			
Показатель Indicator		Медиана (мин–макс) Median (min–max)	
Возраст, лет Age, years		77 (39–91)	
Пол Gender		Мужчин – 18, женщин – 21 Men – 18, woman – 21	
Продолжительность болезни, сут Duration of illness, days		19 (6–33)	
ИВЛ более 1 сут UPV for more than 1 day		9 (24%) пациентов 9 (24%) patients	
Показатели крови Blood counts			
Показатель Index		Медиана (мин–макс) Median (min–max)	Референс–значения Reference–values
Лейкоциты, 10 ⁹ /л Leukocytes, 10 ⁹ /l		14,7 (1,4–45,6)	4–9
Нейтрофилы, % Neutrophils, %		87,35 (63,0–95,4)	47–72
Лимфоциты, % Lymphocytes, %		6 (1–32)	19–45
Моноциты, % Monocytes, %		3 (1–5,9)	3–11
Гемоглобин, г/л Hemoglobin, gl		127 (76–164)	117–161
Тромбоциты, 10 ⁹ /л Platelets, 10 ⁹ /l		159 (40–462)	150–400
С-реактивный белок, мг/л C-reactive protein mg/l		29 (1–316)	0–5
D-димер, нг/мл D-dimer, ng/ml		970 (350–5250)	0–240
Прокальцитонин, нг/мл Procalcitonin, ng/ml		0,267 (0–2,224)	0,00–0,05
Жирным шрифтом выделены значения, отличающиеся от референс-значений Values that differ from the reference values are highlighted in bold			
Показатели повреждения легких Indicators of lung damage			
Показатель Index		Абсолютное значение, n = 37 Absolute value, n = 37	
КТ3, КТ3/4, КТ4 СТ3, СТ3/4, СТ4		15/37	
КТ0, КТ1, КТ2 СТ0, СТ1, СТ2		22/37	
Выпот в плевральной полости Effusion in the pleural cavity		12/37	
Сопутствующие заболевания и осложнения Concomitant diseases and complications			
Диагноз Diagnosis		Абсолютное значение, n = 37 Absolute value, n = 37	
Ишемическая болезнь сердца Coronary heart disease		32/37	
Гипертоническая болезнь Hypertension		34/37	
Цереброваскулярная болезнь Cerebrovascular disease		21/37	
Диабет Diabetes		11/37	
Хроническая болезнь почек Chronic kidney disease		11/37	

Продолжение табл. 1 см. на стр. 139.

Ожирение Obesity		11/37
Хроническая обструктивная болезнь легких Chronic obstructive pulmonary disease		9/37
Бактериальные осложнения Bacterial complications		33/37
	Терапия Therapy	
	Показатель Index	Абсолютное значение, $n = 37$ Absolute value, $n = 37$
Противовирусная терапия (риамилловир, фавипиравир, ремдесивир) Antiviral therapy (riamilovir, favipiravir, remdesivir)		32/37
Антибактериальная терапия Antibacterial therapy		35/37
Глюкокортикостероиды Glucocorticosteroids		34/37
Упреждающая противовоспалительная терапия (тоцилизумаб, барицитиниб, олокизумаб) Proactive anti-inflammatory therapy (tocilizumab, baricitinib, olokizumab)		27/37
Антикоагулянтная терапия (гепарин, эноксапарин натрия, аписабан) Anticoagulant therapy (heparin, enoxaparin sodium, apixaban)		37/37
Жаропонижающая, муколитическая терапия Antipyretic, mucolytic therapy		37/37

Результаты

Частота обнаружения герпесвирусов человека у пациентов с летальным исходом COVID-19 и без COVID-19

Проведено сравнительное исследование посмертных образцов от 39 пациентов, умерших от COVID-19 (1-я группа), и от 20 пациентов группы сравнения, у которых РНК SARS-CoV-2 и симптомы COVID-19 обнаружены не были (2-я группа). ДНК ГВЧ (ВПГ-1, ВПГ-2, ВЗВ, ВЭБ, ЦМВ, ВГЧ-6А и ВГЧ-6В) определяли в образцах из легких, печени, лимфоузлов, селезенки и головного мозга. В 1-й группе суммарно во всех изученных органах по крайней мере по одному типу ГВЧ были обнаружены у всех 39 пациентов, 2 типа ГВЧ – у 22 пациентов, 3 типа ГВЧ – у 13 пациентов и 4 типа ГВЧ – у одного пациента (табл. 2). Во 2-й группе по одному типу ГВЧ также были обнаружены у всех пациентов, 2 типа ГВЧ – у 7 пациентов, 3 типа ГВЧ – у 8 пациентов и 4 типа ГВЧ – у двух пациентов. Различия по частоте встречаемости ДНК ГВЧ между группами оказались статистически незначимы ($p > 0,05$).

Оценивали распространение каждого изученного типа ГВЧ в органах суммарно как встречавшихся индивидуально, так и в сочетаниях с другими ГВЧ. Результаты показали (рис. 1), что в 1-й группе значительно чаще выявляли ДНК ВЭБ и ВГЧ-6 – у 95 и 85% пациентов, соответственно, по сравнению с ЦМВ, ВЗВ и ВПГ – у 28, 5 и 21% пациентов соответственно ($p < 0,05$). Частота определения ДНК ГВЧ в органах пациентов 2-й группы составляла: ВЭБ и ВГЧ-6 – 85 и 100% соответственно, ДНК ЦМВ, ВЗВ и ВПГ – 35, 0 и 25% соответственно. Различия между 1-й и 2-й группами по частоте обнаружения ГВЧ оказались незначимы ($p > 0,05$). В обеих группах значительно чаще встречались ВЭБ и ВГЧ-6 по сравнению с другими ГВЧ ($p < 0,05$) (рис. 1).

Таблица 2. Частота обнаружения ГВЧ у пациентов с летальным исходом COVID-19 (1-я группа) и у пациентов без SARS-CoV-2 (2-я группа)

Table 2. HHV detection rates in patients with fatal outcome of COVID-19 (group 1) and in patients without SARS-CoV-2 (group 2)

Герпесвирусы человека Human herpesviruses	1-я группа Group 1 ($n = 39$)		2-я группа Group 2 ($n = 20$)	
	n	%	n	%
ВГЧ-6 HHV-6	0	0,0	3	15
ВЭБ EBV	2	5,1	0	0
ЦМВ CMV	1	2,6	0	0
ВГЧ-6 + ВЭБ HHV-6 + EBV	20	51,3	7	35
ВЭБ + ЦМВ EBV + CMV	1	2,6	0	0
ВЭБ + ВПГ EBV + HSV	1	2,6	0	0
ЦМВ + ВГЧ-6 + ВПГ CMV + HHV-6 + HSV	1	2,6	0	0
ВГЧ-6 + ВЭБ + ЦМВ HHV-6 + EBV + CMV	5	12,8	5	25
ВГЧ-6 + ВЭБ + ВЗВ HHV-6 + EBV + VZV	2	5,1	0	0
ВГЧ-6 + ВЭБ + ВПГ HHV-6 + EBV + HSV	5	12,8	3	15
ВГЧ-6 + ВЭБ + ЦМВ + ВПГ HHV-6 + EBV + CMV + HSV	1	2,6	2	10

Распределение герпесвирусов человека в различных органах пациентов

Анализ ДНК ГВЧ показал (табл. 3), что в легких, лимфоузлах и в селезенке у пациентов с летальным

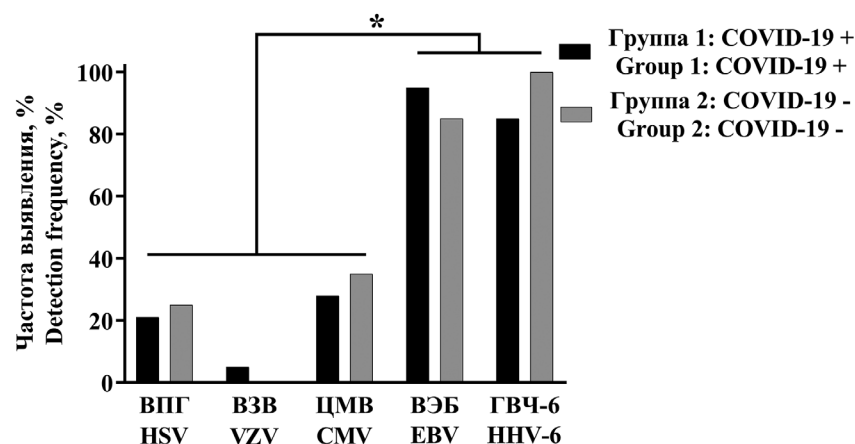


Рис. 1. Частота обнаружения герпесвирусов в аутопсийных материалах у пациентов с летальным исходом COVID-19 (1-я группа) и без COVID-19 (2-я группа).

По горизонтали – обозначения герпесвирусов; по вертикали – частота выявления ДНК герпесвирусов (в %). COVID-19(+) – пациенты 1-й группы с летальным исходом COVID-19; COVID-19(-) – пациенты 2-й группы, скончавшиеся без COVID-19. * – $p < 0,05$.

Fig. 1. The frequency of herpesvirus detection in autopsy materials in patients with COVID-19 fatal outcome (group 1) and without COVID-19 (group 2).

Horizontally – the designation of herpesviruses; vertically – the frequency of detection of herpesvirus DNA, in %. COVID-19(+) – 1st group patients with fatal COVID-19; COVID-19(-) – 2nd group patients who died without COVID-19. * – $p < 0.05$.

Таблица 3. Сравнительный анализ частоты обнаружения ГВЧ в органах у пациентов с летальным исходом COVID-19 (1-я группа) и у пациентов, скончавшихся без COVID-19 (2-я группа)

Table 3. Comparative analysis of HHV detection rates in different organs of patients with COVID-19 fatal outcome (group 1) and in patients who died not from COVID-19 (group 2)

Органы, количество образцов Organs, number of samples		Частота обнаружения ДНК ГВЧ, n (%) [*] HHV DNA detection rates, n (%) [*]				
		ВПГ-1/2 HSV1/2	ВЗВ VZV	ВЭБ EBV	ЦМВ CMV	ГВЧ-6 HHV-6
Легкие Lung	1-я группа group 1 (n = 39)	6 (15)	1 (3)	30 (77)**	6 (15)	16 (41)
	2-я группа group 2 (n = 19)	4 (22)	0	5 (26)**	6 (32)	7 (37)
Печень Liver	1-я группа group 1 (n = 37)	3 (8)	0	18 (49)	6 (16)	25 (68)
	2-я группа group 2 (n = 20)	2 (10)	0	9 (45)	3 (15)	17 (85)
Лимфоузлы Lymph nodes	1-я группа group 1 (n = 35)	4 (11)	0	33 (94)	7 (18)**	13 (37)
	2-я группа group 2 (n = 17)	2 (12)	0	15 (88)	0**	7 (41)
Селезенка Spleen	1-я группа group 1 (n = 36)	2 (6)	1 (3)	24 (67)	3 (8)	10 (28)**
	2-я группа group 2 (n = 20)	2 (10)	0	16 (80)	4 (20)	14 (70)**
Головной мозг Brain	1-я группа group 1 (n = 38)	6 (16)	0	9 (24)	2 (5)	7 (18)**
	2-я группа group 2 (n = 20)	2 (10)	0	2 (10)	0	0**

Примечание. * – указано количество всех изученных ГВЧ в каждом органе, включая встречавшиеся в одном органе по 2, 3 или 4 типам ГВЧ; ** – значения, статистически значимо различающиеся между группами ($p < 0,05$).

Note. * – the number of all studied HHVs in each organ is indicated, including 2, 3 or 4 HHVs identified in one organ; ** – values that differ statistically between groups ($p < 0.05$).

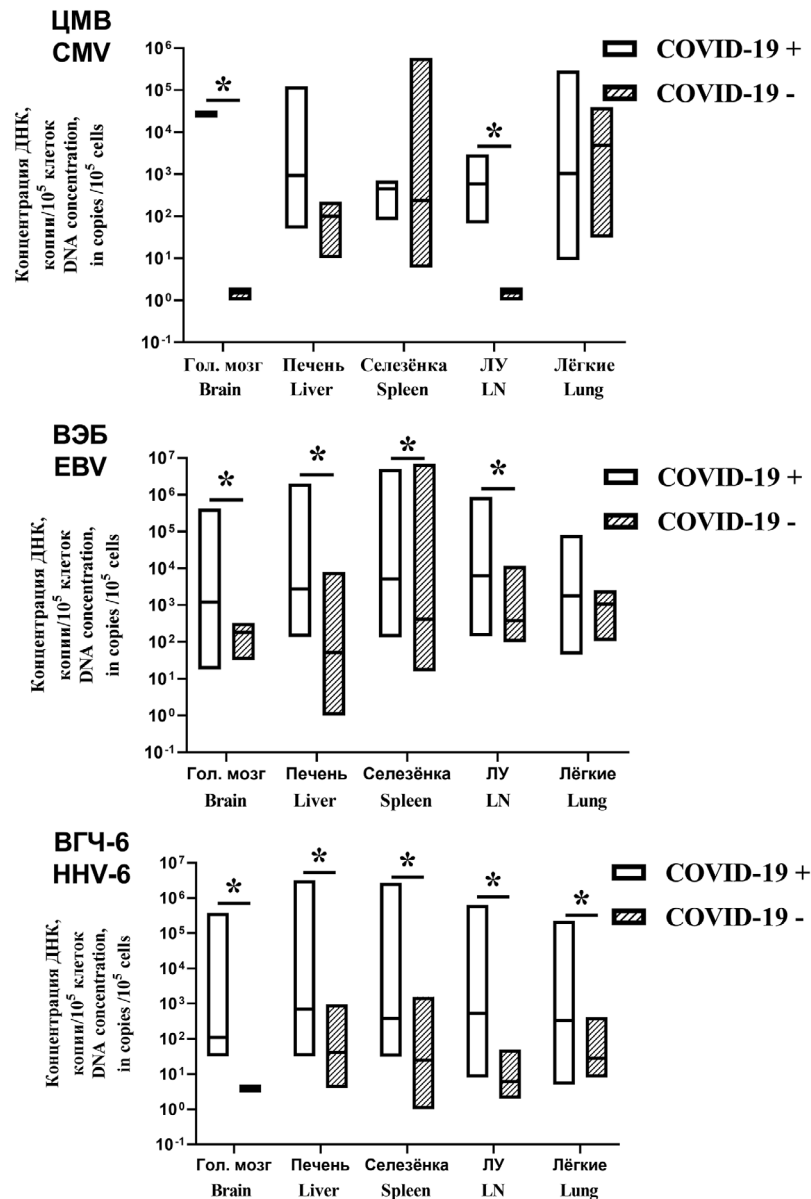


Рис. 2. Концентрации ДНК герпесвирусов в органах пациентов, умерших с подтвержденным диагнозом COVID-19 (COVID+) или в результате соматических неинфекционных заболеваний (COVID-).

По горизонтали – обозначения органов, из которых получены аутопсийные материалы; по вертикали – количество ДНК ГВЧ в копиях на 100 тыс. клеток. Представлены минимальные и максимальные значения концентрации ДНК, линии обозначают медианы. * – $p < 0,05$.

Fig. 2. Concentrations of herpesvirus DNA in the organs from patients who died with a confirmed diagnosis of COVID-19 (COVID +) or as a result of somatic non-infectious diseases (COVID-).

On X-axis – the designations of the organs from which autopsy materials were obtained; on Y-axis – the amount of HHV DNA in copies per 100 thousand cells. The minimum and maximum values of DNA concentration are presented, the lines indicate the medians. * – $p < 0.05$.

исходом COVID-19 чаще других типов ГВЧ встречался ВЭБ ($p < 0,05$). В печени чаще всего определяли ВГЧ-6 ($p < 0,05$), в головном мозге – ВЭБ и ВГЧ-6. У пациентов без COVID-19 (2-я группа) в целом вирусы распределялись по органам сходным образом, однако было отмечено несколько отличий. Так, у пациентов 1-й группы достоверно чаще по сравнению со 2-й группой ($p < 0,05$) в легких выявляли геном ВЭБ, в лимфоузлах – ЦМВ, а в образцах головного мозга – ВГЧ-6. У пациентов из группы срав-

нения в селезенке чаще обнаруживался геном ВГЧ-6 ($p < 0,05$).

Количественный анализ ДНК ГВЧ в органах пациентов

Для оценки вирусной нагрузки проведен количественный анализ ДНК ГВЧ ВЭБ, ЦМВ и ВГЧ-6, который показал, что в большинстве органов у пациентов с COVID-19 медианные концентрации ДНК ВЭБ и ВГЧ-6 были выше, чем у пациентов в группе

Таблица 4. Сравнительный анализ вирусной нагрузки ГВЧ в органах пациентов с летальным исходом COVID-19 (1-я группа) и пациентов, скончавшихся без COVID-19 (2-я группа)

Table 4. Comparative analysis of the HHV viral load in the organs from patients with COVID-19 fatal outcome (group 1) and patients who died not from COVID-19 (group 2)

Концентрация ДНК ГВЧ, копии/100 тыс. клеток Concentration of HHV DNA, in copies/100 thousand cells	Количество образцов, содержащих ДНК ГВЧ The number of samples containing HHV DNA			
	1-я группа group 1 (n = 185)		2-я группа group 2 (n = 96)	
	n	%	n	%
0	47	25,4	33	34,4
1–1000	41	22,2**	47	49,0**
1001–10 000	45	24,3*	10	10,4*
> 10 000	52	28,1**	6	6,2**

Примечание: * – $p = 0,002$; ** – $p < 0,001$.

Notes: * – $p = 0,002$; ** – $p < 0,001$

сравнения ($p < 0,05$). Концентрации ДНК ЦМВ в печени, селезенке и в легких, а также ДНК ВЭБ в легких не различались (рис. 2).

Важные данные были получены при анализе вирусной нагрузки ГВЧ у пациентов в 1-й и 2-й группах. У пациентов с COVID-19 количество проб, содержащих более 1000 и более 10 000 копий ДНК ГВЧ на 100 тыс. клеток суммарно составляло 52,4%, тогда как в группе сравнения аналогичный показатель составил 16,6%. Различия между группами были высокозначимы (табл. 4).

Полученные данные указывают на присутствие ГВЧ в клинически значимых количествах в органах пациентов, скончавшихся от COVID-19, а также о реактивации у них ГВЧ. В то же время в группе сравнения в 80 из 96 образцов (83%) содержание ДНК ГВЧ было менее 1000 на 100 тыс. клеток. Эти данные позволяют предположить, что у большинства пациентов без COVID-19 ГВЧ, по-видимому, находились в латентном состоянии.

Сравнительный анализ герпесвирусов человека у пациентов с повреждениями легких и печени

Для оценки ГВЧ как факторов риска тяжелого течения и неблагоприятного исхода COVID-19 сравнивали результаты выявления ГВЧ у пациентов с разной степенью повреждения легких, о которой судили по показателям компьютерной томографии (КТ). Анализ данных КТ легких показал, что у 15/37 (41%) пациентов картина КТ соответствовала среднетяжелым и тяжелым повреждениям – более 50% поражения объема легких (КТ3, КТ3/4, КТ4); у 22/37 (59%) – легким и умеренным повреждениям или их отсутствию (0–50%; КТ0, КТ1, КТ2). В секционных образцах легких ГВЧ были обнаружены у 21/37 (56,7%) пациентов: у 10 пациентов с КТ3, КТ3/4, КТ4 и у 11 – с КТ0, КТ1, КТ2. Частота встречаемости ЦМВ, ВЭБ и ВГЧ-6 в группах пациентов с тяжелыми и умеренными повреждениями легких статистически значимо не различалась. Сравнение медианных значений ДНК ВЭБ

и ЦМВ также не выявило статистически значимых различий между пациентами с тяжелыми и легкими повреждениями легких. В то же время выявлены различия при сравнении вирусной нагрузки ВГЧ-6 в образцах. Концентрация ДНК ВГЧ-6 у пациентов с КТ3, КТ3/4, КТ4 была в 3,1 раза больше по сравнению с пациентами с КТ0, КТ1, КТ2: медиана 705 (мин. 280 – макс. 223 509) копий на 100 тыс. клеток против медианы 226 (мин. 5 – макс. 537) копий на 100 тыс. клеток соответственно). Различия были статистически значимы ($p = 0,02$). Интересные данные получили также при изучении ВПГ. Так, ВПГ был выявлен у 5/15 (33%) пациентов с тяжелыми повреждениями легких (КТ3, КТ3/4, КТ4) и у 1/22 (4,5%) пациента при легких повреждениях (КТ0, КТ1, КТ2) (ОШ 10; 95% ДИ 1,02–97,5; $p < 0,05$). Полученные результаты свидетельствуют о том, что тяжелые повреждения легких ассоциированы с присутствием ВПГ и ВГЧ-6.

Одним из патологических проявлений при COVID-19 является плевральный выпот [21]. Плевральный выпот был диагностирован у 11/37 пациентов с COVID-19 (30%). Анализ частоты встречаемости всех изученных ГВЧ показал, что статистически значимые различия были выявлены при диагностике ВПГ-инфекции. У пациентов с плевральным выпотом ДНК ВПГ была обнаружена в 36% (4/11) случаев, без плеврального выпота – в 8% (2/26) случаев (ОШ 6,9; 95% ДИ 1,03–45,6; $p = 0,04$), что свидетельствует об ассоциации ВПГ с нарушениями функции легких. Частота встречаемости других типов ГВЧ не коррелировала с плевральным выпотом.

Изучение вирусной нагрузки 3 типов ГВЧ (ВЭБ, ЦМВ и ВГЧ-6) у пациентов с плевральным выпотом и без такового показало, что вирусная нагрузка ВЭБ и ЦМВ была больше у пациентов с плевральным выпотом по сравнению с пациентами без него: медианные концентрации ВЭБ составили 2396 против 1114 копий ДНК на 100 тыс. клеток соответственно; ЦМВ – 146 629 против 931 копий ДНК на 100 тыс. клеток соответственно, однако статистической значимости различия

не достигали. В то же время плевральный выпот ассоциировался с высокими концентрациями ВГЧ-6 в легких. Так, реактивация ВГЧ-6 наблюдалась у 2/11 (18%) пациентов с плевральным выпотом (вирусная нагрузка более 1000 копий на 100 тыс. клеток), но ни у одного из 26 пациентов без гидроторакса. Статистический анализ показал, что появление плеврального выпота ассоциируется с реактивацией ВГЧ-6 ($p = 0,026$).

Важными показателями повреждения печени являются уровни ферментов аланин- (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ). У 36 пациентов с летальным исходом COVID-19 был проведен количественный анализ концентраций АЛТ и АСТ в сыворотке крови. Повышенный уровень АЛТ и АСТ (> 50 ед/мл) был обнаружен у 19/36 пациентов (53%). Сравнивали концентрации ДНК ГВЧ в образцах печени у пациентов с нормальными и высокими показателями активности ферментов. Связь между медианными концентрациями ЦМВ и ВГЧ-6 и повышенными уровнями ферментов не обнаружили. Установили, что в образцах печени у 6/19 пациентов (32%) с показателями АСТ/АЛТ > 50 ед/мл выявлялся высокий уровень ДНК ВЭБ: медианные значения составили 19 793 (10 714–2 020 609) копий на 100 тыс. клеток. Из 17 пациентов, у которых показатели печени были в норме, только у 1/17 (6%) было выявлено более 1000 копий ДНК ВЭБ. Повышение уровня изученных ферментов печени статистически значимо чаще ассоциировалось с активацией ВЭБ ($p = 0,042$).

Таким образом, у пациентов с летальным исходом COVID-19 присутствие ГВЧ ассоциировалось с тяжелыми повреждениями легких и печени.

Частота выявления РНК SARS-CoV-2

У 39 пациентов с летальным исходом COVID-19 в секционных материалах определяли наличие РНК SARS-CoV-2. Показано, что у 28 пациентов (72%) была обнаружена РНК хотя бы в одном из органов. У одного пациента SARS-CoV-2 выявили во всех аутопсийных материалах, у 11/39 (28%) пациентов не выявили РНК SARS-CoV-2 ни в одном органе.

Анализ частоты встречаемости РНК SARS-CoV-2 в разных органах показал, что в образцах из легких, головного мозга, печени и лимфоузлов частота была приблизительно одинаковой и составила 38% (15/39), 32% (12/38), 35% (13/37) и 31% (11/35) соответственно, в образцах из селезенки была ниже – 14% (5/36). Эти данные подтверждают политропную природу вируса и свидетельствуют о SARS-CoV-2-инфекции как о системном заболевании.

Анализ содержания РНК SARS-CoV-2 продемонстрировал, что вирусная РНК в тканях легкого выявлялась на относительно высоком уровне, соответствующем пороговому циклу (Ct) $22,9 \pm 5,5$, что статистически значимо не отличалось от уровня РНК в образцах головного мозга и лимфоузлов: Ct $26,3 \pm 5,6$ и Ct $25,2 \pm 5,9$ соответственно. В то же время в тканях печени (Ct $28,0 \pm 5,9$) и селезенки (Ct $31,6 \pm 4,6$) уровень РНК SARS-CoV-2 был значимо ниже ($p < 0,05$).

Представляло интерес сопоставить данные по выявлению ДНК ГВЧ и РНК SARS-CoV-2 в одних и тех же образцах. Оказалось, что из 56 образцов, положительных на SARS-CoV-2, большинство – 48 (86%) – содержали ДНК ГВЧ. Наиболее часто обнаруживалась коинфекция ВЭБ и SARS-CoV-2 – в 19/48 (39,6%) образцов, ЦМВ и ВГЧ-6 – значительно реже – в 4 и в 2 образцах соответственно. Интересно, что в образцах, инфицированных SARS-CoV-2, нередко встречались по 2 типа ГВЧ – в 17/48 (35%) образцах и даже по 3 типа ГВЧ – в 5/48 (10%) образцах. Коинфекция SARS-CoV-2 и ГВЧ, по-видимому, вызывает более серьезные осложнения у больных COVID-19 по сравнению с моноинфекцией SARS-CoV-2 и может приводить к летальному исходу заболевания.

Обсуждение

В настоящей работе у каждого из 39 пациентов с летальным исходом COVID-19 были обнаружены геномные ДНК ГВЧ. Наиболее часто и в высоких концентрациях встречались ВЭБ и ВГЧ-6: в аутопсийных образцах из всех органов индивидуально и в сочетаниях с другими ГВЧ ВЭБ и ВГЧ-6 были выявлены у 95 и 85% пациентов соответственно. Высокая частота обнаружения ДНК ВЭБ была показана также в других исследованиях. Так, ДНК ВЭБ была обнаружена у 40/42 (95%) пациентов, инфицированных SARS-CoV-2, в отделении интенсивной терапии [22], и у 28/34 (82,4%) пациентов с тяжелым течением COVID-19 [23]. Одним из объяснений высокой частоты распространения ВЭБ и ВГЧ-6 может быть их тропизм: ВЭБ поражает преимущественно В-лимфоциты, ВГЧ-6 – Т-лимфоциты. Лимфотропность обеспечивает быстрое распространение вирусов по организму, вхождение в органы и ткани и персистенцию в качестве резидентных клеток, где они могут сохраняться в латентном состоянии и реактивироваться.

Для определения влияния ВЭБ на тяжесть течения и исход COVID-19 обследовали пациентов с коинфекцией ВЭБ и SARS-CoV-2, результаты исследования показали, что у 37/67 (55,2%) пациентов риск появления симптомов лихорадки был в 3 раза выше, чем у пациентов с одной только инфекцией SARS-CoV-2, уровни С-реактивного белка и АСТ также были статистически значимо больше [24]. Авторы заключили, что реактивация ВЭБ может ассоциироваться с тяжелым течением COVID-19. М. Meng и соавт. обнаружили признаки активной ВЭБ-инфекции у 55/217 (25%) пациентов с COVID-19 и часть из них лечили ганцикловиром. Авторы отметили, что среди пациентов, получавших ганцикловир, уровень выживаемости был больше в сравнении с группой, где препарат не применяли ($p = 0,01$), и сделали вывод, что реактивация ВЭБ у пациентов с COVID-19 может быть связана с повышенным риском смерти [25]. Важные результаты получены при изучении связи реактивации ВЭБ со смертностью среди 345 пациентов с COVID-19. Метаанализ результатов 4 опубликованных работ по реактивации ВЭБ у больных COVID-19 показал [14], что у пациентов с ВЭБ(-)/SARS-CoV-2(+) смертность

была статистически значимо меньше (9,9%), чем у пациентов с ВЭБ(+)/SARS-CoV-2(+) (23,6%). Было подтверждено, что реактивация ВЭБ увеличивает смертность у пациентов с COVID-19, и сделан вывод: в тех случаях, когда состояние здоровья пациентов с COVID-19 постепенно ухудшается, необходимо заподозрить реактивацию ВЭБ, поскольку она является возможным маркером тяжести течения COVID-19. Авторы считают доказанным, что реактивация ВЭБ увеличивает смертность у пациентов с COVID-19.

Реактивацию ЦМВ выявили у 19/156 (12,2%) пожилых пациентов с COVID-19 и наблюдали среди них значительное увеличение смертности [26]. Авторы заключили, что реактивация ЦМВ у пациентов с COVID-19 в возрасте, равном или меньше 86 лет, была независимым фактором риска госпитальной смертности. В другой работе у 16 из 140 (11,4%) пациентов с COVID-19 определяли ДНК ЦМВ в периферической крови. Смерть наступила у 8/16 ЦМВ-положительных пациентов (50%) по сравнению с 11/124 (8,87%) ЦМВ-отрицательными лицами ($p < 0,001$) [27].

Анализ ДНК ВПГ-1 в образцах бронхоальвеолярного лаважа (BAL) у пациентов с пневмонией, вызванной SARS-CoV-2, выявил высокую инфицированность – в 47/83 (56%) образцов. Уровень смертности у пациентов с ВПГ-положительными результатами оказался более высоким по сравнению с пациентами без ВПГ (57,4% против 33,5%; $p = 0,015$). Реактивация ВПГ-1 в нижних отделах дыхательных путей ассоциировалась с неблагоприятным прогнозом и значительным увеличением смертности [28].

Примерно у 16% пациентов с COVID-19 развиваются тяжелые и крайне тяжелые формы заболевания, и показатели смертности у этих пациентов составляют от 11 до 60% [29]. Результаты настоящей работы, а также данные прижизненных исследований, рассмотренные выше, показывают, что ГВЧ 1–7-го типов могут вносить вклад в развитие тяжелого течения COVID-19 и вызывать летальный исход заболевания.

Патогенез COVID-19 характеризуется прежде всего поражением клеток респираторного тракта, легких и развитием тяжелой гипоксии. К настоящему времени накоплено достаточно данных, свидетельствующих о развитии у больных COVID-19 полиорганной недостаточности – дисфункции многих органов, включая сердце, почки, печень, ЖКТ, эндотелий сосудов [30]. В настоящем исследовании показано присутствие ГВЧ в образцах из всех изученных органов пациентов, умерших от COVID-19: в легких, лимфатических узлах, головном мозге, печени и в селезенке. Впервые показано, что в разных органах пациентов с летальным исходом встречаются по 2, 3 и даже по 4 ГВЧ из разных подсемейств. Количество проб с высокой концентрацией вирусной ДНК, содержащих более 1000 копий ДНК и даже более 10 000 копий на 100 тыс. клеток, суммарно составляло 52%. Интересно, что в печени и в селезенке пациентов, скончавшихся от COVID-19, были обнаружены ВГЧ-6 в концентрациях более 1 млн копий ДНК на 100 тыс. клеток. Согласно имеющимся данным, такие кон-

центрации ВГЧ-6 наблюдаются у лиц, у которых вирусная ДНК интегрирована в геном – в теломерные районы хромосом. Для сохранения своего генома ВГЧ-6 использует эту уникальную форму латенции, т.к. геномы всех других ГВЧ в латентном состоянии находятся в виде кольцевой эписомы. Интегрированная ДНК ВГЧ-6 способна к реактивации и индукции разных заболеваний [31].

Обращает на себя внимание большое количество пациентов, в аутопсийных образцах которых обнаружены высокие концентрации ДНК ГВЧ. Работ, в которых проведено сравнение содержания ДНК ГВЧ в сыворотке/плазме крови и в тканях органов у пациентов с COVID-19, найти в доступной литературе не удалось. Возможно, объяснение содержится в работе [32], в которой изучали ВЭБ в плазме крови и в ткани опухоли у пациентов с раком желудка, ассоциированным с ВЭБ. ДНК ВЭБ определяли в плазме крови методом количественной ПЦР, в срезах опухолевой ткани – методом гибридизации *in situ*. Обнаружили, что среднее соотношение ДНК ВЭБ в плазме к ДНК в ткани составляло всего 8,8%. Предположили, что лишь небольшой процент инфицированных ВЭБ раковых клеток желудка секретирует ДНК ВЭБ в периферическую кровь. В настоящей работе периферическая кровь пациентов с летальным исходом COVID-19 была недоступна. Однако можно предположить, что высокие концентрации ДНК ГВЧ, обнаруженные в образцах из органов пациентов, – результат накопления ДНК в тканях при реактивации вирусов, и эта ДНК в значительной степени остается *in situ*.

Клинические и лабораторные исследования, проведенные в настоящей работе, показали, что присутствие ГВЧ в органах пациентов с летальным исходом COVID-19 ассоциировалось с тяжелыми поражениями легких и поражением печени. Это заключение подтверждается результатами прижизненного обследования пациентов. Так, у 76/95 (80%) пациентов, госпитализированных с COVID-19 с признаками пневмонии и повышенными значениями АЛТ, были обнаружены маркеры активной ВЭБ-инфекции, тогда как у доноров крови активная ВЭБ-инфекция наблюдались лишь у 10/92 (10,9%) [33]. Сходные данные в отношении ВПГ-инфекции получены при прижизненном обследовании пациентов, умерших от COVID-19 [34]. Пневмония, вызванная SARS-CoV-2 и осложненная острым респираторным дистресс-синдромом, а также очень высокие значения АЛТ и АСТ в сыворотке крови (3000–4000 ед/л) – показатели активного гепатита, ассоциировались с высокой концентрацией ВПГ-1 в сыворотке крови (более 14 000 000 копий/мл) за 3–7 сут до смерти пациентов.

Полученные нами результаты, а также данные опубликованных работ свидетельствуют о реактивации и высоком содержании ГВЧ в органах скончавшихся пациентов, подтверждают данные о полиорганной природе патологических процессов и указывают на вклад ГВЧ в летальный исход COVID-19.

Обследование больных COVID-19 показало, что у пациентов с тяжелым течением инфекции, осо-

бенно у пожилых пациентов, часто или почти всегда наблюдаются предшествующие сопутствующие заболевания, перечень которых весьма значителен: диабет, рак, ожирение, ВИЧ-инфекция, хронические воспалительные заболевания почек, печени, легких, цереброваскулярные заболевания [35]. В связи с этим в группу сравнения были включены 20 пациентов, скончавшихся от заболеваний неинфекционной природы (без COVID-19): инфаркта, инсульта, хронических заболеваний печени, онкологических заболеваний. Изучение ДНК ГВЧ в аутопсийных материалах от пациентов группы сравнения показало, что частота обнаружения ГВЧ была высокой и практически не отличалась от таковой среди пациентов с COVID-19. В то же время концентрация ДНК ГВЧ сильно различалась. Так, концентрация ДНК ГВЧ, превышающая 1000 копий на 100 тыс. клеток, включая образцы, содержащие 10 000 копий на 100 тыс. клеток, была обнаружена у 17% пациентов, что с высокой степенью значимости ($p < 0,001$) отличалось от группы с COVID-19 (52%). Присутствие ГВЧ у пациентов с тяжелыми патологиями различных органов наблюдали также другие авторы. Показано, что реактивация ЦМВ может способствовать прогрессированию атеросклероза [36]. Описан случай кардиомиопатии, ассоциированной с ВЭБ-инфекцией миокарда, в результате которой повышался риск электрической нестабильности, перфорации сердца и внезапной смерти [37]. К сходному выводу о связи повреждения сердечно-сосудистой системы с ВЭБ-инфекцией пришли также другие авторы [38].

Имеются данные о способности ВЭБ вызывать интерстициальную пневмонию, или пневмонит, иногда с плевральным выпотом. Описаны 16 случаев ВЭБ-ассоциированного пневмонита [39].

Обнаружение ГВЧ в образцах биопсии печени (преимущественно ВГЧ-6) и в сыворотке крови (преимущественно ВЭБ) у пациентов с хроническим гепатитом С и клинический анализ повреждений функции печени позволили установить, что ГВЧ увеличивают тяжесть течения хронических гепатитов [40].

Метаанализ, проведенный методами доказательной медицины, показал, что герпесвирусная инфекция ассоциируется с повышенным риском нарушения мозгового кровообращения, повреждением ткани мозга, нарушением его функций – ишемическим инсультом. Риск инсульта особенно сильно связан с ВЗВ-, ВЭБ- и ВПГ-инфекциями [41].

Полученные нами данные свидетельствуют о реактивации ГВЧ у большинства (52%) пациентов с летальным исходом COVID-19 и у части пациентов (17%) группы сравнения. Можно предположить, что у большинства пациентов из группы сравнения и у части пациентов, скончавшихся от COVID-19, ГВЧ находились в латентном состоянии.

В аутопсийных образцах от 39 пациентов с летальным исходом COVID-19 определяли наличие РНК SARS-CoV-2, у 28 пациентов (72%) была обнаружена РНК хотя бы в одном из органов. В 47/56 (84%) образцов наблюдали одновременно ДНК ГВЧ

и РНК SARS-CoV-2. Результаты настоящей работы и данные других авторов, наблюдавших коинфекцию SARS-CoV-2 и ГВЧ, ставят вопрос, может ли инфекция SARS-CoV-2 быть фактором риска реактивации герпесвирусов, и с другой стороны, каковы механизмы усиления SARS-CoV-2 инфекции при реактивации ГВЧ.

Один из механизмов может быть связан со способностью ГВЧ воздействовать на рецептор SARS-CoV-2 ACE2. Показано, что ВЭБ повышает экспрессию ACE2 и таким образом усиливает инфицирование клеток SARS-CoV-2 [42]. Позже обнаружили, что ЦМВ способен повысить экспрессию рецептора ACE2 в эпителиальных и эндотелиальных клетках, облегчая проникновение вируса в клетки легких и других органов [43]. Отмечая, что репликация ВЭБ и ВГЧ-6 происходит в эпителии ротоглотки и носоглотки, которые являются местами инфицирования SARS-CoV-2, полагают, что реактивация ВЭБ и ВГЧ-6 может усилить тяжесть COVID-19 [23], в том числе путем прямого цитотоксического действия. Реактивация ГВЧ при инфицировании SARS-CoV-2 может происходить и непрямыми путями – в результате нарушения регуляции иммунных механизмов. Наблюдается активация дендритных клеток, Th1, Th17 и NK-клеток, повышение продукции многих провоспалительных цитокинов, включая IL-6, IL-8, TNF- α и IL-10, которые увеличивают риск реактивации ГВЧ [44]. У пациентов, обследованных в настоящей работе, обнаружены прижизненные изменения показателей клеток и сыворотки крови, свидетельствующие о ярко выраженном воспалительном процессе (табл. 1).

К реактивации ГВЧ при COVID-19 может приводить прием системных кортикостероидов, назначаемых для подавления цитокинового шторма. По данным J. Naendrup и соавт. (2022), лечение кортикостероидами вызывало реактивацию ВЭБ у 58% и ЦМВ – у 55% пациентов [45]. Показано, что одним из молекулярных механизмов реактивации ВЭБ под действием гидрокортизона и дексаметазона может быть индукция экспрессии мРНК сверххраненного вирусного гена *BZLF1*, кодирующего литический трансактиватор – белок ZEBRA [46]. В терапии COVID-19 рекомендованы к применению препараты-ингибиторы (например, блокаторы янус-киназ, рецепторов IL-6, IL-1, блокаторы IL-6), которые обладают иммуносупрессивным действием и могут увеличивать риск реактивации ГВЧ.

Рассмотренные механизмы реактивации ГВЧ при заражении SARS-CoV-2 не исключают друг друга и, по-видимому, могут действовать совместно, увеличивая тяжесть течения COVID-19 и неблагоприятный исход заболевания. Совокупность представленных данных указывает на целесообразность включения герпесвирусных инфекций в протоколы обследования пациентов с COVID-19, находящихся как в крайне тяжелом состоянии, так и в состоянии средней тяжести, особенно из-за широкой доступности противогерпетических препаратов и имеющихся положительных результатах лечения COVID-19.

Выводы

1. ДНК ряда ГВЧ (ВПГ-1, ВПГ-2, ВЗВ, ВЭБ, ЦМВ, ВГЧ-6А и ВГЧ-6В) обнаружены в аутопсийных материалах у всех 39 пациентов, скончавшихся от COVID-19, а также у всех 20 пациентов, умерших от других заболеваний без COVID-19.

2. ДНК ГВЧ обнаружены в легких, в печени, в лимфоузлах, в головном мозге и в селезенке. У пациентов с летальным исходом COVID-19, по сравнению с пациентами, скончавшихся без COVID-19, статистически значимо чаще обнаруживалась в легких ДНК ВЭБ (76% против 26%), в лимфоузлах ДНК ЦМВ (18% против 0%) и в головном мозге ДНК ВГЧ-6 (18% против 0%). У пациентов, скончавшихся без COVID-19, в селезенке чаще обнаруживалась ДНК ВГЧ-6 (70% против 28%).

3. Количество образцов с концентрацией ДНК ГВЧ, превышающей 1000 копий/100 тыс. клеток, в материалах от пациентов с летальным исходом COVID-19 было в 3 раза больше (52,4%), чем от пациентов без COVID-19 (16,6%), что указывает на реактивацию ГВЧ у пациентов с летальным исходом и на латентное состояние ВГЧ у большинства пациентов без COVID-19.

4. Тяжелые повреждения легких (по данным КТ и плеврального выпота) у пациентов с летальным COVID-19 ассоциировались со значительным повышением концентрации ДНК ВГЧ-6 и существенным превышением частоты выявления ДНК ВПГ по сравнению со среднетяжелыми и легкими повреждениями в аутоптатах легких.

5. Повышенные уровни ферментов АЛТ/АСТ, свидетельствующие о повреждениях печени, у 32% пациентов с летальным исходом COVID-19 ассоциировались с реактивацией ВЭБ, у пациентов с нормальными уровнями АЛТ/АСТ реактивация ВЭБ наблюдалась лишь у 6% пациентов.

6. У 28/39 (72%) пациентов с летальным исходом COVID-19 в секционных материалах обнаружили РНК SARS-CoV-2 в легких, головном мозге и лимфоузлах – в высоких концентрациях. Коинфекция SARS-CoV-2 чаще всего наблюдалась с ВЭБ.

ЛИТЕРАТУРА

- Carvalho J.L., Silva-Carvalho A.E., Garcez E.M., Saldanha-Araujo F. Commentary: mesenchymal stem cells: a new piece in the puzzle of COVID-19 treatment. *Front. Immunol.* 2021; 12: 682195. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.682195>
- Rabi F.A., Al Zoubi M.S., Kasasbeh G.A., Salameh D.M., Al-Nasser A.D. SARS-CoV-2 and coronavirus disease 2019: what we know so far. *Pathogens.* 2020; 9(3): 231. <https://doi.org/10.3390/pathogens9030231>
- Blanco-Melo D., Nilsson-Payant B.E., Liu W.C., Uhl S., Hoagland D., Möller R., et al. Imbalanced host response to SARS-CoV-2 drives development of COVID-19. *Cell.* 2020; 181(5): 1036–45. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.026>
- Montazersaheb S., Hosseiniyan Khatibi S.M., Hejazi M.S., Tarhriz V., Farjami A., Ghasemian Sorbeni F., et al. COVID-19 infection: an overview on cytokine storm and related interventions. *Virol. J.* 2022; 19(1): 92. <https://doi.org/10.1186/s12985-022-01814-1>
- Lowery S.A., Sariol A., Perlman S. Innate immune and inflammatory responses to SARS-CoV-2: Implications for COVID-19. *Cell Host Microbe.* 2021; 29(7): 1052–62. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.05.004>

- Liu L., Wei Q., Lin Q., Fang J., Wang H., Kwok H., et al. Anti-spike IgG causes severe acute lung injury by skewing macrophage responses during acute SARS-CoV infection. *JCI Insight.* 2019; 4(4): e123158. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.123158>
- Zheng M., Gao Y., Wang G., Song G., Liu S., Sun D., et al. Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. *Cell Mol. Immunol.* 2020; 17(5): 533–5. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0402-2>
- Wang Y., Zheng J., Islam M.S., Yang Y., Hu Y., Chen X. The role of CD4⁺FoxP3⁺ regulatory T cells in the immunopathogenesis of COVID-19: implications for treatment. *Int. J. Biol. Sci.* 2021; 17(6): 1507–20. <https://doi.org/10.7150/ijbs.59534>
- Thorne L.G., Reuschl A.K., Zuliani-Alvarez L., Whelan M.V.X., Turner J., Noursadeghi M., et al. SARS-CoV-2 sensing by RIG-I and MDA5 links epithelial infection to macrophage inflammation. *EMBO J.* 2021; 40(15): e107826. <https://doi.org/10.15252/emboj.2021107826>
- Cantan B., Luyt C.E., Martin-Loeches I. Influenza infections and emergent viral infections in intensive care unit. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 2019; 40(4): 488–97. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1693497>
- Talan L., Akdemir Kalkan İ., Altuntaş N.D., Yörük F. Cytomegalovirus reactivation in critically-ill COVID-19 patients. *Balkan Med. J.* 2022; 39(4): 301–2. <https://doi.org/10.4274/balkanmedj.galeos.2022.2022-2-2>
- Amaral P.H., Ferreira B.M., Roll S., Neves P.D., Pivetta L.G., Mohrbacher S., et al. COVID-19 and cytomegalovirus co-infection: a challenging case of a critically ill patient with gastrointestinal symptoms. *Eur. J. Case Rep. Intern. Med.* 2020; 7(10): 001911. https://doi.org/10.12890/2020_001911
- Bernal K.D.E., Whitehurst C.B. Incidence of Epstein-Barr virus reactivation is elevated in COVID-19 patients. *Virus Res.* 2023; 334: 199157. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2023.199157>
- Manoharan S., Ying L.Y. Epstein Barr virus reactivation during COVID-19 hospitalization significantly increased mortality/death in SARS-CoV-2(+)/EBV(+) than SARS-CoV-2(+)/EBV(-) patients: a comparative meta-analysis. *Int. J. Clin. Pract.* 2023; 2023: 1068000. <https://doi.org/10.1155/2023/1068000>
- Berzero G., Campanini G., Vegezzi E., Paoletti M., Pichiecchio A., Simoncelli A.M., et al. Human herpesvirus 6 encephalitis in immunocompetent and immunocompromised hosts. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm.* 2021; 8(2): e942. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000942>
- Di Nora A., Pizzo F., Costanza G., Ruggieri M., Falsaperla R. Human herpes 6 encephalitis in co-infection with COVID-19. *Acta Neurol. Belg.* 2023; 123(2): 687–8. <https://doi.org/10.1007/s13760-022-01961-w>
- Katz J., Yue S., Xue W. Herpes simplex and herpes zoster viruses in COVID-19 patients. *Ir. J. Med. Sci.* 2022; 191(3): 1093–7. <https://doi.org/10.1007/s11845-021-02714-z>
- Shafiee A., Teymouri Athar M.M., Amini M.J., Hajishah H., Siahvoshi S., Jalali M., et al. Reactivation of herpesviruses during COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Rev. Med. Virol.* 2023; 33(3): e2437. <https://doi.org/10.1002/rmv.2437>
- Nakashima J., Kadomatsu Y., Itagaki S., Otani T., Kiriu T., Matsunaga A., et al. A case-series of six autopsy cases of COVID-19 including three cases of cytomegalovirus coinfection. *Pathol. Int.* 2022; 72(6): 358–60. <https://doi.org/10.1111/pin.13230>
- Haslbauer J.D., Zinner C., Stalder A.K., Schneeberger J., Menter T., Bassetti S., et al. Vascular damage, thromboinflammation, plasmablast activation, T-cell dysregulation and pathological histiocytic response in pulmonary draining lymph nodes of COVID-19. *Front. Immunol.* 2021; 12: 763098. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.763098>
- Iqbal B., Rahman N.M., Hallifax R.J. COVID-19-related pleural diseases. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 2023; 44(4): 437–46. <https://doi.org/10.1055/s-0043-1769616>
- Paolucci S., Cassaniti I., Novazzi F., Fiorina L., Piralla A., Comolli G., et al. EBV DNA increase in COVID-19 patients with impaired lymphocyte subpopulation count. *Int. J. Infect. Dis.* 2021; 104: 315–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.12.051>
- Simonnet A., Engelmann I., Moreau A.S., Garcia B., Six S., El Kalioubie A., et al. High incidence of Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, and human-herpes virus-6 reactivations in critically ill patients with COVID-19. *Infect. Dis. Now.* 2021; 51(3): 296–9. <https://doi.org/10.1016/j.idnow.2021.01.005>


24. Chen T., Song J., Liu H., Zheng H., Chen C. Positive Epstein-Barr virus detection in coronavirus disease 2019 (COVID-19) patients. *Sci. Rep.* 2021; 11(1): 10902. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90351-y>
25. Meng M., Zhang S., Dong X., Sun W., Deng Y., Li W., et al. COVID-19 associated EBV reactivation and effects of ganciclovir treatment. *Immun. Inflamm. Dis.* 2022; 10(4): e597. <https://doi.org/10.1002/iid3.597>
26. Giacconi R., Cardelli M., Piacenza F., Pierpaoli E., Farnocchia E., Di Rosa M., et al. Effect of cytomegalovirus reactivation on inflammatory status and mortality of older COVID-19 patients. *Int. J. Mol. Sci.* 2023; 24(7): 6832. <https://doi.org/10.3390/ijms24076832>
27. Pérez-Granda M.J., Catalán P., Muñoz P., Aldámiz T., Barrios J.C., Ramírez C., et al. Cytomegalovirus reactivation in patients diagnosed with severe COVID-19: A point prevalence study in a general hospital. *Rev. Esp. Quimioter.* 2023; 36(1): 45–51. <https://doi.org/10.37201/req/068.2022>
28. Pérez-Pedrero Sánchez-Belmonte M.J., Sánchez-Casado M., Moran Gallego F.J., Piza Pinilla R., Gomez Hernando C., Paredes Borrachero I. Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) over-infection in patients with acute respiratory distress syndrome secondary to COVID-19 pneumonia: Impact on mortality. *Med. Clin. (Engl. Ed.)* 2023; 160(2): 66–70. <https://doi.org/10.1016/j.medcle.2022.04.019>
29. Yang X., Yu Y., Xu J., Shu H., Xia J., Liu H., et al. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study. *Lancet Respir. Med.* 2020; 8(5): 475–81. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30079-5](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30079-5)
30. Li Q., Chen Z., Zhou X., Li G., Zhang C., Yang Y. Ferroptosis and multi-organ complications in COVID-19: mechanisms and potential therapies. *Front. Genet.* 2023; 14: 1187985. <https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1187985>
31. Gabrielli L., Balboni A., Borgatti E.C., Virgili G., Petrisli E., Cantiani A., et al. Inherited chromosomally integrated human herpesvirus 6: laboratory and clinical features. *Microorganisms.* 2023; 11(3): 548. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030548>
32. Qiu M.Z., He C.Y., Lu S.X., Guan W.L., Wang F., Wang X.J., et al. Prospective observation: Clinical utility of plasma Epstein-Barr virus DNA load in EBV-associated gastric carcinoma patients. *Int. J. Cancer.* 2020; 146(1): 272–80. <https://doi.org/10.1002/ijc.32490>
33. Соломай Т.В., Семененко Т.А., Филатов Н.Н., Ведунова С.Л., Лавров В.Ф., Смирнова Д.И. и др. Реактивация инфекции, вызванной вирусом Эпштейна–Барр (*Herpesviridae: Lymphocryptovirus*, HHV-4), на фоне COVID-19: эпидемиологические особенности. *Вопросы вирусологии.* 2021; 66(2): 152–61. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-40> <https://elibrary.ru/nhbzyr>
34. Roncati L., Manenti A., Fabbiani L., Malagoli C., Nasillo V., Lusenti B., et al. HSV1 viremia with fulminant hepatitis as opportunistic sequela in severe COVID-19. *Ann. Hematol.* 2022; 101(1): 229–31. <https://doi.org/10.1007/s00277-021-04417-y>
35. Silaghi-Dumitrescu R., Patrascu I., Lehene M., Bercea I. Comorbidities of COVID-19 patients. *Medicina (Kaunas).* 2023; 59(8): 1393. <https://doi.org/10.3390/medicina59081393>
36. Nikitskaya E., Lebedeva A., Ivanova O., Maryukhnich E., Shpektor A., Grivel J.C., et al. Cytomegalovirus-productive infection is associated with acute coronary syndrome. *J. Am. Heart Assoc.* 2016; 5(8): e003759. <https://doi.org/10.1161/JAHA.116.003759>
37. Chimenti C., Verardo R., Grande C., Francone M., Frustaci A. Infarct-like myocarditis with coronary vasculitis and aneurysm formation caused by Epstein-Barr virus infection. *ESC Heart Fail.* 2020; 7(3): 938–41. <https://doi.org/10.1002/ehf2.12611>
38. Chen X., Li Y., Deng L., Wang L., Zhong W., Hong J., et al. Cardiovascular involvement in Epstein-Barr virus infection. *Front. Immunol.* 2023; 14: 1188330. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1188330>
39. Prasoppokakorn T., Assanasen T., Chantranuwatana P., Suankratay C. EBV-associated lymphoid interstitial pneumonia in IBD patient: Case report and literature review. *Respir. Med. Case Rep.* 2020; 30: 101059. <https://doi.org/10.1016/j.rmcr.2020.101059>
40. Yurlov K.I., Masalova O.V., Kisteneva L.B., Khlopova I.N., Samokhvalov E.I., Malinovskaya V.V., et al. Human herpesviruses increase the severity of hepatitis. *Biology (Basel).* 2021; 10(6): 483. <https://doi.org/10.3390/biology10060483>
41. Lin J., Zheng Y., Zhao N., Cui F., Wu S. Herpesvirus latent infection promotes stroke via activating the OTUD1/NF- κ B signaling pathway. *Aging (Albany NY).* 2023; 15(17): 8976–92. <https://doi.org/10.18632/aging.205011>
42. Verma D., Church T.M., Swaminathan S. Epstein-Barr virus lytic replication induces ACE2 expression and enhances SARS-CoV-2 pseudotyped virus entry in epithelial cells. *J. Virol.* 2021; 95(13): e0019221. <https://doi.org/10.1128/JVI.00192-21>
43. Perera M.R., Greenwood E.J.D., Crozier T.W.M., Elder E.G., Schmitt J., Crump C.M., et al. Human cytomegalovirus infection of epithelial cells increases SARS-CoV-2 superinfection by upregulating the ACE2 receptor. *J. Infect. Dis.* 2023; 227(4): 543–53. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiac452>
44. Yu X., Li L., Chan M.T.V., Wu W.K.K. Bioinformatic analyses suggest augmented interleukin-17 signaling as the mechanism of COVID-19-associated herpes zoster. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2021; 28(46): 65769–75. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-15567-x>
45. Naendrup J.H., Garcia Borrega J., Eichenauer D.A., Shimabukuro-Vornhagen A., Kochanek M., Böll B. Reactivation of EBV and CMV in severe COVID-19-epiphenomena or trigger of hyperinflammation in need of treatment? A large case series of critically ill patients. *J. Intensive Care Med.* 2022; 37(9): 1152–8. <https://doi.org/10.1177/08850666211053990>
46. Yang E.V., Webster Marketon J.I., Chen M., Lo K.W., Kim S.J., Glaser R. Glucocorticoids activate Epstein Barr virus lytic replication through the upregulation of immediate early BZLF1 gene expression. *Brain Behav. Immun.* 2010; 24(7): 1089–96. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.04.013>

REFERENCES

- Carvalho J.L., Silva-Carvalho A.E., Garcez E.M., Saldanha-Araujo F. Commentary: mesenchymal stem cells: a new piece in the puzzle of COVID-19 treatment. *Front. Immunol.* 2021; 12: 682195. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.682195>
- Rabi F.A., Al Zoubi M.S., Kasasbeh G.A., Salameh D.M., Al-Nassir A.D. SARS-CoV-2 and coronavirus disease 2019: what we know so far. *Pathogens.* 2020; 9(3): 231. <https://doi.org/10.3390/pathogens9030231>
- Blanco-Melo D., Nilsson-Payant B.E., Liu W.C., Uhl S., Hoagland D., Möller R., et al. Imbalanced host response to SARS-CoV-2 drives development of COVID-19. *Cell.* 2020; 181(5): 1036–45.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.026>
- Montazersaheb S., Hosseiniyan Khatibi S.M., Hejazi M.S., Tarhriz V., Farjami A., Ghasemian Sorbeni F., et al. COVID-19 infection: an overview on cytokine storm and related interventions. *Virol. J.* 2022; 19(1): 92. <https://doi.org/10.1186/s12985-022-01814-1>
- Lowery S.A., Sariol A., Perlman S. Innate immune and inflammatory responses to SARS-CoV-2: Implications for COVID-19. *Cell Host Microbe.* 2021; 29(7): 1052–62. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.05.004>
- Liu L., Wei Q., Lin Q., Fang J., Wang H., Kwok H., et al. Anti-spike IgG causes severe acute lung injury by skewing macrophage responses during acute SARS-CoV infection. *JCI Insight.* 2019; 4(4): e123158. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.123158>
- Zheng M., Gao Y., Wang G., Song G., Liu S., Sun D., et al. Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. *Cell Mol. Immunol.* 2020; 17(5): 533–5. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0402-2>
- Wang Y., Zheng J., Islam M.S., Yang Y., Hu Y., Chen X. The role of CD4⁺FoxP3⁺ regulatory T cells in the immunopathogenesis of COVID-19: implications for treatment. *Int. J. Biol. Sci.* 2021; 17(6): 1507–20. <https://doi.org/10.7150/ijbs.59534>
- Thorne L.G., Reuschl A.K., Zuliani-Alvarez L., Whelan M.V.X., Turner J., Noursadeghi M., et al. SARS-CoV-2 sensing by RIG-I and MDA5 links epithelial infection to macrophage inflammation. *EMBO J.* 2021; 40(15): e107826. <https://doi.org/10.15252/embj.2021107826>
- Cantan B., Luyt C.E., Martin-Loeches I. Influenza infections and emergent viral infections in intensive care unit. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 2019; 40(4): 488–97. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1693497>
- Talan L., Akdemir Kalkan İ., Altıntaş N.D., Yörük F. Cytomegalovirus reactivation in critically-ill COVID-19 patients. *Balkan Med. J.* 2022; 39(4): 301–2. <https://doi.org/10.4274/balkanmedj.galenos.2022.2022-2-2>

12. Amaral P.H., Ferreira B.M., Roll S., Neves P.D., Pivetta L.G., Mohrbacher S., et al. COVID-19 and cytomegalovirus co-infection: a challenging case of a critically ill patient with gastrointestinal symptoms. *Eur. J. Case Rep. Intern. Med.* 2020; 7(10): 001911. https://doi.org/10.12890/2020_001911
13. Bernal K.D.E., Whitehurst C.B. Incidence of Epstein-Barr virus reactivation is elevated in COVID-19 patients. *Virus Res.* 2023; 334: 199157. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2023.199157>
14. Manoharan S., Ying L.Y. Epstein Barr virus reactivation during COVID-19 hospitalization significantly increased mortality/death in SARS-CoV-2(+)/EBV(+) than SARS-CoV-2(+)/EBV(-) patients: a comparative meta-analysis. *Int. J. Clin. Pract.* 2023; 2023: 1068000. <https://doi.org/10.1155/2023/1068000>
15. Berzero G., Campanini G., Vegezzi E., Paoletti M., Pichiecchio A., Simoncelli A.M., et al. Human herpesvirus 6 encephalitis in immunocompetent and immunocompromised hosts. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm.* 2021; 8(2): e942. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000942>
16. Di Nora A., Pizzo F., Costanza G., Ruggieri M., Falsaperla R. Human herpes 6 encephalitis in co-infection with COVID-19. *Acta Neurol. Belg.* 2023; 123(2): 687–8. <https://doi.org/10.1007/s13760-022-01961-w>
17. Katz J., Yue S., Xue W. Herpes simplex and herpes zoster viruses in COVID-19 patients. *Ir. J. Med. Sci.* 2022; 191(3): 1093–7. <https://doi.org/10.1007/s11845-021-02714-z>
18. Shafiee A., Teymouri Athar M.M., Amini M.J., Hajishah H., Si-ahvoshi S., Jalali M., et al. Reactivation of herpesviruses during COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Rev. Med. Virol.* 2023; 33(3): e2437. <https://doi.org/10.1002/rmv.2437>
19. Nakashima J., Kadomatsu Y., Itagaki S., Otani T., Kiriu T., Matsunaga A., et al. A case-series of six autopsy cases of COVID-19 including three cases of cytomegalovirus coinfection. *Pathol. Int.* 2022; 72(6): 358–60. <https://doi.org/10.1111/pin.13230>
20. Haslbauer J.D., Zinner C., Stalder A.K., Schneeberger J., Menter T., Bassetti S., et al. Vascular damage, thromboinflammation, plasmablast activation, T-cell dysregulation and pathological histiocytic response in pulmonary draining lymph nodes of COVID-19. *Front. Immunol.* 2021; 12: 763098. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.763098>
21. Iqbal B., Rahman N.M., Hallifax R.J. COVID-19-related pleural diseases. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 2023; 44(4): 437–46. <https://doi.org/10.1055/s-0043-1769616>
22. Paolucci S., Cassaniti I., Novazzi F., Fiorina L., Piralla A., Comolli G., et al. EBV DNA increase in COVID-19 patients with impaired lymphocyte subpopulation count. *Int. J. Infect. Dis.* 2021; 104: 315–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.12.051>
23. Simonnet A., Engelmann I., Moreau A.S., Garcia B., Six S., El Kalioubie A., et al. High incidence of Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, and human-herpes virus-6 reactivations in critically ill patients with COVID-19. *Infect. Dis. Now.* 2021; 51(3): 296–9. <https://doi.org/10.1016/j.idnow.2021.01.005>
24. Chen T., Song J., Liu H., Zheng H., Chen C. Positive Epstein-Barr virus detection in coronavirus disease 2019 (COVID-19) patients. *Sci. Rep.* 2021; 11(1): 10902. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90351-y>
25. Meng M., Zhang S., Dong X., Sun W., Deng Y., Li W., et al. COVID-19 associated EBV reactivation and effects of ganciclovir treatment. *Immun. Inflamm. Dis.* 2022; 10(4): e597. <https://doi.org/10.1002/iid3.597>
26. Giacconi R., Cardelli M., Piacenza F., Pierpaoli E., Farnocchia E., Di Rosa M., et al. Effect of cytomegalovirus reactivation on inflammatory status and mortality of older COVID-19 patients. *Int. J. Mol. Sci.* 2023; 24(7): 6832. <https://doi.org/10.3390/ijms24076832>
27. Pérez-Granda M.J., Catalán P., Muñoz P., Aldámiz T., Barrios J.C., Ramírez C., et al. Cytomegalovirus reactivation in patients diagnosed with severe COVID-19: A point prevalence study in a general hospital. *Rev. Esp. Quimioter.* 2023; 36(1): 45–51. <https://doi.org/10.37201/req/068.2022>
28. Pérez-Pedrero Sánchez-Belmonte M.J., Sánchez-Casado M., Moran Gallego F.J., Piza Pinilla R., Gomez Hernando C., Paredes Borrachero I. Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) over-infection in patients with acute respiratory distress syndrome secondary to COVID-19 pneumonia: Impact on mortality. *Med. Clin. (Engl. Ed.)* 2023; 160(2): 66–70. <https://doi.org/10.1016/j.medcle.2022.04.019>
29. Yang X., Yu Y., Xu J., Shu H., Xia J., Liu H., et al. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study. *Lancet Respir. Med.* 2020; 8(5): 475–81. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30079-5](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30079-5)
30. Li Q., Chen Z., Zhou X., Li G., Zhang C., Yang Y. Ferroptosis and multi-organ complications in COVID-19: mechanisms and potential therapies. *Front. Genet.* 2023; 14: 1187985. <https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1187985>
31. Gabrielli L., Balboni A., Borgatti E.C., Virgili G., Petrisli E., Cantiani A., et al. Inherited chromosomally integrated human herpesvirus 6: laboratory and clinical features. *Microorganisms.* 2023; 11(3): 548. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030548>
32. Qiu M.Z., He C.Y., Lu S.X., Guan W.L., Wang F., Wang X.J., et al. Prospective observation: Clinical utility of plasma Epstein-Barr virus DNA load in EBV-associated gastric carcinoma patients. *Int. J. Cancer.* 2020; 146(1): 272–80. <https://doi.org/10.1002/ijc.32490>
33. Solomay T.V., Semenenko T.A., Filatov N.N., Vedunova S.L., Lavrov V.F., Smirnova D.I., et al. Reactivation of Epstein-Barr virus (Herpesviridae: Lymphocryptovirus, HHV-4) infection during Covid-19: epidemiological features. *Voprosy virusologii.* 2021; 66(2): 152–61. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-40> <https://elibrary.ru/nhbzyr> (in Russian)
34. Roncati L., Manenti A., Fabbiani L., Malagoli C., Nasillo V., Lusenti B., et al. HSV1 viremia with fulminant hepatitis as opportunistic sequela in severe COVID-19. *Ann. Hematol.* 2022; 101(1): 229–31. <https://doi.org/10.1007/s00277-021-04417-y>
35. Silaghi-Dumitrescu R., Patrascu I., Lehene M., Bercea I. Comorbidities of COVID-19 patients. *Medicina (Kaunas).* 2023; 59(8): 1393. <https://doi.org/10.3390/medicina59081393>
36. Nikitskaya E., Lebedeva A., Ivanova O., Maryukhnich E., Shpektor A., Grivel J.C., et al. Cytomegalovirus-productive infection is associated with acute coronary syndrome. *J. Am. Heart Assoc.* 2016; 5(8): e003759. <https://doi.org/10.1161/JAHA.116.003759>
37. Chimenti C., Verardo R., Grande C., Francone M., Frustaci A. Infarct-like myocarditis with coronary vasculitis and aneurysm formation caused by Epstein-Barr virus infection. *ESC Heart Fail.* 2020; 7(3): 938–41. <https://doi.org/10.1002/ehf2.12611>
38. Chen X., Li Y., Deng L., Wang L., Zhong W., Hong J., et al. Cardiovascular involvement in Epstein-Barr virus infection. *Front. Immunol.* 2023; 14: 1188330. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1188330>
39. Prasopkokorn T., Assanasen T., Chantranuwatana P., Suankratay C. EBV-associated lymphoid interstitial pneumonia in IBD patient: Case report and literature review. *Respir. Med. Case Rep.* 2020; 30: 101059. <https://doi.org/10.1016/j.rmcr.2020.101059>
40. Yurlov K.I., Masalova O.V., Kisteneva L.B., Khlopova I.N., Samokhvalov E.I., Malinovskaya V.V., et al. Human herpesviruses increase the severity of hepatitis. *Biology (Basel).* 2021; 10(6): 483. <https://doi.org/10.3390/biology10060483>
41. Lin J., Zheng Y., Zhao N., Cui F., Wu S. Herpesvirus latent infection promotes stroke via activating the OTUD1/NF-κB signaling pathway. *Aging (Albany NY).* 2023; 15(17): 8976–92. <https://doi.org/10.18632/aging.205011>
42. Verma D., Church T.M., Swaminathan S. Epstein-Barr virus lytic replication induces ACE2 expression and enhances SARS-CoV-2 pseudotyped virus entry in epithelial cells. *J. Virol.* 2021; 95(13): e0019221. <https://doi.org/10.1128/JVI.00192-21>
43. Perera M.R., Greenwood E.J.D., Crozier T.W.M., Elder E.G., Schmitt J., Crump C.M., et al. Human cytomegalovirus infection of epithelial cells increases SARS-CoV-2 superinfection by upregulating the ACE2 receptor. *J. Infect. Dis.* 2023; 227(4): 543–53. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiac452>
44. Yu X., Li L., Chan M.T.V., Wu W.K.K. Bioinformatic analyses suggest augmented interleukin-17 signaling as the mechanism of COVID-19-associated herpes zoster. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2021; 28(46): 65769–75. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-15567-x>
45. Naendrup J.H., Garcia Borrega J., Eichenauer D.A., Shimabukuro-Vornhagen A., Kochanek M., Böll B. Reactivation of EBV and CMV in severe COVID-19-epiphenomena or trigger of hyperinflammation in need of treatment? A large case series of critically ill patients. *J. Intensive Care Med.* 2022; 37(9): 1152–8. <https://doi.org/10.1177/08850666211053990>
46. Yang E.V., Webster Marketon J.I., Chen M., Lo K.W., Kim S.J., Glaser R. Glucocorticoids activate Epstein Barr virus lytic replication through the upregulation of immediate early BZLF1 gene expression. *Brain Behav. Immun.* 2010; 24(7): 1089–96. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.04.013>

Информация об авторах:

Юрлов Кирилл Иванович  – научный сотрудник ФГБУ «НИЦЭМ им. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: kir34292@yandex.ru; eLibrary SPIN: 1767-5652; <https://orcid.org/0000-0002-4694-2445>

Якушина Софья Александровна – младший научный сотрудник ФГБУ «НИЦЭМ им. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия; врач-инфекционист ГБУЗ «ИКБ № 1 ДЗМ», Москва, Россия. E-mail: sofia.iakushina@gmail.com; eLibrary SPIN: 9585-8019; <https://orcid.org/0000-0003-0507-0174>

Федорова Наталья Евгеньевна – канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник ФГБУ «НИЦЭМ им. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: ninani@mail.ru; eLibrary SPIN: 1090-2763; <https://orcid.org/0000-0001-8466-7993>

Кистенева Лидия Борисовна – д-р мед. наук, ведущий научный сотрудник ФГБУ «НИЦЭМ им. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: lidia.kisteneva@gmail.com; eLibrary SPIN: 9205-3670; <https://orcid.org/0000-0001-7336-409X>

Келли Елена Ивановна – врач-патологоанатом ГБУЗ «ИКБ № 1 ДЗМ», Москва, Россия. E-mail: ekelly@yandex.ru; <https://orcid.org/0009-0000-2718-9462>

Каниболоцкий Александр Алексеевич – канд. мед. наук, доцент, заведующий патологоанатомическим отделением НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ; заведующий ОМО по патологической анатомии ГБУ «НИИОЗММ ДЗМ», Москва, Россия. E-mail: dr.kaa@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-6123-8387>; eLibrary SPIN: 3976-1662, AuthorID: 894956; WOS Research ID: Web of Science ResearcherID: HLG-3242-2023; Scopus 57223849355

Ивкин Евгений Николаевич – врач-патологоанатом НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ, специалист ОМО по патологической анатомии ГБУ «НИИОЗММ ДЗМ», Москва, Россия. E-mail: evgeniivkin@rambler.ru; <https://orcid.org/0009-0004-2609-1788>

Антипята Наталья Александровна – заместитель главного врача по медицинской части ГБУЗ «ИКБ № 1 ДЗМ», Москва, Россия. E-mail: natadog70@bk.ru; <https://orcid.org/0000-0001-8578-2838>

Тюрин Игорь Николаевич – главный врач ГБУЗ «ИКБ № 1 ДЗМ», Москва, Россия. E-mail: tyurin.dti@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-5696-1586>

Ларичев Виктор Филиппович – д-р мед. наук, ведущий научный сотрудник ФГБУ «НИЦЭМ им. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: vlaritchev@mail.ru; eLibrary SPIN: 5826-1430; <https://orcid.org/0000-0001-8262-5650>

Демидова Наталья Андреевна – научный сотрудник ФГБУ «НИЦЭМ им. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: ailande@yandex.ru; eLibrary SPIN: 8759-0277; <https://orcid.org/0000-0003-1961-9789>

Леснова Екатерина Ивановна – научный сотрудник ФГБУ «НИЦЭМ им. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: wolf252006@yandex.ru; eLibrary SPIN: 9901-8607; <https://orcid.org/0000-0002-2801-6843>

Климова Регина Рафаиловна – канд. биол. наук, старший научный сотрудник ФГБУ «НИЦЭМ им. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: rklimova@yandex.ru; eLibrary SPIN: 8286-6108; <https://orcid.org/0000-0002-4147-8444>


Масалова Ольга Владимировна – д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник, заведующая лабораторией ФГБУ «НИЦЭМ им. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: ol.mas@mail.ru; eLibrary SPIN: 7210-0870; <https://orcid.org/0000-0001-5571-5669>

Куц Алла Александровна – д-р биол. наук, профессор, ведущий научный сотрудник ФГБУ «НИЦЭМ им. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: vitalku@mail.ru; eLibrary SPIN: 6964-1715; <https://orcid.org/0000-0002-3396-5533>

Участие авторов: Юрлов К.И. – проведение экспериментов, анализ и интерпретация данных; Якушина С.А. – концепция и дизайн исследования, сбор, систематизация и анализ данных, подготовка текста; Федорова Н.Е. – анализ и интерпретация данных, подготовка текста; Кистенева Л.Б. – концепция и дизайн исследования, подготовка текста; Келли Е.И. – сбор экспериментального материала, анализ экспериментальных данных; Каниболоцкий А.А. – анализ экспериментальных данных; Ивкин Е.Н. – анализ экспериментальных данных; Антипята Н.А. – сбор экспериментального материала, анализ клинических и лабораторных данных; Тюрин И.Н. – сбор экспериментального материала, анализ клинических и лабораторных данных; Ларичев В.Ф. – проведение экспериментов; Демидова Н.А. – проведение экспериментов; Леснова Е.И. – проведение экспериментов; Климова Р.П. – анализ экспериментальных данных; Масалова О.В. – дизайн исследования, анализ и интерпретация данных, подготовка текста; Куц А.А. – концепция и дизайн исследования, анализ и интерпретация данных, подготовка текста.

Поступила 15.01.2024
Принята в печать 11.03.2024
Опубликована 27.04.2024

Information about the authors:

Kirill I. Yurlov  – Researcher, Gamaleya NRC of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia. E-mail: kir34292@yandex.ru; eLibrary SPIN: 1767-5652; <https://orcid.org/0000-0002-4694-2445>

Sofia A. Yakushina – junior researcher, Gamaleya NRC of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia; infectious disease physician SBHI Infectious Diseases Clinical Hospital No. 1 of the Moscow City Health Department, Moscow, Russia. E-mail: sofia.iakushina@gmail.com; eLibrary SPIN: 9585-8019; <https://orcid.org/0000-0003-0507-0174>

Natalya E. Fedorova – Senior Researcher, Gamaleya NRC of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia. E-mail: ninani@mail.ru; eLibrary SPIN: 1090-2763; <https://orcid.org/0000-0001-8466-7993>

Lidiia B. Kisteneva – Dr. Sci. (Medicine), Leading Researcher, Gamaleya NRC of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia. E-mail: lidia.kisteneva@gmail.com; eLibrary SPIN: 9205-3670; <https://orcid.org/0000-0001-7336-409X>

Elena I. Kelly – specialist in pathological anatomy Infectious Diseases Clinical Hospital No. 1 of the Moscow Department of Health, Moscow, Russia. E-mail: ekelly@yandex.ru; <https://orcid.org/0009-0000-2718-9462>

Alexander A. Kanibolotsky – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, Head of the Pathoanatomical Department of the Research Institute of Emergency Medicine named after N.V. Sklifosovsky DZM; Head of the Department of Medical Education for Pathological Anatomy of the Research Institute of Healthcare Organization and Medical Management of the Moscow Department of Health, Moscow, Russia. E-mail: dr.kaa@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-6123-8387>; eLibrary SPIN: 3976-1662; AuthorID: 894956; WOS Research ID: Web of Science ResearcherID: HLG-3242-2023; Scopus 57223849355,

Yevgeniy N. Ivkin – pathologist doctor Research Institute of Emergency Medicine named after N.V. Sklifosovsky DZM; specialist in pathological anatomy Department of Medical Education for Pathological Anatomy of the Research Institute of Healthcare Organization and Medical Management of the Moscow Department of Health, Moscow, Russia. E-mail: evgeniivkin@rambler.ru; <https://orcid.org/0009-0004-2609-1788>

Natalia A. Antipiat – deputy chief physician Infectious Diseases Clinical Hospital No. 1 of the Moscow Department of Health, Moscow, Russia. E-mail: natadog70@bk.ru; <https://orcid.org/0000-0001-8578-2838>

Igor N. Turin – chief physician Infectious Diseases Clinical Hospital No. 1 of the Moscow Department of Health, Moscow, Russia. E-mail: tyurin.dti@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-5696-1586>

Viktor F. Larichev – Dr. Sci. (Medicine), Leading Researcher, Gamaleya NRC of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia. E-mail: vlaritchev@mail.ru; eLibrary SPIN: 5826-1430; <https://orcid.org/0000-0001-8262-5650>

Natalia A. Demidova – Researcher, Gamaleya NRC of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia. E-mail: ailande@yandex.ru; eLibrary SPIN: 8759-0277; <https://orcid.org/0000-0003-1961-9789>,

Regina R. Klimova – Senior Researcher, Gamaleya NRC of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia. E-mail: rklimova@yandex.ru; eLibrary SPIN: 8286-6108; <https://orcid.org/0000-0002-4147-8444>

Ekaterina I. Lesnova – Researcher, Gamaleya NRC of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia. E-mail: wolf252006@yandex.ru; eLibrary SPIN: 9901-8607; <https://orcid.org/0000-0002-2801-6843>

Olga V. Masalova – Dr. Sci. (Biology), Leading Researcher, Head of the Laboratory, Gamaleya NRC of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia. E-mail: ol.mas@mail.ru; eLibrary SPIN: 7210-0870; <https://orcid.org/0000-0001-5571-5669>

Alla A. Kushch – Professor, Dr. Sci. (Biology), Leading Researcher, Gamaleya NRC of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia. E-mail: vitaliku@mail.ru; eLibrary SPIN: 6964-1715; <https://orcid.org/0000-0002-3396-5533>

Contribution: Yurlov K.I. – conducting experiments, analyzing and interpreting data; Yakushina S.A. – research concept and design, data collection, systematization and analysis, text preparation; Fedorova N.E. – analyzing and interpreting data, preparing the text; Kisteneva L.B. – the concept and design of the study, the preparation of the text; Kelly E.I. – collection of experimental material, analysis of experimental data; Kanibolotsky A.A. – analysis of experimental data; Ivkin Ye.N. – analysis of experimental data; Antipiat N.A. – collection of experimental material, analysis of clinical and laboratory data; Turin I.N. – collection of experimental material, analysis of clinical and laboratory data; Larichev V.F. – conducting experiments; Demidova N.A. – conducting experiments; Lesnova E.I. – conducting experiments; Klimova R.R. – analysis of experimental data; Masalova O.V. – research design, data analysis and interpretation, text preparation; Kushch A.A. – research concept and design, data analysis and interpretation, text preparation.

Received 15 January 2024

Accepted 11 March 2024

Published 27 April 2024

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-223>

© КАРТАШОВ М.Ю., КРИВОШЕИНА Е.И., КУРУШИНА В.Ю., МОШКИН А.Б., ХАНХАРЕЕВ С.С., БИЧЕ-ООЛ Ч.Р., ПЕЛЁВИНА О.Н., ПОПОВ Н.В., БОГОМАЗОВА О.Л., ТЕРНОВОЙ В.А., 2024



Встречаемость и генетическое разнообразие вируса Алонгшан (*Flaviviridae*), выявленного в клещах на юге Восточной Сибири

Карташов М.Ю.^{1✉}, Кривошеина Е.И.¹, Курушина В.Ю.¹, Мошкин А.Б.², Ханхареев С.С.³, Биче-оол Ч.Р.⁴, Пелёвина О.Н.⁵, Попов Н.В.⁶, Богомазова О.Л.⁶, Терновой В.А.¹

¹ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Центр геномных исследований мирового уровня по обеспечению биологической безопасности и технологической независимости в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий, 630559, р.п. Кольцово, Россия;

²ФКУЗ «Читинская противочумная станция» Роспотребнадзора, 672014, г. Чита, Россия;

³Управление Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Республике Бурятия, 670013, г. Улан-Удэ, Россия;

⁴ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Тыва», 667010, г. Кызыл, Россия;

⁵ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Хакасия», 655017, г. Абакан, Россия;

⁶ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Иркутской области», 664047, г. Иркутск, Россия

Резюме

Введение. Инфекции, переносимые иксодовыми клещами, являются значимой проблемой для многих регионов России, в том числе и для Восточной Сибири. Неблагополучная эпидемиологическая ситуация может характеризоваться не только ростом встречаемости уже известных «клещевых» инфекций, но и выявлением новых нозологических форм и возбудителей, роль которых остается малоизученной или вообще неизученной. Сегментированные флавиподобные вирусы могут быть причиной инфекционных заболеваний человека и создавать угрозу для здоровья населения.

Цель работы – поиск и молекулярно-генетическая характеристика изолятов вируса Алонгшан (*Flaviviridae: Alongshan virus, ALSV*), переносимого клещами на юге Восточной Сибири.

Материалы и методы. Было собрано и исследовано 1060 клещей, отловленных на территории Республик Хакасия, Тыва, Бурятия, Иркутской области и Забайкальского края весенне-летний период 2023 г. Детекцию РНК ALSV выполняли с помощью метода полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией с последующим определением нуклеотидной последовательности и проведением филогенетического анализа для каждого из 4 сегментов генома.

Результаты. Инфицированность ALSV клещей *Ixodes persulcatus*, собранных в Республике Хакасия, составила 3,3% (95% ДИ 1,4–7,5), в Иркутской области – 1% (95% ДИ 0,3–3,7), в Республике Тыва – 0,9% (95% ДИ 0,3–3,4), в Забайкальском крае – 0,7% (95% ДИ 0,2–3,6). Генетические варианты ALSV, циркулирующие в клещах *I. persulcatus* на территории юга Восточной Сибири, по всем 4 сегментам группируются с последовательностями, обнаруженными в Китае, и кластеризуются в азиатскую подгруппу, переносимую таежным клещом. Уровень различия нуклеотидных последовательностей фрагментов генома среди выявленных генетических вариантов ALSV составил от 2 до 3%.

Заключение. Показано широкое распространение ALSV в клещах *I. persulcatus* на территории республик Хакасия и Тыва, Иркутской области и Забайкальского края. Эти данные актуализируют мониторинг за изменением ареала распространения флавиподобных вирусов, потенциально опасных для человека, и их переносчиков.

Ключевые слова: многокомпонентные флавиподобные вирусы; вирус Алонгшан; ALSV; иксодовые клещи; Восточная Сибирь

Для цитирования: Карташов М.Ю., Кривошеина Е.И., Курушина В.Ю., Мошкин А.Б., Ханхареев С.С., Биче-оол Ч.Р., Пелёвина О.Н., Попов Н.В., Богомазова О.Л., Терновой В.А. Встречаемость и генетическое разнообразие вируса Алонгшан (*Flaviviridae*), выявленного в клещах на юге Восточной Сибири. *Вопросы вирусологии*. 2024; 69(2): 151–161. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-223> EDN: <https://elibrary.ru/jwvfoe>

Благодарности. Авторы выражают благодарность руководству и сотрудникам ФКУЗ «Читинская ПЧС», ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Бурятия», ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Хакасия», ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Тыва», ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Иркутской области» за помощь в проведении исследований.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2019-1665).

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

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-223>

Prevalence and genetic diversity of the *Alongshan virus* (*Flaviviridae*) circulating in ticks in the south of Eastern Siberia

Mikhail Yu. Kartashov^{1✉}, Ekaterina I. Krivosheina¹, Valentina Yu. Kurushina¹, Alexander B. Moshkin², Sergey S. Khankhareev³, Choigana R. Biche-ool⁴, Oksana N. Pelevina⁵, Nikita V. Popov⁶, Olga L. Bogomazova⁶, Vladimir A. Ternovoi¹

¹State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», 630559, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia;

²Chita anti-plague station, 672014, Chita, Russia;

³Department of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare of the Republic of Buryatia, 670013, Ulan-Ude, Russia;

⁴Center of Hygiene and Epidemiology in the Republic of Tuva, 667010, Kyzyl, Russia;

⁵Center for Hygiene and Epidemiology in the Republic of Khakassia, 655017, Abakan, Russia;

⁶Center for Hygiene and Epidemiology in the Irkutsk region, 664047, Irkutsk, Russia

Abstract

Introduction. Tick-borne infections are of great importance for many regions of Russia, including Eastern Siberia. This unfavorable epidemiological situation can be characterized not only by the circulation of well-known tick-borne infections, but also by the identification of new pathogens, the role of which remains little or generally unexplored. Multicomponent flavi-like viruses can cause infectious diseases in humans and pose a threat to public health.

The purpose of the study was the identification and molecular genetic characterization of the *Alongshan virus* (*Flaviviridae*, ALSV) isolates, transmitted by ticks in the south of Eastern Siberia.

Materials and methods. Total 1060 ticks were collected and analyzed from the territory of the Republics of Khakassia, Tuva, Buryatia, Irkutsk Region and Transbaikal Territory (Zabaykalsky Krai) in the spring-summer period 2023. ALSV RNA was detected by RT-PCR followed by nucleotide sequence determination and phylogenetic analysis for each segment of the genome.

Results. The ALSV infection rate in *Ixodes persulcatus* ticks collected in the Republic of Khakassia was 3.3% (95% CI: 1.4–7.5); in Irkutsk Oblast – 1.0% (95% CI: 0.3–3.7); in the Republic of Tuva – 0.9% (95% CI: 0.3–3.4) and in Transbaikal Krai – 0.7% (95% CI: 0.2–3.6). Sequences of all four segments of ALSV genetic variants circulating in *I. persulcatus* ticks in the south of Eastern Siberia are grouped with sequences found in China and clustered into the Asian subgroup transmitted by taiga ticks. The level of difference in the nucleotide sequences of genome fragments among the identified genetic variants of ALSV ranged from 2 to 3%.

Conclusion. The article shows the widespread distribution of ALSV in *I. persulcatus* ticks in the Republics of Khakassia and Tyva, Irkutsk Oblast and Transbaikal Territory. The obtained data actualize monitoring of changes in the area of distribution of potentially dangerous for humans flavi-like viruses and their vectors.

Keywords: multicomponent flavi-like viruses; *Alongshan virus*; ALSV; ixodid ticks; Eastern Siberia

For citation: Kartashov M.Yu., Krivosheina E.I., Kurushina V.Yu., Moshkin A.B., Khankhareev S.S., Biche-ool C.R., Pelevina O.N., Popov N.V., Bogomazova O.L., Ternovoi V.A. Prevalence and genetic diversity of the *Alongshan virus* (*Flaviviridae*) circulating in ticks in the south of Eastern Siberia. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2024; 69(2): 151–161. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-223> EDN: <https://elibrary.ru/jwvfoe>

Funding. This study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (agreement No. 075-15-2019-1665).

Acknowledgement. The authors express their gratitude to the management and staff of the Chita anti-plague station, Department of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare for the Republic of Buryatia, Center for Hygiene and Epidemiology in the Republic of Khakassia, Center for Hygiene and Epidemiology in the Republic of Tuva, Center for Hygiene and Epidemiology in the Irkutsk region for assistance in conducting these studies.

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

Введение

Флавивирусы, переносимые клещами, широко распространены по всему миру и представляют серьезную медицинскую проблему, вызывая значительное количество инфекционных заболеваний среди людей [1]. Среди флавивирусов, переносчиками которых являются клещи, на территории России встречаются вирус Повассан, вирус омской геморрагической лихорадки, вирус шотландского энцефаломиелита овец

(*Louping ill virus*) и вирус клещевого энцефалита [2–4]. Несмотря на достаточно большое видовое разнообразие, геном всех флавивирусов имеет типичное строение и представляет собой несегментированную оц(+)РНК длиной около 11 kb, кодирующую одну протяженную открытую рамку считывания, по краям которой находятся 5'- и 3'-нетранслируемые области [5]. Однако за последнее десятилетие были выделены флавиподобные вирусы, которые отличают-

ся от «классических» флавивирусов принципиально другим строением генома и представляют собой обособленную группу в семействе *Flaviviridae*. Такие вирусы обладают сегментированным одноцепочечным РНК-геномом положительной полярности, в структуре которого имеется гомология с РНК-зависимой РНК-полимеразой (NS5) и хеликазой (NS3) «классических» флавивирусов. В эту группу входят вирус Алонгшан (*Alongshan virus, ALSV*), вирус Джингмен (*Jingmen tick virus*), вирус Янгоу (*Yanggou tick virus*) и другие вирусы группы *Jingmenvirus*.

Геномы многокомпонентных флавиподобных вирусов включают от 4 (характерно для большинства вирусов, изолированных из клещей, летучих мышей, обезьян и человека) до 5 (встречается у вирусов, выделенных из комаров) сегментов [6]. Сегмент 1 кодирует неструктурный белок NS5-like, имеющий гомологию с белком NS5 (РНК-зависимая РНК-полимераза) классических флавивирусов. Сегмент 3 кодирует неструктурный белок, имеющий высокую степень гомологии с флавивирусным белком NS3. Белок NS3, наряду с NS5, играет центральную роль в репликации вируса и является одним из наиболее изученных неструктурных белков. N-концевой домен NS3 обладает протеазной активностью, а С-концевой домен выполняет функцию хеликазы. Протеиназная активность необходима для процессинга полипротеина, хеликазный домен участвует в кэппировании и синтезе вирусной

РНК. На сегодняшний день хорошо изучена структура белка NS3 у большинства несегментированных флавивирусов и показана высокая гомология не только в строении, но также в механизмах гидролиза АТФ, распознавания и раскручивания РНК [7]. Структурные белки VP1, VP2, VP3 закодированы в сегментах 2 и 4 и не имеют известных гомологов как среди семейства *Flaviviridae*, так и среди других известных на сегодняшний день вирусов. Сегмент 2 у ALSV кодирует предполагаемые гликопротеины VP1a и VP1b, а также маленький белок с тремя трансмембранными доменами, функция которого не известна. Белки VP2 (предполагаемый капсидный белок) и VP3 (предполагаемый вирусный мембранный белок) закодированы в сегменте 4 и имеют частично перекрывающиеся рамки трансляции.

Благодаря достижениям в области высокопроизводительного секвенирования и вирусной метагеномики варианты флавиподобных вирусов были обнаружены в различных образцах на территории 4 континентов: в Азии (Китай, Лаос, Япония, Турция), Европе (Финляндия, Италия, Косово, Румыния, Россия), Южной Америке (Бразилия, Тринидад и Тобаго, Колумбия) и Африке (Уганда, Кения и Гвинея) (табл. 1). На территории России также показано широкое распространение сегментированных флавиподобных вирусов (ALSV и вирус Янгоу). Так, генетический материал ALSV был обнаружен в образцах голодных кле-

Таблица 1. Распространение ALSV в мире

Table 1. Distribution of ALSV in the world

Вид хозяина Host species	Страна Country	Номер последовательности в GenBank GenBank accession number	Ссылка Reference
<i>I. persulcatus</i>	Китай China	MH158439–MH158440, MH678646–MH678648	[11]
<i>I. persulcatus</i>	Китай China	MT246198–MT246199, MT514916–MT514917, MT536950–MT536953	
<i>I. ricinus</i>	Финляндия Finland	MN107153–MN107160	[12]
<i>I. ricinus</i>	Франция France	MN095519–MN095522	[13]
<i>I. ricinus</i>	Сербия Serbia	MT822179–MT822180	[14]
<i>I. ricinus, D. reticulatus</i>	Германия Germany	MW094148–MW094151	[15]
<i>I. ricinus</i>	Швейцария Switzerland	OP921096–OP921099	[16]
<i>Hae. longicornis</i>	Китай China	MZ676705	
<i>I. persulcatus, D. nuttalli, Hae. concinna, I. ricinus, D. reticulatus</i>	Россия Russia	MN604229, MN648770–MN648777, MT210218–MT210225, MW525311, MW525312, MW525314–MW525321, MW52531–MW52533, MW525284–MW525310, MW556738–MW556741, MW584331	[8–10, 17]
<i>Culex tritaeniorhynchus</i>	Китай China	MK213942	
<i>Bos taurus</i>	Китай China	MK122718, MK122720, MN218594, MN218595	[18]
<i>Homo sapiens</i>	Китай China	MH158415–MH158438	[18]

щей *I. persulcatus*, *I. ricinus*, *Dermacentor reticulatus* и *D. nuttalli*, собранных в Калининградской, Ульяновской, Челябинской областях, а также в республиках Карелия, Татарстан, Горный Алтай и Тыва [8–10].

В настоящее время показана патогенность многокомпонентных флавиподобных вирусов для сельскохозяйственных животных и человека. Однако эти сведения носят фрагментарный и ограниченный характер. Не исключена вероятность того, что роль флавиподобных вирусов в инфекционной патологии домашних животных и человека может быть существенно более значимой, чем принято считать. Так, ALSV был выделен из крови пациента с лихорадкой на северо-востоке Китая [9]. У 86 из 384 пациентов с лихорадкой и 18 пациентов с укусами клещей в анамнезе был выявлен ALSV с помощью молекулярно-генетических и серологических диагностических тестов. Пациенты, инфицированные ALSV, в анамнезе имели лихорадку, головную боль и другие симптомы, которые напоминают проявления других инфекций, переносимых клещами. Близкородственный ALSV вирус Джингмен был обнаружен в крови приматов в Уганде, в крови крупного рогатого скота в Бразилии и в крови пациентов с диагнозом «геморрагическая лихорадка Крым-Конго» в Косово [19–21]. Эти результаты также указывают на то, что сегментированные флавиподобные вирусы могут являться причиной инфекционных заболеваний человека и создавать угрозу для здоровья населения.

Проблема инфекций, переносчиками которых являются иксодовые клещи, актуальна для многих регионов России, в том числе и для Восточной Сибири,

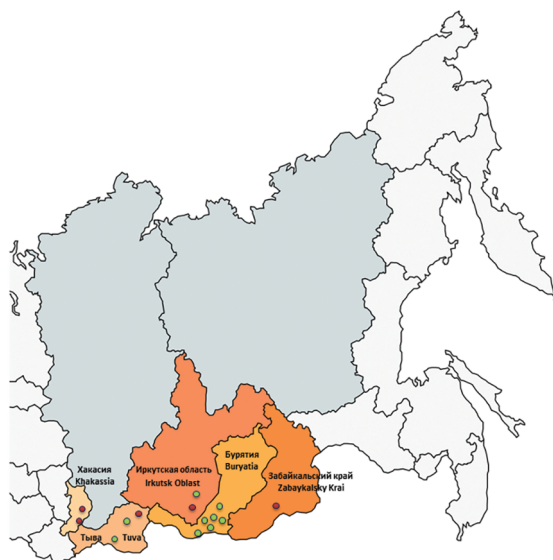


Рис. 1. Места отлова исследуемых клещей.

Красным цветом отмечены локации, где в собранных клещах была выявлена РНК ALSV; зеленым – локации, где РНК ALSV не была обнаружена.

Fig. 1. Locations where the studied ticks were captured.

Locations where ticks positive for ALSV RNA were collected are marked in red; Locations where no ALSV RNA was detected are indicated in green.

где отмечается беспрецедентный рост заболеваемости населения вирусным клещевым энцефалитом, иксодовым клещевым боррелиозом и клещевым риккетсиозом. Показано, что экосистемы юга Восточной Сибири и севера Монголии являются оптимальными для существования разнообразных переносчиков и возбудителей трансмиссивных инфекций, переносимых клещами [22]. Обширная территория юга Восточной Сибири граничит или территориально близка к внутренним районам Китая, где впервые и была обнаружена циркуляция ALSV. Тем не менее в литературе имеются данные лишь об единичной находке ALSV на территории Республики Тыва.

Цель данной работы – поиск и молекулярно-генетическая характеристика изолятов ALSV, переносимых клещами, на юге Восточной Сибири.

Материалы и методы

Всего для исследования было проанализировано 1060 индивидуальных проб клещей, отловленных на территории республик Хакасия, Тыва, Бурятия, Иркутской области и Забайкальского края в весенне-летний период 2023 г. (рис. 1). Сбор образцов клещей производили с растительности методом «на флаг». Клещей дважды отмывали 70% этанолом для удаления внешних загрязнений и наружной микрофлоры, после чего хранили при температуре -80°C до проведения дальнейших исследований. Видовую принадлежность клещей устанавливали по морфологическим характеристикам согласно определителю с последующей таксономической верификацией проб, положительных на наличие ALSV, путем определения нуклеотидной последовательности фрагмента гена цитохромоксидазы, локализованного в митохондриальном геноме клеща.

Гомогенизацию полученных образцов осуществляли с использованием лабораторного гомогенизатора TissueLyserLT (Qiagen, Германия) в 300 мкл стерильного физраствора. Выделение суммарной РНК из исследуемых образцов проводили методом фенол-хлороформной экстракции с использованием TRIzol Reagent.

Скрининг полученных образцов на наличие РНК флавиподобных вирусов выполняли с помощью метода полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), используя праймеры Miass_gly_3F/Miass_gly_3R, комплементарные фрагменту генома сегмента 2 (табл. 2). Постановку ОТ-ПЦР производили на термоблокере T-1000 («Bio-Rad», США) в 25 мкл реакционной смеси. Для положительных образцов были получены ампликоны, частично перекрывающие все 4 сегмента генома ALSV. Для исключения возможной интеграции фрагментов вирусного генома ALSV в геном клеща [23] с положительными пробами параллельно была проведена ПЦР без этапа обратной транскрипции, в результате которой ни один ампликон наработан не был.

Детекцию полученных ампликонов проводили методом гель-электрофореза в 2% агарозном геле в трис-ацетатном буфере, содержащем 0,1% бромид-

Таблица 2. Используемые в работе праймеры**Table 2.** Primers used in this work

Мишень Target	Праймер Primer	Структура праймера (5'→3') Primer sequence (5'→3')	Длина Amplicon length (bp)	Т _{отжиг} (°C) Annealing T (°C)	Ссылка Reference
<i>cox1</i>	IpCX_f	ATTAGGAGCACCTGATATAGCTTTCCC	660	60	[24]
	IpCX_r	GCTGTAATAAGCTCGAGTGTGCGATAA			
Сегмент 2 Segment 2	Miass_gly_3F	TGGATCAGCTCACACCACAC	333	53	[25]
	Miass_gly_3R	TCACCGTCACAGTGAATGG			
Сегмент 1 Segment 1	MiassF	GGTACACGGACCTGGGATCCTATTG	825	50	
	MiassR	TCTCTGACTCCTGTTCTAATC			
Сегмент 2 Segment 2	AL2_2F	CTTGCTACATCGGAATCATGCC	1091	56	
	AL2_2R	GATAAGCCCTCTCGATACCTC			
Сегмент 3 Segment 3	AL3_2F	TGCTGTCCATAGCAATCATAACC	865	56	Данная работа Current study
	AL3_2R	GTAGGACACGTCCTTTGCGA			
Сегмент 4 Segment 4	AL4_2F	GGAAGAGCTGGATACCGAACTG	1274	56	
	AL4_2R	TGCCAGATGTGTAGCTTCCC			

да этидия. Секвенирование по Сэнгеру осуществляли с использованием набора BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США). Определение нуклеотидных последовательностей выполняли на основе капиллярного электрофореза с помощью автоматического секвенатора 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Анализ полученных нуклеотидных последовательностей проводили с использованием программного продукта UniproUGENE v. 1.48. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей исследуемых фрагментов генома проводили методом максимального правдоподобия с использованием модели эволюции Tamura-Nei в программе MEGA X. Показатели статистической надежности узлов филогенетического дерева рассчитывали с помощью бутстреп-анализа с использованием 1000 случайных реплик; 95% доверительный интервал (ДИ) уровня инфицированности клещей из изучаемых патогенами рассчитывали с использованием онлайн-сервиса (<https://www.pedro.org.au/english/downloads/confidence-interval-calculator>).

Результаты

Все образцы были протестированы методом ОТ-ПЦР с использованием скрининговых праймеров для сегмента 2 генома ALSV. Встречаемость РНК среди клещей *I. persulcatus*, собранных в Республике Хакасия, составила 3,3% (95% ДИ 1,4–7,5). Аналогичный показатель для Иркутской области составил 1% (95% ДИ 0,3–3,7), для Республики Тыва – 0,9% (95% ДИ 0,3–3,4) и для Забайкальского края – 0,7% (95% ДИ 0,2–3,6). Среди клещей *D. nuttalli*, отловленных на территории Республики Бурятия, РНК ALSV обнаружено не было, что, вероятно, связано с гораздо более низкой вирусофорностью данного вида клещей (табл. 3).

Выявленные в работе нуклеотидные последовательности были депонированы в базу данных GenBank под номерами OR620965–OR620974 для фрагмента

сегмента 1, OR620975–OR620984 для фрагмента сегмента 2, OR620985–OR620994 для фрагмента сегмента 3 и OR620995–OR621004 для фрагмента сегмента 4.

Филогенетические деревья демонстрируют, что генетические варианты ALSV, циркулирующие в клещах *I. persulcatus* на территории юга Восточной Сибири, по всем четырем сегментам группируются с последовательностями, обнаруженными в Китае (рис. 2).

Различия в нуклеотидных последовательностях между выявленными вариантами по определенным в работе фрагментам генома составили от 2 до 3%. Различия в выведенных аминокислотных последовательностях варьировали от 0,5 до 1,5% (рис. 3).

Генетическое сходство нуклеотидных последовательностей между полученными в настоящем исследовании вариантами ALSV и рядом прототипных изолятов флави- и флавиподобных вирусов приведено в табл. 4. Наиболее высокий уровень гомологии варианты ALSV из Восточной Сибири проявляли с китайским изолятом ALSV H3 (94–97%). Уровень гомологии изучаемых вариантов с прототипным изолятом ALSV Miass502, выделенным из клеща *I. persulcatus* на территории Челябинской области, составил 90–97%. Аналогичный показатель при сравнении с вариантами ALSV, выделенными из *I. ricinus* в Европе, колебался в пределах 90%. Гомология с последовательностями других флавиподобных вирусов (Джингмен, Янггоу, Тачен) составляла от 50 до 75% для разных сегментов генома. Гомология сегмента 1 (NS-5 like) и сегмента 3 (NS-3 like) при сравнении с геномом вирусом клещевого энцефалита составила 54 и 41%, соответственно.

Обсуждение

Полученные в настоящей работе данные об уровне встречаемости ALSV на территории южных регионов Восточной Сибири в целом соответствуют ана-

Таблица 3. Встречаемость ALSV в исследуемых пробах клещей, обитающих на юге Восточной Сибири

Table 3. Detection rates of ALSV in the studied ticks living in the south of Eastern Siberia

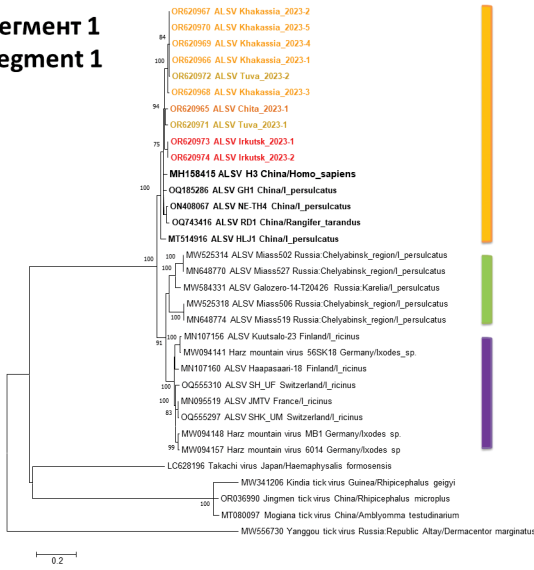
Регион Region	Вид клещей Tick species	Район District	Географические координаты Latitude, Longitude	Число проанализи- рованных образцов Number of analysed ticks	Число положительных образцов Number of virus-positive
Забайкальский край Zabaykalsky Krai	<i>I. persulcatus</i>	Дульдургинский район, Национальный парк Алханай Duldurga district, Alkhanai National Park	50.873671, 113.398280	150	1
Республика Хакасия Republic of Khakassia	<i>I. persulcatus</i>	Бейский район, долина реки Табат Beysky district, Tabat river valley	52.947886, 90.721274	100	2
		г. Саяногорск, дачное общество Большой Карак Sayanogorsk, Bolshoi Karak	53.032989, 91.415743	50	3
Иркутская область Irkutsk region	<i>I. persulcatus</i>	Иркутский район, Байкальский тракт, 20 км Irkutsk district, Baikalsky tract, 20 km	52.189528, 104.489475	100	0
		Иркутский район, Байкальский тракт, 26 км Irkutsk district, Baikalsky tract, 26 km	52.162501, 104,524191	100	2
Республика Тыва Republic of Tyva	<i>I. persulcatus</i>	Каа-Хемский район, местечко Копту Kaa-Khem district, Koptu	51.757770, 95.418196	20	0
	<i>I. persulcatus</i>	Тоджинский район, перевал Тожу Todzhinsky district, Tozhu pass	52.701197, 96.802060	170	2
	<i>I. persulcatus</i>	Тандинский район, местечко Дургенский каньон Tandinsky district, Durgen Canyon	51.049461, 94.646579	20	0
Республика Бурятия Republic of Buryatia	<i>D. nuttalli</i>	Джидинский район, с. Гэгэтуй Dzhidinsky district, village Gegetui	50.683752, 105.181199	50	0
		Тарбагатайский район, с. Саратовка Tarbagatai district, village Saratovka	51.537704, 107.346951	50	0
		Тарбагатайский район, гора Спящий лев Tarbagatai district, Mount «Sleeping Lion»	51.537704, 107346951	50	0
		Тарбагатайский район, окрестности с. Саянтуй Tarbagatai district, village Sayantui	51,694972, 107.448139	50	0
		Иволгинский район, окрестности с. Ключи Ivolginsky district, village Kluchi	51.687606, 107.173963	50	0
		Селенгинский район, окрестности г. Гусиноозерск Selenginsky district, Gusinoozersk	50.632847, 105.382886	50	0
		Заиграевский район, окрестности с. Эрхирик, Онохой Zaigraevsky district, village Erhirik	51.898049, 108.006255	50	0

логичным данным, полученным для других регионов России. Наибольшая инфицированность клещей обнаружена в Хакасии (3,3%), что приближается к вирусофорности клещей из Челябинской области (4,3%) и Калининградской области (7,8%). Уровень инфицированности для других регионов Восточной Сибири (0,7–1%) соответствует ранее полученным показателям для Республики Тыва (0,6%), Республики Карелия (0,8%) и Республики Татарстан (1,4%) [8–10]. На основе полученных нами данных можно предположить наличие некоего градиента в возрастании

инфицированности клещей ALSV с востока на запад, однако это предположение следует подтвердить проведением более обширного мониторинга и увеличением исследуемых проб клещей.

Согласно данным литературы, при филогенетическом анализе сегмента 2, кодирующего поверхностные структурные вирусные белки, показано, что основными факторами эволюции ALSV являются вид основного переносчика и место изоляции вируса. Предположительно изоляты ALSV разделяются в соответствии с основным видом переносчи-

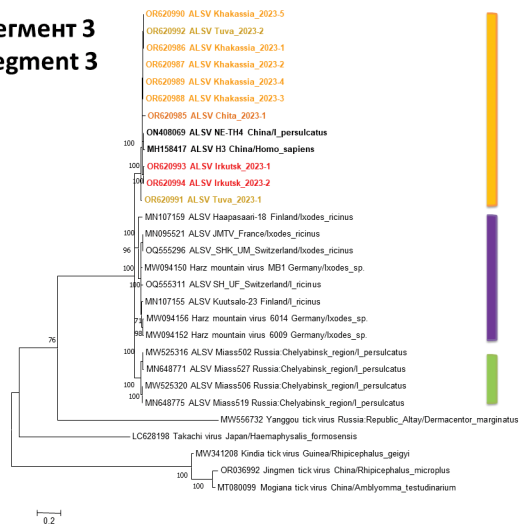
**Сегмент 1
Segment 1**



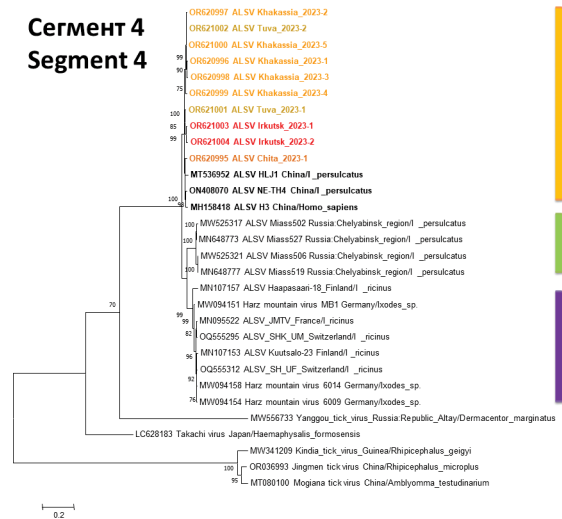
**Сегмент 2
Segment 2**



**Сегмент 3
Segment 3**



**Сегмент 4
Segment 4**



группа «*I. persulcatus*», азиатская кланда
group «*I. persulcatus*», Asian clade

группа «*I. persulcatus*», европейская кланда
group «*I. persulcatus*», European clade

группа «*I. ricinus*»
group «*I. ricinus*»

Рис. 2. Филогенетические деревья выявленных вариантов ALSV.

Fig. 2. Phylogenetic trees of identified ALSV variants.

ка на группы «*I. ricinus*» и «*I. persulcatus*». Группа «*I. persulcatus*» делится на две подгруппы: европейскую (республики Карелия и Алтай, Челябинская область) и азиатскую (Китай, республики Алтай, Тыва и Карелия, Челябинская и Ульяновская области и Алтайский край) [9]. Данное предположение нашло подтверждение в настоящем исследовании, т.е. все изоляты ALSV, циркулирующие на юге Восточной Сибири в клещах *I. persulcatus*, однозначно кластеризовались в азиатскую подгруппу соответствующего переносчика при анализе по каждому из сегментов генома.

В проведенной ранее работе было показано, что наибольший уровень внутривидового различия в нуклеотидных последовательностях ALSV характерен для сегмента 1, кодирующего аналог NS5 белка «классических» флавивирусов [23]. Это подтверждается на примере выявленных вариантов ALSV. Однако при анализе аминокислотных последовательностей видно, что аналоги белков NS5 и NS3 более консервативны по сравнению со структурными белками ALSV (рис. 3).

Можно предположить, что для вирусов с многокомпонентным геномом характерны события перегрупп-

Таблица 4. Уровень гомологии нуклеотидной последовательности (%) ряда выявленных вариантов ALSV по сравнению с прототипными изолятами флави- и флавиподобных вирусов

Table 4. Level of nucleotide sequence similarity (%) of a number of identified ALSV variants in comparison with prototype isolates of flavi- and flavi-like viruses

Прототипные изоляты Prototype isolates		Варианты ALSV, полученные в работе ALSV variants identified in this study			
		Chita 2023-1	Khakassia 2023-1	Tuva 2023-1	Irkutsk 2023-1
ALSV H3	Cer. 1/Seg.1	96,3	95,8	96,2	96,1
	Cer. 2/Seg.2	93,9	94,4	93,9	93,8
	Cer. 3/Seg.3	96,3	97,1	96,4	96,3
	Cer. 4/Seg.4	97,3	96,5	97,3	96,5
ALSV Miass502	Cer. 1/Seg.1	89,7	89,8	89,5	89,4
	Cer. 2/Seg.2	98,0	97,4	98	97,2
	Cer. 3/Seg.3	90,9	90,4	91,4	89,9
	Cer. 4/Seg.4	90,2	90,2	91,1	90,3
ALSV Kuutsalo	Cer. 1/Seg.1	88,9	89,5	89,5	89,1
	Cer. 2/Seg.2	91,7	91,6	91,3	91,5
	Cer. 3/Seg.3	90,7	90,7	91,2	90,6
	Cer. 4/Seg.4	91,2	90,9	91,5	90,8
Jingmen tick virus isolate 21GZ1	Cer. 1/Seg.1	75,2	76,5	75,3	75,2
	Cer. 2/Seg.2	50,3	50,3	50,4	50,4
	Cer. 3/Seg.3	74,5	74,2	75,8	74,5
	Cer. 4/Seg.4	63,3	63,2	64,4	64,1
Yanggou tick virus isolate Republic Altay/997/2016	Cer. 1/Seg.1	73,4	73,2	74,2	73,7
	Cer. 2/Seg.2	61,9	61,9	62,1	61,9
	Cer. 3/Seg.3	76,2	76,5	76,4	75,7
	Cer. 4/Seg.4	70,2	70,4	70,3	69,8
Takachi virus isolate IM-OI110	Cer. 1/Seg.1	74,2	75,2	74,5	75,3
	Cer. 2/Seg.2	65,7	66,1	66,3	66,3
	Cer. 3/Seg.3	77,3	77,2	77,4	77,2
	Cer. 4/Seg.4	74,6	74,5	74,9	75,4
Tick-borne encephalitis virus strain Zausaev	Cer. 1/Seg.1	54,5	54,7	54,6	54,3
	Cer. 2/Seg.2	–	–	–	–
	Cer. 3/Seg.3	41,6	41,4	41,7	41,5
	Cer. 4/Seg.4	–	–	–	–

пировки/рекомбинации, которые могут вносить вклад в их генетическую изменчивость. Топология филогенетических деревьев, построенных для фрагментов всех 4 сегментов, как у выявленных генетических вариантов ALSV, так и у прототипных изолятов практически совпадает. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что геном флавиподобных вирусов чрезвычайно стабилен среди позвоночных и беспозвоночных. Этот факт позволяет предположить, что вирус уже хорошо адаптирован к обоим хозяевам.

Показано, что на территории Республики Тыва существуют сочетанные очаги флавивирусов (вирус клещевого энцефалита) и флавиподобных вирусов (ALSV и вирус Янгтоу) [9]. В связи с широким распространением вируса клещевого энцефалита в Восточной Сибири и обнаружением в клещах данного региона ALSV, наличие таких сочетанных очагов можно предположить и на других изучаемых территориях. Это поднимает вопрос о возможной коциркуляции этих вирусов, их взаимного влияния друг на друга и коинфицировании человека при укусе клеща.

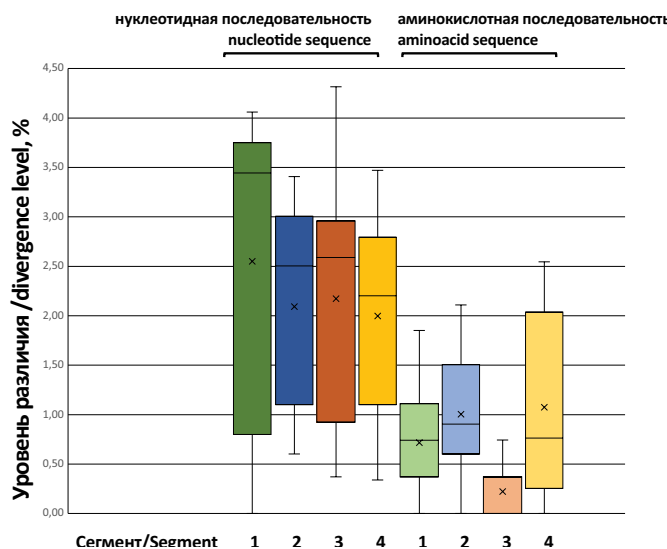


Рис. 3. Уровень различия нуклеотидных и аминокислотных последовательностей выявленных вариантов ALSV на юге Восточной Сибири.

Fig. 3. Level of differences in nucleotide and amino acid sequences of identified ALSV variants in the south of Eastern Siberia.

Заключение

Современная неблагополучная эпидемиологическая ситуация, сложившаяся в России в отношении инфекций, переносимых клещами, характеризуется не только ростом заболеваемости уже известными «клещевыми» инфекциями, но и выявлением новых нозологических форм и возбудителей, роль которых в региональной инфекционной патологии остается малоизученной или вообще неизученной. Данные о циркуляции флавиподобных вирусов, потенциально опасных для человека, могут служить основой для коррекции профилактических и противоэпидемических мероприятий. Для понимания актуальной обстановки, проведения регионально-ориентированной лабораторной диагностики и осуществления своевременных и адекватных профилактических мероприятий по отношению к инфекциям, переносимым клещами на территории Восточной Сибири, необходима достоверная информация о спектре циркулирующих на территории региона переносимых клещами патогенов и их генетической вариабельности. В работе показано широкое распространение вируса Алонгшан на территории республик Хакасия и Тыва, Иркутской области и Забайкальского края. Для выявленных вариантов вируса проведена молекулярно-генетическая характеристика и получены частичные нуклеотидные последовательности всех 4 сегментов генома. Эти данные актуализируют необходимость проведения мониторинга за изменением границ распространения флавиподобных вирусов, потенциально опасных для человека, и их переносчиков, что позволит спрогнозировать варианты распространения инфекции.


ЛИТЕРАТУРА

- Pierson T.C., Diamond M.S. The continued threat of emerging flaviviruses. *Nat. Microbiol.* 2020; 5(6): 796–812. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0714-0>
- Leonova G.N., Kondratov I.G., Ternovoi V.A., Romanova E.V., Protopopova E.V., Chausov E.V., et al. Characterization of Powassan viruses from Far Eastern Russia. *Arch. Virol.* 2009; 154(5): 811–20. <https://doi.org/10.1007/s00705-009-0376-y>
- Růžek D., Yakimenko V.V., Karan L.S., Tkachev S.E. Omsk haemorrhagic fever. *Lancet.* 2010; 376(9758): 2104–13. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61120-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61120-8)
- Львов Д.К., Альховский С.В., Жирнов О.П. 130 лет вирусологии. *Вопросы вирусологии.* 2022; 67(5): 357–84. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-140> <https://elibrary.ru/qhemb1>
- García-Blanco M.A., Vasudevan S.G., Bradrick S.S., Nicchitta C. Flavivirus RNA transactions from viral entry to genome replication. *Antiviral Res.* 2016; 134: 244–9. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.09.010>
- Colmant A.M.G., Charrel R.N., Coutard B. Jingmenviruses: Ubiquitous, understudied, segmented flavi-like viruses. *Front. Microbiol.* 2022; 13: 997058. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.997058>
- Gao X., Zhu K., Wojdyla J.A., Chen P., Qin B., Li Z., et al. Crystal structure of the NS3-like helicase from Alongshan virus. *IUCrJ.* 2020; 7(Pt. 3): 375–82. <https://doi.org/10.1107/S2052252520003632>
- Kholodilov I.S., Litov A.G., Klimentov A.S., Belova O.A., Polienko A.E., Nikitin N.A., et al. Isolation and characterisation of Alongshan virus in Russia. *Viruses.* 2020; 12(4): 362. <https://doi.org/10.3390/v12040362>
- Kholodilov I.S., Belova O.A., Morozkin E.S., Litov A.G., Ivannikova A.Y., Makenov M.T., et al. Geographical and tick-dependent distribution of flavi-like Alongshan and Yanggou tick viruses in Russia. *Viruses.* 2021; 13(3): 458. <https://doi.org/10.3390/v13030458>
- Kholodilov I.S., Belova O.A., Ivannikova A.Y., Gadzhikurbanov M.N., Makenov M.T., Yakovlev A.S., et al. Distribution and characterisation of tick-borne flavi-, flavi-like, and phenuiviruses in the Chelyabinsk region of Russia. *Viruses.* 2022; 14(12): 2699. <https://doi.org/10.3390/v14122699>
- Wang Z.D., Wang B., Wei F., Han S.Z., Zhang L., Yang Z.T., et al. A new segmented virus associated with human febrile illness in China. *N. Engl. J. Med.* 2019; 380(22): 2116–25. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1805068>
- Kuivanen S., Levanov L., Kareinen L., Sironen T., Jääskeläinen A.J., Plyusnin I., et al. Detection of novel tick-borne pathogen, Alongshan virus, in Ixodes ricinus ticks, south-eastern Finland, 2019. *Euro Surveill.* 2019; 24(27): 1900394. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.27.1900394>
- Temmam S., Bigot T., Chrétien D., Gondard M., Pérot P., Pommelet V., et al. Insights into the host range, genetic diversity, and geographical distribution of Jingmenviruses. *mSphere.* 2019; 4(6): e00645–19. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00645-19>
- Stanojević M., Li K., Stamenković G., Ilić B., Paunović M., Pešić B., et al. Depicting the RNA virome of hematophagous arthropods from Belgrade, Serbia. *Viruses.* 2020; 12(9): 975. <https://doi.org/10.3390/v12090975>
- Ebert C.L., Söder L., Kubinski M., Glanz J., Gregersen E., Dümmer K., et al. Detection and characterization of Alongshan virus in ticks and tick saliva from Lower Saxony, Germany with serological evidence for viral transmission to game and domestic animals. *Microorganisms.* 2023; 11(3): 543. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030543>
- Stegmüller S., Fraefel C., Kubacki J. Genome Sequence of Alongshan virus from Ixodes ricinus ticks collected in Switzerland. *Microbiol. Resour. Announc.* 2023; 12(3): e0128722. <https://doi.org/10.1128/mra.01287-22>
- Bugmyrin S.V., Romanova L.A., Chernokhaeva L.L., et al. Pathogens in Ixodes persulcatus and Ixodes ricinus ticks (Acari, Ixodidae) in Karelia (Russia). *Ticks Tick Borne Dis.* 2022; 13(6): 102045. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2022.102045>
- Wang Z.D., Wang W., Wang N.N., Qiu K., Zhang X., Tana G., et al. Prevalence of the emerging novel Alongshan virus infection in sheep and cattle in Inner Mongolia, northeastern China. *Parasit Vectors.* 2019; 12(1): 450. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3707-1>
- Ladner J.T., Wiley M.R., Beitzel B., Auguste A.J., Dupuis A.P. 2nd, Lindquist M.E., et al. A multicomponent animal virus isolated from mosquitoes. *Cell Host Microbe.* 2016; 20(3): 357–67. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.07.011>
- Souza W.M., Fumagalli M.J., Torres Carrasco A.O., Romeiro M.F., Modha S., Seki M.C., et al. Viral diversity of Rhipicephalus microplus parasitizing cattle in southern Brazil. *Sci. Rep.* 2018; 8(1): 16315. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34630-1>
- Emmerich P., Jakupi X., von Possel R., Berisha L., Halili B., Günther S., et al. Viral metagenomics, genetic and evolutionary characteristics of Crimean-Congo hemorrhagic fever orthonairovirus in humans, Kosovo. *Infect. Genet. Evol.* 2018; 65: 6–11. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.07.010>
- Данчинова Г.А., Хаснатинов М.А., Злобин В.И., Козлова И.В., Верхозина М.М., Сунцова О.В. и др. Иксодовые клещи юга Восточной Сибири и Монголии и их спонтанная зараженность возбудителями природно-очаговых трансмиссивных инфекций. *Бюллетень сибирской медицины.* 2006; 5(S1): 137–43. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2006--137-143> <https://elibrary.ru/rtnbop>
- Morozkin E.S., Makenov M.T., Zhurenkova O.B., Kholodilov I.S., Belova O.A., Radyuk E.V., et al. Integrated Jingmenvirus polymerase gene in Ixodes ricinus genome. *Viruses.* 2022; 14(9): 1908. <https://doi.org/10.3390/v14091908>
- Карташов М.Ю., Кривошеина Е.И., Свириной К.А., Тупота Н.Л., Терновой В.А., Локтев В.Б. Генотипирование возбудителей клещевых инфекций и определение видового состава клещей, нападающих на людей в Новосибирске и его пригородах. *Инфекция и иммунитет.* 2022; 12(6): 1103–12. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-GOT-1979>
- Litov A.G., Okhezin E.V., Kholodilov I.S., Polienko A.E., Karganova G.G. Quantitative polymerase chain reaction system for Alongshan virus detection. *Methods Protoc.* 2023; 6(5): 79. <https://doi.org/10.3390/mps6050079>

REFERENCES

- Pierson T.C., Diamond M.S. The continued threat of emerging flaviviruses. *Nat. Microbiol.* 2020; 5(6): 796–812. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0714-0>
- Leonova G.N., Kondratov I.G., Ternovoi V.A., Romanova E.V., Protopopova E.V., Chaousov E.V., et al. Characterization of Powassan viruses from Far Eastern Russia. *Arch. Virol.* 2009; 154(5): 811–20. <https://doi.org/10.1007/s00705-009-0376-y>
- Růžek D., Yakimenko V.V., Karan L.S., Tkachev S.E. Omsk haemorrhagic fever. *Lancet.* 2010; 376(9758): 2104–13. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61120-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61120-8)
- Lvov D.K., Al'khovskiy S.V., Zhirnov O.P. 130th anniversary of virology. *Voprosy virusologii.* 2022; 67(5): 357–84. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-140> <https://elibrary.ru/qhemb1>
- Garcia-Blanco M.A., Vasudevan S.G., Bradrick S.S., Nicchitta C. Flavivirus RNA transactions from viral entry to genome replication. *Antiviral Res.* 2016; 134: 244–9. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.09.010>
- Colmant A.M.G., Charrel R.N., Coutard B. Jingmenviruses: Ubiquitous, understudied, segmented flavi-like viruses. *Front. Microbiol.* 2022; 13: 997058. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.997058>
- Gao X., Zhu K., Wojdyla J.A., Chen P., Qin B., Li Z., et al. Crystal structure of the NS3-like helicase from Alongshan virus. *IUCrJ.* 2020; 7(Pt. 3): 375–82. <https://doi.org/10.1107/S20522525200003632>
- Kholodilov I.S., Litov A.G., Klimentov A.S., Belova O.A., Polienko A.E., Nikitin N.A., et al. Isolation and characterisation of Alongshan virus in Russia. *Viruses.* 2020; 12(4): 362. <https://doi.org/10.3390/v12040362>
- Kholodilov I.S., Belova O.A., Morozkin E.S., Litov A.G., Ivannikova A.Y., Makenov M.T., et al. Geographical and tick-dependent distribution of flavi-like Alongshan and Yanggou tick viruses in Russia. *Viruses.* 2021; 13(3): 458. <https://doi.org/10.3390/v13030458>
- Kholodilov I.S., Belova O.A., Ivannikova A.Y., Gadzhikurbanov M.N., Makenov M.T., Yakovlev A.S., et al. Distribution and characterisation of tick-borne flavi-, flavi-like, and phenuiviruses in the Chelyabinsk region of Russia. *Viruses.* 2022; 14(12): 2699. <https://doi.org/10.3390/v14122699>
- Wang Z.D., Wang B., Wei F., Han S.Z., Zhang L., Yang Z.T., et al. A new segmented virus associated with human febrile illness in China. *N. Engl. J. Med.* 2019; 380(22): 2116–25. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1805068>
- Kuivanen S., Levanov L., Kareinen L., Sironen T., Jääskeläinen A.J., Plyusnin I., et al. Detection of novel tick-borne pathogen, Alongshan virus, in Ixodes ricinus ticks, south-eastern Finland, 2019. *Euro Surveill.* 2019; 24(27): 1900394. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.27.1900394>
- Temmam S., Bigot T., Chrétien D., Gondard M., Pérot P., Pommelet V., et al. Insights into the host range, genetic diversity, and geographical distribution of Jingmenviruses. *mSphere.* 2019; 4(6): e00645–19. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00645-19>
- Stanojević M., Li K., Stamenković G., Ilić B., Paunović M., Pešić B., et al. Depicting the RNA virome of hematophagous arthropods from Belgrade, Serbia. *Viruses.* 2020; 12(9): 975. <https://doi.org/10.3390/v12090975>
- Ebert C.L., Söder L., Kubinski M., Glanz J., Gregersen E., Dümmer K., et al. Detection and characterization of Alongshan virus in ticks and tick saliva from Lower Saxony, Germany with serological evidence for viral transmission to game and domestic animals. *Microorganisms.* 2023; 11(3): 543. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030543>
- Stegmüller S., Fraefel C., Kubacki J. Genome Sequence of Alongshan virus from Ixodes ricinus ticks collected in Switzerland. *Microbiol. Resour. Announc.* 2023; 12(3): e0128722. <https://doi.org/10.1128/mra.01287-22>
- Bugmyrin S.V., Romanova L.Y., Belova O.A., Kholodilov I.S., Bespyatova L.A., Chernokhaeva L.L., et al. Pathogens in Ixodes persulcatus and Ixodes ricinus ticks (Acari, Ixodidae) in Karelia (Russia). *Ticks Tick Borne Dis.* 2022; 13(6): 102045. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2022.102045>
- Wang Z.D., Wang W., Wang N.N., Qiu K., Zhang X., Tana G., et al. Prevalence of the emerging novel Alongshan virus infection in sheep and cattle in Inner Mongolia, northeastern China. *Parasit Vectors.* 2019; 12(1): 450. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3707-1>
- Ladner J.T., Wiley M.R., Beitzel B., Auguste A.J., Dupuis A.P. 2nd, Lindquist M.E., et al. A multicomponent animal virus isolated from mosquitoes. *Cell Host Microbe.* 2016; 20(3): 357–67. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.07.011>
- Souza W.M., Fumagalli M.J., Torres Carrasco A.O., Romeiro M.F., Modha S., Seki M.C., et al. Viral diversity of Rhipicephalus microplus parasitizing cattle in southern Brazil. *Sci. Rep.* 2018; 8(1): 16315. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34630-1>
- Emmerich P., Jakupi X., von Possel R., Berisha L., Halili B., Günther S., et al. Viral metagenomics, genetic and evolutionary characteristics of Crimean-Congo hemorrhagic fever orthonaviruses in humans, Kosovo. *Infect. Genet. Evol.* 2018; 65: 6–11. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.07.010>
- Danchinova G.A., Khasnatinov M.A., Zlobin V.I., Kozlova I.V., Verkhovzina M.M., Suntsova O.V., et al. Ixodid ticks in Southern part of Eastern Siberia and Mongolia and their spontaneous infectiveness by infectious agents. *Byulleten' sibirskoi meditsiny.* 2006; 5(S1): 137–43. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2006-137-143> <https://elibrary.ru/rtnbop> (in Russian)
- Morozkin E.S., Makenov M.T., Zhurenkova O.B., Kholodilov I.S., Belova O.A., Radyuk E.V., et al. Integrated Jingmenvirus polymerase gene in Ixodes ricinus genome. *Viruses.* 2022; 14(9): 1908. <https://doi.org/10.3390/v14091908>
- Kartashov M.Yu., Krivosheina E.I., Svirin K.A., Tupota N.L., Ternovoi V.A., Loktev V.B. Genotyping of tick-borne pathogens and determination of human attacking tick species in Novosibirsk and its suburbs. *Infektsiya i immunitet.* 2022; 12(6): 1103–12. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-GOT-1979> (in Russian)
- Litov A.G., Okhezina E.V., Kholodilov I.S., Polienko A.E., Karganova G.G. Quantitative polymerase chain reaction system for Alongshan virus detection. *Methods Protoc.* 2023; 6(5): 79. <https://doi.org/10.3390/mps6050079>

Информация об авторах:

Карташов Михаил Юрьевич  – канд. биол. наук, старший научный сотрудник отдела молекулярной вирусологии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Россия. E-mail: mikkartash@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-7857-6822>

Кривошеина Екатерина Ильинична – научный сотрудник отдела молекулярной вирусологии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Россия. E-mail: ktr962@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-5181-0415>

Курушина Валентина Юрьевна – стажер-исследователь отдела молекулярной вирусологии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Россия. E-mail: kurushina.valenti@gmail.com; <https://orcid.org/0009-0005-8148-5242>

Мошкин Александр Борисович – директор ФКУЗ «Читинская ПЧС» Роспотребнадзора, Чита, Россия. E-mail: pchs.chita@mail.ru; <https://orcid.org/0009-0007-8491-2363>

Ханхареев Сергей Степанович – канд. мед. наук, руководитель Управления Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Республике Бурятия, Улан-Удэ, Россия. E-mail: org@03.rospotrebнадzor.ru; <https://orcid.org/0000-0002-4884-7919>

Биче-оол Чойгана Романовна – и.о. заведующей отдела обеспечения эпидемиологического надзора ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Тыва», Кызыл, Россия. E-mail: priem@17cgie.ru; <https://orcid.org/0009-0002-1622-0553>

Пелёвина Оксана Николаевна – энтомолог отдела эпидемиологии ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Хакасия», Абакан, Россия. E-mail: pelevina_on@fbuz19.ru; <https://orcid.org/0009-0004-9507-4199>

Попов Никита Викторович – заведующий отделением энтомологии ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Иркутской области», Иркутск, Россия. E-mail: ento-molog@mail.ru; <https://orcid.org/0009-0002-6276-2388>

Богомазова Ольга Леонидовна – энтомолог ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Иркутской области», Иркутск, Россия. E-mail: entomolog@sesoirk.irkutsk.ru; <https://orcid.org/0009-0009-6892-1125>

Терновой Владимир Александрович – канд. биол. наук, врио заведующего отделом молекулярной вирусологии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Россия. E-mail: tern@vector.nsc.ru; <https://orcid.org/0000-0003-1275-171X>

Участие авторов: Карташов М.Ю. – концепция и дизайн исследования, проведение исследований, написание текста статьи; Кривошеина Е.И., Курушина В.Ю. – проведение лабораторных исследований; Мошкин А.Б., Ханхареєв С.С., Биче-оол Ч.Р., Пелёвина О.Н., Попов Н.В., Богомазова О.Л. – сбор и доставка проб биологического материала; Терновой В.А. – общее руководство, научное редактирование.

Поступила 01.02.2024

Принята в печать 28.03.2024

Опубликована 27.04.2024

Information about the authors:

Mikhail Yu. Kartashov – Ph.D. (Biol.), Senior Researcher, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia. E-mail: mikkartash@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-7857-6822>

Ekaterina I. Krivosheina – Researcher, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia. E-mail: katr962@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-5181-0415>

Valentina Yu. Kurushina – Junior Researcher, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia. E-mail: kurushina.valenti@gmail.com; <https://orcid.org/0009-0005-8148-5242>

Alexander B. Moshkin – Director, «Chita anti-plague station», Chita, Russia. E-mail: pchs.chita@mail.ru; <https://orcid.org/0009-0007-8491-2363>

Sergey S. Khankhareev – Ph.D. (Med.), Director, Department of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare for the Republic of Buryatia, Ulan-Ude, Russia. E-mail: org@03.rospotrebnadzor.ru; <https://orcid.org/0000-0002-4884-7919>

Choigana R. Biche-ool – Head of the Epidemiological Surveillance Department, Center of Hygiene and Epidemiology in the Republic of Tuva, Kyzyl, Russia. E-mail: priem@17cgie.ru; <https://orcid.org/0009-0002-1622-0553>

Oksana N. Pelevina – Entomologist, Center for Hygiene and Epidemiology in the Republic of Khakassia, Abakan, Russia. E-mail: pelevina_on@fbuz19.ru; <https://orcid.org/0009-0004-9507-4199>

Nikita V. Popov – Head of Department-Entomologist, Center for Hygiene and Epidemiology in the Irkutsk region, Irkutsk, Russia. E-mail: entomolog@mail.ru; <https://orcid.org/0009-0002-6276-2388>

Olga L. Bogomazova – Entomologist, Center for Hygiene and Epidemiology in the Irkutsk region, Irkutsk, Russia. E-mail: entomolog@sesoirk.irkutsk.ru; <https://orcid.org/0009-0009-6892-1125>

Vladimir A. Ternovoi – Ph.D. (Biol.), Head of Department, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia. E-mail: tern@vector.nsc.ru; <https://orcid.org/0000-0003-1275-171X>

Contribution: Kartashov M.Yu. – concept and design of the study, conducting research, writing the text of the article; Krivosheina E.I., Kurushina V.Yu. – performing the experiments; Moshkin A.B., Khankhareev S.S., Biche-ool C.R., Pelevina O.N., Popov N.V., Bogomazova O.L. – collection and delivery of samples of biological material; Ternovoi V.A. – research management.

Received 01 February 2024

Accepted 28 March 2024

Published 27 April 2024

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-224>

© КРАСНОВ Я.М., НАЙДЕНОВА Е.В., ГУСЕВА Н.П., ПОЛУНИНА Т.А., ШАРАПОВА Н.А., СОСЕДОВА Е.А., КОТОВА Н.В., ЗАХАРОВ К.С., КАЗАНЦЕВ А.В., ДОМАНИНА И.В., ЧЕКАШОВ В.Н., ШИЛОВ М.М., КОНДРАТЬЕВ Е.Н., ОСИНА Н.А., КУТЫРЕВ В.В., 2024

Филогенетический анализ вариантов вируса Пуумала (Hantaviridae: *Orthohantavirus*), циркулирующих на территории Саратовской области

Краснов Я.М., Найденова Е.В.✉, Гусева Н.П., Полунина Т.А., Шарапова Н.А., Соседова Е.А., Котова Н.В., Захаров К.С., Казанцев А.В., Доманина И.В., Чекашов В.Н., Шиллов М.М., Кондратьев Е.Н., Осина Н.А., Кутырев В.В.

ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, 410005, г. Саратов, Россия

Резюме

Цель работы – определение полной нуклеотидной последовательности и проведение филогенетического анализа вариантов геномов вируса Пуумала, выделенных на территории Саратовской области.

Материалы и методы. Образцами для исследования послужил полевой материал, собранный в Гагаринском (бывшем Саратовском), Энгельском, Новобурасском и Хвалынском районах Саратовской области в период с 2019 по 2022 г. Для специфического обогащения генома вируса Пуумала в образцах использовали ПЦР и панель праймеров, подготовленную для данного исследования. Далее проводили секвенирование полученных продуктов реакции и сборку фрагментов в одну последовательность для каждого из сегментов генома вируса. При построении филогенетических деревьев применяли алгоритм maximum parsimony.

Результаты. Показано, что генетические варианты вируса Пуумала, выделенные в Саратовской области, имеют высокую степень подобия генома, что говорит о единстве их происхождения. По данным филогенетического анализа, все выделенные варианты вируса (за исключением изолятов вируса из Хвалынского района) образуют обособленную ветвь в кластере, сформированном хантавирусами из других субъектов Приволжского федерального округа. Самыми близкими к образцам из Саратовской области являются варианты вируса из республик Удмуртия и Татарстан, а также из Самарской и Ульяновской областей.

Заключение. Полученные данные указывают на наличие выраженной территориальной приуроченности штаммов к определенным регионам или областям, являющимся природными биотопами их носителей. Этот факт позволяет довольно точно определять территорию возможного инфицирования заболевших и/или циркуляцию переносчиков данных вариантов вируса по последовательности отдельных сегментов их генома.

Ключевые слова: хантавирусы; вирус Пуумала; нуклеотидная последовательность; Саратовская область; филогеография

Для цитирования: Краснов Я.М., Найденова Е.В., Гусева Н.П., Полунина Т.А., Шарапова Н.А., Соседова Е.А., Котова Н.В., Захаров К.С., Казанцев А.В., Доманина И.В., Чекашов В.Н., Шиллов М.М., Кондратьев Е.Н., Осина Н.А., Кутырев В.В. Филогенетический анализ вариантов генома вируса Пуумала (Hantaviridae: *Orthohantavirus*), выделенных на территории Саратовской области. *Вопросы вирусологии*. 2024; 69(2): 162–174. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-224> EDN: <https://elibrary.ru/ijmubu>

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

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

Этическое утверждение. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus author guidelines for animal use» (IAVES 23 July 2010). Исследование одобрено комиссией по биоэтике ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора (протокол № 8 от 21.11.2023).

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-224>

Phylogenetic analysis of variants of the Puumala virus (Hantaviridae: *Orthohantavirus*) circulating in the Saratov region

Yaroslav M. Krasnov, Ekaterina V. Naidenova✉, Natalia P. Guseva, Tatiana A. Polunina, Natalia A. Sharapova, Ekaterina A. Sosedova, Nina V. Kotova, Kirill S. Zakharov, Andrey V. Kazantsev, Irina V. Domanina, Vladimir N. Chekashov, Mikhail M. Shilov, Evgeniy N. Kondratiev, Natalia A. Osina, Vladimir V. Kutyrev

Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», 410005, Saratov, Russia

Abstract

The objective is to determine the complete nucleotide sequence and conduct a phylogenetic analysis of genome variants of the Puumala virus isolated in the Saratov region.

Materials and methods. The samples for the study were field material collected in the Gagarinsky (formerly Saratovsky), Engelssky, Novoburassky and Khvalynsky districts of the Saratov region in the period from 2019 to 2022. To specifically enrich the Puumala virus genome in the samples, were used PCR and developed a specific primer panel. Next, the resulting PCR products were sequenced and the fragments were assembled into one sequence for each segment of the virus genome. To construct phylogenetic trees, the maximum parsimony algorithm was used.

Results. Genetic variants of the Puumala virus isolated in the Saratov region have a high degree of genome similarity to each other, which indicates their unity of origin. According to phylogenetic analysis, they all form a separate branch in the cluster formed by hantaviruses from other subjects of the Volga Federal District. The virus variants from the Republics of Udmurtia and Tatarstan, as well as from the Samara and Ulyanovsk regions, are closest to the samples from the Saratov region.

Conclusion. The data obtained show the presence of a pronounced territorial confinement of strains to certain regions or areas that are the natural biotopes of their carriers. This makes it possible to fairly accurately determine the territory of possible infection of patients and/or the circulation of carriers of these virus variants based on the sequence of individual segments of their genome.

Keywords: *hantaviruses; Puumala orthohantavirus; nucleotide sequence; Saratov region; Phylogeography*

For citation: Krasnov Ya.M., Naidenova E.V., Guseva N.P., Polunina T.A., Sharapova N.A., Sosedova E.A., Kotova N.V., Zakharov K.S., Kazantsev A.V., Domanina I.V., Chekashov V.N., Shilov M.M., Kondratiev E.N., Osina N.A., Kutyrev V.V. Phylogenetic analysis of the genome variants of the Puumala virus (Hantaviridae: *Orthohantavirus*) isolated in the Saratov region. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2024; 69(2): 162–174. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-224> EDN: <https://elibrary.ru/ijmubu>

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

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

Ethics approval. Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with “Consensus author guidelines for animal use” (IAVES 23 July 2010). The study was approved at the meeting of the Bioethics Commission of the Russian Anti-Plague Institute «Microbe» (protocol No. 8, dated 21.11.2023).

Введение

Известно, что на Приволжский федеральный округ (ПФО) Российской Федерации приходится более 80% всех ежегодно зарегистрированных случаев заболевания геморрагической лихорадкой с почечным синдромом (ГЛПС) [1, 2], и Саратовская область не является исключением. Так, по данным, изложенным в письме Главного государственного санитарного врача Российской Федерации А.Ю. Поповой от 11.03.2024 № 02/4030-2024-32 «Об эпидемиологической ситуации по геморрагической лихорадке с почечным синдромом в 2023 году и прогнозе на 2024 год», в 2023 г. в России зарегистрировано 5093 случая ГЛПС (3,47 на 100 тыс. населения; среднесноголетний показатель (2012–2023 гг., без учета 2020 и 2021 гг.) – 5,34

на 100 тыс. населения), из которых 84,7% случаев приходится на ПФО.

Районирование территории Саратовской области показало, что в 16 из 38 административных районов за период с 2010 по 2022 г. была отмечена высокая интенсивность эпидемических проявлений ГЛПС. К максимально неблагоприятным относится в том числе Гагаринский район (бывший Саратовский), а также природный парк «Кумысная поляна», расположенный на территории г. Саратова. Площадь парка составляет 4417 га [3]. В рамках организации местного самоуправления территория Гагаринского района с 1 января 2022 г. включена в городской округ г. Саратова, при этом не входя в черту города.

В европейской части России, в том числе и Саратовской области, наиболее распространенным воз-

будителем ГЛПС является вирус Пуумала (*Puumala orthohantavirus*), основной природный носитель (хозяин) которого – рыжая полевка (*Myodes glareolus* Schreber, 1780) [4, 5]. Вирус Пуумала, как и другие хантавирусы, принадлежит к роду *Orthohantavirus* семейства *Hantaviridae* [6]. Вирусный геном представлен сегментированной одноцепочечной РНК отрицательной полярности. Большой сегмент генома (L) кодирует вирусную РНК-полимеразу RdRp, средний (M) – два поверхностных гликопротеина G1 и G2, а малый сегмент (S) – нуклеокапсидный белок (N) [7].

В предыдущей работе [8], совместно с коллегами из ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», было проведено секвенирование полных геномов (сегменты S, M и L) трех образцов, взятых от рыжих полевок, пойманных в природном парке «Кумысная поляна» (г. Саратов) в середине 2019 г. Анализ полученных результатов позволил подтвердить, что вспышку ГЛПС, отмеченную в то время в Саратове, вызвал именно вирус Пуумала. Полученные нуклеотидные последовательности оказались близкими к ранее описанным вариантам из республик Татарстан и Удмуртия, а также Самарской области. Проведены филогенетический анализ вариантов вируса Пуумала, циркулирующих у рыжих полевок, отловленных на территории Республики Татарстан [9, 10], и сравнение с образцами из Удмуртской Республики и Ульяновской области [11]. Анализ показал близость вирусных геномов из исследуемых регионов с вариантами, изолированными в Татарстане. Установлено, что выявленные изоляты вируса Пуумала из Тюменской, Архангельской и Омской областей образуют общую восточно-финскую ветвь, что вызывает дополнительные вопросы о путях распространения основного носителя. Кроме этого, приводятся данные сравнения генетических вариантов из Татарстана, Удмуртии, Самары и Саратова, при этом авторы делают вывод о вероятном возникновении вариантов вируса Пуумала в данных регионах в результате реассортации, поскольку они содержали сегменты S и L, относящиеся к башкирской ветви, и сегмент M, возможно полученный от предков сублинии из Курской, Московской и Ивановской областей [12]. Также предпринята попытка смоделировать филогенетическое распространение хантавируса Пуумала по всей Европе в течение последнего послеледникового периода [13].

Таким образом, целью представленной работы является определение полной нуклеотидной последовательности генома разных вариантов вируса Пуумала, выделенных на территории Саратовской области, и проведение филогенетического анализа полученных данных.

Материалы и методы

Образцами для исследования послужили пробы органов мелких млекопитающих, в основном рыжей полевки, собранных в 2019–2022 гг. в пригородной и городской зоне Саратова (Природный парк «Кумыс-

ная поляна»), а также в Гагаринском, Энгельском, Новобураском и Хвалынском районах Саратовской области. Зоологическая группа осуществляла регулярные выезды в точки, определенные планом ежегодного мониторинга, где и проводился отлов.

Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus author guidelines for animal use» (IAVES 23 July 2010). Исследование одобрено комиссией по биоэтике ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора (протокол № 8 от 21.11.2023).

Выделение нуклеиновых кислот осуществляли с помощью набора для экстракции РНК/ДНК «АмплиПрайм РИБО-преп», а обратную транскрипцию – с комплектом реагентов «Реверта-L» (ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия). Присутствие генетического материала хантавирусов определяли методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с набором реагентов «ОМ-Скрин-ГЛПС-РВ» (НПК «Синтол», Россия).

Для исследований была составлена панель из 38 образцов суспензий легких мелких млекопитающих, в которых методом ОТ-ПЦР была выявлена РНК вируса Пуумала. Для специфического обогащения вирусного генома (сегменты S, M и L) в образцах из полевого материала использовали набор праймеров, рассчитанный авторами (табл. 1).

Далее секвенирование полученных продуктов ПЦР проводили с помощью генетического анализатора AB 3500xl и/или Ion S5, в соответствии с рекомендациями производителя (Thermo Fisher Scientific, США). Для сборки секвенированных фрагментов в одну последовательность использовали программное обеспечение MEGA7 (<http://www.megasoftware.net/>) и UGENE (<http://ugene.net>).

При построении филогенетических деревьев в работу брали последовательность сегмента S (центральная часть в 1071 нуклеотид), а также большую часть последовательности сегментов M и L генома вируса Пуумала, представленных в международной базе данных NCBI GeneBank. Данный раздел работы проводили с использованием алгоритма maximum parsimony в программном пакете BioNumerics 7.6 (Applied Maths, Бельгия).

Результаты и обсуждение

В результате проведенного исследования были получены нуклеотидные последовательности генома вируса Пуумала, циркулирующего на территории Саратовской области, из которых 33 с наиболее качественным уровнем прочтения депонированы в международной базе данных NCBI GenBank (табл. 2).

Сравнительный анализ 26 нуклеотидных последовательностей полного генома вируса Пуумала из пригородной и городской зон Саратова (Гагаринский район) показал их высокую идентичность между собой (98,6–100%), независимо от года изоляции. Образцы из Новобураского (№ 272) и Энгельского (№№ 99, 100, 101) районов имели идентичность

Таблица 1. Последовательности олигонуклеотидных праймеров, используемых в работе**Table 1.** Oligonucleotide primer used in the work

Праймер Primer	Структура праймера Primer sequence	Температура отжига, °C Annealing T, °C	Длина ампликона, п.н. Amplicon length, bp
	Сегмент S Segment S		
Pum_S_1f	TAGTAGTAGACTCCTTGAAAAAGCTAC	50	370
Pum_S_1r	CAATGTCAATGGCGTTCAC		
Pum_S_2f	GAAGAATGGCAGATGCTGTGTCCC	58	454
Pum_S_2r	ACGGTCTGTCTTCCACGAGTTGAC		
Pum_S_3f	CGACTGGGATTGAACCTGATGATC	56	344
Pum_S_3r	CGGGTGTAAGTTCCCTCAGCTTTC		
Pum_S_4f	CATTTGAGGATAATTAATGGCTTTAGG	54	376
Pum_S_4r	AATCAACTTATCAATGTCTGCCAC		
Pum_S_5f	TGCGTAATATCATGAGTCCAGTGATG	56	355
Pum_S_5r	AGCCATCCCAGCAACATAAATG		
Pum_S_6f	ACATCGAATCTCCTAATGCACC	54	354
Pum_S_6r	TGATCTATGAGTGACTGAGCAAGG		
Pum_S_7f	TGCTCAGTCACTCATAGATCAGAAAG	53	400
Pum_S_7r	AGCTCAGTTTCACATTCTTGGG		
Pum_S_7-2f	AATCAGGAGCCCTTAAAGATATG	53	467
Pum_S_7-2r	TCAGCATGTTGAGGTAGTATGTTGTG		
Pum_S_fin_f	GTTTTGAATTAATGACTAATCAGGG	50	350
Pum_S_fin_r	TAGTAGTATGCTCCTTGAAAAAGCAATC		
	Сегмент M Segment M		
Pum_M_1f	TAGTAGTAGACTCCGCAAGAAGAAGC	54	386
Pum_M_1r	ATCCTCTCAAATTCACCTCACTGC		
Pum_M_2f	CATGGGAAATTAAGGTGATCTTG	54	309
Pum_M_2r	AATTGCCCTGAAACACAGTATG		
Pum_M_3f	GTTTGATCCCTACTTTAGTGGTTG	53	349
Pum_M_3r	CTTCATACTATCACAGATGTCACC		
Pum_M_4f	ATACTGTGTTTCAGGGCAATTGG	56	386
Pum_M_4r	CCTGTACTTTCCAGCAATACGTAG		
Pum_M_5f	ATCGTTCTGCTGAAGTCTTTCAAG	56	345
Pum_M_5r	AAGACTGTGCATTGTGTGTCTTCTC		
Pum_M_6f	ACTGGGTTTCATCTCATTACCTGG	54	341
Pum_M_6r	TAACTCTACGGCAAGAGAGTGTG		
Pum_M_7f	GAGTTATGTGTACCAGGTCTTCACGG	55	340
Pum_M_7r	GCTTGAAGGGCAGATGTTGTTG		
Pum_M_8f	ATGGGCTCGATGGTCTGTGAGG	58	380
Pum_M_8r	TATCCCAGACCCGTGTGCTGTGTC		
Pum_M_9f	CTCTCTTTAGGTATCGGAGTCGG	55	392
Pum_M_9r	CAGCAGTTTGCCAAGGATAAGC		
Pum_M_10f	AAACTGCATTTCAATGCTATGGTTC	55	326
Pum_M_10r	TTGAAATTGTCCCTATCAAACACAC		
Pum_M_10-2f	GGCTGTAACCCACTTGATTGCC	58	430
Pum_M_10-2r	CCATCAAACCTGGCACACAGGTGTTG		
Pum_M_11f	TAATATTTAAGCAATGGTGCACACTAC	53	452
Pum_M_11r	CCTTAATTGAAGTAAGAAATGCAG		
Pum_M_12f	GATGGGAATACAATTCAGGATAC	53	307
Pum_M_12r	GCCTTAATTGAAGTAAGAAATGCAG		
Pum_M_13f	GAATGGATTGATCCTGACAGTTCAC	56	502
Pum_M_13r	ATCCAATTTCCATTGAGGACCC		

Продолжение табл. 1 см. на стр. 166.

ORIGINAL RESEARCHES

Праймер Primer	Структура праймера Primer sequence	Температура отжига, °C Annealing T, °C	Длина ампликона, п.н. Amplicon length, bp
Pum_M_13-2f	CAATGTGTTACGGATCTACTACAGC	54	393
Pum_M_13-2r	GCAACTATCTACTAAGGCTTATGCTC		
Pum_M_fin_f	GACAGGATACAACCAAGCAGATAGTG	54	417
Pum_M_fin_r	TAGTAGTAGACTCCGCAAGAACAAAAG		
	Сегмент L Segment L		
Pum_L_1f	TAGTAGTAGACTCCGAGATAGAGAAG	51	468
Pum_L_1r	TGTGCTTCTACCTGTAGTTGTTGCTC		
Pum_L_2f	ATGATGTGATACAAAGCATGGAG	53	453
Pum_L_2r	TCCTAAAGCCAGATTGACAATTAC		
Pum_L_3f	GTTTATTGAGCAACAACACTACAGGTAG	53	394
Pum_L_3r	GCCCAGTTACTTCTTTAAATGC		
Pum_L_4f	TGTAAGAATTGGCTCGGAACCTGATC	56	421
Pum_L_4r	TCAATCAATGCCTTCGACTTAGGATC		
Pum_L_5f	ATCTCAAAGGATTCAAAGAAAGGG	54	391
Pum_L_5r	TCAAGTGATTTAGATGGCAGGATAC		
Pum_L_6f	CGTGATATTACTGAATCTCTTATTGC	53	406
Pum_L_6r	TGAGATGTGGAAAGAAAAGAAATGG		
Pum_L_7f	CTTCTTGCTACAGCTACATGGTTTC	54	410
Pum_L_7r	ACGATAATGCTTATACACGACCC		
Pum_L_8f	AAGACACTATTAGTTAGCTTAGCCC	52	354
Pum_L_8r	GCTGTTCAACAACACTACCTGATTG		
Pum_L_9f	TTCATCTTGAAACAGTTGAATGGG	54	438
Pum_L_9r	CTTTGGTATTTCTTAACAATTCTTGC		
Pum_L_9-2f	TCATCTTGAAACAGTTGAATGGG	54	341
Pum_L_9-2r	AAACGAATTGCCTCAATGAGAG		
Pum_L_10f	GTCAGGAGCATTACAAGAAGATGGTC	56	369
Pum_L_10r	CAACGAGGACTGGATTTCACTTTCTC		
Pum_L_11f	ATTCAACAGGCTTTAGAGAAGGC	54	450
Pum_L_11r	GATATAATTTGGCCACACACG		
Pum_L_12f	AATATGGGTGAATTGTCTGATGAAG	54	440
Pum_L_12r	GAATGTAGATAGAACTCCGCATTTG		
Pum_L_13f	GGCAGGAACTTTCATTGGCATG	57	440
Pum_L_13r	GACATAGAACCATCACCACCTAACGG		
Pum_L_14f	TTATATGGTACTGCTCCTGGTATGG	54	383
Pum_L_14r	AGGATGTTGTTCACTCCAAAGCTC		
Pum_L_15f	TTTGTAGGTTAAAGTTCAGTGGAAAAG	53	459
Pum_L_15r	TTGGTCTATGAATTTGTCTTGTG		
Pum_L_15-2f	CTTTGGAGTGAACAACATCCTGTG	54	320
Pum_L_15-2r	ATCCCTCCAGGCATATCTTTAG		
Pum_L_16f	GGATATGGAGCTCTTTCAAACACTTG	55	387
Pum_L_16r	CACAATTACAATCCTCGACTTTCC		
Pum_L_17f	TTATTGGTTGAAGACTATGTCTCTTG	52	441
Pum_L_17r	ATTAAATGTIACCCTCAAATCTCC		
Pum_L_18f	CTTTATGAAGGAGATTTGAGGGTAAC	53	423
Pum_L_18r	CCTTAGATTATGGTATGCATGG		
Pum_L_19f	CTAATGGATTTAGGGCTATGGC	54	385
Pum_L_19r	TGACCATTGAGTACTAGAGATTGTGC		
Pum_L_20f	AGCACAATCTCTAGTACTCAATGGTC	53	405
Pum_L_20r	CGAACTCTGTAAATCATAACGGATC		
Pum_L_fin_f	GTCCAAGCATTACAATTTCCATAC	52	304
Pum_L_fin_r	TAGTAGTATGCTCCGAGAAAAGAGC		

Таблица 2. Нуклеотидные последовательности вируса Пуумала, полученные в результате исследования

Table 2. List of Puumala orthohantavirus sequences obtained in this study and deposited in the NCBI GenBank database

№ No.	Образец Sample	Место получения образца Place of the sample collection	Год сбора материала Year of collection	Номер в базе NCBI GenBank GenBank Accession Number		
				сегмент S segment S	сегмент M segment M	сегмент L segment L
1.	114		2019	OL343591.1	OL343569.1	OL343547.1
2.	131		2019	OL343593.1	OL343571.1	OL343549.1
3.	296		2019	OL343594.1	OL343572.1	OL343550.1
4.	348		2019	OL343595.1	OL343573.1	OL343551.1
5.	420		2019	OL343596.1	OL343574.1	OL343552.1
6.	422		2019	OL343597.1	OL343575.1	OL343553.1
7.	439		2019	OL343598.1	OL343576.1	OL343554.1
8.	525		2019	OL343599.1	OL343577.1	OL343555.1
9.	645		2019	OL343600.1	OL343578.1	OL343556.1
10.	656		2019	OL343601.1	OL343579.1	OL343557.1
11.	696		2019	OL343602.1	OL343580.1	OL343558.1
12.	701		2019	OL343603.1	OL343581.1	OL343559.1
13.	836	Гагаринский район	2019	OL343604.1	OL343582.1	OL343560.1
14.	988	Gagarinsky district	2019	OL343605.1	OL343583.1	OL343561.1
15.	989		2019	OL343606.1	OL343584.1	OL343562.1
16.	1039		2019	OL343585.1	OL343563.1	OL343541.1
17.	1042		2019	OL343586.1	OL343564.1	OL343542.1
18.	1059		2019	OL343587.1	OL343565.1	OL343543.1
19.	1081		2019	OL343588.1	OL343566.1	OL343544.1
20.	1107		2019	OL343589.1	OL343567.1	OL343545.1
21.	1109		2019	OL343590.1	OL343568.1	OL343546.1
22.	1186		2019	OL343592.1	OL343570.1	OL343548.1
23.	3		2022	OQ032670.1	*	*
24.	29		2022	OQ032672.1	*	*
25.	30		2022	OQ032673.1	*	*
26.	31		2022	OQ032671.1	*	*
27.	99		2022	OQ032667.1	*	*
28.	100	Энгельсский район	2022	OQ032669.1	*	*
29.	101	Engelssky district	2022	OQ032668.1	*	*
30.	117		2021	OR999067	*	*
31.	122	Хвалынский район	2021	OR999068	*	*
32.	129	Khvalynsky district	2021	OR999069	*	*
33.	272	Новобурасский район	2021	OR999070	*	*
		Novoburassky district				

Примечание. * – данные на этапе анализа.

Note. * – Data at the analysis stage.

генома 98,4–99,1% с 26 образцами из Гагаринского района. Три образца из Хвалынского района Саратовской области (№№ 117, 122, 129) были идентичны на 95,5% со всеми вариантами из Гагаринского района. Таким образом, выявлено достаточно большое количество отличий среди вариантов генома вируса из Хвалынского района по сравнению с образцами из Энгельсского, Гагаринского и Новобурасского районов, граничащих друг с другом (**рис. 1**).

С использованием имеющихся нуклеотидных последовательностей S-сегмента генома вируса Пуумала, представленных в международной генетической базе, был проведен анализ, включающий 368 вирусных вариантов (**рис. 2, а**) и построено общее филогенетическое дерево. Сравнение последовательностей М- или

L-сегментов генома хантавирусов ограничивается гораздо меньшим их количеством относительно сегмента S, представленным в базе данных, но при этом картина кластеризации изменяется незначительно, сохраняя, как правило, то же взаимное расположение.

При установлении филогенетического родства варианты генома вируса Пуумала из Саратовской области по сегменту S образовали общий кластер с вирусными последовательностями из Ульяновской, Самарской и Пензенской областей, а также республик Татарстан, Башкортостан и Удмуртия. Варианты последовательностей этого же сегмента генома, полученные на других территориях России (Омская, Тюменская, Архангельская, Московская, Ивановская и Курская области, Республика Карелия), оказались

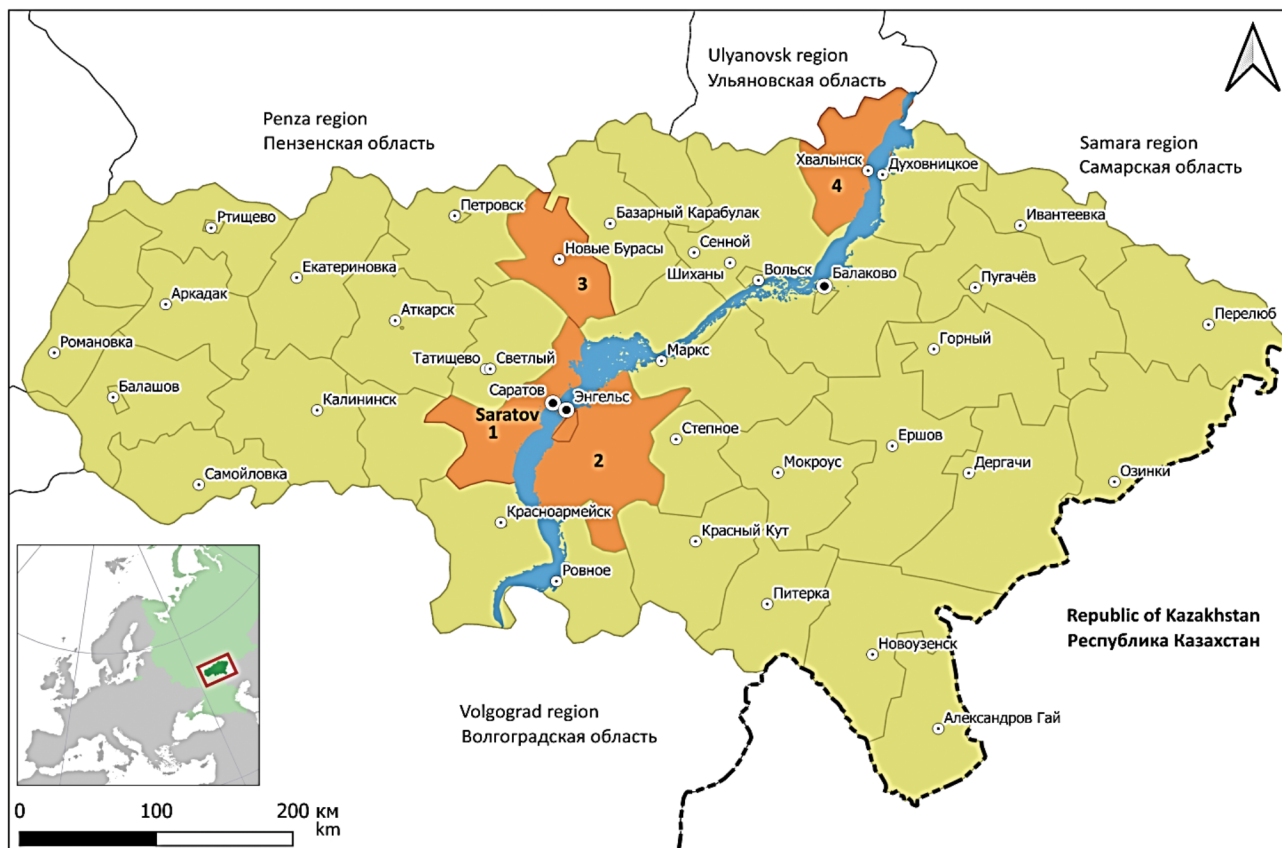


Рис. 1. Административное деление Саратовской области.

Цветом выделены Гагаринский район и городской округ Саратова (1), Энгельсский (2), Новобурасский (3) и Хвалынский (4) районы.

Fig. 1. Administrative division of the Saratov region.

The city district of Saratov (1), Engelsky (2), Novoburassky (3) and Khvalynsky (4) districts are highlighted in color.

значительно удалены от кластера, сформированного из образцов с территории перечисленных выше субъектов ПФО. Стоит отметить, что на одной ветви, образованной геномами из Самарской области, находятся два образца (NCBI, MT822195 и MT822196), полученные из клинического материала, собранного в январе 2020 г. в Швейцарии (рис. 2 а, б). Но в аннотации к этим последовательностям нет информации о возможном месте заражения больных ГЛПС, в результате чего четкие выводы сделать сложно. В остальном в кластер, образованный из последовательностей генома вируса (сегмент S) с территории ПФО, не попало ни одного варианта из других федеральных округов России, стран ближнего или дальнего зарубежья.

Внутри кластера 1 (рис. 2 а, б), образованного геномами вируса Пуумала из образцов с территории ПФО, степень идентичности последовательностей составляет 91,4–100%. Несмотря на то что в сравнительном анализе использовалась только центральная часть последовательности сегмента S (1071 пн), каждый вариант из данного кластера имеет не менее 62 уникальных единичных мутаций, являющихся общими для всех образцов из кластера 1 и отличающих эти варианты от всех других (рис. 2 а, б). На рис. 2 б показано, что варианты генома хантавируса Пуумала

из городского округа Саратова и Энгельсского района и один – из Новобурасского района образуют компактную группу в виде отдельного ответвления. Места отлова носителей вируса Пуумала в пределах городского округа Саратова находились друг от друга от нескольких сотен метров до 9 км. Между местами отлова носителей вируса Пуумала в пределах городского округа Саратова и Энгельсского района расстояние по прямой составляет 14–19 км, а для образца из Новобурасского района – около 46 км. Несмотря на значительное удаление, для вариантов генома вируса Пуумала с данных территорий наблюдается высокая степень идентичности (98% и более), что может свидетельствовать о едином биотопе основных носителей и свободном их перемещении в пределах указанных регионов. Хвалынский район находится на севере Саратовской области (расстояние до других обследованных регионов более 100 км) и граничит с Ульяновской и Самарской областями (рис. 1). Данный факт четко отражается на расположении в кластере 1 (рис. 2 б) вариантов вируса Пуумала. Показано, что образцы из Хвалынского района находятся на разных ветвях с вариантами из Гагаринского, Энгельсского и Новобурасского районов, отличаясь от них на 55–78 однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) (Single Nucleotide Polymorphism, SNP), т.е.

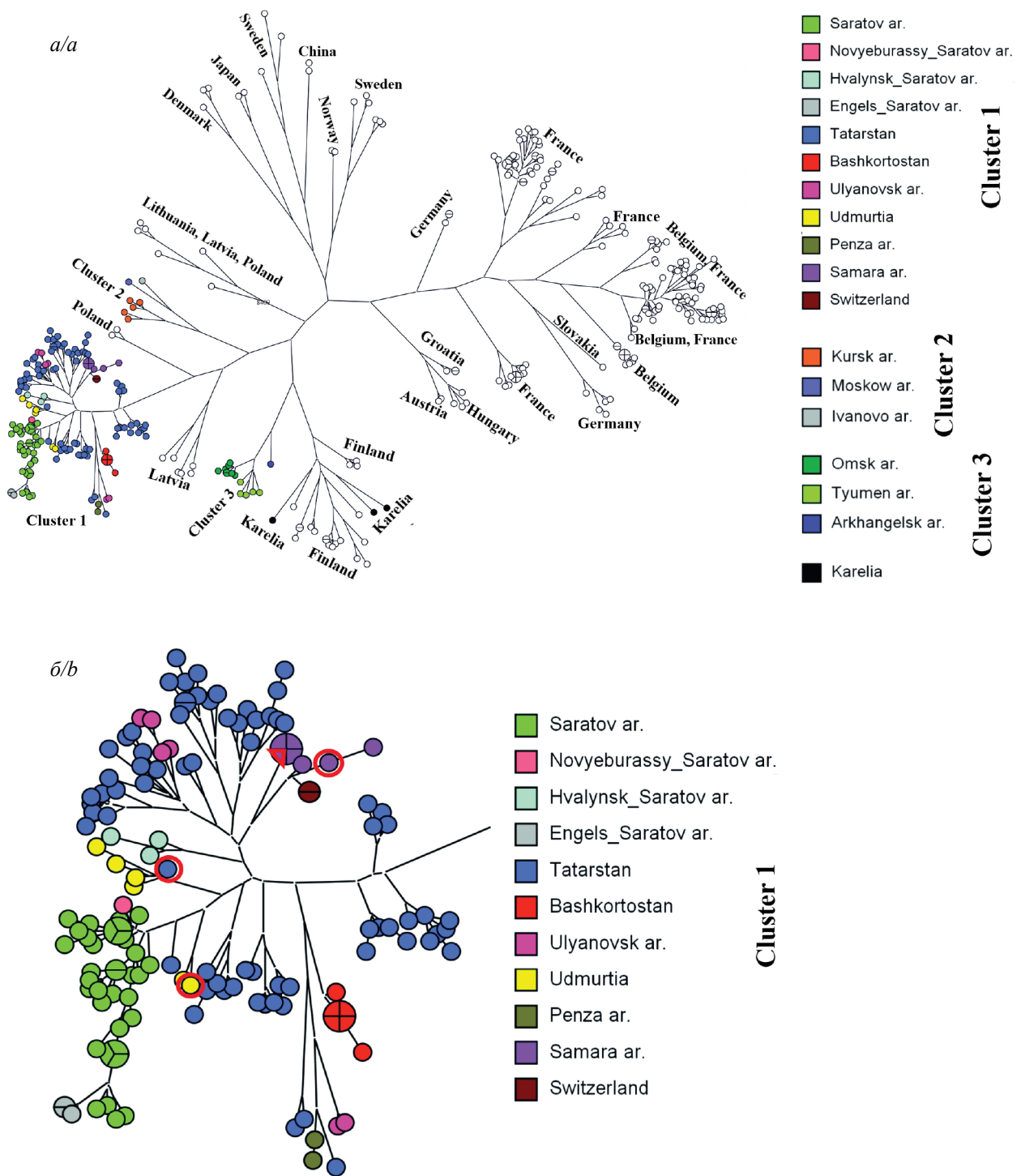


Рис. 2. Филогенетическое дерево, показывающее близость родства между 368 вариантами генома (сегмент S) вируса Пуумала с территории России, стран ближнего и дальнего зарубежья.

a – по трем кластерам; *b* – увеличенный фрагмент филогенетического дерева – кластер 1 на рис. 2 *a*. На рис. 2 *b* образцы, обведенные красным цветом, остались единственными вариантами из республик Башкортостан и Татарстан, Самарской и Ульяновской областей в случае филогенетических деревьев по сегментам M и L.

Fig. 2. Phylogenetic tree showing the close relationship between 368 genome variants (segment S) strains of the *Puumala orthohantavirus* from Russia, near and far abroad countries.

a – for three clusters; *b* – enlarged fragment of the phylogenetic tree – cluster 1 in Figure 2 *a*. The close relationship between genome variants (segment S) of 151 strains of the *Puumala orthohantavirus* from the Volga Federal District is shown. In Figure 2 *b*, samples circled in red remained the only variants from the republics of Bashkortostan and Tatarstan, Samara and Ulyanovsk regions in the case of phylogenetic trees for segments M and L.

имеют идентичность с последними 92,7–96,9%. Ближайшими к вариантам хантавируса из Хвалынского района являются геномы вируса Пуумала из Самарской области, затем его варианты из Республики Татарстан и Ульяновской области (рис. 2 б).

Детальное рассмотрение расположения вариантов генома (сегмент S) вируса Пуумала из Саратовской области (рис. 2 б) показывает очень близкое родство между образцами с территории Гагаринского района, а также их большое сходство с образцами из Энгельского и Новобурасского районов. Отличие между последовательностью сегмента S (1071 пн) у варианта вируса Пуумала, выделенного в августе 2021 г. в Новобурасском районе, от ближайшего к нему варианта Пуумала, полученного в мае 2019 г. на территории Гагаринского района, составляет 5 ОНП. Отличие между последовательностями сегмента S (1071 пн) у варианта вируса Пуумала, обнаруженного в июле 2022 г. в Энгельском районе, от ближайшего к нему, полученного в феврале 2020 г. при обследовании Гагаринского района, составляет 15 ОНП. Между всеми исследованными вариантами вируса Пуумала, циркулирующими на территории Гагаринского

района Саратовской области, максимальное отличие в последовательности сегмента S (1071 пн) составляет 22 ОНП (идентичность 98% и более).

Анализ молекулярных часов, проведенный группами исследователей [14, 15], показал, что S-сегмент генома хантавирусов эволюционирует со скоростью около $6,7 \times 10^{-4}$ единичных замен в год. Эти данные свидетельствуют о довольно медленном изменении генома вируса Пуумала в природе. В целом кластеризация по сегменту S показывает общее происхождение от одного предкового вируса или нескольких близких друг другу его вариантов для всех использованных в анализе образцов с территории ПФО.

Сравнительный филогенетический анализ вируса Пуумала по сегментам M или L образцов, полученных на территории Саратовской области, показывает некоторые изменения в кластеризации, сохраняя, однако, общие тенденции взаимного расположения.

Следует отметить, что по сегментам M или L данных о последовательностях генома вируса Пуумала значительно меньше, чем по сегменту S. На рис. 2 б образцы, обведенные красным цветом, остались единственными вариантами из республик Башкортостан и Татарстан,

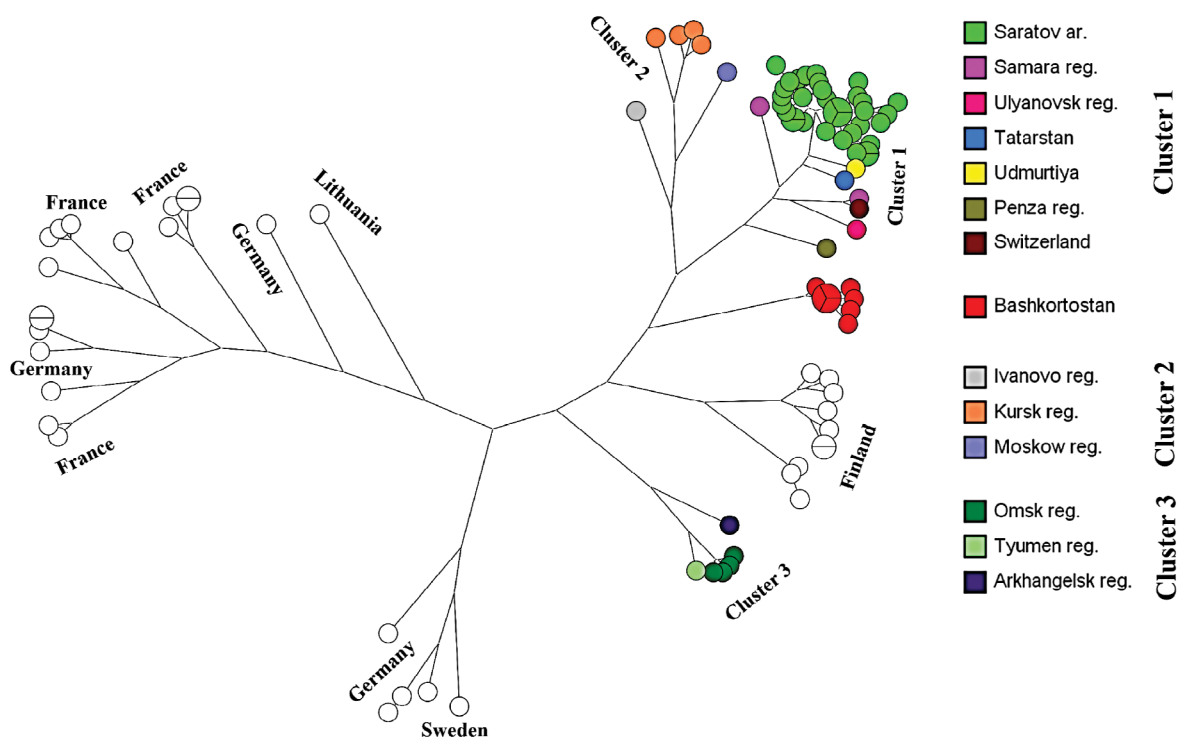


Рис. 3. Филогенетическое дерево, показывающее близость родства между 94 вариантами генома (сегмент M) вируса Пуумала с территории России, стран ближнего и дальнего зарубежья.

Примечание: Башкортостан (AB297666, AF442614, KT885051, L08754, MH251332, MK496160, MZ673553, NC_077666); Курская обл. (MZ580943, MZ580946, MZ580949, MZ580952); Ивановская обл. (OP561838); Московская обл. (OP561841); Самарская обл. (AB433850, AB433852); Ульяновская обл. (OP561826); Татарстан (Z84205); Удмуртия (OP561835); Пензенская обл. (OP561847); Швейцария (MT822194); Омская обл. (AF367061, AF442615, AF442616, AF442617); Архангельская обл. (OP561850); Тюменская обл. (OP561853).

Fig. 3. Phylogenetic tree showing the close relationship between 94 genome variants (segment M) of *Puumala orthohantavirus* strains from Russia, near and far abroad countries.

Note: Bashkortostan (NCBI: AB297666, AF442614, KT885051, L08754, MH251332, MK496160, MZ673553, NC_077666); Kursk region (MZ580943, MZ580946, MZ580949, MZ580952); Ivanovo region (OP561838); Moscow region (OP561841); Samara region (AB433850, AB433852); Ulyanovsk region (OP561826); Tatarstan (Z84205); Udmurtia (OP561835); Penza region (OP561847); Switzerland (MT822194); Omsk region (AF367061, AF442615, AF442616, AF442617); Arkhangelsk region (OP561850); Tyumen region (OP561853).

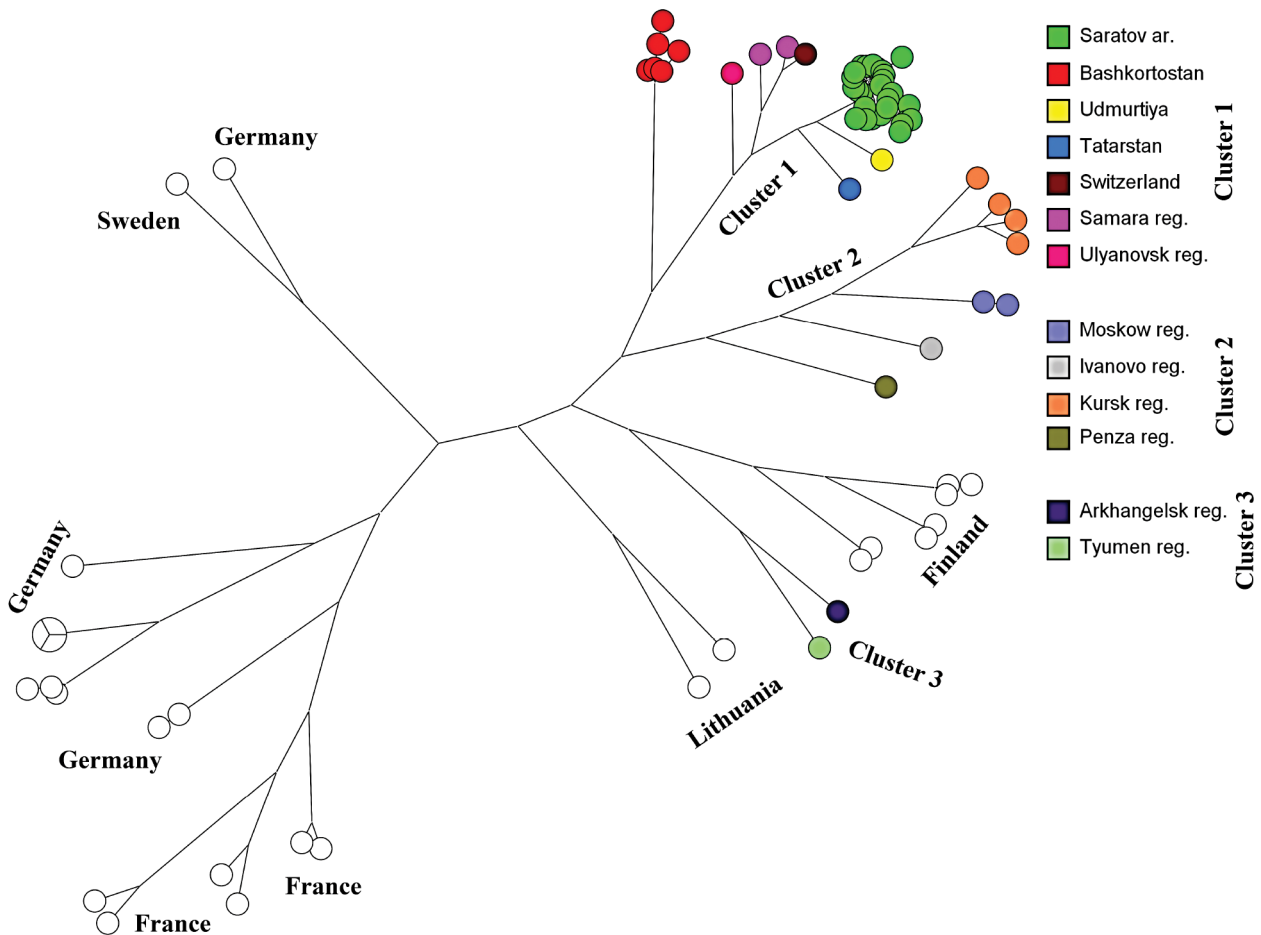


Рис. 4. Филогенетическое дерево, показывающее близость родства между 76 вариантами генома (сегмент L) вируса Пуумала с территории России, стран ближнего и дальнего зарубежья.

Примечание: Башкортостан (AB297667, KT885050, MK496161, MK496164, MH251333, NC_077667); Самарская обл. (AB574183, AB574184); Ульяновская обл. (OP561825); Удмуртия (OP561834); Татарстан (EF405801); Швейцария (MT822193); курская обл. (MZ580944, MZ580947, MZ580953, MZ580950); Московская обл. (OP561840, OP561843); Ивановская обл. (OP561837); Пензенская обл. (OP561846); Архангельская обл. (OP561849); Тюменская обл. (OP561852).

Fig. 4. Phylogenetic tree showing the close relationship between 76 genome variants (segment L) of *Puumala orthohantavirus* strains from the territory of Russia, near and far abroad countries.

Note: Bashkortostan (NCBI: AB297667, KT885050, MK496161, MK496164, MH251333, NC_077667); Samara region (AB574183, AB574184); Ulyanovsk region (OP561825); Udmurtia (OP561834); Tatarstan (EF405801); Switzerland (MT822193); Kursk region (MZ580944, MZ580947, MZ580953, MZ580950); Moscow region (OP561840, OP561843); Ivanovo region (OP561837); Penza region (OP561846); Arkhangelsk region (OP561849); Tyumen region (OP561852).

Самарской и Ульяновской областей в случае филогенетических деревьев по сегментам M и L.

На рис. 3 представлен результат филогенетической кластеризации между 94 вариантами генома (сегмент M, локус в 2920 пн) вируса Пуумала с территории России, стран ближнего и дальнего зарубежья. Полученное филогенетическое дерево показывает, что образцы из Гагаринского района (Saratov ar.) по-прежнему образуют однородную группу и находятся в одном кластере с вариантами из субъектов ПФО, при этом ближайшими по подобию к ним являются варианты вируса из республик Удмуртия (OP561835, идентичность 94,9–95,6%), Татарстан (Z84205, идентичность 94,6–95,3%) и Самарской области (AB433850, идентичность 91,3–92,0% и AB433852, идентичность 90,6–91,3%). Обращает на себя внимание то, что при кластеризации по сегменту M последовательности

генома вируса, полученные из Московской, Курской и Ивановской областей, располагаются ближе к вариантам с территории ПФО, нежели варианты из Республики Башкортостан входящей в ПФО. По сегменту M варианты из Башкирии образуют отдельную ветвь, не входящую в кластеры 1 и 2. Напротив, при филогенетической кластеризации вируса по сегменту S все последовательности из ПФО были в одном кластере и значительно удалены от вариантов из Центральной части России. Вероятно, у хантавируса, полученного в Республике Башкортостан, произошла реассортация по сегменту M с каким-то вариантом данного вируса из региона, не входящего в состав ПФО.

Заключение ряда авторов [12] о вероятном возникновении вариантов вируса Пуумала на территории Татарстана, Удмуртии, Самары и Саратова в результате реассортации, поскольку они содержали сегменты S

и L, относящиеся к башкирской ветви, и сегмент M, полученный от предков сублинии из Курской, Московской и Ивановской областей, не получило подтверждения в настоящем исследовании. Очевидно стабильное сохранение единства филогенетической обособленности геномов вируса Пуумала на территории субъектов ПФО, за исключением вариантов с территории Башкортостана по сегменту M (рис. 3) и образца из Пензенской области – по сегменту L (рис. 4). На рис. 3, где представлено сродство по сегменту M, любой из вариантов генома вируса Пуумала в кластере 1 отличается как минимум на 433 ОНП (идентичность 85,2%) от любого из вариантов генома вируса Пуумала в кластере 2. Отличие вариантов из Башкортостана составляет не менее 531 ОНП (идентичность 81,8%) от любого из вариантов как в кластере 1, так и кластере 2. Ветвь с ближайшими вариантами вируса Пуумала из Финляндии имеет около 580 ОНП (идентичность 80,1%) от вариантов из Башкортостана.

Отсутствие данных с большинства областей России о циркулирующих на них вариантах вируса Пуумала очень затрудняет возможность сделать выводы о возможных путях возникновения реассортантов.

На рис. 4 представлен результат филогенетической кластеризации между 76 вариантами генома (сегмент L, locus в 6405 пн) вируса Пуумала с территории России, стран ближнего и дальнего зарубежья. Все варианты из Гагаринского района (Saratov ag.) Саратовской области неизменно находятся в одном кластере с другими вирусами Пуумала из субъектов ПФО. Ближайшими к вариантам из Саратовской области, как и в случае сегмента M, являются образцы вируса Пуумала из республик Удмуртия (OR561834, идентичность 95,2–95,8%) и Татарстан (EF405801, идентичность 94,5–95,1%), а также Самарской области (AB574183 и AB574184, идентичность 91,7–92,7%). При анализе сегмента L варианты вируса Пуумала из Республики Башкортостан, хотя и располагаются в одном кластере (кластер 1) вместе вариантами данного вируса из других субъектов ПФО, но значительно от них обособлены, максимальная идентичность составляет 86,1% (около 890 ОНП от ближайшего к ним варианта из Ульяновской обл. в этом кластере). Результат филогенетической кластеризации вариантов генома вируса Пуумала по сегменту L показывает, что образец из Пензенской области не располагается в кластере 1 вместе с вариантами вируса из ПФО, а находится в кластере 2 с вариантами из Ивановской, Московской и Курской областей. Как видно из рис. 2 б и рис. 3, образец из Пензенской области по сегментам S и M относится к кластеру 1, состоящему только из вариантов вируса с территории ПФО. Таким образом, показана возможная реассортация по сегменту L варианта вируса Пуумала из Пензенской области с вариантами этого вируса из Ивановской, Московской или Курской областей, видимо, в результате миграции рыжей полевки. В опубликованных ранее материалах авторы отмечали, что данный вариант генома мог возникнуть в результате двухэтапной рекомбинации [12].

Заключение

Полученные результаты филогенетического анализа разных вариантов вируса Пуумала из Саратовской области с последовательностями, представленными в базе NCBI GenBank, позволяют сделать следующие выводы:

- все варианты штаммов вируса Пуумала, циркулирующие в Саратовской области, имеют высокую степень подобия геномов, что может свидетельствовать о единстве их происхождения;

- генетические последовательности вируса Пуумала из Хвалынского района имеют значительные отличия от вариантов, полученных из центральных регионов Саратовской области;

- все генетические последовательности вируса Пуумала, полученные из городского округа Саратова, в том числе и по сегментам генома S, M и L, не имеют реассортации.

Обобщая полученные данные можно отметить наличие выраженной территориальной приуроченности штаммов вируса Пуумала (точнее их носителей) к определенным регионам или областям. Это позволяет по последовательности сегментов вирусного генома довольно точно определять район возможного инфицирования заболевших и места обитания переносчиков данных геновариантов вируса *Puumala orthohantavirus*.

Материал подготовлен к публикации на основании исследований, выполненных в рамках НИР 92-21 «Разработка системы верификации результатов индикации и идентификации возбудителей опасных инфекционных болезней бактериальной и вирусной природы с помощью молекулярно-генетических методов» (2021–2023 гг.).

ЛИТЕРАТУРА

1. Савицкая Т.А., Иванова А.В., Исаева Г.Ш., Решетникова И.Д., Трифонов В.А., Зиятдинов В.Б. и др. Анализ эпидемиологической ситуации по геморрагической лихорадке с почечным синдромом в Российской Федерации в 2022 г. и прогноз ее развития на 2023 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2023; (1): 85–95. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2023-1-85-95> <https://elibrary.ru/mgxzxa>
2. Иванова А.В., Сафронов В.А., Попов Н.В., Куклев Е.В. Эпидемиологическое районирование территории Приволжского федерального округа по уровню потенциальной эпидемической опасности природных очагов геморрагической лихорадки с почечным синдромом. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; (1): 91–6. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-1-91-96> <https://elibrary.ru/jrywjx>
3. Чумачкова Е.А., Иванова А.В., Поршаков А.М., Вяткин И.Н., Форостяная М.В., Чумачков К.Я. и др. Районирование территории Саратовской области по интенсивности эпидемических проявлений ГЛПС с использованием ГИС-анализа. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2023; (3): 156–63. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2023-3-156-163> <https://elibrary.ru/dwrlpq>
4. Tkachenko E.A., Ishmukhametov A.A., Dzagurova T.K., Bernshstein A.D., Morozov V.G., Siniugina A.A., et al. Hemorrhagic fever with renal syndrome, Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 2019; 25(12): 2325–8. <https://doi.org/10.3201/eid2512.181649>
5. Ишмухаметов А.А., Дзагурова Т.К., Морозов В.Г., Курашова С.С., Баловнева М.В., Соцкова С.Е. и др. Характеристика хантавирусов – возбудителей зоонозных геморрагических лихорадок. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2017; 16(3): 26–32. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2017-16-3-26-32> <https://elibrary.ru/yhrmch>
6. ICTV. Taxonomy Browser. Available at: <https://ictv.global/taxonomy>

7. Kabwe E., Davidyuk Y., Shamsutdinov A., Garanina E., Martynova E., Kitaeva K., et al. Orthohantaviruses, emerging zoonotic pathogens. *Pathogens*. 2020; 9(9): 775. <https://doi.org/10.3390/pathogens9090775>
8. Яшина Л.Н., Трегубчак Т.В., Малышев Б.С., Сметанникова Н.А., Грищенко И.В., Дольский А.А. и др. Возбудитель вспышки ГЛПС в Саратовской области, 2019 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; (4): 150–6. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2021-4-150-156> <https://elibrary.ru/dxxsey>
9. Davidyuk Y.N., Kabwe E., Shamsutdinov A.F., Knyazeva A.V., Martynova E.V., Ismagilova R.K., et al. The Distribution of Puumala orthohantavirus genome variants correlates with the regional landscapes in the Trans-Kama area of the Republic of Tatarstan. *Pathogens*. 2021; 10(9): 1169. <https://doi.org/10.3390/pathogens10091169>
10. Kabwe E., Shamsutdinov A.F., Suleimanova S., Martynova E.V., Ismagilova R.K., Shakirova V.G., et al. Puumala orthohantavirus reassortant genome variants likely emerging in the watershed forests. *Int. J. Mol. Sci.* 2023; 24(2): 1018. <https://doi.org/10.3390/ijms24021018>
11. Kabwe E., Al Sheikh W., Shamsutdinov A.F., Ismagilova R.K., Martynova E.V., Ohlopko O.V., et al. Analysis of Puumala orthohantavirus genome variants identified in the territories of Volga Federal District. *Trop. Med. Infect. Dis.* 2022; 7(3): 46. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed7030046>
12. Blinova E., Deviatkin A., Makenov M., Popova Y., Dzagurova T. Evolutionary formation and distribution of Puumala virus genome variants, Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 2023; 29(7): 1420–4. <https://doi.org/10.3201/eid2907.221731>
13. Castel G., Chevenet F., Razzauti M., Murri S., Marianneau P., Cosson J.F., et al. Phylogeography of Puumala orthohantavirus in Europe. *Viruses*. 2019; 11(8): 679. <https://doi.org/10.3390/v11080679>
14. Souza W.M., Bello G., Amarilla A.A., Alfonso H.L., Aquino V.H., Figueiredo L.T. Phylogeography and evolutionary history of rodent-borne hantaviruses. *Infect. Genet. Evol.* 2014; 21: 198–204. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.11.015>
15. Ramsden C., Holmes E.C., Charleston M.A. Hantavirus evolution in relation to its rodent and insectivore hosts: no evidence for codivergence. *Mol. Biol. Evol.* 2009; 26(1): 143–53. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn234>
- of the Saratov region by the intensity of epidemic manifestations of HFRS using GIS analysis. *Problemy osobo opasnykh infektsii*. 2023; (3): 156–63. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2023-3-156-163> <https://elibrary.ru/dwrlpq> (in Russian)
4. Tkachenko E.A., Ishmukhametov A.A., Dzagurova T.K., Bernshtein A.D., Morozov V.G., Siniugina A.A., et al. Hemorrhagic fever with renal syndrome, Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 2019; 25(12): 2325–8. <https://doi.org/10.3201/eid2512.181649>
5. Ishmukhametov A.A., Dzagurova T.K., Morozov V.G., Kurashova S.S., Balovneva M.V., Sotskova S.E., et al. Characteristics of hantaviruses as causative agents of the zoonotic hemorrhagic fevers. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika*. 2017; 16(3): 26–32. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2017-16-3-26-32> <https://elibrary.ru/yrhmch> (in Russian)
6. ICTV. Taxonomy Browser. Available at: <https://ictv.global/taxonomy>
7. Kabwe E., Davidyuk Y., Shamsutdinov A., Garanina E., Martynova E., Kitaeva K., et al. Orthohantaviruses, emerging zoonotic pathogens. *Pathogens*. 2020; 9(9): 775. <https://doi.org/10.3390/pathogens9090775>
8. Yashina L.N., Tregubchak T.V., Malyshev B.S., Smetannikova N.A., Grishchenko I.V., Dol'skii A.A., et al. Hantavirus associated with hemorrhagic fever with renal syndrome outbreak in the Saratov region in 2019. *Problemy osobo opasnykh infektsii*. 2021; (4): 150–6. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2021-4-150-156> <https://elibrary.ru/dxxsey> (in Russian)
9. Davidyuk Y.N., Kabwe E., Shamsutdinov A.F., Knyazeva A.V., Martynova E.V., Ismagilova R.K., et al. The Distribution of Puumala orthohantavirus genome variants correlates with the regional landscapes in the Trans-Kama area of the Republic of Tatarstan. *Pathogens*. 2021; 10(9): 1169. <https://doi.org/10.3390/pathogens10091169>
10. Kabwe E., Shamsutdinov A.F., Suleimanova S., Martynova E.V., Ismagilova R.K., Shakirova V.G., et al. Puumala orthohantavirus reassortant genome variants likely emerging in the watershed forests. *Int. J. Mol. Sci.* 2023; 24(2): 1018. <https://doi.org/10.3390/ijms24021018>
11. Kabwe E., Al Sheikh W., Shamsutdinov A.F., Ismagilova R.K., Martynova E.V., Ohlopko O.V., et al. Analysis of Puumala orthohantavirus genome variants identified in the territories of Volga Federal District. *Trop. Med. Infect. Dis.* 2022; 7(3): 46. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed7030046>
12. Blinova E., Deviatkin A., Makenov M., Popova Y., Dzagurova T. Evolutionary formation and distribution of Puumala virus genome variants, Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 2023; 29(7): 1420–4. <https://doi.org/10.3201/eid2907.221731>
13. Castel G., Chevenet F., Razzauti M., Murri S., Marianneau P., Cosson J.F., et al. Phylogeography of Puumala orthohantavirus in Europe. *Viruses*. 2019; 11(8): 679. <https://doi.org/10.3390/v11080679>
14. Souza W.M., Bello G., Amarilla A.A., Alfonso H.L., Aquino V.H., Figueiredo L.T. Phylogeography and evolutionary history of rodent-borne hantaviruses. *Infect. Genet. Evol.* 2014; 21: 198–204. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.11.015>
15. Ramsden C., Holmes E.C., Charleston M.A. Hantavirus evolution in relation to its rodent and insectivore hosts: no evidence for codivergence. *Mol. Biol. Evol.* 2009; 26(1): 143–53. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn234>

REFERENCES

1. Savitskaya T.A., Ivanova A.V., Isaeva G.Sh., Reshetnikova I.D., Trifonov V.A., Ziatdinov V.B., et al. Analysis of the epidemiological situation of hemorrhagic fever with renal syndrome in the Russian Federation in 2022 and forecast of its development for 2023. *Problemy osobo opasnykh infektsii*. 2023; (1): 85–95. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2023-1-85-95> <https://elibrary.ru/mgxzxa> (in Russian)
2. Ivanova A.V., Safronov V.A., Popov N.V., Kuklev E.V. Epidemiological zoning of the Volga federal district territory by the level of potential epidemic hazard of hemorrhagic fever with renal syndrome natural foci. *Problemy osobo opasnykh infektsii*. 2020; (1): 91–6. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-1-91-96> <https://elibrary.ru/jrywjx> (in Russian)
3. Chumachkova E.A., Ivanova A.V., Porshakov A.M., Vyatkin I.N., Forostyanaya M.V., Chumachkov K.Ya., et al. Zoning of the territory

Информация об авторах:

Краснов Ярослав Михайлович – канд. хим. наук, ведущий научный сотрудник ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Россия. E-mail: rusrapi@microbe.ru; <https://orcid.org/0000-0002-4909-2394>

Найденова Екатерина Владимировна – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Россия. E-mail: katim2003@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-6474-3696>

Гусева Наталья Петровна – канд. биол. наук, старший научный сотрудник ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Россия. E-mail: rusrapi@microbe.ru; <https://orcid.org/0000-0003-3763-9708>

Полунина Татьяна Алексеевна – канд. мед. наук, старший научный сотрудник ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Россия. E-mail: rusrapi@microbe.ru; <https://orcid.org/0000-0002-2234-2760>

Шарапова Наталья Анатольевна – канд. биол. наук, научный сотрудник ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Россия. E-mail: rusrapi@microbe.ru; <https://orcid.org/0000-0002-5289-7783>

Соседова Екатерина Анатольевна – научный сотрудник ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Россия. E-mail: rusrapi@microbe.ru; <https://orcid.org/0009-0004-4443-2646>

Котова Нина Владимировна – научный сотрудник ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Россия. E-mail: rusrapi@microbe.ru; <https://orcid.org/0000-0002-9270-523X>

Захаров Кирилл Сергеевич – канд. биол. наук, старший научный сотрудник ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Россия. E-mail: zaharov_ks@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-4726-309X>

Казанцев Андрей Васильевич – научный сотрудник ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Россия. E-mail: rusrapi@microbe.ru; <https://orcid.org/0000-0003-1790-0411>

Доманина Ирина Владимировна – научный сотрудник ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Россия. E-mail: rusrapi@microbe.ru; <https://orcid.org/0000-0002-4731-8089>

Чекашов Владимир Николаевич – канд. биол. наук, старший научный сотрудник ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Россия. E-mail: rusrapi@microbe.ru; <https://orcid.org/0000-0002-9593-4353>

Шилов Михаил Михайлович – канд. биол. наук, научный сотрудник ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Россия. E-mail: rusrapi@microbe.ru; <https://orcid.org/0000-0002-0083-8212>

Кондратьев Евгений Николаевич – научный сотрудник ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Россия. E-mail: rusrapi@microbe.ru; <https://orcid.org/0000-0002-7508-4355>

Осина Наталья Александровна – канд. биол. наук, заведующий отделом микробиологии ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Россия. E-mail: rusrapi@microbe.ru; <https://orcid.org/0000-0003-0954-5683>

Кутырев Владимир Викторович – академик РАН, профессор, директор ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Россия. E-mail: rusrapi@microbe.ru; <https://orcid.org/0000-0003-3788-3452>

Участие авторов: Краснов Я.М. – концепция и дизайн исследования, проведение лабораторных исследований, обработка данных, написание текста статьи; Найденова Е.В. – сбор и обработка материала, написание и редактирование текста статьи; Гусева Н.П. – проведение лабораторных исследований и обработка материала; Полунина Т.А. – проведение лабораторных исследований и обработка материала; Шаропова Н.А. – проведение лабораторных исследований и обработка материала; Соседова Е.А. – проведение лабораторных исследований и обработка материала; Котова Е.А. – проведение лабораторных исследований и обработка материала; Захаров К.С. – сбор и доставка полевого материала, подготовка иллюстраций; Казанцев А.В. – обработка материала; Доманина И.В. – проведение лабораторных исследований; Чекашов В.Н. – сбор и доставка полевого материала; Шилов М.М. – сбор и доставка полевого материала; Кондратьев Е.Н. – сбор и доставка полевого материала; Осина Н.А. – руководство исследованиями; Кутырев В.В. – общее руководство.

Поступила 05.02.2024

Принята в печать 02.04.2024

Опубликована 27.04.2024

Information about the authors:

Yaroslav M. Krasnov – PhD in Chemistry, leading researcher, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru; <https://orcid.org/0000-0002-4909-2394>

Ekaterina V. Naidenova – PhD in Biology, leading researcher, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru; <https://orcid.org/0000-0001-6474-3696>

Natalya P. Guseva – PhD in Biology, senior researcher, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru; <https://orcid.org/0000-0003-3763-9708>

Tatyana A. Polunina – PhD in Medical sciences, senior researcher, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru; <https://orcid.org/0000-0002-2234-2760>

Natalya A. Sharapova – PhD in Biology, researcher, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru; <https://orcid.org/0000-0002-5289-7783>

Ekaterina A. Sosedova – researcher, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru; <https://orcid.org/0009-0004-4443-2646>

Nina V. Kotova – researcher, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru; <https://orcid.org/0000-0002-9270-523X>

Kirill S. Zakharov – PhD in Biology, senior researcher, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru; <https://orcid.org/0000-0002-4726-309X>

Andrey V. Kazantsev – researcher, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru; <https://orcid.org/0000-0003-1790-0411>

Irina V. Domanina – researcher, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru; <https://orcid.org/0000-0002-4731-8089>

Vladimir N. Chekashov – PhD in Biology, senior researcher, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru; <https://orcid.org/0000-0002-9593-4353>

Mikhail M. Shilov – PhD in Biology, researcher, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru; <https://orcid.org/0000-0002-0083-8212>

Evgeniy N. Kondratiev – researcher, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru; <https://orcid.org/0000-0002-7508-4355>

Natalya A. Osina – PhD in Biology, Head of Department of Microbiology, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru; <https://orcid.org/0000-0003-0954-5683>

Vladimir V. Kutyrev – Academician of RAS, Professor, Director, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru; <https://orcid.org/0000-0003-3788-3452>

Contribution: Krasnov Ya.M. – concept and design of the study, laboratory research, data processing, writing the text of the article; Naidenova E.V. – collection and processing of the material, writing and editing the text of the article; Guseva N.P. – laboratory research and processing of the material; Polunina T.A. – laboratory research and processing; Sharapova N.A. – conducting laboratory research and processing of the material; Sosedova E.A. – conducting laboratory research and processing of the material; Kotova E.A. – conducting laboratory research and processing of the material; Zakharov K.S. – collection and delivery of field material, preparation of illustrations; Kazantsev A.V. – processing of the material; Domanina I.V. – conducting laboratory research; Chekashov V.N. – collection and delivery of field material; Shilov M.M. – collection and delivery of field material; Kondratiev E.N. – collection and delivery of field material; Osina N.A. – research management; Kutyrev V.V. – general guidance.

Received 05 February 2024

Accepted 02 April 2024

Published 27 April 2024

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-226>

© ЛАТЫШЕВ О.Е., ЗАЙКОВА О.Н., ЕЛИСЕЕВА О.В., САВОЧКИНА Т.Е., ЧЕРНОРЫЖ Я.Ю., СЫРОЕШКИН А.В., ПЕТРОВ Г.В., ВОРКУНОВА Г.К., ЛАРИЧЕВ В.Ф., ФЕДЯКИНА И.А., ЧЕРЕПУШКИН С.А., ЦИБЕЗОВ В.В., ЮЖАКОВА К.А., КУЛИКОВА Н.Ю., ЛЕБЕДЕВА В.В., ЯКУНИН Д.Ю., КОЗЛОВА А.А., БАРАНЕЦ М.С., ЮРЛОВ К.И., ЛЕСНОВА Е.И., ГРЕБЕННИКОВА Т.В., 2024

Разработка, получение и характеристика вирусоподобных частиц SARS-CoV-2 (Coronaviridae: Orthocoronavirinae: Betacoronavirus: Sarbecovirus)

Латышев О.Е.¹, Зайкова О.Н.¹, Елисеева О.В.¹, Савочкина Т.Е.¹, Чернорыж Я.Ю.¹, Сыроешкин А.В.², Петров Г.В.², Воркунова Г.К.¹, Ларичев В.Ф.¹, Федякина И.Т.¹, Черепушкин С.А.¹, Цибезов В.В.¹, Южакова К.А.¹, Куликова Н.Ю.¹, Лебедева В.В.¹, Якунин Д.Ю.¹, Козлова А.А.¹, Баранец М.С.¹, Юрлов К.И.¹, Леснова Е.И.¹, Гребенникова Т.В.^{1✉}

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

²ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», 117198, г. Москва, Россия

Резюме

Введение. Пандемия COVID-19, вызванная коронавирусом SARS-CoV-2, породила серьезные проблемы в здравоохранении по всему миру. Ученым в кратчайшие сроки пришлось решать задачи по разработке методов лечения и профилактики этого заболевания. Наиболее эффективным способом прерывания развивающихся новых эпидемических вспышек является вакцинация. Одним из современных и эффективных подходов при разработке вакцин является использование вирусоподобных частиц (Virus like particles, VLP). **Цель исследования** – разработать технологию получения VLP на основе рекомбинантных белков SARS-CoV-2 (E, M, N и S), продуцируемых в клетках насекомых, и дать их комплексную характеристику.

Материалы и методы. Источником вирусных белков послужили синтетические гены, кодирующие белки коронавируса E, M, N и S. Были разработаны VLP с разными поверхностными S-белками 4 штаммов коронавируса: подобный вирусу Ухань, Delta, Alpha и Omicron, клонированные в плазмиду rFastBac. Белки были синтезированы в бакуловирусной системе экспрессии и собраны в VLP в перевиваемой линии клеток *Trichoplusia ni* (T.ni). Синтез генов, клонирование в трансферные плазмиды и получение рекомбинантных бакуловирусов проводили стандартными методами. Наличие вставки в геноме бакуловируса определяли методом полимеразной цепной реакции. Для исследования антигенной активности VLP применяли иммуноферментный анализ, иммуноблоттинг. Очистку VLP проводили ультрацентрифугированием через 20% сахарозу. Оценку морфологии выполняли с помощью электронной микроскопии и методом динамического светорассеяния.

Результаты. Получены и охарактеризованы VLP, состоящие из рекомбинантных белков S, M, E и N, на основе консенсусных последовательностей, циркулирующих в мире геновариантов SARS-CoV-2. Показана специфичность антигенных детерминант синтезированных VLP антителам, формирующимся к белкам SARS-CoV-2, изучены иммуногенные свойства VLP.

Заключение. Разработаны способы получения и очистки VLP с универсальным набором поверхностных антигенов, способных к самосборке и индуцирующих специфический иммунитет против SARS-CoV-2.

Ключевые слова: вирусоподобные частицы; рекомбинантные вакцины; COVID-19; SARS-CoV-2; бакуловирусная система экспрессии

Для цитирования: Латышев О.Е., Зайкова О.Н., Елисеева О.В., Савочкина Т.Е., Чернорыж Я.Ю., Сыроешкин А.В., Петров Г.В., Воркунова Г.К., Ларичев В.Ф., Федякина И.Т., Черепушкин С.А., Цибезов В.В., Южакова К.А., Куликова Н.Ю., Лебедева В.В., Якунин Д.Ю., Козлова А.А., Баранец М.С., Юрлов К.И., Леснова Е.И., Гребенникова Т.В. Разработка, получение и характеристика вирусоподобных частиц SARS-CoV-2 (Coronaviridae: Orthocoronavirinae: Betacoronavirus: Sarbecovirus). *Вопросы вирусологии*. 2024; 69(2): 175–186. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-226> EDN: <https://elibrary.ru/gkxfed>

Финансирование. Работа финансирована Государственной тематикой Министерства здравоохранения Российской Федерации «Разработка прототипа вакцины на основе VLP для профилактики COVID-19» (регистрационный номер 121032600024-1).

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 ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (протокол № 03/2021 от 14.09.2021).

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-226>

Development, production and characterization of SARS-CoV-2 virus-like particles (Coronaviridae: Orthocoronavirinae: Betacoronavirus: Sarbecovirus)

Oleg E. Latyshev¹, Olga N. Zaykova¹, Olesya V. Eliseeva¹, Tatyana E. Savochkina¹, Yana Yu. Chernoryzh¹, Anton V. Syroeshkin², Gleb V. Petrov², Galina K. Vorkunova¹, Victor F. Larichev¹, Irina T. Fediakina¹, Stanislav A. Cherepushkin¹, Valeriy V. Tsibezov¹, Ksenia A. Yuzhakova¹, Nadezhda Yu. Kulikova¹, Varvara V. Lebedeva¹, Dmitriy Yu. Yakunin¹, Alina A. Kozlova¹, Marina S. Baranets¹, Kirill I. Yurlov¹, Ekaterina I. Lesnova¹, Tatyana V. Grebennikova¹✉

¹National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya of the Ministry of Health of the Russian Federation, 123098, Moscow, Russia;

²Peoples' Friendship University of Russia, 117198, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. The COVID-19 pandemic caused by SARS-CoV-2 has created serious health problems worldwide. The most effective way to prevent the occurrence of new epidemic outbreaks is vaccination. One of the modern and effective approaches to vaccine development is the use of virus-like particles (VLPs).

The **aim of the study** is to develop a technology for production of VLP based on recombinant SARS-CoV-2 proteins (E, M, N and S) in insect cells.

Materials and methods. Synthetic genes encoding coronavirus proteins E, M, N and S were used. VLP with various surface proteins of strains similar to the Wuhan virus, Delta, Alpha and Omicron were developed and cloned into the pFastBac plasmid. The proteins were synthesized in the baculovirus expression system and assembled into VLP in the portable *Trichoplusia ni* cell. The presence of insertion in the baculovirus genome was determined by PCR. ELISA and immunoblotting were used to study the antigenic activity of VLP. VLP purification was performed by ultracentrifugation using 20% sucrose. Morphology was assessed using electron microscopy and dynamic light scattering.

Results. VLPs consisting of recombinant SARS-CoV-2 proteins (S, M, E and N) were obtained and characterized. The specific binding of antigenic determinants in synthesized VLPs with antibodies to SARS-CoV-2 proteins has been demonstrated. The immunogenic properties of VLPs have been studied.

Conclusion. The production and purification of recombinant VLPs consisting of full-length SARS-CoV-2 proteins with a universal set of surface antigens have been developed and optimized. Self-assembling particles that mimic the coronavirus virion induce a specific immune response against SARS-CoV-2.

Keywords: *Virus-like particles; recombinant vaccines; COVID-19; SARS-CoV-2; baculovirus expression system*

For citation: Latyshev O.E., Zaykova O.N., Eliseeva O.V., Savochkina T.E., Chernoryzh Ya.Yu., Syroeshkin A.V., Petrov G.V., Vorkunova G.K., Larichev V.F., Fediakina I.T., Cherepushkin S.A., Tsibezov V.V., Yuzhakova K.A., Kulikova N.Yu., Lebedeva V.V., Yakunin D.Yu., Kozlova A.A., Baranets M.S., Yurlov K.I., Lesnova E.I., Grebennikova T.V. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2024; 69(2): 175–186. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-226> EDN: <https://elibrary.ru/gkxfed>

Funding. The study was funded by the Russian Ministry of Health State Project «Development of a prototype VLP-based vaccine for COVID-19 prophylaxis» (registration number 12103260024-1).

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

Ethics approval. Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with Consensus author guidelines for animal use (IAVES 23 July 2010). The research protocol was approved by the Ethics Committee of the National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya (Protocol No. 03/2021 dated 14 September 2021).

Введение

По данным Всемирной организации здравоохранения, по состоянию на 8 ноября 2023 г. в мире зарегистрировано более 770 млн подтвержденных случаев COVID-19, включая 6,9 млн смертей. По со-

стоянию на 4 ноября 2023 г. было введено в общей сложности 13 534 474 309 доз вакцины¹. В России за 44 нед 2023 г. среди выявленного 34 191 случая COVID-19 было 22 993 случаев, закончившихся выздоровлением, 5042 случая потребовали госпитализации и 63 имели летальный исход².

¹World Health Organization. COVID-19. Available at: <https://covid19.who.int/>

²В России за неделю выздоровело 22 993 человека. Режим доступа: <https://объясняем.рф/stopkoronavirus/v-rossii-za-nedelyu-vyzdorovelo-22-993-cheloveka/>

Вакцинация является одним из наиболее эффективных и доступных медицинских вмешательств, которое ежегодно спасает миллионы жизней [1]. Несмотря на это, заболевания, которые удается предотвратить с помощью вакцин, возникают вновь, и уровень приемлемости вакцины остается неоптимальным как для плановых вакцинаций, так и для вакцинаций, не включенных в календарь прививок [2]. Существующие вакцины против SARS-CoV-2 – это векторные, вакцины на основе мРНК, инактивированные вакцины, а также вакцины на основе вирусоподобных частиц (Virus like particles, VLP) [3]. На эффективность вакцин влияет постоянное приобретение вирусных мутаций из-за присущей вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразе высокой частоты ошибок и существования сильноизменчивого мотива связывания с рецептором в S-белке [4].

Перспективный подход в создании эффективных вакцин – это разработка вакцин на основе VLP, которые представляют собой структурные белки вируса, способные к самосборке, имитирующие вирион, но не несущие в себе вирусного генома. В настоящее время вакцины на основе VLP проходят разные фазы клинических исследований – NVX-CoV2373 (Novavax) [5], Covifenz (Medicago) [6], ABNCoV2 (RadboudUniversity) [7] и LYB001 (Yantai Patronus Biotech Co Ltd) [8]. Однако в указанные вакцины включен только S-белок SARS-CoV-2. Представляется более перспективным разрабатывать вакцины на основе 4 структурных белков коронавируса для имитации вириона SARS-CoV-2.

SARS-CoV-2 относится к роду β -*Coronavirus* семейства *Coronaviridae* порядка *Nidovirales* [9]. Геном SARS-CoV-2 представлен РНК положительной полярности длиной около 30 тыс. нуклеотидов и имеет примерно 82% идентичности последовательностей с SARS-CoV и MERS-CoV и более 90% идентичности последовательностей основных ферментов и структурных белков. Вирион SARS-CoV-2 состоит из 4 структурных белков, которые включают белки шипа (S), оболочки (E), мембраны (M) и нуклеокапсида (N) [10, 11].

Белок N связывается с РНК вируса, образуя рибонуклеокапсид, находящийся внутри вирусной частицы. Белок N – наиболее консервативный белок коронавируса. Белки E и M – это относительно небольшие белки (75 aa и 222 aa соответственно), составляющие вирусную оболочку. Белок S составляет шип на поверхности вируса. Этот белок играет важнейшую роль в патогенезе вируса. Рецептор-связывающий домен (Receptor binding domain, RBD) – домен, входящий в состав этого белка, отвечает за связывание вирусной частицы и клеточного рецептора. Считается, что антитела, нейтрализующие вирус, вырабатываются именно против этого белка.

VLP содержат большое количество повторяющихся фрагментов вирусных поверхностных белков, представляющих собой конформационные вирусные эпитопы, которые способны вызывать Т-клеточный и В-клеточный иммунный ответ. При иммунизации

VLP стимулируют дендритные клетки, которые захватывают соответствующие антигены для презентации Т- и В-лимфоцитам [12].

Технология получения VLP позволяет при необходимости быстро менять их состав, согласно текущей эпидемической ситуации. Так как изначально ген, кодирующий белок коронавируса, находится в виде ДНК в плазмидном векторе, в его последовательность можно вносить изменения при помощи сайт-направленного мутагенеза и таким образом корректировать антигенный состав вакцины, обеспечивая образование широкого спектра антител против пандемически значимых вариантов SARS-CoV-2.

Цель исследования – разработать технологию получения и очистки VLP на основе рекомбинантных белков E, M, N и S SARS-CoV-2, собранных в клетках насекомых, и дать их комплексную характеристику.

Материалы и методы

Молекулярно-эпидемиологические исследования

После комплексных эпидемиологических исследований для определения актуальных эпидемически значимых штаммов вирусов подбирали и оптимизировали последовательности генов вируса для последующего клонирования в донорную плазмиду, а затем в бакмиду [13].

Получение рекомбинантных бакуловирусов

Кодирующие последовательности были получены синтетическим путем, частота использования кодонов была оптимизирована для экспрессии в культуре клеток насекомых. Для создания каждой генетической конструкции использовали систему экспрессии Bac-to-Bac. Для получения бакуловируса, экспрессирующего белки M, E, N и S актуальных штаммов коронавируса, применяли трансферный вектор pFastBac (донорную плазмиду). Данный вектор содержит экспрессионную кассету, в которой, помимо клонированных генов, находятся фланкирующие последовательности транспозона Tn7. Рекомбинантная трансферная плаزمиды используется для трансформации клеток DH10Bac *Escherichia coli*, которые содержат модифицированный бакуловирусный геном в виде бакмиды и вектор-помощник, кодирующий фермент транспозазу. Отбор рекомбинантных клонов DH10Bac осуществляли методом цветного теста. В выбранных колониях белого цвета перенос экспрессионной кассеты в бакуловирусный геном подтверждали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с праймерами, один из которых специфичен к клонированной последовательности, а другой – к геному бакуловируса.

Получение и очистка VLP

Трансфекцию перевиваемой линии клеток *Spodoptera frugiperda* Sf-21 проводили очищенными препаратами бакмидной ДНК, содержащей кодированные последовательности генов коронавируса, с использованием катионного липосомного агента Cellfectin (Invitrogen, США), для каждой кон-

струкции использовали по два клона (посевная концентрация клеток 5×10^5 кл/мл на 10 мкл бакмиды). После трансфекции проводили еще два пассажа на клетках Sf-9.

VLP получали методом коинфекции – одновременного заражения перевиваемой линии клеток насекомых *Trichoplusia ni* (T.ni) различными сочетаниями рекомбинантных бакуловирусов. Перевиваемую культуру клеток насекомых T.ni культивировали в течение 4 сут после заражения.

После культивирования культуральную жидкость (КЖ) осветляли методом низкоскоростного центрифугирования для освобождения от клеток и клеточного дебриса при 1000 об/мин в течение 5 мин и при 6000 об/мин в течение 20 мин соответственно (4 °C, ротор Sorval SS34).

Для выделения и очистки синтезированных VLP осветленную КЖ наслаивали в ультрацентрифужные пробирки на слой 6 мл 20% раствора сахарозы (не допуская смешивания), приготовленного на буфере TNC (10 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, pH 7,4). Центрифугировали в течение 2 ч при 28 000 об/мин (центрифуга Optima XE-100, ротор SW 32Ti, Beckman Coulter, +4 °C). Надосадочную жидкость удаляли, полученные осадки ресуспендировали в буфере TNC и хранили при температуре 4 °C.

Характеристика VLP

Электронная микроскопия. Очищенные VLP в объеме 3 мкл наносили на медную сетку, покрытую углеродной подложкой (Ted Pella, США) и обработанную в атмосфере тлеющего разряда. Инкубировали 30 с при комнатной температуре. Затем наносили каплю 2% раствора ацетата урана, инкубировали 30 с. Исследование производили в просвечивающем электронном микроскопе JEOL 2100 (JEOL, Япония), оборудованном катодом из гексаборита лантана, при ускоряющем напряжении 200 кВ. Изображения получали с увеличением $\times 25\,000$ с помощью ПЗС-камеры Gatan X100 с размером матрицы 2000 \times 2000 пикселей (Gatan, США).

Физические размеры VLP. Физический размер и однородность распределения VLP в очищенной суспензии определяли методом динамического светорассеяния на установке Malvern Zeta Sizer NANO.

Определение концентрации белка. Концентрацию общего белка в готовых очищенных препаратах VLP определяли с помощью коммерческого набора BCA Protein Assay Kit (Thermo, США).

Вестерн-блот. Анализ структурных белков VLP проводили методом электрофореза в 12% полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (ПААГ-ДСН) по методу Laemmli (1970) на приборе Mini-PROTEAN II (Bio-Rad, США) согласно инструкции производителя. После проведения электрофореза белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (0,45 мкм, Schleicher & Schuell, Германия) в мини-ячейке Mini Trans-Blot (Bio-Rad, cat. № 170-3930) согласно методике производителя. Мембраны инкубировали с положительными сыворотками кро-

ви лиц, переболевших COVID-19, и отрицательными сыворотками, полученными за 20 лет до пандемии, в разведении 1 : 50. Антитела, провзаимодействовавшие с белками из VLP, на мембране инкубировали с антителами к IgG человека, конъюгированными с пероксидазой хрена («Сорбент», Россия) в разведении 1 : 200, и после инкубации проявляли с использованием Super Signal West Femto Maximum (Thermo Scientific, США) в соответствии с протоколом производителя. Для детекции сигнала хемилюминесценции на мембране экспонировали зеленочувствительную рентгеновскую фотопленку (cat. №126041, Carestream, США). Пленку проявляли с использованием проявителя и фиксажа фирмы «ВИПС-МЕД» (Россия) согласно методике фирмы-производителя.

Реакция нейтрализации с сыворотками крови лиц, перенесших COVID-19. Клетки Vero E6 заражали SARS-CoV-2, при появлении цитопатического действия вируса (ЦПД) флакон замораживали, оттаивали, КЖ центрифугировали при 3000 об/мин, аликвотировали и замораживали. Титр вируса определяли методом конечных разведений, для чего КЖ добавляли к монослою клеток Vero E6 в разведениях от 10^{-1} до 10^{-8} . Титром вируса считали последнее разведение, где обнаруживалось ЦПД. Пятидесятипроцентную тканевую цитопатическую инфекционную дозу (ТЦИД₅₀) рассчитывали по методу Рида и Менча. При постановке реакции нейтрализации (РН) использовали разведение КЖ, содержащее 100 ТЦИД₅₀ в 100 мкл.

Из сывороток крови лиц, перенесших коронавирусную инфекцию, готовили разведения от 1 : 10 до 1 : 1280 и вносили по 100 мкл в лунки 96-луночного планшета. К разведениям сывороток добавляли по 100 мкл вирусосодержащей суспензии и инкубировали смесь в течение 1 ч при 37 °C. Затем смесь переносили в 96-луночный планшет с монослоем клеток Vero E6. Через 72 ч реакцию учитывали, просматривая лунки планшета в микроскоп. Если в сыворотке крови присутствуют нейтрализующие вирус антитела, вирус не будет вызывать ЦПД клеток. Титром сыворотки крови (последним нейтрализующим разведением) считали разведение, при котором обеспечивается 100% защита клеток (отсутствует ЦПД).

Специфическая активность. Идентичность антигенов в VLP антигенам в вирусной частице SARS-CoV-2 оценивали с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) по взаимодействию с антителами к SARS-CoV-2 в сыворотках лиц, переболевших COVID-19, охарактеризованных ранее в РН. В лунки планшета сорбировали VLP в течение 18 ч при 4 °C. Затем в лунки с сорбированными VLP вносили сыворотки здоровых лиц (отрицательный контроль) и лиц, перенесших COVID-19, в разведении 1 : 100, инкубировали 1 ч при 37 °C. Затем добавляли антитела к IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma, США). После инкубации в течение 15 мин (20–25 °C) останавливали реакцию 1 M H₂SO₄. Интенсивность окраски в лунках определяли на спектрофотометре при длине волны 450 нм.

Уровень синтеза VLP оценивали по количественному содержанию RBD белка S методом ИФА. В качестве «захватывающих» и детектирующих антител использовали моноклональные антитела (МКА) к RBD, полученные и охарактеризованные ранее в лаборатории. Лунки иммунологических планшетов сорбировали МКА в концентрации 10 мкг/мл в течение 18 ч при 4 °С. Затем вносили рекомбинантный RBD в концентрациях 15,6; 31,25; 62,5; 125; 250; 500; 1000 нг/мл для построения калибровочной кривой и исследуемые образцы VLP в разведении 1 : 200–1 : 400. После инкубации в течение 1 ч при 37 °С добавляли пероксидазный конъюгат МКА и инкубировали 1 ч при 37 °С. Затем вносили хромоген-субстратную смесь с тетраметилбензидином («Хема», Россия). Инкубировали 15 мин (20–25 °С), останавливали реакцию 1 М H₂SO₄. Интенсивность окраски в лунках определяли на спектрофотометре при длине волны 450 нм. Количественное содержание VLP выражали в концентрации RBD, которую вычисляли по величине оптической плотности, используя калибровочную кривую, по следующей формуле:

$$C_{\text{RBD}} = (A_{450}/k) \times n,$$

где: k – угол наклона калибровочной кривой;

n – кратность разведения исследуемой пробы VLP.

Иммуногенность VLP

Для оценки иммуногенности VLP изучали формирование гуморального (РН и непрямого ИФА, как описано выше) и клеточного иммунного ответа (реакция бласттрансформации лимфоцитов, РБТЛ) после 3-кратной иммунизации золотистых хомяков (*Mesocricetus auratus*) при внутримышечном введении VLP в концентрации 40 мкг на животное.

Реакция бласттрансформации лимфоцитов

Все манипуляции выполняли в стерильных условиях. У хомяков извлекали селезенки и гомогенизировали в 3 мл чистой среды RPMI-1640 в стерильном гомогенизаторе. Суспензию клеток центрифугировали на одноступенчатом градиенте плотности фикола-пака (HistoPaque-1077, Sigma, США), выделяли фракцию мононуклеарных клеток, отмывали дважды в чистой среде RPMI-1640 и помещали в 96-луночные культуральные панели с концентрацией 10⁵ клеток в 100 мкл в лунку. Антигены-стимуляторы добавлялись по 100 мкл в лунку к клеткам до конечных концентраций. В качестве положительного контроля служили спленоциты, активированные конканавалином А (КонаА 12,5 мг, «ПанЭко», Россия). В качестве отрицательных контролей использовали: спленоциты из селезенки неиммунизированных хомяков; спленоциты без стимуляции антигенами, а также спленоциты, стимулированные неспецифическим антигеном (вирус Крымской-Конго геморрагической лихорадки, *Criomean-Congo hemorrhagic fever*). Клетки культивировали в полноростовой среде RPMI-1640, с 20% эмбриональной телячьей сывороткой, 2 мМ глутамин, 4,5 г/л глюкозы, 50 мкг/мл гентамицина, 0,2 ед/мл инсулина при 37 °С в атмосфере 5% CO₂. Пролифе-

рацию спленоцитов оценивали в реакции бласттрансформации через 4–5 сут с помощью инвертированного микроскопа (×400). Результаты РБТЛ выражали в виде индекса стимуляции пролиферации (ИСП) – отношения среднего числа бластов в присутствии стимуляторов к среднему числу бластов в отсутствие стимуляторов. Положительным считали результат, если ИСП превышает 2.

Оценку гуморального иммунного ответа проводили методами непрямого ИФА и РН с сыворотками хомяков после 2-й и 3-й иммунизации. Оценку клеточного иммунитета (РБТЛ) проводили после 1-й и 2-й иммунизации.

Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программ Prizm Graphpad 8.4.3 (Graph Pad Software, США) и Statistica 12.6 (Stat Soft Inc., США). Результаты считали статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Молекулярно-эпидемиологические исследования и получение рекомбинантных бакуловирусов

В результате проведенных молекулярно-эпидемиологических исследований [13] для получения рекомбинантных белков как антигенов вакцины были выбраны гены S-белка 4 актуальных штаммов, наиболее распространенных в Российской Федерации и Европе – подобный вирусу Ухань, Delta, Alpha и Omicron и гены белков E, M и N SARS-CoV-2. Выбранные аминокислотные последовательности были

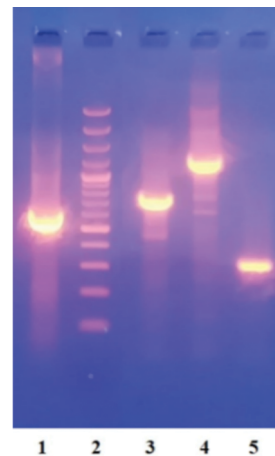


Рис. 1. Вставки генов соответствующего размера в рекомбинантных бакуловирусах, полученные в результате ПЦР.

1 – диагностический фрагмент гена белка S (597 п.н.); 2 – маркер молекулярных масс; 3 – вставка, содержащая ген белка M (768 п.н.); 4 – вставка, содержащая ген белка N (1359 п.н.); 5 – вставка, содержащая ген белка E (327 п.н.).

Fig. 1. Gene inserts of the appropriate size in recombinant baculoviruses obtained as a result of PCR.

1 – diagnostic fragment of the S protein gene (597 bp); 2 – marker of molecular weights; 3 – insert containing the M protein gene (768 bp); 4 – insert containing the N protein gene (1359 bp); 5 – an insert containing the E protein gene (327 bp).

оптимизированы для наработки в клетках насекомых и клонированы в трансферный вектор pFastBacDual. Получили рекомбинантные бакуловирусы, несущие гены белка S 4 разных штаммов, а также белков E, M и N SARS-CoV-2. Наличие вставок генов в рекомбинантных бакуловирусах было подтверждено методом ПЦР (рис. 1).

Для оптимизации условий получения белков SARS-CoV-2 был использован 3-й пассаж рекомбинантных бакуловирусов, которым заражали перевиваемую культуру клеток насекомых T.ni. Оценку накопления целевых продуктов выполняли при помощи электрофореза в полиакриламидном геле, а также методом ИФА, в котором в качестве материала для исследования использовали лизат клеток насекомых, инфицированных рекомбинантными бакуловирусами в разных дозах, с учетом длительности инкубации (2–5 сут после заражения клеток). В качестве детектирующих антител использовали МКА к RBD S-белка SARS-CoV-2. В результате проведенной работы были установлены оптимальные клоны для каждой конструкции, а также длительность инкубации культуры клеток насекомых, инфицированных различными рекомбинантными бакуловирусами. Полученные данные были использованы при проведении опытов, направленных на оптимизацию параметров коинфекции – одновременного заражения перевиваемой линии клеток насекомых T.ni различными сочетаниями рекомбинантных бакуловирусов. На 1-м этапе рекомбинантные бакуловирусы использовали в одинаковой дозе заражения (0,02 ТЦД₅₀). В результате были сконструированы 4 различные VLP, содержащие на своей поверхности разные S-белки SARS-CoV-2: на поверхности каждой частицы был один из 4 S-белков актуальных клонированных, а также белки E, M и N, что было подтверждено методом иммуноблоттинга (рис. 2).

Таким образом, с использованием вестерн-блота было доказано, что учитываемые белковые полосы в образцах рекомбинантных белков VLP являются

специфическими и соответствуют спайковому (S) гликопротеину, гликопротеину малой оболочки (E), мембранному (M) гликопротеину и нуклеокапсидному (N) белку.

Характеристика очищенных препаратов VLP

Морфологию, физический размер и однородность распределения очищенных VLP определяли с помощью электронной микроскопии, а также методом динамического светорассеяния на установке Malvern Zeta Sizer NANO (рис. 3).

Специфичность и уровень синтеза очищенных VLP оценивали по концентрации общего белка и по концентрации RBD белка S. Полученные VLP считали специфически активными при содержании RBD больше 5 мкг/мл. Исходя из данных электронной микроскопии, если более 90% полученных VLP собраны правильно и не разрушены, то концентрацию общего белка в очищенных препаратах VLP можно принять за концентрацию VLP. В табл. 1 представлены средние значения содержания VLP, полученные из 1 л КЖ.

Иммуноспецифичность VLP с использованием сывороток крови здоровых людей и людей, переболевших новой коронавирусной инфекцией

Синтезированные и очищенные VLP имитируют структуру вириона SARS-CoV-2, при этом антигенные детерминанты представлены аналогично таковым у SARS-CoV-2. Результаты исследования иммуноспецифичности (рис. 4) с сыворотками крови лиц, переболевших COVID-19, свидетельствуют о специфичности полученных VLP.

Таким образом, полученные VLP эффективно «узнаются» специфическими антителами из сывороток крови лиц, перенесших COVID-19. При этом наблюдается корреляция между титром в реакции нейтрализации и оптической плотностью при ИФА, что доказывает наличие специфически взаимодействующих антител с VLP.

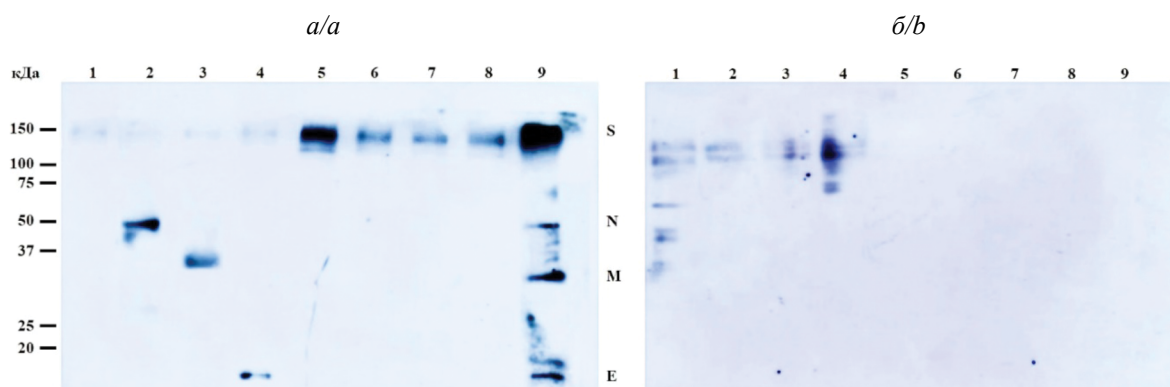


Рис. 2. Вестерн-блот рекомбинантных белков VLP после обработки положительной (а) и отрицательной сывороткой (б).

Дорожки: 1 – отрицательный контроль (клетки T.ni); 2 – N; 3 – M; 4 – E; 5 – S (подобный вирусу Ухань), 6 – S (Omicron); 7 – S (Delta); 8 – S (Alpha); 9 – положительный контроль (SARS-CoV-2).

Fig. 2. Western blot of recombinant VLP proteins after treatment with positive (a) and negative serum (b).

Tracks: 1 – negative control (cells T.ni); 2 – N; 3 – M; 4 – E; 5 – S (Wuhan-like virus); 6 – S (Omicron); 7 – S (Delta); 8 – S (Alpha); 9 – positive control (SARS-CoV-2).

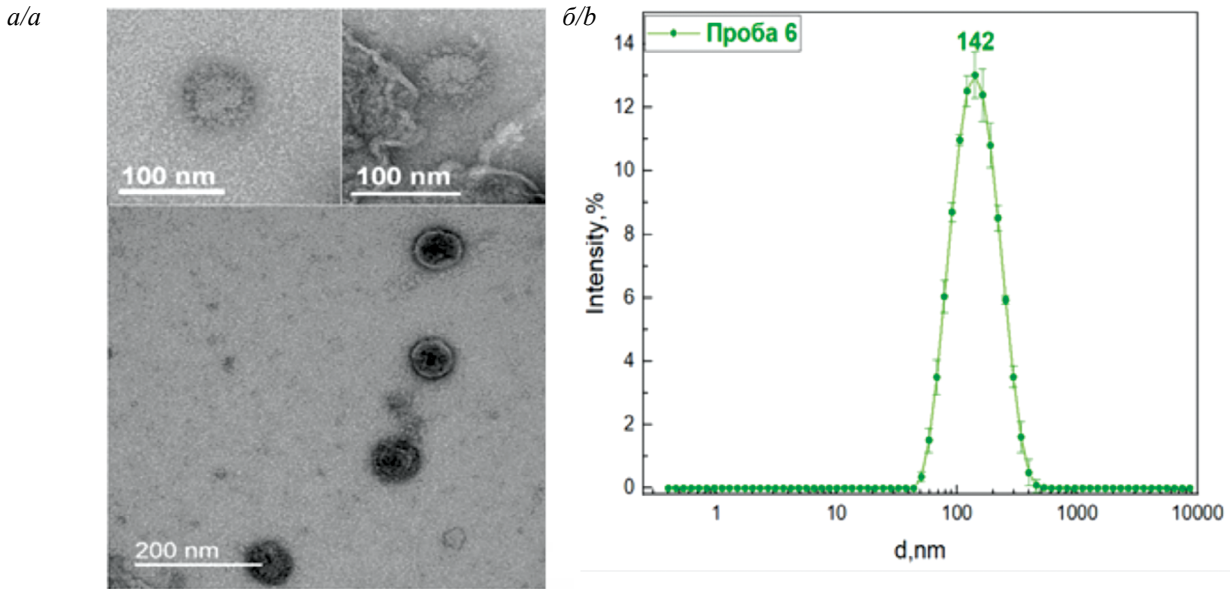


Рис. 3. Морфология и физические размеры очищенных VLP.

a – электронная микроскопия VLP; *б* – гистограмма распределения VLP по размеру.

Fig. 3. Morphology and physical dimensions of purified VLPs.

a – electron microscopy of VLP; *b* – histogram of VLP size distribution.

Таблица 1. Эффективность синтеза VLP, содержащих S-белок 4 штаммов коронавируса: подобный вирусу Ухань, Delta, Alpha и Omicron

Table 1. Efficiency of VLP synthesis of 4 coronavirus strains containing S protein: similar to the Wuhan-like virus, Delta, Alpha and Omicron

VLP SARS-CoV-2	Содержание общего белка в очищенных VLP, полученных из 1 л КЖ, мг (<i>n</i> = 10) Total protein content in purified VLPs obtained from 1 liter of culture fluid, mg (<i>n</i> = 10)
Подобный вирусу Ухань / Wuhan-like virus (<i>n</i> = 8)	5,6 ± 1,9
Delta (<i>n</i> = 11)	5,9 ± 1,7
Alpha (<i>n</i> = 11)	6,2 ± 1,2
Omicron (<i>n</i> = 8)	5,5 ± 1,9

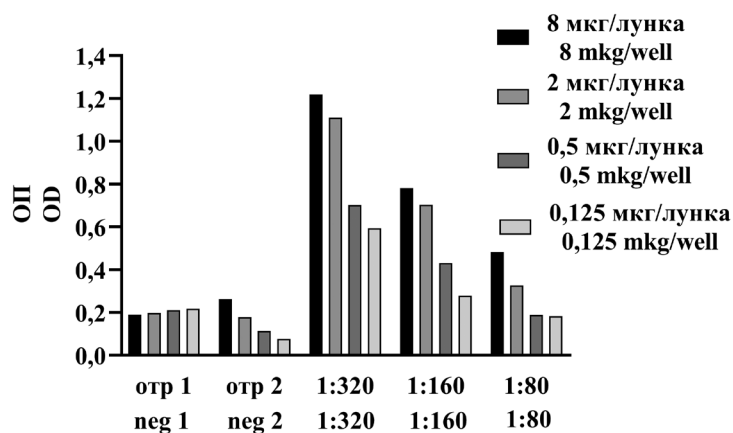


Рис. 4. Результаты исследования иммуноспецифичности VLP в ИФА с сыворотками крови лиц, охарактеризованных в РН.

По оси абсцисс представлены сыворотки крови, охарактеризованные в РН; по оси ординат – оптическая плотность при длине волны 450 нм, легенда – VLP в концентрациях 8, 2, 0,5 и 0,125 мкг/лунку: отр 1 – сыворотка, отрицательная в РН; отр 2 – сыворотка, отрицательная в РН, взятая более 20 лет назад; 1 : 320 – сыворотка, положительная в РН, титр 1 : 320; 1 : 160 – сыворотка, положительная в РН, титр 1 : 160; 1 : 80 – сыворотка, положительная в РН, титр 1 : 80.

Fig. 4. Results of a study of the immune specificity of VLP in ELISA with human sera characterized by NT.

The X-axis shows human sera characterized in NT; the Y-axis shows optical density at a wavelength of 450 nm, legend – VLP at concentrations of 8, 2, 0.5 and 0.125 micrograms/well: отр 1 – serum negative in NT; отр 2 – serum negative in NT collected more than 20 years ago; 1 : 320 – serum positive in NT, titer 1 : 320; 1 : 160 – serum positive in NT, titer 1 : 160; 1 : 80 – serum positive in NT, titer 1 : 80.

Таблица 2. Результаты наличия специфических IgG, нейтрализующих антител и ИСП в сыворотке крови и крови золотистых хомячков, иммунизированных внутримышечно VLP в концентрации 40 мкг/доза, $M \pm SEM$

Table 2. Results of the presence of specific IgG, neutralizing antibodies and LPAs in the serum and blood of golden hamsters immunized intramuscularly with VLP at a concentration of 40 μg /dose, $M \pm SEM$

Иммунизация Immunization	ИСП LPA	Иммунизация Immunization	РН, обр.зн. NT, val.	ИФА, опт.пл. ELISA, opt.dens.	ИФА, обр.зн. титра ELISA, Reciprocal titer value
1	0,4 \pm 0,01	2	340 \pm 173	1,094 \pm 0,26	12,800
2	8,9 \pm 0,91*	3	1280 \pm 0*	1,613 \pm 0,01	12,800

Примечание. * – значения, достоверно отличающиеся от значения предыдущей вакцинации ($p < 0,05$).

Note. * – values significantly different from the value of the previous immunization ($p < 0.05$).

Иммуногенность VLP

Для оценки иммуногенности VLP изучали формирование гуморального (РН и ИФА) после 2-й и 3-й иммунизации и клеточного иммунитета (РБТЛ) после 1-й и 2-й иммунизации золотистых хомячков (*Mesocricetus auratus*) при внутримышечном введении VLP в концентрации 40 мкг/доза. С помощью комплекса методов были получены результаты, представленные в виде среднего значения и среднеквадратического отклонения ($M \pm SEM$) в табл. 2.

Показано, что для формирования клеточного иммунитета достаточна двукратная иммунизация. После 2-й иммунизации происходит статистически значимое, почти 20-кратное увеличение ИСП (8,9 \pm 0,91) по сравнению с 1-й иммунизацией (0,4 \pm 0,01) ($p < 0,05$). При исследовании гуморального иммунитета установлено, что специфические вируснейтрализующие антитела IgG обнаруживаются после 2-й и 3-й иммунизации хомячков. При этом уровень IgG не меняется в зависимости от количества иммунизаций (оптическая плотность: 1,094 \pm 0,26 и 1,613 \pm 0,01 после 2-й и 3-й иммунизации соответственно) ($p > 0,05$). При этом отмечается достоверное увеличение вируснейтрализующих антител после 3-й иммунизации почти в 4 раза по сравнению со 2-й иммунизацией (обр.зн. 1280 \pm 0 и 340 \pm 173 после 2-й и 3-й иммунизации соответственно) ($p < 0,05$). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о формировании специфического гуморального и клеточного ответа у всех исследуемых иммунизированных хомячков в ответ на внутримышечное введение VLP в концентрации 40 мкг/доза.

Обсуждение

Пандемия COVID-19 привела к серьезным экономическим и социальным последствиям во всем мире. С самого начала коронавирус SARS-CoV-2, возбудитель COVID-19, постоянно менялся и продолжает эволюционировать до настоящего времени. На сегодняшний день в разных регионах мира зарегистрировано множество геновариантов SARS-CoV-2. Существуют серьезные опасения по вопросу эффективности имеющихся вакцин против новых вариантов вируса. С учетом вышесказанного, крайне актуальной остается проблема разработки новых вакцинных препаратов, которые не только вызывают эффективный иммунный ответ, но и индуцируют перекрестно-реак-

тивный иммунитет, обеспечивая защиту от новых вариантов SARS-CoV-2 [14]. Результаты исследования циркулирующих в Европе и в Российской Федерации уникальных геновариантов SARS-CoV-2 показали, какие антигенные детерминанты необходимо учитывать при разработке вакцинного препарата. Был проведен анализ изменчивости генома SARS-CoV-2 в процессе распространения COVID-19.

В настоящей работе получены VLP, имитирующие вирион SARS-CoV-2, содержащие 4 структурных белка – E, M, N и S SARS-CoV-2. При этом поверхностные детерминанты представлены S-белками актуальных клонированных – подобный штамму Ухань (19A), индийский (Delta), британский (Alpha) и Omicron. Таким образом, вакцина на основе полученных VLP обеспечивает образование антител широкого спектра и позволит предотвратить инфекцию, вызванную разными штаммами SARS-CoV-2, а также формировать иммунный ответ, аналогичный тому, который индуцируется при естественной инфекции [15]. Весомым преимуществом VLP-вакцин является отсутствие генетического материала, что исключает возможность репликации вирусного генома. Кроме того, антигены, представленные на поверхности VLP в их нативной конформации, более стабильны, чем в форме субъединиц, что приводит к использованию меньших доз антигена, необходимых для запуска защитного иммунного ответа.

Между штаммами Ухань и Omicron эпитопы Т-клеток высоко консервативны, в то время как многие эпитопы нейтрализующих антител находятся в вариативных областях спайк-тримера, а субварианты Omicron BA.1–BA.5 имеют мутации в RBD, что снижает нейтрализующую способность антител, формируемых современными вакцинами [15, 16]. Это подчеркивает необходимость использования новых подходов в разработке вакцин и добавления других антигенов, таких как E, M, N-белки, которые менее мутированы, чем белок S, в составе вакцин против COVID-19. Поскольку антитела менее эффективны к новым вариантам вируса, чем Т-клетки, вакцина, которая индуцирует как клеточный иммунитет, так и гуморальный, может иметь значительное преимущество.

Таким образом, синтезированные VLP, имитирующие вирион SARS-CoV-2, содержащие 4 структурных белка – E, M, N и S SARS-CoV-2 актуальных клонированных

стимулирующие формирование гуморального и клеточного иммунитета, являются перспективным антигеном для дальнейшей разработки вакцины на основе VLP, которая позволит обеспечить эффективную защиту от SARS-CoV-2 [15, 16].

Использованная в настоящей работе бакуловирусная система экспрессии в клетках насекомых для создания VLP имеет ряд преимуществ: бакуловирусы не инфицируют человека, что делает работу безопасной; клетки насекомых растут в бессывороточной среде, не содержащей животных продуктов, ретровирусов и не являются онкогенными; синтез VLP в бакуловирусной системе экспрессии может быть масштабирован и оптимизирован для промышленного производства иммунобиологических препаратов.

На сегодняшний день одобренные и доступные на коммерческом рынке вакцины на основе VLP включают вакцины против вируса папилломы человека (Cervarix Gardasil, Gardasil 9), против вируса гепатита В (Energix Glaxo Smith Kline, Recombivax) [17]. Против инфекции COVID-19 показала иммуногенные и протективные свойства у мышей, крыс и хорьков VLP-вакцина бр-VLP-58-1023-A1-K3 с адьювантом CpG ODN/alum, экспрессирующая все 4 структурных белковых антигена SARS-CoV-2 [18]. Эта вакцина прошла I фазу клинических исследований с участием человека [19].

Заключение

Была оптимизирована система синтеза и очистки вирусоподобных частиц – VLP из рекомбинантных белков, синтезированных в бакуловирусной системе экспрессии. В результате исследований получены устойчивые VLP, состоящие из 4 рекомбинантных белков SARS-CoV-2 – E, M, N и S, имитирующие вирион SARS-CoV-2, способные индуцировать специфический иммунный ответ против SARS-CoV-2. Доказана специфичность полученных VLP. Разработанные VLP могут быть использованы в качестве антигена в иммунобиологическом лекарственном препарате для профилактики COVID-19.

ЛИТЕРАТУРА

- Rappuoli R., Pizza M., Del Giudice G., De Gregorio E. Vaccines, new opportunities for a new society. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2014; 111(34): 12288–93. <https://doi.org/10.1073/pnas.1402981111>
- Omer S.B., Salmon D.A., Orenstein W.A., deHart M.P., Halsey N. Vaccine refusal, mandatory immunization, and the risks of vaccine-preventable diseases. *N. Engl. J. Med.* 2009; 360(19): 1981–8. <https://doi.org/10.1056/NEJMsa0806477>
- Li M., Wang H., Tian L., Pang Z., Yang Q., Huang T., et al. COVID-19 vaccine development: milestones, lessons and prospects. *Signal Transduct. Target Ther.* 2022; 7(1): 146. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00996-y>
- Lou F., Li M., Pang Z., Jiang L., Guan L., Tian L., et al. Understanding the secret of SARS-CoV-2 variants of concern/interest and immune escape. *Front. Immunol.* 2021; 12: 744242. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.744242>
- Heath P.T., Galiza E.P., Baxter D.N., Boffito M., Browne D., Burns F., et al. Safety and efficacy of NVX-CoV2373 COVID-19 vaccine. *N. Engl. J. Med.* 2021; 385(13): 1172–83. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2107659>
- Chhibber S., Jain D. Plant-based vaccines to combat COVID-19: strategies, status and prospects. *Purva Mimaansa*. 2022; 13: 25–30.

- Smit M.J., Sander A.F., Ariaans M.B.P.A., Fougeroux C., Heinzl C., Fendel R., et al. First-in-human use of a modular capsid virus-like vaccine platform: an open-label, non-randomised, phase 1 clinical trial of the SARS-CoV-2 vaccine ABNCoV2. *Lancet Microbe*. 2023; 4(3): e140–8. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(22\)00337-8](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(22)00337-8)
- Li Y., Zhang Y., Zhou Y., Li Y., Xu J., Ai Y., et al. An RBD virus-like particle vaccine for SARS-CoV-2 induces cross-variant antibody responses in mice and macaques. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2023; 8(1): 173. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01425-4>
- V'kovski P., Kratzel A., Steiner S., Stalder H., Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat. Rev. Microbiol.* 2021; 19(3): 155–70. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6>
- Jackson C.B., Farzan M., Chen B., Choe H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2022; 23(1): 3–20. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00418-x>
- Hu B., Guo H., Zhou P., Shi Z.L. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat. Rev. Microbiol.* 2021; 19(3): 141–54. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>
- Eggenhuizen P.J., Ng B.H., Chang J., Fell A.L., Cheong R.M.Y., Wong W.Y., et al. BCG vaccine derived peptides induce SARS-CoV-2 T cell cross-reactivity. *Front. Immunol.* 2021; 12: 692729. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.692729>
- Ожмегова Е.Н., Савочкина Т.Е., Прилипов А.Г., Тихомиров Е.Е., Ларичев В.Ф., Сайфуллин М.А. и др. Молекулярно-эпидемиологический анализ геновариантов SARS-CoV-2 на территории Москвы и Московской области. *Вопросы вирусологии*. 2022; 67(6): 496–505. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-146> <https://elibrary.ru/cgiwkw>
- Rambaut A., Holmes E.C., O'Toole Á., Hill V., McCrone J.T., Ruis C., et al. A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 to assist genomic epidemiology. *Nat. Microbiol.* 2020; 5(11): 1403–7. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0770-5>
- Choi S.J., Kim D.U., Noh J.Y., Kim S., Park S.H., Jeong H.W., et al. T cell epitopes in SARS-CoV-2 proteins are substantially conserved in the Omicron variant. *Cell. Mol. Immunol.* 2022; 19(3): 447–8. <https://doi.org/10.1038/s41423-022-00838-5>
- Syed A.M., Ciling A., Taha T.Y., Chen I.P., Khalid M.M., Sree Kumar B., et al. Omicron mutations enhance infectivity and reduce antibody neutralization of SARS-CoV-2 virus-like particles. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2022; 119(31): e2200592119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2200592119>
- Hemmati F., Hemmati-Dinarvand M., Karimzade M., Rutkowska D., Eskandari M.H., Khanizadeh S., et al. Plant-derived VLP: a worthy platform to produce vaccine against SARS-CoV-2. *Bio-technol. Lett.* 2022; 44(1): 45–57. <https://doi.org/10.1007/s10529-021-03211-0>
- Yilmaz I.C., Ipekoglu E.M., Bulbul A., Turay N., Yildirim M., Evcili L., et al. Development and preclinical evaluation of virus-like particle vaccine against COVID-19 infection. *Allergy*. 2022; 77(1): 258–70. <https://doi.org/10.1111/all.15091>
- National Library of Medicine. Study of a severe acute respiratory syndrome CoV-2 (SARS-CoV-2) virus-like particle (VLP) vaccine in healthy adults (COVID-19); 2022. Available at: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04818281>

REFERENCES

- Rappuoli R., Pizza M., Del Giudice G., De Gregorio E. Vaccines, new opportunities for a new society. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2014; 111(34): 12288–93. <https://doi.org/10.1073/pnas.1402981111>
- Omer S.B., Salmon D.A., Orenstein W.A., deHart M.P., Halsey N. Vaccine refusal, mandatory immunization, and the risks of vaccine-preventable diseases. *N. Engl. J. Med.* 2009; 360(19): 1981–8. <https://doi.org/10.1056/NEJMsa0806477>
- Li M., Wang H., Tian L., Pang Z., Yang Q., Huang T., et al. COVID-19 vaccine development: milestones, lessons and prospects. *Signal Transduct. Target Ther.* 2022; 7(1): 146. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00996-y>
- Lou F., Li M., Pang Z., Jiang L., Guan L., Tian L., et al. Understanding the secret of SARS-CoV-2 variants of concern/interest and immune escape. *Front. Immunol.* 2021; 12: 744242. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.744242>

5. Heath P.T., Galiza E.P., Baxter D.N., Boffito M., Browne D., Burns F., et al. Safety and efficacy of NVX-CoV2373 COVID-19 vaccine. *N. Engl. J. Med.* 2021; 385(13): 1172–83. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2107659>
6. Chhibber S., Jain D. Plant-based vaccines to combat COVID-19: strategies, status and prospects. *Purva Mimaansa.* 2022; 13: 25–30.
7. Smit M.J., Sander A.F., Ariaans M.B.P.A., Fougereux C., Heinzl C., Fendel R., et al. First-in-human use of a modular capsid virus-like vaccine platform: an open-label, non-randomised, phase 1 clinical trial of the SARS-CoV-2 vaccine ABNCov2. *Lancet Microbe.* 2023; 4(3): e140–8. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(22\)00337-8](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(22)00337-8)
8. Li Y., Zhang Y., Zhou Y., Li Y., Xu J., Ai Y., et al. An RBD virus-like particle vaccine for SARS-CoV-2 induces cross-variant antibody responses in mice and macaques. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2023; 8(1): 173. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01425-4>
9. V'kovski P., Kratzel A., Steiner S., Stalder H., Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat. Rev. Microbiol.* 2021; 19(3): 155–70. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6>
10. Jackson C.B., Farzan M., Chen B., Choe H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2022; 23(1): 3–20. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00418-x>
11. Hu B., Guo H., Zhou P., Shi Z.L. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat. Rev. Microbiol.* 2021; 19(3): 141–54. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>
12. Eggenhuizen P.J., Ng B.H., Chang J., Fell A.L., Cheong R.M.Y., Wong W.Y., et al. BCG vaccine derived peptides induce SARS-CoV-2 T cell cross-reactivity. *Front. Immunol.* 2021; 12: 692729. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.692729>
13. Ozhmegova E., Savochkina T.E., Prilipov A.G., Tikhomirov E.E., Larichev V.F., Sayfullin M.A., et al. Molecular epidemiological analysis of SARS-CoV-2 genovariants in Moscow and Moscow region. *Voprosy virusologii.* 2022; 67(6): 496–505. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-146> <https://elibrary.ru/ergiwk> (in Russian)
14. Rambaut A., Holmes E.C., O'Toole Á., Hill V., McCrone J.T., Ruis C., et al. A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 to assist genomic epidemiology. *Nat. Microbiol.* 2020; 5(11): 1403–7. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0770-5>
15. Choi S.J., Kim D.U., Noh J.Y., Kim S., Park S.H., Jeong H.W., et al. T cell epitopes in SARS-CoV-2 proteins are substantially conserved in the Omicron variant. *Cell. Mol. Immunol.* 2022; 19(3): 447–8. <https://doi.org/10.1038/s41423-022-00838-5>
16. Syed A.M., Ciling A., Taha T.Y., Chen I.P., Khalid M.M., Sreekumar B., et al. Omicron mutations enhance infectivity and reduce antibody neutralization of SARS-CoV-2 virus-like particles. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2022; 119(31): e2200592119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2200592119>
17. Hemmati F., Hemmati-Dinarvand M., Karimzade M., Rutkowska D., Eskandari M.H., Khanizadeh S., et al. Plant-derived VLP: a worthy platform to produce vaccine against SARS-CoV-2. *Biotechnol. Lett.* 2022; 44(1): 45–57. <https://doi.org/10.1007/s10529-021-03211-0>
18. Yilmaz I.C., Ipekoglu E.M., Bulbul A., Turay N., Yildirim M., Evcili I., et al. Development and preclinical evaluation of virus-like particle vaccine against COVID-19 infection. *Allergy.* 2022; 77(1): 258–70. <https://doi.org/10.1111/all.15091>
19. National Library of Medicine. Study of a severe acute respiratory syndrome CoV-2 (SARS-CoV-2) virus-like particle (VLP) vaccine in healthy adults (COVID-19); 2022. Available at: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04818281>

Информация об авторах:

Латышев Олег Евгеньевич – канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: oleglat80@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-5757-3809>

Зайкова Ольга Николаевна – канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: zaykova_o_n@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-4708-2069>

Елисеева Олеся Васильевна – канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: olesenka80@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-0723-9749>

Савочкина Татьяна Евгеньевна – младший научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: tasavochkina@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0003-4366-8476>

Чернорыж Яна Юрьевна – канд. мед. наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: revengeful_w@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-9848-8515>

Сыроешкин Антон Владимирович – д-р биол. наук, профессор, заведующий кафедрой фармацевтической и токсикологической химии РУДН. E-mail: syroeshkin-av@rudn.ru; <https://orcid.org/0000-0003-3279-7520>

Петров Глеб Владимирович – аспирант 3-го года обучения, ассистент кафедры фармацевтической и токсикологической химии РУДН. E-mail: petrov-gv@rudn.ru; <https://orcid.org/0009-0004-1123-7393>

Воркунова Галина Константиновна – д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: g.k.vorkunova@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0003-1346-3744>

Ларичев Виктор Филиппович – д-р мед. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биологии и индикации арбовирусов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: vlarichev@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-8262-5650>

Федякина Ирина Тимофеевна – канд. биол. наук, заведующая лабораторией экологии вирусов, ведущий научный сотрудник отдела экологии вирусов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: irfed2@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-6421-9632>

Черепушкин Станислав Андреевич – научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: cherepushkin1@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-1734-5369>

Цибезов Валерий Владимирович – канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории средств специфической профилактики вирусных болезней, ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: tsibezov@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0003-2150-5764>

Южакова Ксения Андреевна – научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: chekh-ks@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-3130-5029>

Куликова Надежда Юрьевна – научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: nad007@rambler.ru; <https://orcid.org/0000-0002-3008-3383>

Лебедева Варвара Викторовна – научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: lebedevavv@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-3088-0403>

Якунин Дмитрий Юрьевич – аспирант лаборатории молекулярной диагностики ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: yud364@mail.ru; <https://orcid.org/0009-0009-4531-5739>

Козлова Алина Александровна – канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории биологии и индикации арбовирусов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: mailinkakozlova88@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0003-2749-3258>

Баранец Марина Сергеевна – канд. мед. наук, научный сотрудник лаборатории биологии и индикации арбовирусов ФГБУ «НИЦЭМ

им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: shizotorex@mai.ru; <https://orcid.org/0000-0002-3466-3588>

Юрлов Кирилл Иванович – научный сотрудник лаборатории клеточной инженерии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: kir34292@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-4694-2445>

Леснова Екатерина Ивановна – научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: wolf252006@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-2801-6843>

Гребенникова Татьяна Владимировна [✉] – д-р биол. наук, профессор, чл.-корр. РАН, заместитель директора по научной работе подразделения Института вирусологии им. Д.И. Ивановского, руководитель Испытательного центра ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: t_grebennikova@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-6141-9361>

Участие авторов: Латышев О.Е. – проведение экспериментов, анализ и интерпретация данных, подготовка текста; Зайкова О.Н. – проведение экспериментов, подготовка текста; Елисеева О.В. – концепция и дизайн исследований, анализ и интерпретация данных; Савочкина Т.А. – проведение экспериментов, подготовка текста; Чернорыж Я.В. – проведение экспериментов, анализ и интерпретация данных, подготовка текста; Сыроешкин А.В. – проведение экспериментов; Петров Г.В. – проведение экспериментов; Воркунова Г.К. – проведение экспериментов; Ларичев В.Ф. – проведение экспериментов, анализ и интерпретация данных, подготовка текста; Федакина И.Т. – проведение экспериментов; Черепушкин С.А. – проведение экспериментов, подготовка текста; Цибезов В.В. – проведение экспериментов, подготовка текста; Южакова К.А. – проведение экспериментов; Куликова Н.Ю. – проведение экспериментов; Лебедева В.В. – анализ и интерпретация данных; Якунин Д.Ю. – анализ и интерпретация данных; Козлова А.А. – проведение экспериментов; Юрлов К.И. – проведение экспериментов; Леснова Е.И. – проведение экспериментов, подготовка текста; Гребенникова Т.В. – концепция и дизайн исследования, анализ и интерпретация данных, подготовка текста, одобрение окончательного варианта статьи для публикации.

Поступила 03.02.2024

Принята в печать 02.04.2024

Опубликована 27.04.2024

Information about the authors:

Tatyana V. Grebennikova [✉] – Doctor of Biological Sciences, Professor, Corresponding Member RAS, deputy Director for Science of the Division of the Ivanovsky Virology Institute Head of the Control Center of National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia. E-mail: t_grebennikova@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-6141-9361>

Oleg E. Latyshev – PhD, Senior Scientist, Laboratory of molecular diagnostics, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia. E-mail: oleglat80@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-5757-3809>

Olga N. Zaykova – Researcher at the Laboratory of Molecular Diagnostics, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia. E-mail: zaykova_o_n@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-4708-2069>

Olesya V. Eliseeva – PhD, Senior Scientist, Laboratory of molecular diagnostics, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia. E-mail: olesenka80@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-0723-9749>

Tatyana E. Savochkina – Researcher, Laboratory of Molecular Diagnostics, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia. E-mail: tasavochkina@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0003-4366-8476>

Yana Yu. Chernoryzh – Candidate of Medical Sciences, Researcher, laboratory of molecular diagnostics, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia. E-mail: revengeful_w@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-9848-8515>

Anton V. Syroeshkin – Doctor of Biological Sciences, Professor, Head of the Department of Pharmaceutical and Toxicological chemistry at Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba, Moscow, Russia. E-mail: syroeshkin-av@rudn.ru; <https://orcid.org/0000-0003-3279-7520>

Gleb V. Petrov – 3rd year PhD Student, Assistant at the Department of Pharmaceutical and Toxicological chemistry at Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia. E-mail: petrov-gv@rudn.ru; <https://orcid.org/0009-0004-1123-7393>

Galina K. Vorkunova – Doctor of Biological Sciences, Leading Researcher, Laboratory of Molecular Diagnostics National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia. E-mail: g.k.vorkunova@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0003-1346-3744>

Victor F. Larichev – Doctor of Med. Sci, Leading Researcher, laboratory of biology and indication of arbovirus infections National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia. E-mail: vlarichev@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-8262-5650>

Irina T. Fediakina – PhD, Lead Researcher of laboratory of viral ecology, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia. E-mail: irfed2@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-6421-9632>

Stanislav A. Cherepushkin – Researcher of laboratory of molecular diagnostics, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia. E-mail: cherepushkin1@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-1734-5369>

Valeriy V. Tsibezov – PhD, Leading Researcher of laboratory of specific virus prevention products, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia. E-mail: tsibezov@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0003-2150-5764>

Ksenia A. Yuzhakova – Researcher of laboratory of molecular diagnostics, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia. E-mail: chekh-ks@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-3130-5029>

Nadezhda Yu. Kulikova – Researcher of laboratory of molecular diagnostics, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia. E-mail: nad007@rambler.ru; <https://orcid.org/0000-0002-3008-3383>

Varvara V. Lebedeva – Researcher of laboratory of molecular diagnostics, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia. E-mail: lebedevavv@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-3088-0403>

Dmitriy Yu. Yakunin – Graduate student of laboratory of molecular diagnostics, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia. E-mail: yd364@mail.ru; <https://orcid.org/0009-0009-4531-5739>

Alina A. Kozlova – PhD, researcher, laboratory of biology and indication of arbovirus infections, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia. E-mail: malinkakozlova88@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0003-2749-3258>

Marina S. Baranets – PhD, researcher, laboratory of biology and indication of arbovirus infections, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia. E-mail: shizotorex@mai.ru; <https://orcid.org/0000-0002->

3466-3588

Kirill I. Yurlov – Researcher, laboratory of cellular engineering, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia. E-mail: kir34292@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-4694-2445>

Ekaterina I. Lesnova – Researcher, laboratory of Molecular Diagnostics, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia. E-mail: wolf252006@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-2801-6843>

Tatyana V. Grebennikova – Doctor of Biological Sciences, Professor, Corresponding Member RAS, deputy Director for Science of the Division of the Ivanovsky Virology Institute Head of the Control Center of National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia. E-mail: t_grebennikova@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-6141-9361>

Contribution: Latyshev O.E. – performing the experiments, data analysis and interpretation, text preparation; Zaikova O.N. – performing the experiments, text preparation; Eliseeva O.V. – concept and design of research, data analysis and interpretation; Savochkina T.A. – performing the experiments, text preparation; Chernoryzh Ya.Yu. – performing the experiments, analysis and interpretation data, text preparation; Syroeshkin A.V. – performing the experiments; Petrov G.V. – performing the experiments; Vorkunova G.K. – performing the experiments; Larichev V.F. – performing the experiments, analyzing and interpreting data, preparing text; Fedyakina I.T. – performing the experiments; Cherepushkin S.A. – performing the experiments, preparing text; Tsibezov V.V. – performing the experiments, preparing text; Yuzhakova K.A. – performing the experiments; Kulikova N.Yu. – performing the experiments; Lebedeva V.V. – analysis and interpretation of data; Yakunin D.Yu. – analysis and interpretation of data; Kozlova A.A. – performing the experiments; Yurlov K.I. – performing the experiments; Lesnova E.I. – performing the experiments, preparing text; Grebennikova T.V. – the concept and design of the study, analysis and interpretation of data, preparation of the text, approval of the final version of the article for publication.

Received 06 February 2024
Accepted 02 April 2024
Published 27 April 2024

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

SHORT COMMUNICATIONDOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-220>

© JALIL M.B., MOHAMMED ALI M.N., ALABADI H.L., 2024



Seroprevalence of herpes simplex virus type 1 (Herpesviridae: *Simplexvirus: Human alphaherpesvirus 1*) in smokers

Mays B. Jalil^{1✉}, Mariem N. Mohammed Ali¹, Hadi I. Alabadi²¹Department of Microbiology, College of Medicine, University of Basrah, Basrah, Iraq;²Basrah Health Directorate, Basrah, Iraq**Abstract**

Introduction. Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) is one of the most common human viral infections and has a double-stranded DNA genome belonging to the Herpesviridae family. Smoking is one of the leading causes of disease and premature death worldwide, responsible for the death of up to six million people annually. The purpose of the current study was to determine the seroprevalence of HSV-1 infection among smokers.†

Methods. The search strategy was conducted in the period from December 2022 to January 2023. The study included a random sample of 94 (88 males, and 6 females) healthy participants, aged between ≤ 20 to ≥ 60 years, with 50 participants as the control group. The HSV serological testing consisted of detecting antibodies to HSV-1 IgG with the help of ELISA.

Results. Most participants were university students, consisting of 45.7% males and 5.3% females, followed by employed smokers, consisting of 0.2% males and 1.1% females. The number of females was much lower than that of males reaching 6.4 and 93.6% respectively, due to customs and traditions. The seroprevalence was 24.47, 22.3 and 2.1% in males and females respectively. The seroprevalence rate was 13.8% in hookah and cigarette smokers, 9% in cigarette smokers and 1.1% in hookah smokers exclusively. The highest rate was observed in the age groups of 21–30 and 31–40 years with 12.80% and 7.40% respectively.

Conclusions. The study revealed that the seroprevalence of HSV-1 IgG was 24.47%, and was higher among hookah and cigarette smokers compared to those who exclusively smoked cigarettes or hookah.

Keywords: HSV-1; Herpesviridae; Smoking; Seroprevalence; ELISA

For citation: Jalil M.B., Mohammed Ali M.N., Alabadi H.I. Seroprevalence of herpes simplex virus type 1 (Herpesviridae: *Simplexvirus: Human alphaherpesvirus 1*) in smokers. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2024; 69(2): 187–192. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-220> EDN: <https://elibrary.ru/hcmnwk>

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

Acknowledgement. The researchers like to thank everyone who contributed to the study as well as those who offered assistance.

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

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Microbiology Department, College of Medicine, University of Basrah (Protocol No. 030401-042-2023 dated 25/6/2022).

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-220>

Серопревалентность вируса простого герпеса 1-го типа (Herpesviridae: Simplexvirus: Human alphaherpesvirus 1) у курильщиков

Mays B. Jalil^{1✉}, Mariem N. Mohammed Ali¹, Hadi I. Alabadi²¹Кафедра микробиологии, Медицинский колледж, Университет Басры, Басра, Ирак;²Управление здравоохранения Басры, Басра, Ирак**Резюме**

Введение. Вирус простого герпеса 1-го типа (ВПГ-1) – один из самых распространенных вирусных агентов, инфицирующих человека, имеет геном с двухцепочечной ДНК и относится к семейству *Herpesviridae*. Курение – одна из основных причин заболеваний и преждевременной смерти во всем мире, от которой ежегодно умирает до 6 млн человек.

Цель настоящего исследования – определение серопревалентности ВПГ-1 среди курильщиков.

Методы. Исследование проводили в период с декабря 2022 г. по январь 2023 г. В исследование была включена случайная выборка из 94 (88 мужчин и 6 женщин) здоровых лиц в возрасте от 20 до 60 лет, 50 участников составили контрольную группу. Серологическое тестирование на ВПГ заключалось в выявлении антител к ВПГ-1 класса IgG с помощью ИФА.

Результаты. Большинство участников были студентами университета – 45,7% мужчин и 5,3% женщин, за ними следовали работающие курильщики – 0,2% мужчин и 1,1% женщин. Число женщин было значительно меньше, чем мужчин, и составило 6,4 и 93,6% соответственно, что объясняется обычаями и традициями. Серопревалентность составила 24,47, 22,3 и 2,1% среди мужчин и женщин соответственно. Уровень серопревалентности составил 13,8% среди курильщиков кальяна и сигарет, 9% исключительно среди курильщиков сигарет и 1,1% исключительно среди курильщиков кальяна. Наибольший уровень выявляемости антител наблюдался в возрастных группах 21–30 и 31–40 лет – 12,80 и 7,40% соответственно.

Заключение. Исследование показало, что серопревалентность ВПГ-1 IgG составила 24,47% и была выше среди курильщиков кальяна и сигарет по сравнению с теми, кто курил исключительно сигареты или кальян.

Ключевые слова: ВПГ-1; *Herpesviridae*; курение; серопревалентность; ИФА

Для цитирования: Jalil M.B., Mohammed Ali M.N., Alabadi H.I. Серопревалентность вируса простого герпеса 1-го типа (Herpesviridae: Simplexvirus: Human alphaherpesvirus 1) у курильщиков. *Вопросы вирусологии*. 2024; 69(2): 187–192. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-220> EDN: <https://elibrary.ru/hcmnwk>

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

Благодарность. Авторы благодарят всех, кто внес свой вклад в исследование, а также тех, кто предложил помощь.

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

Этическое утверждение. Авторы подтверждают, что добровольное информированное согласие было получено от всех участников исследования. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом отдела микробиологии, Медицинский колледж, Университет Басры (Протокол № 030401-042-2023 от 25.06.2022)

Introduction

Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) is a worldwide infection [1]. HSV-1 is one of the most common human viral pathogens and has a double-stranded DNA genome belonging to the Herpesviridae family [2–4]. The virus, which can cause lifelong infection, is mainly transmitted orally, through direct contact with body fluids and through contact with an infected individual [5, 6]. There are three subfamilies of herpesviruses: alpha, beta, and gamma. HSV-1 is classified as part of the *Alphaherpesvirinae* subfamily [7–9].

The virus can infect people of all ages and cause persistent and recurrent infections [10, 11]. The first instance of HSV-1 infection appears as febrile vesicles on facial skin, which are called herpes labials or fever blisters, and also

commonly known as cold sores on the lips [4, 12]. HSV-1 infection acquisition typically takes place in childhood, well before sexual debut, and is made more likely by close contact with parents, other family members and classmates [6, 13]. Many diseases are caused by HSV-1 infection, however, oral herpes is the most prevalent clinical presentation [5, 6, 13]. A number of studies in many countries have indicated that HSV-1 is mostly contracted through the genitals, rather than through the mouth and it has also been observed that a large number of young people are exposed to the virus for the first time through oral sex [6, 14–22].

Although there is possibly a link between smoking cigarettes and herpes virus infection, it is especially concerning in people who smoke cigarettes more frequent-

ly. Smoking is one of the leading causes of disease and premature death worldwide, responsible for the death of up to six million people annually. The World Health Organization (WHO) released statistics showing that by 2030, there will be as many as eight million deaths [23]. According to previous studies, there are 700 million smokers in developing nations overall. In total, 6 trillion cigarettes are smoked annually around the world, with men accounting for 47% of smokers and women for 12% [24]. The purpose of the current study was to determine the seroprevalence of HSV-1 infection among smokers.

Methods

Study design and serological testing

The study was designed to assess the seroprevalence of HSV-1 IgG in smokers. The survey population is a random sample of individuals who participated. The

search strategy was conducted in the period from December 2022 to January 2023. The study included a random sample of 94 (88 males, 6 females) healthy participants, aged between ≤ 20 to ≥ 60 years, with 50 participants as the control group. The HSV serological testing was conducted on five milliliters of venous blood specimens that were drawn from each individual participating for the detection of IgG antibodies to HSV-1. Laboratory procedures involved centrifuging serum samples at 5000 RPM for five minutes at 4 °C and the serum was stored in Eppendorf tubes and maintained deeply frozen at -20 °C until testing [25]. The HerpeSelect 1 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) commercial kit (SunLong Biotech Co., LTD.) was used to conduct HSV-1 serology testing according to the manufacturer’s instructions.

Ethical approval and informed consent

Before collecting samples, Informed consent was obtained from all individuals and a survey was conducted to collect information on the type, duration and chronic diseases of smoking, as well as occupation. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Microbiology Department, College of Medicine, University of Basrah (Protocol No. 030401-042-2023 dated 25/6/2022).

Statistical analyses

Microsoft Excel 2013 was used to store the information collected through the survey results. A normal distribution test was performed on quantitative variables, which were then given as means of standard deviation (SD). Qualitative variables were displayed as percentages. Data were analyzed through Version 26 of the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS Inc.) software. The Chi-square test (χ^2 -test) was applied to determine the statistical significance of the data difference. Statistical significance is set at $p < 0.05$.

Results

Table 1 provides a breakdown of the demographic characteristics of participants in the study and is divided into two sections (gender and age group). The ages of the participants ranged between ≤ 20 and ≥ 60 years and were distributed into six categories. The overall average age of participants was 25 ± 13.57 years while the average age of healthy participants was 25 ± 13.15 years. There were 94 participants, with 93.6% (88) being males and 6.4% (6) being females, as well as healthy participants with 94% (47) and 6% (3) males and females respectively. The age group of 21 to 30 years of age had the highest participation rate (50%) of smokers in this study. Most participants were university students 45.7% of which were males and 5.3% – females, followed by employed smokers, consisting of 0.2% males and 1.1% females. The number of females was much lower than that of males reaching 6.4% and 93.6% respectively, due to customs and traditions (Table 1).

Among the 94 selected samples, the seroprevalence for HSV-1 was 24.47, 22.3 and 2.1% in males and females respectively. The seroprevalence rate was 13.8% in

Table 1. Demographic characteristics of the individuals who participated in this study

Age Group (years) Возрастная группа (годы)	Gender Пол		Total Всего (%)
	male мужской (%)	female женский (%)	
≤ 20	8.5	1.1	9.6
21–30	47.9	2.1	50.0
31–40	13.8	2.1	16.0
41–50	9.6	1.1	10.6
51–60	4.3	0.0	4.3
>60	9.6	0.0	9.6
Total Всего	93.6	6.4	100.0
Occupation Профессия			
Employed Работающий	20.2	1.1	21.28
Student Студент	45.7	5.3	51.06
Unemployed Безработный	19.1	0.0	19.15
Retired Пенсионер	8.5	0.0	8.51
Total Всего	93.62	6.38	100.00
No. positive of HSV-1 Число положительных по ВПГ-1, %	22.3	2.1	24.47
Mean \pm SD Среднее \pm SD		25 \pm 13.57	
p-value значение p		0.5	

Note. SD – Standard deviation.

Примечание. SD – стандартное отклонение.

hookah and cigarette smokers, 9% in cigarette smokers and 1.1% in hookah smokers exclusively (**Figure 1**), and was a highest rate in the age groups 21–30 and 31–40 years with 12.80% and 7.40% respectively (**Figure 2**).

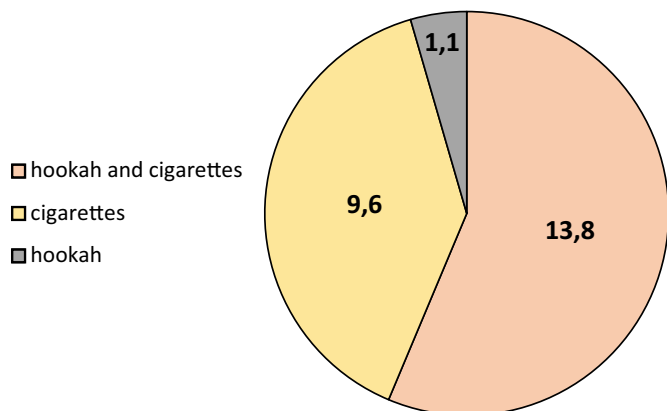


Fig. 1. Distribution of study participants according to the type of smoking.

Рис. 1. Распределение участников исследования по типу курения.

According to gender, a sizable fraction of hookah and cigarette smokers took part in this survey, where a rate of males 32.98% and females 1.06%. The percentage of cigarette smokers was 40.43% among males and 1.06% among females. The percentage for hookah and vape users among males was 3.19% and 1.06% among females. Hookah users among males and females were 14.89% and 3.19% respectively. and for Vape, hookah, and cigarette users was 1.06 % for males and females (**Figure 3**).

Discussion

Herpes simplex virus type 1 infection is lifelong and it is typically contracted orally and during childhood [13]. The infection can cause serious illness, including severe problems with the nervous system, the eye and the mucous membranes, even though it is almost always mild or asymptomatic [5, 13]. Given that cigarette smoking is one of the most significant possible causes of disrupting the immune system’s function by altering various immunological pathways, there is a close correlation between herpesvirus infection and host immune system response of smokers [26]. However, the effect of smoking on the

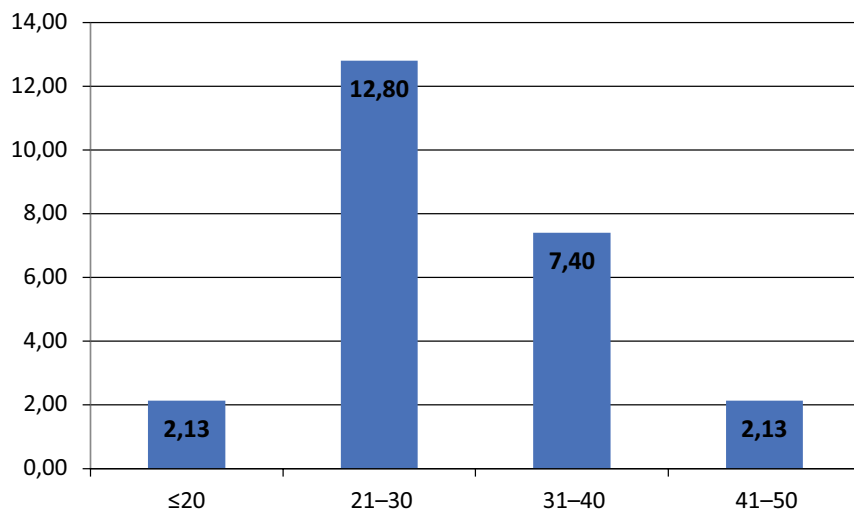


Fig. 2. Distribution of study participants according to the age groups.

Рис. 2. Распределение участников исследования по возрастным группам.

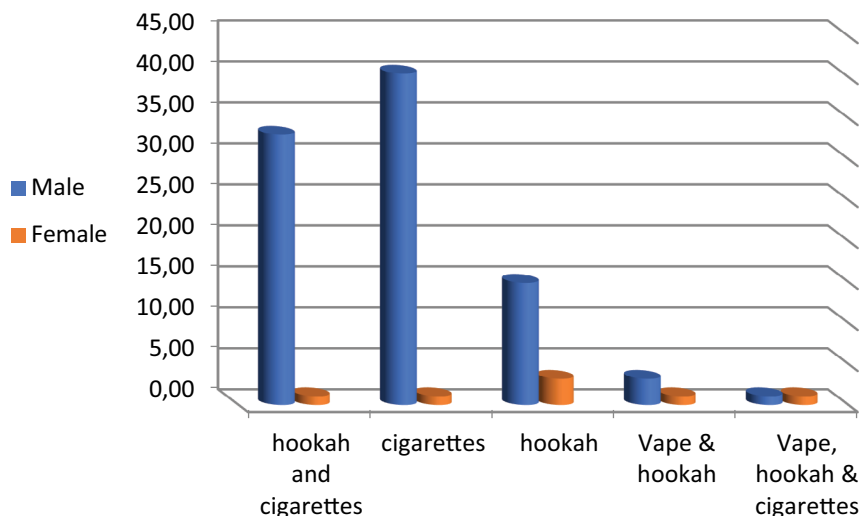


Fig. 3. Distribution of study participants according to gender.

Рис. 3. Распределение участников исследования по полу.

rate of infection with the herpes virus has not been investigated in many studies.

The findings of the current study differed from those of earlier studies on various demographic groups carried out in various countries. The study showed that there is a paucity of research on the seroprevalence of HSV-1 infection in Iraq. The study found that the seroprevalence was 24.47% for HSV-1, 22.3 and 2.1% for males and females respectively. The HSV-1 seroprevalence rate was 13.8% in hookah and cigarette smokers, 9% in cigarette smokers and 1.1% in hookah smokers exclusively. The highest seroprevalence rate of HSV-1 IgG was in the age groups 21–30 and 31–40 years amounting to 12.80 and 7.40% respectively. Urban studies of females in Uganda and Nigeria revealed high prevalence of HSV-1 infection at 98% and 96.6% respectively [27, 28]. According to the findings of previous studies, the prevalence rates of HSV-1 in the US, Canada and Northern Europe were 58, 51 and 57.7% respectively [29, 30]. When a population-based survey (NHANES III) was carried out from 1988 to 1994, it revealed the prevalence rate of HSV-2 infection in France and the United States amounting to 17.2 and 21.9% respectively [31]. HSV-1 was 68% prevalent globally in 2012, according to the WHO, with Africa having the highest frequency at 87% of the virus [3]. Debrah et al.'s study of women revealed that 99.2% of them had HSV-1 infection, which is a very high prevalence [32]. Adults in Europe have a seroprevalence of 20 to 100% for HSV-1. The average seroprevalence of HSV-1 in Western Europe, Southern Europe, Eastern Europe and Turkey, according to a study conducted in European subregions/countries, was 66.1, 77.2, 78.7 and 87.9%, respectively [30]. According to a previous study, approximately 80% of Australians have the HSV-1 virus, compared to lower prevalence rates in Western nations like Europe (74%), as well as higher prevalence rates in Asia [33], Latin America and the Caribbean [29], Africa [34], the Middle East and North Africa [35], as well as Asia [33], Latin America and the Caribbean [29].

Due to the fact that herpes infection can spread silently across the population and can have serious consequences as a result of the infection development and the emergence of its complications, it is important to increase awareness of these illnesses among the general public. In the current study, University students made up the majority of participants, followed by employees, and more men than women participated because the parents of female university students were unaware that they smoked, which was another factor in why they chose not to participate. The study revealed that the seroprevalence of HSV-1 IgG was higher among hookah and cigarette smokers compared to those who smoked cigarettes or hookah exclusively. Numerous factors, including the geographic location, the number of samples and the inspection process, may be responsible for the virus spreading at this rate in comparison to other nations.

Conclusions

In the current study, the seroprevalence for HSV-1 IgG was 24.47%. University students made up the majority

of participants, followed by employed individuals. More men than women participated because the parents of female university students were unaware that they smoked, which was another reason why they chose not to participate. The study revealed that the seroprevalence of HSV-1 IgG was higher among hookah and cigarette smokers compared to those who smoke cigarettes or hookah exclusively.

Acknowledgments

The researchers would like to thank everyone who contributed to the study as well as those who offered assistance.

REFERENCES

- Kasubi M.J., Nilsen A., Marsden H.S., Bergström T., Langeland N., Haarr L. Prevalence of antibodies against herpes simplex virus types 1 and 2 in children and young people in an urban region in Tanzania. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44(8): 2801–7. <https://doi.org/10.1128/jcm.00180-06>
- Arvin A., Campadelli-Fiume G., Mocarski E., Moore P.S., Roizman B., Whitley R., et al. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge: Cambridge University Press; 2007.
- Looker K.J., Magaret A.S., May M.T., Turner K.M., Vickerman P., Gottlieb S.L., et al. Global and regional estimates of prevalent and incident herpes simplex virus type 1 infections in 2012. *PLoS One.* 2015; 10(10): e0140765. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140765>
- Crimi S., Fiorillo L., Bianchi A., D'Amico C., Amoroso G., Gorassini F., et al. Herpes virus, oral clinical signs and QoL: systematic review of recent data. *Viruses.* 2019; 11(5): 463. <https://doi.org/10.3390/v11050463>
- Brady R.C., Bernstein D.I. Treatment of herpes simplex virus infections. *Antiviral Res.* 2004; 61(2): 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2003.09.006>
- Bernstein D.I., Bellamy A.R., Hook E.W. 3rd, Levin M.J., Wald A., Ewell M.G., et al. Epidemiology, clinical presentation, and antibody response to primary infection with herpes simplex virus type 1 and type 2 in young women. *Clin. Infect. Dis.* 2013; 56(3): 344–51. <https://doi.org/10.1093/cid/cis891>
- Albà M.M., Das R., Orengo C.A., Kellam P. Genomewide function conservation and phylogeny in the Herpesviridae. *Genome Res.* 2001; 11(1): 43–54. <https://doi.org/10.1101/gr.149801>
- Davison A.J. Herpesvirus systematics. *Vet. Microbiol.* 2010; 143(1): 52–69. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.02.014>
- Zmasek C.M., Knipe D.M., Pellett P.E., Scheuermann R.H. Classification of human Herpesviridae proteins using Domain-architecture Aware Inference of Orthologs (DAIO). *Virology.* 2019; 529: 29–42. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.01.005>
- Looker K.J., Garnett G.P. A systematic review of the epidemiology and interaction of herpes simplex virus types 1 and 2. *Sex. Transm. Infect.* 2005; 81(2): 103–7. <https://doi.org/10.1136/sti.2004.012039>
- Mark H.D., Nanda J.P., Roberts J., Rompalo A., Melendez J.H., Zenilman J. Performance of focus ELISA tests for HSV-1 and HSV-2 antibodies among university students with no history of genital herpes. *Sex. Transm. Dis.* 2007; 34(9): 681–5. <https://doi.org/10.1097/01.olq.0000258307.18831.f0>
- Leung A.K.C., Barankin B. Herpes labialis: an update. *Recent Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov.* 2017; 11(2): 107–13. <https://doi.org/10.2174/1872213x11666171003151717>
- Fatahzadeh M., Schwartz R.A. Human herpes simplex virus infections: epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2007; 57(5): 737–63; quiz 764–6. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2007.06.027>
- Vyse A.J., Gay N.J., Slomka M.J., Gopal R., Gibbs T., Morgan-Capner P., et al. The burden of infection with HSV-1 and HSV-2 in England and Wales: implications for the changing epidemiology of genital herpes. *Sex. Transm. Infect.* 2000; 76(3): 183–7. <https://doi.org/10.1136/sti.76.3.183>

15. Wutzler P., Doerr H.W., Färber I., Eichhorn U., Helbig B., Sauerbrei A., et al. Seroprevalence of herpes simplex virus type 1 and type 2 in selected German populations-relevance for the incidence of genital herpes. *J. Med. Virol.* 2000; 61(2): 201–7. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9071\(200006\)61:2%3C201::aid-jmv5%3E3.0.co;2-p](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9071(200006)61:2%3C201::aid-jmv5%3E3.0.co;2-p)
16. Aarnisalo J., Ilonen J., Vainionpää R., Volanen I., Kaitosaari T., Simell O. Development of antibodies against cytomegalovirus, varicella-zoster virus and herpes simplex virus in Finland during the first eight years of life: a prospective study. *Scand. J. Infect. Dis.* 2003; 35(10): 750–3. <https://doi.org/10.1080/00365540310015881>
17. Roberts C.M., Pfister J.R., Spear S.J. Increasing proportion of herpes simplex virus type 1 as a cause of genital herpes infection in college students. *Sex. Transm. Dis.* 2003; 30(10): 797–800. <https://doi.org/10.1097/01.olq.0000092387.58746.c7>
18. Pebody R.G., Andrews N., Brown D., Gopal R., De Melker H., François G., et al. The seroepidemiology of herpes simplex virus type 1 and 2 in Europe. *Sex. Transm. Infect.* 2004; 80(3): 185–91. <https://doi.org/10.1136/sti.2003.005850>
19. Xu F., Lee F.K., Morrow R.A., Sternberg M.R., Luther K.E., Dubin G., et al. Seroprevalence of herpes simplex virus type 1 in children in the United States. *J. Pediatr.* 2007; 151(4): 374–7. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2007.04.065>
20. Kramer M.A., Uitenbroek D.G., Ujcic-Voortman J.K., Pfrommer C., Spaargaren J., Coutinho R.A., et al. Ethnic differences in HSV1 and HSV2 seroprevalence in Amsterdam, the Netherlands. *Euro Surveill.* 2008; 13(24): 18904.
21. Sauerbrei A., Schmitt S., Scheper T., Brandstädt A., Saschenbrecker S., Motz M., et al. Seroprevalence of herpes simplex virus type 1 and type 2 in Thuringia, Germany, 1999 to 2006. *Euro Surveill.* 2011; 16(44): 20005.
22. Ayoub H.H., Chemaitelly H., Abu-Raddad L.J. Characterizing the transitioning epidemiology of herpes simplex virus type 1 in the USA: model-based predictions. *BMC Med.* 2019; 17(1): 57. <https://doi.org/10.1186/s12916-019-1285-x>
23. WHO. WHO Report on the Global Tobacco Epidemic, 2011: warning about the dangers of tobacco. Geneva; 2011.
24. WHO. WHO Report on the Global Tobacco Epidemic, 2008: the MPOWER package. Geneva; 2008.
25. Naame Z.K., Thuwaini M.M., Mahdi D.S. Seroprevalence of (Toxoplasma gondii, CMV, Rubella and HSV1&2) in aborted women in Basra, Southern of Iraq. *Ann. Trop. Med. Public Health.* 2021; 24(5): 295–301.
26. Ohana B., Lipson M., Vered N., Srugo I., Ahdut M., Morag A. Novel approach for specific detection of herpes simplex virus type 1 and 2 antibodies and immunoglobulin G and M antibodies. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2000; 7(6): 904–8. <https://doi.org/10.1128/cdli.7.6.904-908.2000>
27. Nakku-Joloba E., Kambugu F., Wasubire J., Kimeze J., Salata R., Albert J.M., et al. Sero-prevalence of herpes simplex type 2 virus (HSV-2) and HIV infection in Kampala, Uganda. *Afr. Health Sci.* 2014; 14(4): 782–9. <https://doi.org/10.4314/ahs.v14i4.2>
28. Kalu E. Seroprevalence of herpes simplex virus infections among pregnant women attending antenatal clinic in Benin, Nigeria. *Int. J. Trop. Dis. Health.* 2014; 4(1): 70–81. <https://doi.org/10.9734/IJTDH/2014/6048>
29. Sukik L., Alyafei M., Harfouche M., Abu-Raddad L.J. Herpes simplex virus type 1 epidemiology in Latin America and the Caribbean: Systematic review and meta-analytic. *PLoS One.* 2019; 14(4): e0215487. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215487>
30. Yousuf W., Ibrahim H., Harfouche M., Abu Hijleh F., Abu-Raddad L. Herpes simplex virus type 1 in Europe: systematic review, meta-analyses and meta-regressions. *BMJ Glob. Health.* 2020; 5(7): e002388. <https://doi.org/10.1136/bmjgh-2020-002388>
31. Fleming D.T., McQuillan G.M., Johnson R.E., Nahmias A.J., Aral S.O., Lee F.K., et al. Herpes simplex virus type 2 in the United States, 1976 to 1994. *N. Engl. J. Med.* 1997; 337(16): 1105–11. <https://doi.org/10.1056/nejm199710163371601>
32. Debrah O., Agyemang-Yeboah F., Asmah R.H., Timmy-Donkoh E., Seini M.M., Fondjo L.A., et al. SERO-prevalence of herpes simplex virus type 1 and type 2 among women attending routine Cervicare clinics in Ghana. *BMC Infect. Dis.* 2018; 18(1): 378. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3288-1>
33. Khadr L., Harfouche M., Omori R., Schwarzer G., Chemaitelly H., Abu-Raddad L.J. The epidemiology of herpes simplex virus type 1 in Asia: systematic review, meta-analyses, and meta-regressions. *Clin. Infect. Dis.* 2019; 68(5): 757–72. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy562>
34. Harfouche M., Chemaitelly H., Abu-Raddad L.J. Herpes simplex virus type 1 epidemiology in Africa: Systematic review, meta-analyses, and meta-regressions. *J. Infect.* 2019; 79(4): 289–99. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2019.07.012>
35. Chaabane S., Harfouche M., Chemaitelly H., Schwarzer G., Abu-Raddad L.J. Herpes simplex virus type 1 epidemiology in the Middle East and North Africa: systematic review, meta-analyses, and meta-regressions. *Sci. Rep.* 2019; 9(1): 1136. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37833-8>

Information about the authors:

Mays B. Jalil [✉] – Assistant Professor, Principle investigator, Department of Microbiology, College of Medicine, University of Basrah, Basrah, Iraq. E-mail: mays.basil@uobasrah.edu.iq; medicalresearch20@yahoo.com; <https://orcid.org/0000-0002-4799-0879>

Mariem N. Mohammed Ali – Assistant lecturer, Investigator, Department of Microbiology, College of Medicine, University of Basrah, Basrah, Iraq. E-mail: mariem.nbeel@uobasrah.edu.iq; <https://orcid.org/0000-0002-0396-8861>

Hadi I. Alabadi – Physician, Researcher, Basrah Health Directorate, Basrah, Iraq. E-mail: drhadilazim345@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0003-7884-1224>

Contribution: Jalil M.B. – Conceptualization; Investigation; Resources; Data Curation; Writing of the Original Draft, software, supervisor; Mohammed Ali M.N. – Conceptualization; Investigation; Writing of the Original Draft, software; Alabadi H.I. – Conceptualization; Data Curation; Writing of the Original Draft, software.

Received 19 December 2023

Accepted 21 February 2024

Published 27 April 2024

Информация об авторах

Mays B. Jalil [✉] – доцент, главный исследователь, кафедра микробиологии, Медицинский колледж, Университет Басры, Басра, Ирак. E-mail: mays.basil@uobasrah.edu.iq; medicalresearch20@yahoo.com; <https://orcid.org/0000-0002-4799-0879>

Mariem N. Mohammed Ali – ассистент преподавателя, исследователь, кафедра микробиологии, Медицинский колледж, Университет Басры, Басра, Ирак. E-mail: mariem.nbeel@uobasrah.edu.iq; <https://orcid.org/0000-0002-0396-8861>

Hadi I. Alabadi – врач, научный сотрудник, Управление здравоохранения Басры, Басра, Ирак. E-mail: drhadilazim345@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0003-7884-1224>

Участие авторов: Jalil M.B. – концептуализация; исследование; ресурсы; кураторство данных; написание первоначального проекта, работа с программным обеспечением, руководитель; Mohammed Ali M.N. – концептуализация; исследование; написание первоначального проекта, работа с программным обеспечением; Alabadi H.I. – концептуализация; обработка данных; написание первоначального проекта, работа с программным обеспечением.

Поступила 19.12.2023

Принята 21.02.2024

Опубликована 27.04.2024

ЮБИЛЕИ



Выдающийся деятель отечественного здравоохранения и медицинской науки XX века Виктор Михайлович Жданов

«Кто не помнит истории,
тот не имеет будущего»
Вольтер



Виктор Михайлович Жданов, 13.02.1914–14.07.1987

13 февраля мы отдаём дань памяти и глубочайшего уважения великому гражданину XX века академику АМН СССР Виктору Михайловичу Жданову — выдающемуся деятелю отечественного здравоохранения, известному во всём мире учёному, вирусологу, эпидемиологу, талантливому организатору санитарно-эпидемиологической службы СССР, медицинской и вирусологической науки, директору Института вирусологии им. Д.И. Ивановского АМН СССР на протяжении 26 лет.

37 лет мы живём без В.М. Жданова. Время позволяет глубже осмыслить прошедшие события, оценить по достоинству заслуги и поступки людей, оставляет в памяти наиболее яркие впечатления и воспоминания. Чем ярче, талантливей, демократичней личность, тем полнее удастся оценить масштабы его вклада в мировую науку. Вспоминая, мы молодеем вместе с ним, пытаемся понять «феномен В.М. Жданова»

С 1950 по 1960 г. В.М. Жданов (ему 36–46 лет) возглавлял санитарно-эпидемиологическую службу СССР сначала как начальник Главного противоэпидемического Управления СССР, а затем (1955–1960 гг.) как заместитель Министра здравоохранения СССР и Главный государственный санитарный инспек-

тор страны. В.М. Жданов внёс существенный вклад в организацию санитарно-эпидемиологической службы в нашей стране. В эти годы по его инициативе в структуре санитарно-противоэпидемических станций страны были созданы вирусологические подразделения, что значительно повлияло на оперативное осуществление мер специфической и неспецифической профилактики инфекционных заболеваний человека в масштабах всей страны.

В.М. Жданов внёс весомый вклад в совершенствование и развитие структуры санитарно-профилактической и карантинной службы в погранвойсках Сибири (Новокузнецк, Чита), а затем в Туркестанском округе (Ашхабад, 1936–1945 гг.). Сегодня его по праву считают одним из основоположников государственной санитарно-эпидемиологической службы в погранвойсках. Заслуги В.М. Жданова были отмечены орденом Красной Звезды (1945) и Знаком «Почётный пограничник СССР» (1984).

В.М. Жданов научно обосновал возможность ликвидации натуральной оспы во всём мире. По поручению Правительства СССР программа эрадикации оспы была представлена руководителем советской делегации В.М. Ждановым на XI Всемирной Ассамблее здравоохранения (1958 г.). После сложной дискуссии Программа была принята как предложение СССР. Наша страна безвозмездно выделила 25 млн доз противооспенной вакцины. Осуществление глобальной программы позволило спасти от оспы около 200 млн человек во всём мире.

В 1958 г. Жданов был избран членом Исполкома ВОЗ и неоднократно выезжал в инспекционные поездки в страны Азии и Африки с высокими показателями эндемической заболеваемости натуральной оспой. Ликвидация натуральной оспы во всем мире сегодня расценивается как выдающееся достижение человечества XX в., сравнимое с выходом человека в космос и исследованиями в области ядерной энергетики. За выдающиеся заслуги в деле ликвидации оспы во всём мире он был награждён орденом Бифуркационной Иглы и Почётной грамотой Всемирной организации здравоохранения (1987), а в 2020 г. удостоен именной Премии «Life for Future Award» («Жизнь для будущего»), США.

В.М. Жданов был избран членом-корреспондентом АМН СССР в 1950 г. (ему 36 лет), а в 1961 г. — дей-

ствительным членом АМН СССР (47 лет). Он был самым молодым членом АМН СССР.

В 1956 г. В.М. Жданов создал журнал «Вопросы вирусологии» и был его главным научным редактором на протяжении 31 года. Журнал вскоре стал рупором научных достижений и даже переводился на английский язык.

В 1956–1987 гг. В.М. Жданов являлся председателем Всесоюзного общества эпидемиологов, микробиологов, паразитологов и инфекционистов.

В 1960–1963 гг. В.М. Жданов был Главным учёным секретарем АМН СССР; с 1961 по 1987 г. — директором Института вирусологии им. Д.И. Ивановского.

«Звездными часами» назвал Стефан Цвейг переломные моменты в истории государств и великих личностей. Определяющую роль академика В.М. Жданова в развитии отечественной молекулярной вирусологии и создании современного Института вирусологии можно сравнить со звездными часами. Один иностранный ученый так охарактеризовал наш Институт: «Здесь очень высокая концентрация интеллекта на единицу площади».

«Жданов был сильной фигурой. Будучи директором Института вирусологии им. Ивановского с 1961 г., он одним из первых советских учёных занялся проблемами молекулярной биологии вирусов и одним из первых обратил внимание общественности на проблему СПИД. Жданов ушёл из жизни, полный научных планов», — так оценила мировая научная общественность вклад Жданова в развитие исследований в области вирусологии.

Проблема классификации и эволюции вирусов, к которой В.М. Жданов неоднократно обращался в течение жизни, признаётся как одна из его важнейших заслуг. С 1956 г. Виктор Михайлович (после публикации его монографии «Заразные болезни человека. Систематика и эволюция», 1953 г.) — пожизненный член Международного комитета по классификации и таксономии вирусов.

Талант В.М. Жданова — крупного теоретика биологии и медицины — прекрасно проявился в его 32 научных книгах и монографиях, в том числе 7 изданных за рубежом. Всего им написаны более 1500 научных

работ. В.М. Жданов создал в Институте вирусологии им. Д.И. Ивановского школу генно-инженерных исследований и внёс значительный вклад в изучение молекулярных основ репродукции вирусов, в исследовании новых и возвращающихся инфекций, механизмов острых и хронических вирусных инфекций, вирусных гепатитов, гриппа, онкорнавирусов, герпетических инфекций, ВИЧ-инфекции и других социально значимых заболеваний человека. Под его руководством подготовлены более 78 докторских и кандидатских диссертаций.

Хорошо понимая роль фундаментальных исследований в разработке рациональных подходов к профилактике и лечению ВИЧ-инфекции, В.М. Жданов всемерно развивал и поддерживал теоретические направления в изучении ВИЧ, создал в Институте вирусологии Центр ВОЗ по изучению ВИЧ/СПИД и значительно расширил и укрепил международные научные связи с учёными Франции, Германии, Швеции и США.

В.М. Жданов — Лауреат премии Совета Министров СССР, премии Президиума АМН СССР им. Д.И. Ивановского и премии им. В.Д. Тимакова. В.М. Жданов — автор трёх научных открытий, утверждённых Государственным комитетом по делам открытий и изобретений СССР.

Правительство СССР высоко оценило заслуги В.М. Жданова в области фундаментальных и прикладных исследований, наградив его орденом В.И. Ленина (1984), двумя орденами Октябрьской Революции (1971, 1976), двумя орденами Трудового Красного Знамени (1961, 1966), орденом Красной Звезды (1945) и многими медалями.

В.М. Жданов был личностью чрезвычайно яркой, многогранной, богато одарённой природой, обладал выдающимся даром научного предвидения и огромной работоспособностью, ясным и чётким умом и феноменальной памятью, блестящими организаторскими способностями, неукротимой волей и необычайной жадностью жизни, оставаясь при этом скромным человеком. При анализе научного наследия В.М. Жданова начинаешь понимать, что сделанного им хватило бы на несколько жизней обычного человека.

*Л.В. Урываев,
д.м.н., проф., член-корреспондент РАН*

Problems
of Virology

Voprosy
Virusologii